

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALETHÉIA DOS SANTOS FURUSHO

**ESTUDO QUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PARTES AÉREAS DE *Myrceugenia acutiflora*  
(Kiaersk.) D. Legrand & Kausel, MYRTACEAE**

CURITIBA

2018

ALETHÉIA DOS SANTOS FURUSHO

**ESTUDO QUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PARTES AÉREAS DE *Myrceugenia acutiflora*  
(Kiaersk.) D. Legrand & Kausel, MYRTACEAE**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2018

Furusho, Alethéia dos Santos

Estudo químico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes e atividades biológicas de partes aéreas de *Myrceugenia acutiflora* (Kiaersk.) D. Legrand&Kausel, Myrtaceae / Alethéia dos Santos Furusho – Curitiba, 2018.

92 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallami Miguel

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Myrtaceae. 2. *Myrceugenia acutiflora*. 3. Óleos essenciais. 4. Ácido elágico. I. Miguel, Marilis Dallami. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.42



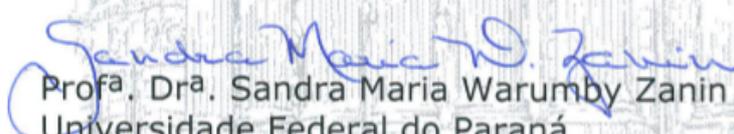
## TERMO DE APROVAÇÃO

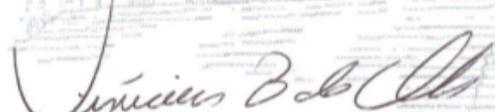
### Alethéia Dos Santos Furusho

Título: "Estudo químico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes e atividades biológicas de partes aéreas de *Myrceugenia acutiflora* (Kiaersk) D. Legrand & Kausel, Myrtaceae"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Orientadora

  
Profª. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Vinícius Bednarczuk de Oliveira  
Centro Universitário Campos Andrade

Curitiba, 27 de fevereiro de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por sempre apoiarem minhas escolhas.

Ao Anthuan Baraquetti, incentivador dos meus estudos, companheiro de todas as horas.

À professora Marilis Dallarmi Miguel e o professor Obdulio Gomes Miguel, pela oportunidade e paciência durante este mestrado.

Ao Ollyver Maurício Rech Bizarro, por ir comigo inúmeras vezes ao Capão do Cifloma coletar material vegetal para o desenvolvimento deste trabalho.

À Natasha Tiemi Fabri e Gustavo Rezende Bellei de Oliveira, pelos debates e críticas construtivas.

À Mariana Cardoso Oshiro, pela parceria nas fotografias de MEV e RMN.

À Katlin Rech, pela elucidação do composto identificado nesta dissertação.

Aos amigos Fernando César Fernandes, Yoháns Martinez, Filipe Horst pela convivência no laboratório de Fitoquímica.

Ao Vinícius Bednarczuk de Oliveira e Maria da Graça Teixeira Toledo pelos conselhos, sugestões e análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Ao técnico Paulo Sérgio Diniz, pelo auxílio na trituração do material vegetal.

À Andressa Veiga pela realização dos testes microbiológicos.

À Vanessa Bobek pela morfoanatomia e testes histoquímicos de partes aéreas da planta.

Ao Harli Pasquini Netto e Bruno Rodrigo Minozzo, pela realização de alguns ensaios de atividade antioxidante, realizados no Laboratório de Análises Moleculares e Bioquímicas, na UEPG.

Ao professor Francisco e a aluna de doutorado Meira do Departamento de Química, pela análise de CG-MS do óleo essencial.

Aos professores Clóvis e Théo pela análise de CG-MS do óleo essencial, realizada na Univali.

À Grazielli da Rocha do Departamento de Química pelos espectros de infravermelho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do material vegetal.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

*Myrceugenia acutiflora* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel, Myrtaceae, é uma espécie nativa da América do Sul e endêmica no Sul e Sudeste do Brasil. Está representada por árvores e arbustos de 2 a 12 metros de altura que florescem de janeiro a março e frutificam nos meses de julho e agosto. Até o momento não foram descritos estudos químicos e farmacognósticos da espécie. Este trabalho teve como objetivos analisar a morfoanatomia e histoquímica de partes aéreas; realizar triagem fitoquímica preliminar, extrair e caracterizar os componentes do óleo essencial; e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e tóxica *in vitro* de extratos, frações e óleo essencial. O estudo morfoanatômico evidenciou estômatos paracíticos, tricomas tectores e estruturas semelhantes a tricomas dibrâquiados, na face abaxial das folhas. A análise histoquímica mostrou a presença de amido em folhas, caules e pecíolos; e compostos fenólicos apenas nos pecíolos. Drusas foram encontradas em todas as partes estudadas. Na análise fitoquímica preliminar, no extrato de folhas, foram encontrados flavonoides na fração hidroalcoólica e iridoides nas frações hexano e clorofórmio. No extrato de caules foram encontrados esteroides na fração hexano; iridoides nas frações hexano e clorofórmio; e triterpenos na fração clorofórmio. Taninos, saponinas, heterosídeos cianogênicos e aminogrupos foram encontrados nos extratos aquosos de ambas as partes da planta. Foi isolado e identificado dos extratos brutos de folhas e caules; e da coluna cromatográfica da fração remanescente de caules, o ácido 3,3',4-tri-*o*-metil elágico, um derivado do ácido elágico. Na caracterização dos constituintes químicos do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, foram identificados 67 compostos, sendo o composto majoritário o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno presente em vários óleos essenciais. A capacidade antioxidante foi realizada por 2 metodologias, através da formação do complexo do fosfomolibdênio e inibição do radical DPPH•. Em ambos os testes, os extratos aquosos e as frações mais polares obtiveram melhor atividade antioxidante. Na atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco, apenas o óleo essencial mostrou atividade inibitória contra uma das cepas utilizadas no teste, a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*. No ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, o extrato bruto de folhas teve atividade tóxica baixa e o óleo essencial teve atividade tóxica elevada, maior que o controle positivo sulfato de quinidina. A espécie *Myrceugenia acutiflora* possui vários metabólitos secundários e atividades biológicas, demonstrando seu potencial farmacológico.

Palavras-chave: *Myrceugenia acutiflora*. Óleo essencial.  $\beta$ -cariofileno. Ácido 3,3',4-tri-*o*-metil elágico. Atividades biológicas. Perfil fitoquímico.

## ABSTRACT

The species *Myrceugenia acutiflora* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel, Myrtaceae, is native of South America and is present in South and Southeast regions of Brazil. It is represented by trees and shrubs of 2 to 12 meters tall that blossoms from January to March and produces fruits between July and August. To date, no phytochemical and pharmacognostic studies of the species have been described. The objectives of this work were to perform morphoanatomical and histochemical analyses of aerial parts; to perform preliminary phytochemical screening, to extract and characterize the components of essential oil; and to evaluate antioxidant, antimicrobial and toxic activities of extracts, fractions and essential oil. The morphoanatomical study showed paracytic stomata, tector trichomes and structures that resemble dibraquiata trichomes in the lower surface (abaxial) of the leaves. The histochemical analyses showed presence of starch in the leaves, stems and petioles; and phenolic compounds only in petioles. Druses were found in all of the parts studied. In the preliminary phytochemical screening, in the leaves' extract, it was found flavonoids in hydroalcoholic fraction and iridoids in the hexane and chloroform fractions. In the stems' extract it was found steroids in the hexane fraction; iridoids in the hexane and chloroform fractions; and triterpenes in the chloroform fraction. Tannins, saponins, cyanogenic heterosides and amino groups were found in aqueous extract from both parts of the plant. It was isolated and identified from the crude extracts of leaves and stems; and from the column chromatography of hydroalcoholic fraction of stems, the 3,3',4-tri-*o*-methylellagic acid, a derivative from ellagic acid. In the characterization of the chemical constituents from the essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry, 67 compounds were identified, being the major component  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene present in many essential oils. The antioxidant capacity was performed by 2 methodologies, formation of the phosphomolybdenum complex and inhibition of DPPH• radical. In both tests, the aqueous extracts and the more polar fractions had the best results. In the evaluation of antimicrobial activity by disk diffusion method, only the essential oil presented inhibitory activity against one of the strains used in the test, the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. In the toxicity assay against *Artemia salina*, the crude extract from the leaves had low toxic activity and the essential oil had high toxic activity, higher than the positive control quinidine sulfate. The species *Myrceugenia acutiflora* has many secondary metabolites and biological activities, demonstrating its pharmacological potential.

Keywords: *Myrceugenia acutiflora*. Essential oil.  $\beta$ -caryophyllene. 3,3',4-tri-methylellagic acid. Biological activities. Phytochemical screening.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ÁRVORE DE <i>Myrceugenia acutiflora</i> .....	25
FIGURA 2 – EXSICATA DE <i>Myrceugenia acutiflora</i> .....	26
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	26
FIGURA 4 – FOLHAS DE <i>Myrceugenia acutiflora</i> .....	42
FIGURA 5 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE <i>M. acutiflora</i>	43
FIGURA 6 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE TRICOMA DE ESPÉCIES DE <i>Myrceugenia</i> sp. ....	44
FIGURA 7 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO MESOFILO DE <i>M. acutiflora</i> .....	46
FIGURA 8 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL DE <i>M. acutiflora</i>	47
FIGURA 9 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE <i>M. acutiflora</i> .....	48
FIGURA 10 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE <i>M. acutiflora</i> .....	49
FIGURA 11 – ANÁLISE POR CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. acutiflora</i> .....	51
FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO $\beta$ -CARIOFILENO.....	55
FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO FITOL .....	56
FIGURA 14 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA RSC .....	60
FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA AMOSTRA RSC (200,13MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ) .....	61
FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA AMOSTRA RSC (50,62MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ) .....	62
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN HETERONUCLEAR HSQC DA AMOSTRA RSC (400MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ).....	62
FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN HETERONUCLEAR HMBC DA AMOSTRA RSC (400MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	63
FIGURA 19 – ESTRUTURA DO ÁCIDO 3,3',4 TRI-O-METIL ELÁGICO .....	65

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA FOLHAS E CAULES.....	67
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO GÊNERO <i>Myrceugenia</i> O. Berg	21
TABELA 2 – ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS DE FOLHAS E CAULES	51
TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>M. acutiflora</i>	52
TABELA 4 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS	56
TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE CAULES	57
TABELA 6 – ANÁLISES DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULES	57
TABELA 7 – ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E CAULES	58
TABELA 8 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULES	58
TABELA 9 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS	59
TABELA 10 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE CAULES	59
TABELA 11 – VALORES DAS BANDAS DE ABSORÇÃO NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (CM <sup>-1</sup> ) DO ÁCIDO 3,3',4-TRI-O-METILELÁGICO	61
TABELA 12 – DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) COMPARADOS COM A LITERATURA	64
TABELA 13 – VALORES DE CI <sub>50</sub> PARA EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DO DPPH•	70
TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. acutiflora</i>	71
TABELA 15 – ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> E CL <sub>50</sub> UTILIZANDO EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEO DE FOLHAS DE <i>M. acutiflora</i>	74

## LISTA DE SIGLAS

AAR%	– Atividade Antioxidante Relativa %
ANOVA	– Análise de Variância
ATCC	– American Type Culture Collection
BHT	– Butilhidroxitolueno
<i>C. albicans</i>	– <i>Candida albicans</i>
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CG	– Cromatografia Gasosa
CI <sub>50</sub>	– Concentração Inibitória 50%
CL <sub>50</sub>	– Concentração Letal 50%
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	– Dimetil-sulfóxido
DP	– Desvio Padrão
DPPH•	– 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAC	– Extrato Aquoso de Caules
EAF	– Extrato Aquoso de Folhas
EBC	– Extrato Bruto de Caules
EBF	– Extrato Bruto de Folhas
EM	– Espectrômetro de Massas
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
FAC	– Fração Acetato de Caules
FAF	– Fração Acetato de Folhas
FCC	– Fração Clorofórmio de Caules
FCF	– Fração Clorofórmio de Folhas
FHC	– Fração Hexano de Caules
FHF	– Fração Hexano de Folhas
FRC	– Fração Remanescente de Caules
FRF	– Fração Remanescente de Folhas
HMBC	– Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	– Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV-TF	– Infravermelho com Transformada de Fourier
KBr	– Brometo de Potássio

- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- NIST – National Institute of Standards and Technology
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- S. aureus* – *Staphylococcus aureus*
- TMS – Tetrametilsilano
- TSA – Trypticase Soy Agar (ágar triptona de soja)
- UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 JUSTIFICATIVA.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 Objetivo Geral.....	16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS. ....	17
2.2 GÊNERO <i>Myrceugenia</i> O. Berg .....	20
2.3 ESPÉCIE <i>Myrceugenia acutiflora</i> (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel .....	22
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	25
3.2 MORFOANATOMIA.....	27
3.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS .....	27
3.3.1 Determinação de Perda por Dessecação.....	27
3.3.2 Determinação de Cinzas Totais.....	28
3.4 PESQUISA DE ÓLEO ESSENCIAL .....	29
3.4.1 Extração de Óleo Essencial.....	29
3.4.2 Identificação dos Componentes do Óleo Essencial .....	29
3.5 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	30
3.5.1 Extratos Brutos Etanólicos.....	30
3.5.2 Extratos Aquosos.....	30
3.6 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO .....	31
3.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	31
3.7.1 Alcaloides .....	32
3.7.2 Leucoantocianidinas .....	32
3.7.3 Flavonoides .....	32
3.7.4 Cumarinas .....	33
3.7.5 Substâncias Iridoidais.....	33
3.7.6 Antraquinonas e Naftoquinonas .....	33
3.7.7 Esteroides e Triterpenos.....	34
3.7.8 Reação de Keller Kelliani.....	34
3.7.9 Antocianinas .....	34
3.7.10 Saponinas.....	35
3.7.11 Heterosídeos Cianogênicos.....	35
3.7.12 Taninos.....	35
3.7.13 Amino Grupos.....	36
3.7.14 Ácidos Fixos .....	36
3.7.15 Ácidos Voláteis .....	36
3.8 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	37
3.8.1 Fração Remanescente de Caules (FRC) .....	37

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	37
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.10.1 Método do Fosfomolibdênio .....	38
3.10.2 Método do DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	39
3.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	40
3.12 TOXICIDADE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1. MORFOANATOMIA.....	42
4.2 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS .....	50
4.2.1 Determinação de Perda por Dessecação.....	50
4.2.2 Determinação de Cinzas Totais.....	50
4.3 PESQUISA DE ÓLEO ESSENCIAL .....	51
4.3.1 Extração de Óleo Essencial.....	51
4.3.2 Identificação dos Componentes do Óleo Essencial .....	51
4.4 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	56
4.5 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO .....	57
4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	58
4.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS .....	59
4.7.1 Resíduo Sólido de Caules .....	59
4.7.3 Fração Remanescente de Caules (FRC) .....	66
4.7.3.1 Amostra FRC-02.....	66
4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	67
4.8.1 Método do Fosfomolibdênio .....	67
4.8.2 Método do DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	68
4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	70
4.9 TOXICIDADE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> .....	72
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA PARA ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 400.000 espécies de plantas superiores espalhadas pelo mundo, produzindo substâncias químicas variadas, o que representa uma possibilidade de descoberta de novos agentes de origem vegetal (MOSQUERA et al., 2007). Produtos naturais são fontes de novas estruturas químicas utilizadas no desenvolvimento de novos produtos, havendo grande interesse nos metabólitos secundários (IMATOMI et al., 2013).

Existe uma variedade de compostos extraídos de plantas com atividades farmacológicas. Estes compostos fitoquímicos estão representados por flavonoides, compostos fenólicos, saponinas, compostos cianogênicos, estilbenos, compostos nitrogenados – alcaloides, aminas, betalainas; terpenoides e outros metabólitos endógenos (IQBAL; SALIM; LIM, 2015).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, possuindo variedade de plantas nativas, as quais representam fontes significativas de compostos bioativos. (NERI-NUMA et al., 2013). No entanto, poucas espécies nativas tem sido estudadas com o propósito de se identificar estes compostos (ERBANO et al., 2012).

Os metabólitos secundários com atividade antioxidante tem atraído interesse devido a sua capacidade de neutralizar radicais livres, protegendo o organismo do envelhecimento, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Antioxidantes naturais como flavonoides, taninos, cumarinas, xantonas, compostos fenólicos e terpenoides são encontrados em diversas partes das plantas como frutos, folhas, sementes e óleos (JAYAPRAKASHA; GIRENNAVAR; PATIL, 2008).

A família Myrtaceae está presente nos trópicos, concentrada na América do Sul, sudeste da Ásia e Austrália. Possui diversos membros economicamente importantes para a alimentação fornecendo frutos e especiarias (REYNERTSON et al., 2008), plantas medicinais e ornamentais (LAPČÍK et al., 2005). Nos estudos fitoquímicos das mirtáceas já foram descritos flavonoides, taninos, terpenoides e óleos essenciais (BASTING et al., 2014).

O gênero *Myrceugenia* sp. possui cerca de 40 espécies e ocorre no Chile e América do Sul. A maioria das espécies sul-americanas são encontradas no Brasil, do Rio de Janeiro à Porto Alegre (REGO, 2008). Existem poucos estudos

fitoquímicos de espécies do gênero, porém já foram descritos óleos essenciais e flavonoides.

Devido aos poucos estudos sobre a espécie *Myrceugenia acutiflora* e por ser uma planta nativa e endêmica da região Sul do Brasil, este trabalho tem como objetivos pesquisar sua composição química, isolar e identificar componentes presentes na planta; e avaliar suas atividades antioxidante, antimicrobiana e tóxica *in vitro*.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

A família Myrtaceae Juss. é uma das principais famílias da flora brasileira, com grande potencial para descoberta de novos produtos naturais. Inúmeras espécies são usadas tradicionalmente para tratar inflamações, febre, gripe, diabetes e doenças infecciosas (BASTING et al., 2014). Devido à importância da família e escassos estudos sobre a espécie *Myrceugenia acutiflora*, principalmente do aspecto fitoquímico, este trabalho tem como objetivos pesquisar sua composição química e atividades biológicas.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e as atividades antioxidante, antimicrobiana e tóxica *in vitro* dos extratos obtidos das folhas e caules da espécie *Myrceugenia acutiflora* (Myrtaceae).

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a morfologia e anatomia de partes aéreas de *M. acutiflora*;
- Analisar o teor de umidade e cinzas totais de partes aéreas de *M. acutiflora*;
- Obter extratos aquosos e alcoólicos a 20%, de folhas e caules, para análise fitoquímica preliminar;
- Obter extratos aquosos de folhas e caules para atividades biológicas;
- Obter extratos brutos alcoólicos e frações de diferentes polaridades de folhas e caules para atividades biológicas e caracterização química;
- Extrair óleo essencial das folhas de *M. acutiflora*;
- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrômetro de Massas (EM);
- Isolar e identificar os constituintes químicos dos extratos brutos e frações por cromatografia em coluna, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF), Ressonância Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos, alcoólicos, frações e óleo essencial através da redução do radical DPPH•;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos, alcoólicos, frações e óleo essencial através da formação do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos, alcoólicos, frações e óleo essencial pelo método da difusão em disco;
- Avaliar a toxicidade preliminar dos extratos aquosos, alcoólicos, frações e óleo essencial frente à *Artemia salina*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

A Myrtaceae Juss. está presente em quase todos os continentes, é uma família de árvores e arbustos (RETAMALES et al., 2015). Possui 5970 espécies, distribuída em 145 gêneros (The Plant List, 2013). É bastante diversa, representada principalmente por árvores frutíferas (DA SILVA et al., 2017); uma das famílias mais difíceis de se definir a taxonomia, devido ao número de espécies e poucos estudos taxonômicos (MORAIS; DA CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

Foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu, sendo encontrada principalmente na Austrália, oeste da Índia e América de clima tropical, porém é vista em outras regiões de clima temperado (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Uma das principais famílias de angiospermas no Brasil, possui uma única tribo no país – Myrtae, e três subtribos, Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae (CRUZ; KAPLAN, 2004). A família está presente na Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Restinga e Cerrado (MORAIS; DA CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

A família é uma das maiores da flora brasileira, com cerca de 23 gêneros e 1000 espécies distribuídas pelo país. Uma característica da família é a presença de cavidades secretoras de óleo, que aparecem nas folhas como pontos transparentes, sendo observadas na maioria dos gêneros (ARMSTRONG, 2011). Outra característica é que os troncos das árvores geralmente são recobertos por ritidoma esfoliativo (KATO; BACHI; HERNANDES, 2011).

As espécies que compõem esta família possuem folhas simples, inteiras, opostas ou raramente alternas, sem estípulas. As flores são hermafroditas, diclamídeas, raramente monoclamídeas, tetra ou pentâmeras, polistêmones, com pétalas frequentemente caducas. Os frutos são do tipo baga, drupa, cápsula ou secos e indeiscentes (ARRUDA, 2013).

Sua classificação anterior em tribos era baseada no tipo de fruto que cada grupo apresentava – carnosos ou secos, porém foi descoberto através de estudos moleculares que a tribo dos frutos carnosos não é monofilética. Atualmente a família é dividida em 2 subfamílias Psiloxylloideae e Myrtoideae. A Psiloxylloideae possui 2 tribos enquanto a Myrtoideae possui 15 tribos, dentre estas encontra-se a Myrtae, a qual apresenta distribuição neotropical (WILSON et al., 2005). No Brasil, estima-se

que 30% das espécies de mirtáceas de ocorrência natural pertençam à subfamília Myrtoideae, caracterizada pelos frutos carnosos do tipo baga ou drupa e folhas opostas (DIAS et al., 2012). Todas as espécies de mirtáceas brasileiras produzem frutos carnosos, ou seja, frutos com polpa tipicamente rica em água e carboidratos; e pobre em lipídios e proteínas (COLUSSI; PRESTES, 2011).

Essa família inclui inúmeros gêneros como *Eugenia* sp., *Eucalyptus* sp., *Psidium* sp., *Myrtus* sp., *Pimenta* sp., *Syzygium* sp., *Leptospermum* sp., *Pseudocaryophyllus* sp. (EVANS, 2009).

Nas florestas, possuem importância ecológica, uma vez que seus frutos carnosos servem de alimentos a animais silvestres, os quais espalham as sementes dos frutos digeridos, favorecendo a sobrevivência das plantas (MORAIS; DA CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014). É uma família botânica indicada para restauração de áreas alteradas, usos ornamentais e fitoterápicos (COSMO et al., 2017).

As mirtáceas brasileiras geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). Muitos membros da família possuem grande interesse econômico como o *Eucalyptus* sp. para o uso da madeira e matéria-prima para a fabricação de produtos de limpeza e aromatizantes, o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), utilizado na culinária, além de uma variedade de espécies que possuem frutos comestíveis como a goiaba (*Psidium guajava*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Os frutos são consumidos *in natura* ou utilizados na produção de geleias, doces e sucos (DUARTE et al., 2010).

Além de serem utilizadas como alimentos, as espécies da família são usadas na medicina tradicional no tratamento de doenças. As partes mais utilizadas são folhas, cascas e frutos (FRAUCHES et al., 2016). Quando empregadas para fins medicinais, as espécies são utilizadas em distúrbios gastrointestinais, hemorragias e doenças infecciosas (CRUZ; KAPLAN, 2004), sendo que suas atividades provavelmente estão relacionadas às propriedades adstringentes (CASCAES et al., 2015). Também já foram comprovadas atividades anti-reumática, anti-diabética, antimicrobiana e diurética (OLIVEIRA et al., 2016).

Algumas espécies, por possuírem atividade consagrada na medicina tradicional e estudos científicos, fazem parte de Monografias da Farmacopeia Brasileira IV edição. Dentre estas, se destacam o eucalipto (*Eucalyptus globulus*

Labill.), cujas folhas são ricas em cineol, utilizadas como expectorantes no tratamento de doenças do trato respiratório; o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry), cujos botões florais são ricos em eugenol, utilizado em aplicações de uso tópico e local, no tratamento de infecções de pele, dores de garganta e dor de dente (DO COUTO et al., 2009).

As folhas jovens da goiabeira possuem elevado conteúdo de taninos e óleos essenciais (DO COUTO et al., 2009). O chá de folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.) é usado contra diarreias, problemas gastrointestinais (cólicas e vômitos), no tratamento de faringite, alívio da dor de dente. Devido às suas propriedades adstringentes, também é utilizado como agente hemostático e em úlceras varicosas (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

O extrato alcoólico de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) é utilizado para hipertensão (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Poucas espécies de Myrtaceae foram analisadas em relação à sua composição química, sendo que a maioria dos estudos são dos componentes do óleo essencial extraído das folhas. Estes óleos obtidos podem exibir atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, larvicida e citotóxica (ARRUDA, 2013).

Os principais constituintes químicos encontrados na família incluem óleos essenciais, leucoantocianinas, taninos, ácidos fenólicos (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), triterpenos e flavonoides (KATO; BACHI; HERNANDES, 2011), principalmente flavonóis como quercitina, miricetina e kaempferol (GREINWALD et al., 1989).

Em relação as propriedades farmacológicas, os extratos demonstraram atividade anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antipirética, hipotensiva, antidiabética e antioxidante (BASTING et al., 2014). Atribui-se a espécie *Myrcia multiflora* ação hipoglicemiante, motivo pelo qual é conhecida como insulina vegetal (DONATO; MORRETES, 2011).

## 2.2 GÊNERO *Myrceugenia* O. Berg

*Myrceugenia* O. Berg é um gênero endêmico da América do Sul (MURILLO-ALDANA et al., 2012), contendo 47 espécies descritas até o momento (The Plant List, 2013). Suas espécies crescem em climas moderadamente frio, temperado e subtropical da América do sul (LIMA; GUEDES-BRUNI, 2004), ocorrendo em 2 centros principais – Chile e sul do Brasil.

De acordo com Setubal et al. (2011), há 2 espécies no arquipélago chileno Juan Fernández, outras 12 espécies no Chile adjacente a Argentina e o restante das espécies está presente na parte leste da América do Sul. A maioria destas é encontrada na costa brasileira e planalto, do Rio de Janeiro a Porto Alegre.

Espécies de *Myrceugenia* sp. presentes no arquipélago chileno apresentam diferentes relações filogenéticas entre si. A *Myrceugenia fernandeziana* apresenta maior correlação com espécies do Brasil enquanto a espécie *Myrceugenia schulzei* apresenta maior correlação com espécies do Chile continental (RUIZ; SILVA, 1999).

As espécies brasileiras são encontradas em locais de alta altitude e clima úmido (BÜNGER; STEHMANN; OLIVEIRA-FILHO, 2014). O Brasil apresenta 32 espécies e 30 estão presentes na região Sul (SOBRAL, 2015).

*Myrceugenia* sp. recebeu este nome porque é similar ao gênero *Eugenia* sp., mas tem o embrião com as mesmas características do gênero *Myrcia* sp. Como consequência, o gênero *Myrceugenia* sp. foi colocado na subtribo Myrciinae junto com *Myrcia* (REGO, 2008).

O gênero apresenta arbustos e árvores de 0,5 a 12 metros de altura, ramos cilíndricos quando adultos e achatados quando jovens, casca lisa a estriada; bolsas secretoras esparsas a densamente distribuídas, às vezes perceptíveis a olho nu. Presença de tricomas simples, tricomas dibráquiados assimétricos, simétricos ou mistos; (LIMA; GUEDES-BRUNI, 2004). As folhas das espécies deste gênero contém tricomas quando jovens, estes são perdidos conforme o crescimento da planta (DIAS et al., 2012).

Diferencia-se dos outros gêneros da subtribo Myrciinae porque possui quatro flores aglomeradas em vez de cinco, inflorescências simples, dicásios ou bractéolas em vez de panículas, óvulos numerosos com dois a quatro lóculos em vez de dois óvulos com dois lóculos (raramente três). Estas características estão presentes em membros das subtribos Eugeniinae e Myrtinae (REGO, 2008).

O gênero continua com posição incerta entre as subtribos de Myrtae (ROSA et al., 2015), a TABELA 1 apresenta a taxonomia de *Myrceugenia* sp.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO GÊNERO *Myrceugenia* O. Berg

Classificação	Taxonomia
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novak ex Takht.
Superordem	Rosanae Takht.
Ordem	Myrtales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Família	Myrtaceae Juss.
Gênero	<i>Myrceugenia</i> O. Berg

FONTE: TROPICOS (2018).

Em relação aos constituintes fitoquímicos, Ruiz et al. (1994), fizeram um estudo quimiotaxonômico baseado na presença de flavonoides em diferentes espécies de *Myrceugenia* sp. Também já foi descrito a presença de chalconas, flavanonas e óleos essenciais (OIKAWA et al., 2016).

Em outro estudo de 2002 onde foram analisadas a composição química dos óleos essenciais obtidos de 5 espécies de *Myrceugenia* sp., foram encontrados compostos oxigenados, aldeídos, cetonas, álcoois e terpenos (LIMBERGER et al., 2002).

Para a espécie *Myrceugenia parvifolia*, em análise histoquímica das folhas, foram encontradas mucilagem, polifenóis e taninos (RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2014).

Em relação a farmacologia, já foi isolado o ácido morônico da espécie *Myrceugenia euosma*, substância que já foi relacionada a atividade antiviral, especificamente atividade anti-HIV (SINGH; BHARATE; BHUTANI, 2005). Extratos metanólicos de folhas e galhos de *Myrceugenia euosma* foram testados para inibição do acúmulo de gordura no organismo, obtendo bons resultados (OIKAWA et al., 2016). No Chile já foi descrito o uso popular de 2 espécies de *Myrceugenia* sp. – *Myrceugenia exsucca* e *Myrceugenia planipes* (THEODULOZ; PACHECO; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1991).

Em 2008, 7 espécies de *Myrceugenia* spp. entraram para a lista de espécies-alvo para a conservação e restauração da biodiversidade do estado de São Paulo (RODRIGUES et al., 2008).

### 2.3 ESPÉCIE *Myrceugenia acutiflora* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel

A espécie é representada por arbustos e árvores de 2 a 12 metros de altura, folhas elípticas a ovaladas, florescem de janeiro a março e frutificam nos meses de inverno, de julho a agosto (LANDRUM, 1981).

A espécie nativa, presente nas regiões Sul e Sudeste, tem como sinônimos *Eugenia acutiflora* Kiaersk. ou *Luma acutiflora* (Kiaersk.) Burret. (SOBRAL, 2015). Sua ocorrência foi confirmada apenas nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina; presente na Mata Atlântica, principalmente em Floresta Ombrófila Mista (Flora do Brasil 2020, 2018).

Até o momento, não foram publicados estudos morfoanatômicos, fitoquímicos ou atividades biológicas da espécie.

### 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são substâncias naturais voláteis presentes em várias plantas (CHENG et al., 2003). A composição química pode variar de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos de enxofre e nitrogenados (HENRIQUES et al., 2011).

São misturas complexas de compostos, contendo em média, 20 a 60 constituintes, em diferentes concentrações. São normalmente caracterizados por 2 ou 3 compostos majoritários em altas concentrações (20-70%) (PAVELA, 2015) e constituídos de terpenos (principalmente mono e sesquiterpenos) e fenilpropanoides.

Os terpenos possuem aromas característicos, os quais contribuem para os sabores de óleos essenciais (RABE; SCHMITZ; DICKSCHAT, 2016). Estes compostos são responsáveis pelas características organolépticas, devido ao seu baixo peso molecular (DE SOUZA et al., 2012). Uma característica dos terpenos é que enantiômeros de terpenos quirais possuem fragrâncias diferentes, sendo que

apenas a minoria dos terpenos, como cineol e  $\alpha$ -humuleno são aquirais (RABE; SCHMITZ; DICKSCHAT, 2016).

Os terpenoides formam uma família diversa de produtos naturais derivados de unidades de isopreno (cadeias contendo 5 carbonos), ligados de forma cabeça-cauda. São subdivididos em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2009).

Os óleos voláteis estão presentes em todos os órgãos vegetais – flores, folhas, frutos (anis), sementes (noz moscada), rizomas (gingibre), cascas (canela), lenho (sândalo) e menos frequentemente em raízes (vetiver) (SILVA, 2010).

A composição e produção dos óleos essenciais são reguladas por fatores fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e genéticos (SANGWAN et al., 2011). Pode ocorrer variação dos componentes em decorrência das condições ambientais as quais a planta está exposta, como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, luminosidade, estágio de desenvolvimento, fatores nutricionais (NASCIMENTO et al., 2018), variedades genéticas e processo de extração empregados (MENDES et al., 2008). São produzidos na planta em resposta a estímulos estressantes, por isso as condições do meio influenciam seu conteúdo e rendimento (CALO et al., 2015). Algumas plantas produzem óleo essencial para inibir a germinação e respiração de outras plantas ao redor (BUCKLE, 2015).

Na natureza, os óleos essenciais possuem um importante papel na proteção de plantas como ação antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida. Atraem insetos para favorecer a dispersão do pólen ou repelem insetos indesejáveis (GUIMARÃES et al., 2011). A atividade inseticida está relacionada a interferência dos constituintes do óleo nos processos fisiológicos e hormonais de artrópodes. Os terpenos, por exemplo, são neurotóxicos aos insetos, pois inibem a enzima acetilcolinesterase (GONZÁLEZ et al., 2014).

Alguns constituintes de óleos essenciais possuem atividades biológicas no sistema nervoso central, indicando que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (FERREIRA, 2014). Constituintes de óleos voláteis como linalol, limoneno e citrionelol possuem atividade ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (GUIMARÃES et al., 2011).

Várias atividades biológicas já foram atribuídas aos óleos essenciais como analgésica, antimicrobiana, antimalárica, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, gastroproterora (DE SOUZA et al., 2010).

Os constituintes do óleo essencial podem agir individualmente, aditivamente ou sinergicamente. Além de serem usados como agentes terapêuticos, as substâncias bioativas isoladas dos óleos essenciais podem servir como protótipo para síntese de novos compostos (COUTINHO et al., 2015).

Comercialmente, os óleos essenciais são utilizados como intensificadores de sabor em produtos alimentícios, em fragrâncias e inseticidas (CHENG et al., 2003). São empregados no controle de pragas no campo e locais de armazenamento de colheita, sendo considerados uma alternativa aos pesticidas sintéticos. Sua permanência no meio ambiente é curta e possui baixa toxicidade em mamíferos (GONZÁLEZ-COLOMA, 2013).

O medicamento Acheflan® é obtido do óleo essencial da erva-baleeira (*Varronia curassavica*), e possui propriedades anti-inflamatórias, sendo indicada no tratamento de mialgias. Sua atividade farmacológica está atrelada a presença do constituinte do óleo essencial  $\alpha$ -humuleno. A companhia farmacêutica produtora do medicamento padronizou a porcentagem do constituinte no óleo em 2,3% a 2,9% (DE LUNA, 2013).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta dos caules e folhas de *Myrceugenia acutiflora* foi realizada no Capão do Cifloma, Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, no mês de junho de 2016. O material vegetal foi coletado de duas árvores (uma jovem e outra adulta) encontradas nas coordenadas geográficas 25°26'57.4''S 49°14'24.8''W; e 25°26'53.5''S 49°14'28.1''W, conforme FIGURA 1. Foram coletados 1960g de folhas e 1265g de caules para morfoanatomia, análise físico-química, extração de óleo essencial e preparo dos extratos.

O estudo da espécie *Myrceugenia acutiflora* tem autorização do IBAMA para acesso ao patrimônio genético, conforme processo nº 020001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

FIGURA 1 – ÁRVORE DE *Myrceugenia acutiflora*



FONTE: A autora (2018).

A identificação da planta por comparação foi realizada no Museu Botânico Municipal de Curitiba pelo botânico Marcelo Leandro Brotto. Foi utilizada a exsicata de número MBM 66323, de acordo com FIGURA 2.

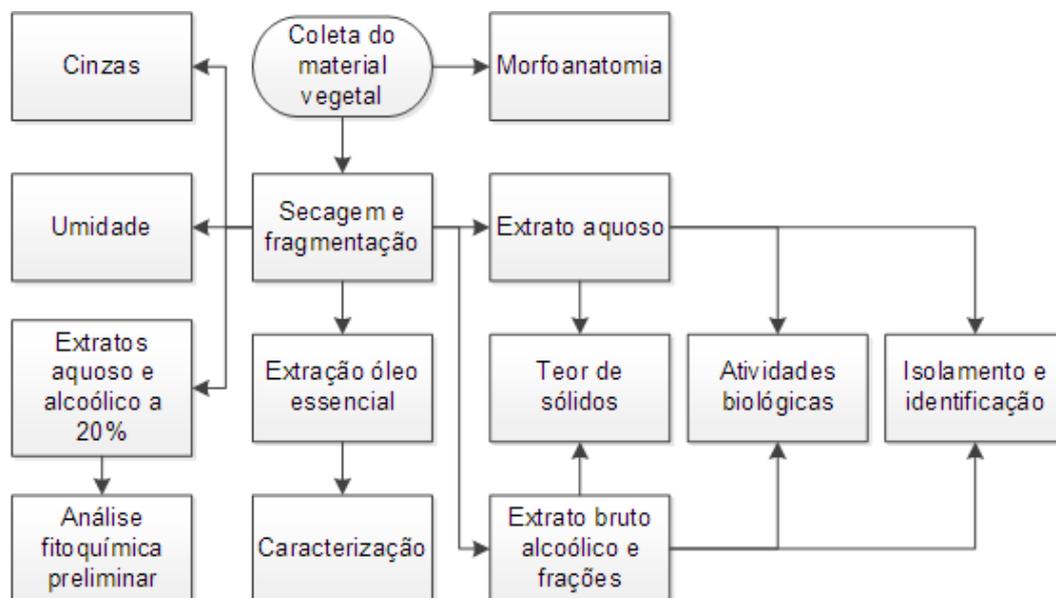
FIGURA 2 – EXSICATA DE *Myrceugenia acutiflora*



FONTE: A autora (2018).

As atividades deste trabalho foram realizadas de acordo com o fluxograma presente abaixo:

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS



FONTE: A autora (2018).

## 3.2 MORFOANATOMIA

A morfoanatomia da *Myrceugenia acutiflora* foi realizada para caules, folhas e pecíolo. O material vegetal fresco foi fixado em solução de FAA (90% de etanol a 70%, 5% de formaldeído a 37% e 5% de ácido acético anidro) (JOHANSEN, 1940) onde permaneceu por 7 dias e depois foi transferido para solução etanólica 70% (v/v) até a realização das análises (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

As lâminas semipermanentes foram feitas através de secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Os cortes histológicos foram corados com azul de astra e fucsina básica (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). Para a montagem das lâminas foi utilizada a glicerina a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Os testes microquímicos foram realizados através de secções transversais à mão livre do material fixado, utilizando os corantes cloreto férrico (JOHANSEN, 1940), lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), e Sudam III (SASS, 1951) para a identificação de compostos fenólicos, amido e lipídios, respectivamente. Os testes microquímicos foram realizados no laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Para o estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material vegetal fixado em solução FAA, foi desidratado em série etanólica crescente e submetido ao ponto crítico em evaporador (SOUZA, 2007). As amostras foram montadas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro. As eletromicrografias foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360-LV, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

## 3.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

### 3.3.1 Determinação de Perda por Dessecação

Este ensaio é utilizado para determinar a quantidade de substâncias voláteis. A umidade foi determinada por método gravimétrico, descrito na Farmacopeia Brasileira V edição (2010). Foi pesado 1g da planta e transferido para cadinho dessecado anteriormente, por 30 minutos. Após resfriamento do mesmo, o cadinho contendo a amostra foi pesado.

A amostra foi colocada na estufa a 105°C por 2 horas. Após o esfriamento em dessecador, foi procedida a medição. A análise foi realizada em triplicata. A média da porcentagem de umidade foi calculada através da equação (1):

$$\text{Umidade \%} = \frac{C_u - C_s}{C_a} \times 100$$

Sendo:

$C_a$  = peso da amostra,

$C_u$  = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação,

$C_s$  = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

### 3.3.2 Determinação de Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira V edição (2010), pesando-se 1g da amostra pulverizada, em cadinho previamente tarado. A amostra foi distribuída homoganeamente e incinerada a temperatura de 600°C, por aproximadamente 6h. O cadinho foi resfriado em dessecador e pesados posteriormente, até peso constante.

O teste foi realizado em triplicata. A média da porcentagem de cinzas foi calculada em relação à planta seca a temperatura ambiente, de acordo com a seguinte equação (2):

$$\text{Cinzas totais \%} = \frac{C_u - C_s}{C_a} \times 100$$

$C_a$  = peso da amostra,

$C_u$  = peso do cadinho contendo a amostra antes da incineração,

$C_s$  = peso do cadinho contendo a amostra após a incineração.

### 3.4 PESQUISA DE ÓLEO ESSENCIAL

#### 3.4.1 Extração de Óleo Essencial

O óleo essencial foi extraído das folhas através de hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger modificado, conforme Farmacopeia Brasileira V edição (2010). As folhas foram secas a temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas e martelos.

Para extração do óleo foram utilizados 395,7g e 3L de água purificada. A extração foi realizada, em temperatura de aproximadamente 100°C, por 6 horas.

O volume do óleo obtido foi medido em bureta graduada e o rendimento foi calculado em mililitros por 100g de material vegetal (BRASIL, 2010). A água foi retirada do óleo, e este foi armazenado em geladeira a 2°C, envolto por papel alumínio para não ocorrer a degradação dos constituintes químicos. Foi feita nova coleta e extração do óleo para obter quantidade suficiente para realização dos testes biológicos.

#### 3.4.2 Identificação dos Componentes do Óleo Essencial

A análise do óleo essencial das folhas foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-2010, acoplado a espectrômetro de massas CG-EM QP2010 Plus, utilizando injetor automático Shimadzu OAC 20i e equipado com coluna capilar RTX-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura programada utilizada foi de 60°C a 250°C, a 3°C/min e temperatura de injeção de 250°C, com volume de injeção de 1µl de amostra, no modo split (1:10). O detector de massas analisou razão massa/carga de 40 a 350Da, utilizando gás hélio como gás carreador a pressão de 59,0kPa; com fluxo de 1,02ml/min em velocidade linear de 36,8cm/s e modo de ionização por impacto de elétrons de 70eV, a 250°C.

Os índices de retenção (IR) foram obtidos através de padrão de série de n-alcenos, utilizando equação de Van der Dool e Kratz (ADAMS, 2007). Os componentes foram quantificados baseados nas áreas dos picos. A identificação dos constituintes do óleo foi realizada por comparação com espectros de massa da biblioteca NIST14 e com dados da literatura.

### 3.5 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

#### 3.5.1 Extratos Brutos Etanólicos

Os extratos alcoólicos brutos foram preparados utilizando 1,4kg para o extrato de folhas e 1,1kg para o extrato de caules. Como solvente, foi utilizado o etanol a 96°GL, em refluxo por 45 horas, em aparelho de soxhlet modificado (PI06001703-7A). Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e uma alíquota foi retirada para determinação do teor de resíduo seco. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a 50°C para 1/5 do volume. O restante foi então evaporado em banho-maria até completa evaporação do solvente para realização do particionamento. Foram retirados 5g dos extratos brutos secos para realização dos testes biológicos, isolamento e identificação.

As frações foram obtidas pela extração em soxhlet com solventes de diferentes polaridades: hexano, clorofórmio e acetato de etila, sendo a última fração denominada remanescente (VIRTUOSO et al., 2005).

Em ambos os extratos brutos de folhas e caules precipitou um pó branco, no extrato bruto das folhas, este resíduo estava em grande quantidade. Esta amostra foi separada do extrato através de filtração, lavada com etanol 77% (v/v) e seca em estufa a 50°C, por 15 minutos. A amostra, denominada RSF; pesou 5,9 g.

#### 3.5.2 Extratos Aquosos

O extrato aquoso de caules foi preparado por maceração em banho-maria por 2h a 70°C (MIGUEL, 2003), utilizando 550g de caules secos e 2,75L de água destilada. Na sequência, o extrato foi filtrado e uma alíquota foi retirada para o teste de teor de resíduo seco.

O extrato aquoso de folhas foi preparado com o líquido proveniente da hidrodestilação do óleo essencial, ou seja, foi obtido por decocção. Esta solução foi filtrada e foi retirada pequena quantidade para cálculo do teor de resíduo seco.

Os extratos foram filtrados e congelados. Posteriormente foram secos por liofilização.

Com o intuito de se tentar obter maior quantidade do resíduo sólido branco presente no extrato bruto dos caules, o material vegetal utilizado para preparo do extrato aquoso de caules foi seco em estufa e usado para preparo de novo extrato bruto. Neste extrato precipitou uma massa semelhante ao RSF; com peso de 6,97g.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO

A determinação de sólidos totais foi realizada conforme Farmacopeia Brasileira V edição (2010) modificado, pesando-se 10ml de extrato bruto em cada placa de Petri, dessecando em estufa por 3 horas. Foi deixado para esfriar em dessecador e o resíduo seco foi calculado em porcentagem por volume. A análise foi feita em triplicata.

### 3.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Para a análise fitoquímica preliminar foram preparados extratos aquosos e extratos hidroalcoólicos de folhas e caules a 20%, conforme Miguel (2003).

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados com 40g das partes secas e fragmentadas, macerando em 200ml de etanol a 70% em banho-maria a 70°C por 1 hora. Os macerados foram filtrados em funil de Büchner e concentrados para eliminar o excesso de etanol. Foram feitas partições dos extratos com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, sendo que o remanescente é a fração hidroalcoólica. Os volumes completados até 200ml com os solventes das respectivas frações. As frações foram armazenadas em refrigerador até o uso.

Os extratos aquosos foram preparados através da maceração em água destilada, em banho-maria a 70°C por 1 hora, utilizando 40g de material vegetal e 200ml de água. Os extratos foram filtrados em funil de Büchner e os volumes completados até 200ml. Os extratos aquosos foram refrigerados até uso.

A análise fitoquímica preliminar foi realizada de acordo com Miguel (2003) e os compostos pesquisados no extrato hidroalcoólico foram: alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, iridoides, esteroides e triterpenos. No extrato aquoso foram pesquisados os seguintes grupos químicos: antocianinas, saponinas, heterosídeos cianogênicos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

### 3.7.1 Alcaloides

Para esta pesquisa utilizou-se os reativos gerais para alcaloides: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e Bouchardart (iodo-iodeto de potássio). Alíquotas de 50ml das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica foram secas em banho-maria a 70°C e os resíduos solubilizados em 1ml de etanol e 20ml de ácido clorídrico a 1%. Somente 2ml dos extratos clorídricos foram transferidos para 4 tubos de ensaio e adicionados em cada tubo 2 gotas dos reativos para alcaloides, sendo o quarto tubo o controle negativo. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Precipitado branco aparece com o uso do reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

### 3.7.2 Leucoantocianidinas

Para a pesquisa de leucoantocianidina, 10ml das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas a *secura* em banho-maria. A fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar. O resíduo nas cápsulas foi solubilizado com 5ml de etanol e adicionado 5 gotas de ácido clorídrico concentrado, com posterior aquecimento. Na reação positiva observa-se o desenvolvimento de coloração vermelha.

### 3.7.3 Flavonoides

Foram secos em banho-maria 10ml das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar. Os resíduos das cápsulas foram solubilizados em 10ml de etanol, metade do volume foi transferido para tubos de ensaio, foram adicionados 200mg de limalha e ácido clorídrico concentrado. A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelha; flavononas com coloração vermelha a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

### 3.7.4 Cumarinas

As cumarinas puras são fluorescentes, porém em meio alcalino, forma-se o ácido cis-o-hidroxicinâmico. Este, na presença de luz ultravioleta, migra para forma trans, exibindo coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos. Em um papel de filtro, foram feitos 3 pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro para cada fração. Às manchas 1 e 2, foi adicionado hidróxido de sódio 1,0mol/L. Sobre a mancha 1, colocado uma moeda. O papel de filtro foi levado a câmara de ultravioleta a 365nm e deixado por 15 minutos. O desenvolvimento de fluorescência de coloração azul ou verde amarelada na mancha indica que a reação é positiva.

### 3.7.5 Substâncias Iridoidais

Foram transferidos para tubos de ensaio, 2ml das frações, cristais de floroglucinol e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Desenvolvimento de coloração verde escura indica reação positiva. Foram transferidos para tubos de ensaio, 2ml das frações e adicionadas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Desenvolvimento de coloração rosa violáceo indica reação positiva. Foram transferidos para tubos de ensaio, 2ml das frações, cristais de vanilina e 2 gotas de ácido sulfúrico. A presença coloração rosa cereja indica reação positiva.

### 3.7.6 Antraquinonas e Naftoquinonas

Foi levado à fervura 30ml do extrato alcoólico e frações em um balão, por 15 minutos sob refluxo e foi adicionando 5ml de ácido sulfúrico 10%. Antes de esfriado, os extratos e frações foram filtrados e foi adicionado 30 ml de água destilada. Com um funil de separação, as frações orgânicas foram decantadas. A fração hidroalcoólica foi extraída com 10ml de éter etílico, sendo que este procedimento foi feito duas vezes. As frações foram concentradas até 5ml e transferidas para um tubo de ensaio, realizando a reação de Bornträger. Foram adicionados 5 ml de hidróxido de amônia e agitado suavemente. O aparecimento de coloração avermelhada indica a presença de antraquinonas e/ ou naftoquinonas.

### 3.7.7 Esteroides e Triterpenos

Foram evaporados 30ml de cada fração em banho-maria e os resíduos foram dissolvidos com clorofórmio. Foram pipetados 0,1ml; 0,5ml e 1,0ml dos extratos clorofórmicos de cada fração para 3 tubos de ensaio e os volumes foram completados com clorofórmio para 2ml. Foram realizadas as reações de Libermann-Bouchardat lentamente, com a adição de 1ml de ácido acético anidro e 2ml de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul é um indicativo da presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 da estrutura química. A coloração verde indica função hidroxila na posição 3 do anel esteroidal e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Quando ocorre o desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente existe a presença de metila em no carbono 14. A coloração verde demonstra a presença de esteroides e/ou triterpenos.

### 3.7.8 Reação de Keller Kelliani

Foram transferidos para 4 tubos de ensaio, 2ml das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e hidroalcoólica, e levado à secura. O resíduo foi dissolvido com 2ml de ácido acético anidro e 0,2ml de solução de cloreto férrico a 1%. A mistura foi transferida para um tubo de ensaio contendo 2ml de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxiaçúcares. A coloração azul é indicativo da presença de esteroides, enquanto a coloração verde indica a presença de triterpenos.

### 3.7.9 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos os quais modificam suas cores de acordo com o pH. Em meio ácido, as antocianinas formam sais de oxônio corados de vermelho e meio alcalino adquire coloração azul à estrutura quinoide. Para a pesquisa de antocianinas foram transferidos 5ml dos extratos aquosos para três tubos de ensaio. O primeiro tubo foi acidificado com ácido clorídrico a 1% (pH 4), o segundo tubo foi alcalinizado com hidróxido de amônio (pH 10) e o terceiro tubo foi neutralizado (pH

7). O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violáceo em meio neutro, indica reação positiva.

### 3.7.10 Saponinas

Para o teste de saponinas foram utilizados os tubos para pesquisa de antocianinas. Estes foram agitados energicamente, com movimentos succionais, por 5 minutos e deixados em repouso por 30 minutos. A altura do anel de espuma foi medida após este período. O desenvolvimento de espuma com altura superior a 1cm e persistente após o repouso indica reação positiva.

### 3.7.11 Heterosídeos Cianogênicos

#### Reação de Schoembein

Em 5ml dos extratos aquosos, foram pingadas 4 gotas de hidróxido de sódio a 10%, adicionados 3 cristais de sulfato ferroso e 1 gota de cloreto férrico a 1%. As amostras foram aquecidas em chapa metálica até ebulição e foram adicionadas 1 gota de ácido clorídrico a 1%. A reação é positiva quando ocorre o desenvolvimento de coloração azul.

### 3.7.12 Taninos

#### 3.7.12.1 Reação com Cloreto Férrico

Foram adicionadas 3 a 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% em 1ml de do extrato aquoso. Coloração azul, verde ou precipitado indica a presença e taninos (DAULA; BASHER, 2009).

#### 3.7.12.2 Teste da gelatina

Foram transferidos para tubos de ensaios 0,5ml; 1ml e 2ml de solução de gelatina a 1%, recém preparada. O desenvolvimento de turbidez ou precipitado indica reação positiva.

### 3.7.13 Amino Grupos

Foram concentrados 10ml dos extratos aquosos até volume de 5ml em banho-maria a 60°C. Em tiras de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas dos extratos concentrados. Após secagem, foram pingadas 2 gotas da solução de ninhidrina a 1% sobre as manchas das amostras do papel de filtro, e levado à estufa a 100°C durante 15 minutos (MIGUEL, 2003).

A presença de amino grupos é indicada pelo aparecimento de coloração violeta ou azul (BOXI et al., 2010).

### 3.7.14 Ácidos Fixos

Foram adicionados 20ml dos extratos aquosos e 2ml de hidróxido de sódio 1N em um balão de fundo chato e levado a refluxo durante 30 minutos. Após esfriamento, os extratos foram acidificados com ácido sulfúrico a 0,5mol/L e extraídos com 10ml de éter etílico, sendo este processo repetido por três vezes. Os extratos etéreos foram tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C e adicionados 5ml de solução de hidróxido de amônio 0,5mol/L. Três gotas do filtrado foram pingadas em papel de filtro e sobre as manchas foram pingadas 1 gota de reagente de Nessler. O papel de filtro foi levado à estufa por 5 minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom. Para controle negativo foi utilizado uma mancha com o reativo de Nessler.

### 3.7.15 Ácidos Voláteis

Amostras de 10ml dos extratos aquosos foram acidificadas com 10ml de ácido sulfúrico 0,5mol/L e levadas ao banho-maria a 60°C. Com fita indicadora de pH presa ao tubo com rolha de cortiça é possível avaliar a presença de ácidos voláteis, o aparecimento de pH baixo, próximo de 1, indica reação positiva.

## 3.8 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

### 3.8.1 Fração Remanescente de Caules (FRC)

Foi realizada cromatografia em coluna com a fração remanescente de caules devido ao seu bom rendimento durante o fracionamento por soxhlet, apresentando quantidade suficiente de amostra para os testes biológicos e isolamento por cromatografia.

Para o preparo da amostra foi utilizada 12,39g da fração e 25,86g de sílica gel 60 (0,06-0,2mm). A fração foi solubilizada em pequena quantidade de metanol, adicionada a sílica e levada a banho-maria a 50°C até completa evaporação do solvente.

A coluna de vidro foi empacotada utilizando a sílica gel como fase estacionária e a fase móvel foi preparada através da mistura de metanol e acetato de etila, começando com a proporção de 40/60 (metanol/acetato de etila) e aumentando a polaridade em 5% até proporção final de 100% de metanol. Após o final da eluição foi feita outra fase móvel para extrair compostos mais polares, utilizando como eluentes metanol e água destilada, partindo da proporção 90/10 (metanol/água) e aumentando a polaridade em 10%, chegando a proporção 60/40. Os eluatos foram coletados em frascos numerados, totalizando 211 frascos de aproximadamente 10ml cada. O solvente dos frascos foi evaporado a temperatura ambiente para obtenção de compostos purificados.

Os frascos 0 a 5 precipitaram sólidos brancos. Foi feita cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel utilizando como fase móvel acetato de etila 95%; ácido fórmico 3,5% e água destilada 1,5% para pesquisa de taninos e flavonoides. Os frascos 1 ao 4 tinham as mesmas características, foram reunidos e denominados FRC-02.

## 3.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

As amostras isoladas do extrato bruto de folhas RSF, extrato bruto de caules RSC e da fração remanescente de caules FRC-02 foram analisadas por RMN. Foi utilizado espectrômetro Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla; observando os

núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 200,13 e 50,62MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em DMSO deuterado e foi utilizado TMS como referência. As análises foram feitas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN).

A amostra RSC também foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, na faixa de 4000 a  $500\text{cm}^{-1}$ , utilizando KBr para confecção da pastilha.

Ambas as análises foram realizadas no departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

### 3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.10.1 Método do Fosfomolibdênio

O experimento foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar (1999).

O reativo fosfomolibdênio foi preparado com 28ml de solução de fosfato de sódio monobásico anidro ( $0,1\text{mol/L}$ ), 12ml solução de molibdato de amônio tetra hidratado ( $0,03\text{mol/L}$ ) e 20ml solução de ácido sulfúrico ( $3\text{mol/L}$ ), sendo o volume final completado em balão volumétrico com água destilada para 100ml.

As amostras dos extratos, frações, óleo essencial e padrões foram preparadas na concentração de  $200\mu\text{g/ml}$ , solubilizadas com metanol. Os padrões utilizados foram vitamina C, rutina e BHT. Alíquotas de  $300\mu\text{l}$  das amostras foram adicionadas a 2,5ml do reagente e incubadas em banho-maria a  $95^\circ\text{C}$  por 1h30. As amostras, em temperatura ambiente, foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 690nm. Para o preparo do branco foi utilizado o solvente metanol nas mesmas condições que as amostras.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata e os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%) em comparação com a vitamina C, conforme equação (3):

$$\text{AAR}\% = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (controle)} - \text{Abs (solvente)}} \times 100$$

*Abs (amostra)* = absorbância da amostra,  
*Abs (branco)* = absorbância do reagente,  
*Abs (controle)* = absorbância da vitamina C,  
*Abs (solvente)* = absorbância do solvente.

Para análise estatística dos dados, foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) e quando necessário, empregado o teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Sisvar e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.10.2 Método do DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O teste foi realizado de acordo com Mensor et al. (2001) modificado. As amostras foram preparadas em diferentes concentrações. Uma alíquota de 700µl de cada concentração reagiu com 300µl da solução metanólica de DPPH• a 0,3mM, em local escuro e a temperatura ambiente, por 30 minutos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 540nm. O branco foi preparado com 700µl de metanol e 300µl da respectiva concentração preparada. O controle negativo foi preparado com 700µl da solução de DPPH• e 300µl de metanol; e os controles positivos utilizados foram soluções-padrão de rutina, vitamina C e BHT.

A atividade antioxidante foi calculada através do decaimento do DPPH•. Diferentes concentrações de cada amostra foram preparadas em triplicata e a média dos percentuais antioxidantes foram calculados de acordo com a equação (4):

$$\text{DPPH}\% = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (DPPH)}} \times 100$$

*Abs (amostra)* = absorbância da amostra de cada concentração,  
*Abs (branco)* = absorbância do branco de cada concentração,  
*Abs (DPPH)* = absorbância da solução de DPPH a 0,3mM em metanol

Para determinação da  $CI_{50}$ , concentração do antioxidante necessário para reduzir a absorbância inicial do DPPH• em 50%, foram utilizadas 5 concentrações de cada amostra, para obtenção da regressão linear, onde o eixo da abcissa (x) é

representado pelas concentrações das amostras e o eixo da ordenada (y) é representado pela porcentagem do reagente DPPH•.

Para análise estatística dos dados, foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) e quando necessário, empregado o teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Sisvar, valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em ágar, de acordo com Bauer et al. (1966) modificado.

Foram utilizados para o experimento os micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), bactéria gram-positiva; *Escherichia coli* (ATCC 8738), bactéria gram negativa; e *Candida albicans* (ATCC 10231), uma levedura. Os micro-organismos foram semeados em ágar TSA por 24h. Com auxílio de alça bacteriológica, as colônias isoladas foram transferidas para solução salina 0,9%. As suspensões foram padronizadas através de comparação visual de turbidez com tubo equivalente à escala 0,5 de McFarland. Com um swab previamente esterilizado, os inóculos foram semeados em placas de Petri contendo meio ágar Müller Hinton para bactérias e ágar Sauboraud para levedura.

As amostras foram solubilizadas em etanol 30% (v/v), exceto os extratos aquosos, os quais foram solubilizados em água destilada estéril e o óleo essencial, o qual foi utilizado puro. Os extratos e frações foram preparados em concentração 2mg/ml. A aplicação de 30µl das amostras foi feita nos discos de papel filtro e o teste foi realizado em duplicata. Foram adicionados 30µl de cloranfenicol (250µg/ml) como controle positivo para bactérias e 30µl de cetoconazol (500µg/mL) como controle positivo para levedura. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. A atividade antimicrobiana das amostras foi verificada pela medida do halo de inibição de crescimento e comparada com o halo formado pelo controle.

### 3.12 TOXICIDADE UTILIZANDO *Artemia salina*

Os cistos foram adquiridos em loja de aquários e o ensaio foi realizado de acordo com Meyer et al. modificado (1982). A água salina foi preparada na

concentração 35,8g/L, utilizando de sal marinho e solubilizado em água purificada. O pH foi mantido entre 8,0 e 9,0 e a água foi aerada por 30 minutos. Foram utilizados 400ml de solução salina, 200mg de ovos e a temperatura foi mantida entre 27°C a 30°C com auxílio de uma lâmpada incandescente. A água artificial do mar foi mantida sob agitação constante para permitir a oxigenação da solução.

Foram feitas diluições dos extratos em 7 concentrações: 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000µg/ml em metanol; exceto para os extratos aquosos, os quais foram solubilizados em água destilada. As amostras foram preparadas em quintuplicata. Após as diluições da solução-mãe nas concentrações desejadas, as amostras foram secas em estufa por 48h para eliminação do solvente e foram ressuspendidas em salina. Para os extratos aquosos as amostras não foram secas. O controle positivo foi preparado utilizando sulfato de quinidina nas mesmas concentrações dos extratos e como controle negativo foi utilizado metanol. Para facilitar a solubilização do óleo essencial foi utilizado tween 80 a 10% (p/v), sendo preparado um controle negativo de tween 80 solubilizado em metanol.

Dez náuplios foram transferidos para cada frasco com auxílio de pipeta Pasteur e o volume foi completado para 5ml com a solução salina. As amostras foram mantidas na presença de luz e agitação constante. Após 24 horas, os náuplios sobreviventes e mortos foram contados. A estimativa da concentração letal capaz de matar 50% da população ( $CL_{50}$ ) foi obtida através da análise estatística Probitos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. MORFOANATOMIA

Embora as espécies de mirtáceas sejam abundantes em óleos essenciais e outros compostos químicos, estudos de anatomia foliar e histoquímicos são escassos (RETAMALES; SCHERSON; SCHARASCHKIN, 2014). As folhas de *Myrceugenia acutiflora* medem aproximadamente 6,5cm de comprimento e 3cm de largura. São folhas opostas, lanceoladas, apresentam ápice agudo, margem inteira e base aguda, características presentes no gênero (LIMA; GUEDES-BRUNI, 2004). As folhas possuem pecíolo curto com cerca de 0,3cm de comprimento, de acordo com a FIGURA 4.

FIGURA 4 – FOLHAS DE *Myrceugenia acutiflora*

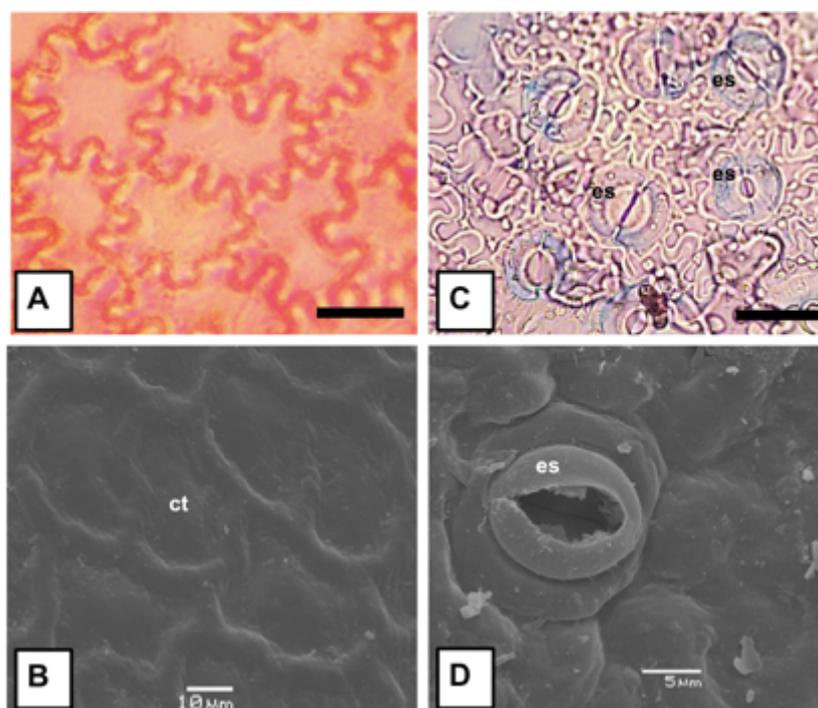


FONTE: A autora (2018).

Em vista frontal, as células da epiderme de *M. acutiflora* apresentam paredes sinuosas em ambas as faces conforme FIGURA 5A-B. De acordo com Metcalfe e Chalk (1972), as espécies de plantas pertencentes a Myrtaceae apresentam estômatos anomocíticos, porém há vários relatos de estômatos paracíticos em membros desta família, demonstrando que não existe padrão único. Para a espécie

em estudo foram encontrados estômatos paracíticos apenas na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática (FIGURA 5C-D). Em um estudo feito por Retamales e Scharaschkin (2015) com 14 espécies de *Myrceugenia* spp., foram descritos estômatos anomocíticos para todas as espécies. Para outras 2 espécies estudadas por Verbinenn (2001) também foram encontrados estômatos anomocíticos. Embora já tenha sido descrito a presença de estômatos paracíticos para a espécie *Myrceugenia acutata* D. Legrand (BEZERRA, 2013), esse tipo de estômato não parece estar presente na maioria das espécies do gênero, o que poderia ajudar na identificação da *Myrceugenia acutiflora*.

FIGURA 5 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE *M. acutiflora*



FONTE: A autora (2018).

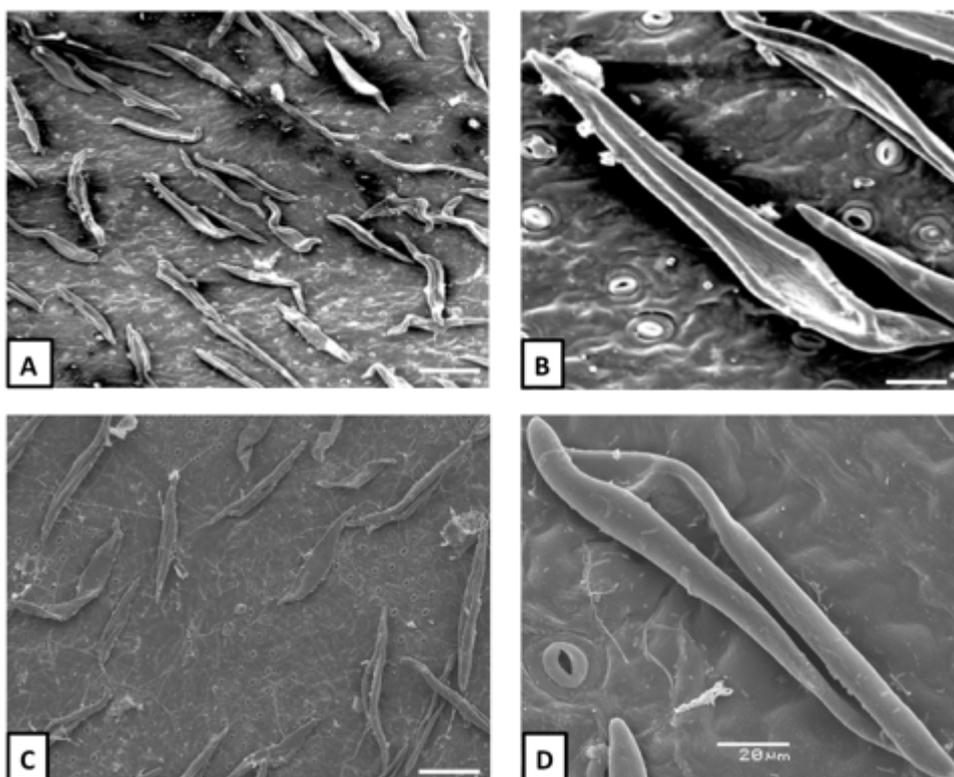
**A.** Face adaxial, epiderme sinuosa em microscopia ótica (MO). **B.** Face adaxial em microscopia eletrônica varredura (MEV). **C.** Face abaxial, estômatos paracíticos em MO. **D.** Face abaxial em MEV. ep: epiderme, es: estômato. Barra= 50 µm (A e C)

Os tricomas são observados para espécies da família, sendo descritos para alguns gêneros como *Calyptanthes* sp. e *Eugenia* sp.; e algumas espécies de *Myrcia* sp., constituindo um importante caráter para a diferenciação das espécies do Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Eventualmente, folhas glabrescentes podem ser erroneamente classificadas como folhas glabras. O termo glabrescente descreve a condição da planta de possuir tricomas quando jovens, porém os perdem ao longo

do seu desenvolvimento (GOMES et al., 2009). Essa característica está presente nas folhas e caules do gênero *Myrceugenia* sp. (LIMA; GUEDES-BRUNI, 2004).

Para as folhas da espécie em estudo foram encontrados estruturas condizentes com tricomas dibrâquiados, ilustrados na FIGURA 6C-D. Os achados foram comparados com os tricomas dibrâquiados da espécie *Myrceugenia correifolia*, conforme FIGURA 6A-B.

FIGURA 6 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE TRICOMA DE ESPÉCIES DE *Myrceugenia* sp.



FONTE: Adaptado de RETAMALES; SCHARASCHKIN (2015) – FIGURAS A e B. A autora (2018) – FIGURAS C e D.

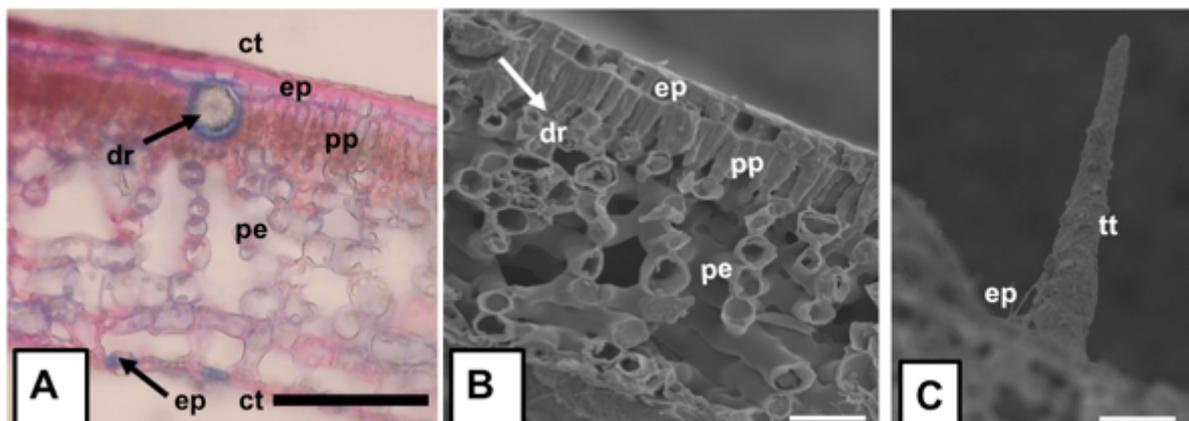
**A.** Superfície abaxial levemente pubescente de *Myrceugenia correifolia*. **B.** Tricoma dibrâquiado de *Myrceugenia correifolia*. **C.** Superfície abaxial de folha jovem de *Myrceugenia acutiflora*. **D.** Tricoma dibrâquiado de *Myrceugenia acutiflora*. Barra = 50 μm (A-B), 200 μm (C).

Também foram encontrados tricomas tectores unicelulares, de acordo com FIGURA 7C e FIGURA 8A. A presença de mais de um tipo de tricoma foi descrita para diversas espécies do gênero (LIMA; GUEDES-BRUNI, 2004; RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015). A distribuição de tricomas tectores em folhas e caules constitui uma barreira mecânica contra alta intensidade luminosa, temperaturas extremas e perda excessiva de água (DE FARIAS et al., 2008).

O mesofilo é classificado como heterogêneo ou dorsiventral, encontrado na maioria das Mirtáceas (DIAS et al., 2012), apresentando parênquima paliádico provido de apenas 1 estrato celular, ilustrado na FIGURA 7B-C, característica anteriormente descrita para *Myrceogenia parvifolia* (DC.) Kausel (RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015). O parênquima esponjoso apresentou cerca de 6-8 camadas. A estrutura do parênquima esponjoso não é constante dentro das subtribos de Mirtáceas que foram estudados por Cardoso, Proença e Sajo (2009), podendo variar de células irregulares dispostas de forma compacta a células lobadas com muitos espaços intercelulares. Em 3 espécies de *Myrceogenia* sp. estudada por esses autores, todas possuíam parênquima esponjoso frouxo.

Em secção transversal da folha, a epiderme de *M. acutiflora* apresenta-se uniestratificada com células isodiamétricas em ambas as faces, FIGURA 8A. A cutícula é lisa em ambas as faces, FIGURA 5B e 6D, e tem reação positiva ao corante Sudam III. No gênero *Myrcia* sp., as espécies podem apresentar folhas recobertas por cutícula lisa e estriada. No entanto, as células epidérmicas de *Eugenia* sp. são recobertas exclusivamente por cutícula estriada (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000). Subjacente à epiderme encontra-se uma a duas camadas de colênquima angular no qual nota-se grãos de amidos assim como nas demais células do parênquima fundamental.

*M. acutiflora* tem drusas (cristais de oxalato de cálcio) na região do mesofilo e nervura central, visualizado na FIGURA 7A-B. As drusas estão presentes em diversas espécies de Mirtáceas (DE FARIAS et al., 2008). Embora sua função não esteja clara, acredita-se que esteja relacionada com a regulação de cálcio e outros minerais e defesa contra herbívoros e patógenos (VOLK et al., 2002). A presença e o tipo de cristal, a localização e frequência nos tecidos vegetais, auxiliam na diagnose da espécie (DONATO; MORRETES, 2005).

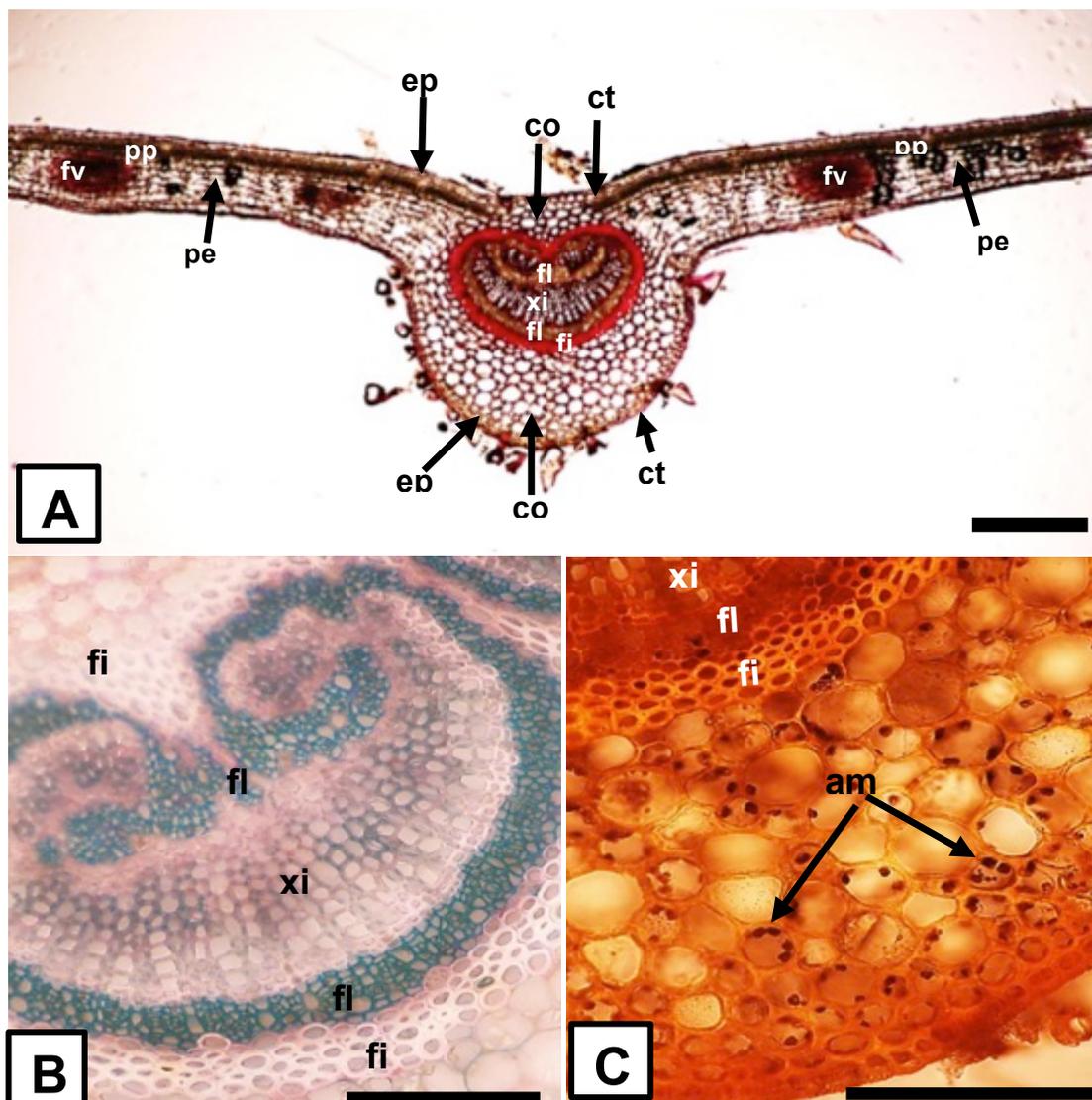
FIGURA 7 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO MESOFILO DE *M. acutiflora*

FONTE: A autora (2018).

**A.** Mesofilo contendo drusas. **B.** Mesofilo em MEV. **C.** Tricoma tector unisseriado em MEV. am: amido, ep: epiderme, pe: parênquima esponjoso, pp: parênquima paliçádico, tt: tricoma tector, xi: xilema, fi: fibras, fl: floema, xi: xilema, dr: drusas, ct: cutícula. Barra = 200 µm (A), 50 µm (B e C).

O formato da nervura central, em secção transversal, apresenta uma importante característica na identificação de drogas vegetais (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; WOSCH et al., 2015; BOBEK, 2015), neste sentido verificou-se que a espécie em estudo apresentou nervura central com formato plano-convexo FIGURA 8A. Entretanto, dentro *Myrtinae*, a superfície adaxial das espécies apresenta uma projeção (CARDOSO; PROENÇA; SAJO, 2009).

O sistema vascular mostra-se em arco aberto com invaginação nas extremidades e é envolvido por uma bainha esclerenquimática, conforme FIGURA 8B. Feixes vasculares bicolaterais nas nervuras medianas foram encontrados nas espécies estudadas por Gomes et al., (2009). O sistema vascular principal da família Myrtaceae é único, em forma de arco aberto ou encurvado nas extremidades e com feixe vascular do tipo bicolateral circundado por fibras (METCALFE; CHALK, 1972).

FIGURA 8 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL DE *M. acutiflora*

FONTE: A autora (2018).

**A.** Visão geral da secção transversal. **B.** Detalhes dos feixes vasculares. **C.** Grãos de amido corados com lugol. am: amido, co: colênquima, ct: cutícula, pe: parênquima esponjoso, pp: parênquima paliádico, ep: epiderme, fv: feixe vascular, fi: fibras, fl: floema, xi: xilema. Barra = 200  $\mu\text{m}$  (A-C).

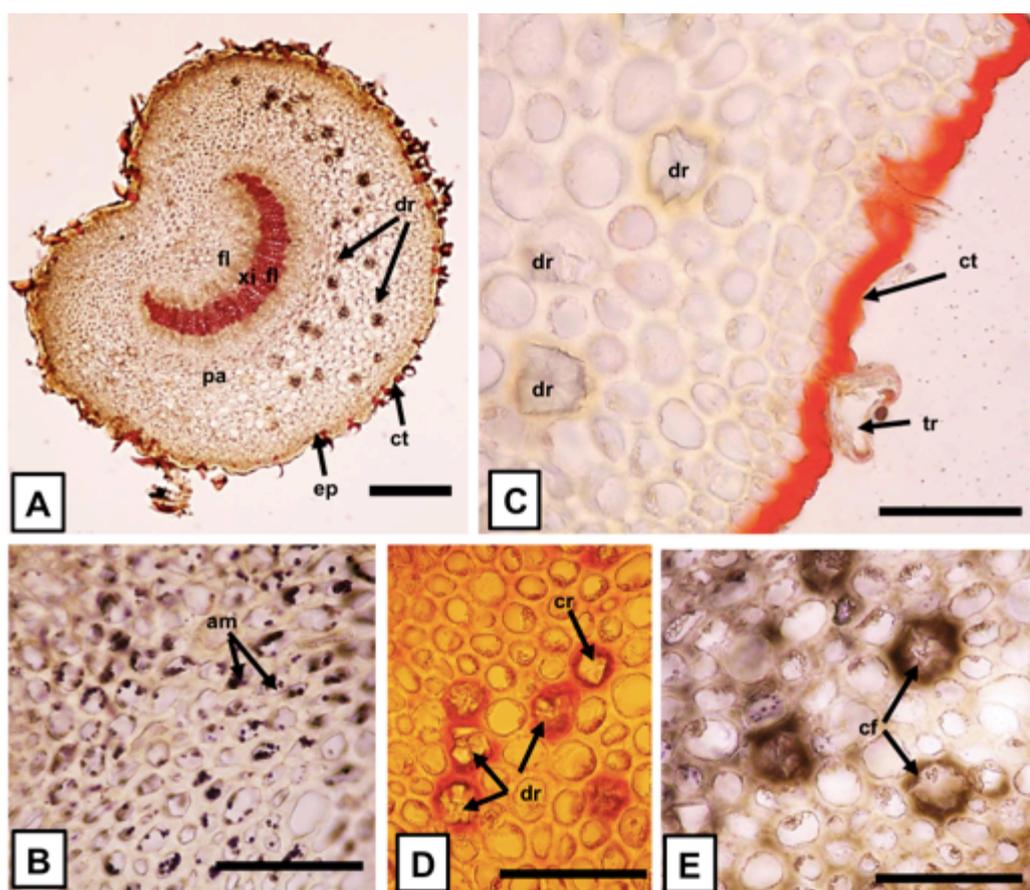
O pecíolo em secção transversal apresenta formato côncavo-convexo, e tricomas tectores espalhados pela epiderme uniestratificada, conforme FIGURA 9A. Apresenta cutícula espessa a qual reage positivamente ao Sudam III, ilustrado na FIGURA 9C. O sistema vascular apresenta feixe vascular em arco aberto, diferente da folha, onde não ocorre bainha esclerenquimática, FIGURA 9A.

Nota-se a presença de muitas drusas de oxalato de cálcio, FIGURA 9B-D, grãos de amido e idioblastos com conteúdo fenólico no parênquima fundamental FIGURA 9E.

Diferente de outras espécies de Mirtáceas, não foram observadas células secretoras nas folhas e pecíolos de *M. acutiflora*, porém foi encontrado 1 tricoma glandular no pecíolo, ilustrado na FIGURA 8C. Segundo Retamales e Scharaschkin (2015) a presença de tricomas glandulares ou secretores não é uma característica muito encontrada para espécies de Myrtaceae da América do Sul. Cardoso, Proença e Sajo (2009) observaram este tipo de tricoma apenas na superfície abaxial de folhas de *Myrceugenia euosma* (O. Berg) D. Legrand.

Os tricomas glandulares são locais de produção de metabólitos secundários como taninos, resinas, mucilagem e óleos essenciais. Estas substâncias são armazenadas nos tricomas ou volatilizadas na superfície da planta, participando na defesa da planta contra insetos fitófagos e patógenos; ou atraindo polinizadores (WAGNER, 1991).

FIGURA 9 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *M. acutiflora*



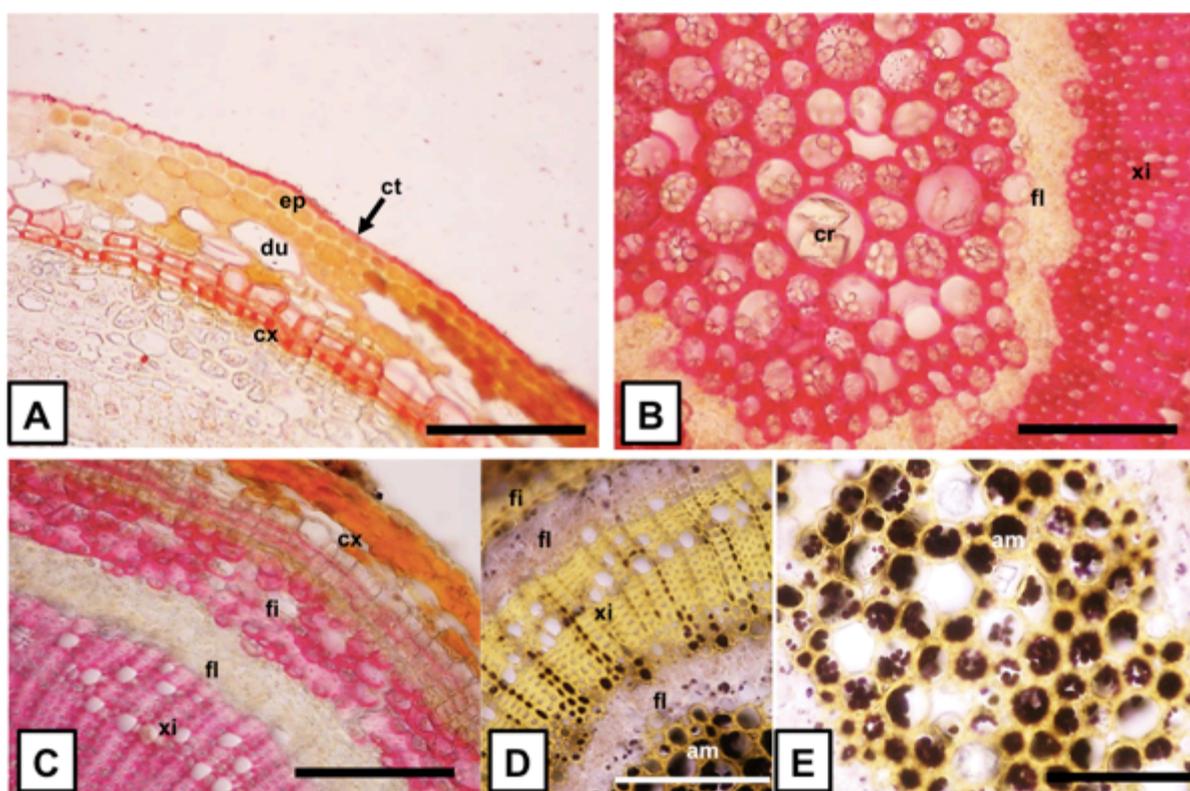
FONTE: A autora (2018).

**A.** Visão geral do pecíolo em MO. **B.** Grãos de amido em reação com lugol em MO. **C.** cutícula em reação com Sudam III. **D.** Drusas e cristais presentes no parênquima. **E.** Compostos fenólicos corados com cloreto férrico. am: amido, cf: compostos fenólicos, cr: cristais, dr: drusas, ep: epiderme, fi: fibras, fl: floema, pa: parênquima, tr: tricoma, xi: xilema. Barra = 100µm (A), 200 µm (B-E).

O caule possui formato circular quando seccionado transversalmente, A epiderme é uniestratificada e recoberta por cutícula delgada que reage positivamente ao Sudam III, FIGURA 10A. Escassos tricomas tectores unicelulares encontram-se espalhados pela epiderme. Dutos secretores estão presentes no córtex, FIGURA 10A .

O sistema vascular é biclateral FIGURA 10D e está envolvido por uma bainha esclerenquimática descontínua a qual reage positivamente ao teste com floroglucina clorídrica FIGURA 10E. Na região medular são observados numerosos grãos de amido, drusas e cristais de oxalato de cálcio FIGURA 10B-D.

FIGURA 10 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE *M. acutiflora*



FONTE: A autora (2018).

**A.** Reação com Sudam III em MO. **B.** Reação com floroglucina clorídrica. **C-D.** Detalhes dos feixes vasculares. **E.** grãos de amido na região medular em reação com lugol. ct: cutícula, cr: cristais, cx: córtex, du: duto secretor, ep: epiderme, fi: fibras, fl: floema, xi: xilema. Barra = 200 µm (A-E).

## 4.2 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

### 4.2.1 Determinação de Perda por Dessecação

No ensaio de perda por dessecação realizado foram obtidos resultado de umidade média  $12,82\% \pm 0,31$  e  $15,26\% \pm 0,21$  para folhas e caules, respectivamente, de acordo com TABELA 2.

O teor de umidade é um parâmetro de qualidade de drogas vegetais, pois o excesso de água favorece o crescimento microbiano, aparecimento de fungos, insetos e pode causar a hidrólise dos componentes químicos presentes no material. De forma geral, os teores de umidade permitidos nas monografias encontram-se entre 8 a 14%, variando de acordo com as partes da planta e monografia específica das espécies (SIMÕES et al., 2017). Na Farmacopeia V edição (2010) estes valores oscilam entre 8 a 15%.

Para a espécie em estudo, o resultado de umidade encontrado para folhas está dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia, enquanto o resultado da umidade de caules encontra-se um pouco elevado em relação a média de outras espécies vegetais. Neste caso, é aconselhado deixar o material vegetal secar à temperatura ambiente por período superior a 7 dias, especialmente quando a coleta for realizada nos meses de inverno.

### 4.2.2 Determinação de Cinzas Totais

O teor de cinzas foi de  $4,72\% \pm 0,22$  para folhas e  $2,99\% \pm 0,18$  para caules; conforme TABELA 2. A determinação de cinzas totais é resultado da incineração do material vegetal. O conteúdo de cinzas provém dos componentes minerais da planta e/ou substâncias inorgânicas que podem estar presentes como contaminantes da droga vegetal. Altos teores de cinzas pode ser indício de contaminação como areia, terra, indicando mau tratamento na colheita, higienização e processamento do material (GUIZZO et al., 2015).

Como não há monografia da *Myrceugenia acutiflora*, ambos os testes físico-químicos auxiliam na formulação de parâmetros de controle de qualidade e identificação da espécie.

TABELA 2 – ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS DE FOLHAS E CAULES

Ensaio*	Folhas	Caules
Umidade (%) ± DP	12,82 ± 0,31	15,26 ± 0,21
Cinzas (%) ± DP	4,72 ± 0,22	2,99 ± 0,18

FONTE: A autora (2018).

\*Valores expressos como média ± desvio padrão.

### 4.3 PESQUISA DE ÓLEO ESSENCIAL

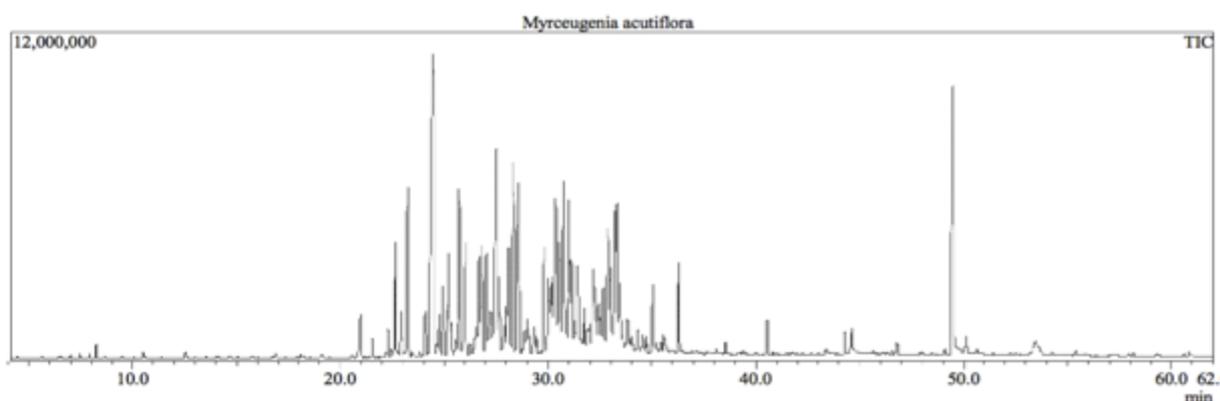
#### 4.3.1 Extração de Óleo Essencial

Para a extração de óleo essencial utilizando 395g, foi obtido 0,2ml; com rendimento equivalente a 0,05% (v/m). O rendimento dos óleos essenciais normalmente é muito baixo, com exceções, como nos botões florais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), atingindo 15% (SILVA, 2010).

#### 4.3.2 Identificação dos Componentes do Óleo Essencial

A análise dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, de acordo com FIGURA 11.

FIGURA 11 - ANÁLISE POR CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. acutiflora*



FONTE: A autora (2018).

A corrida cromatográfica apresentou 67 constituintes, com 93,85% de compostos identificados. Dentre estes, houve a predominância de sesquiterpenos com 80,43%; sendo 51,75% de sesquiterpenos hidrocarbonetos e 28,68% de

sesquiterpenos oxigenados, conforme TABELA 3. Em um estudo com as folhas da goiaba (*Psidium guajava* L.), Smith e Siwatibau (1975) observaram que o teor de terpenos oxigenados é menor em folhas jovens.

TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *M. acutiflora*

(continua)				
Tempo de retenção (min)	RI (encontrado)	RI (teórico)	Constituinte químico	Área relativa (%)
<b>Monoterpenos hidrocarbonetos</b>				<b>0,12</b>
8.243	1019	1024	limoneno	0,12
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</b>				<b>51,75</b>
20.973	1330	1335	δ-elemeno	0,82
21.547	1343	1348	α-cubebeno	0,22
22.293	1360		NI**	0,37
22.453	1364	1373	α-ylangeno	0,12
22.663	1369	1374	α-copaeno	1,64
22.943	1375	1387	β-bourbonero	0,66
23.253	1382	1389	β-elemeno	2,58
24.083	1402	1409	α-gurjuneno	0,96
24.483	1411	1417	<b>(E)-cariofileno</b>	<b>8,60</b>
24.777	1418	1430	β-copaeno	0,57
24.953	1423	1434	γ-elemeno	1,15
25.207	1429	1439	aromandendreno	1,60
25.350	1432	1448	cis-muurola-3,5-dieno	0,66
25.553	1437	1451	trans-muurola-3,5-dieno	0,31
25.747	1442	1452	α-humuleno	2,79
26.033	1448	1458	allo-aromandendreno	1,90
26.260	1454	1461	cis-cadina-1(6),4-dieno	0,24
26.563	1461	1475	trans-cadina-1(6),4-dieno	0,72
26.687	1464	1478	γ-muuroloeno	1,60
26.823	1467	1480	germacreno D	1,83
27.027	1472	1489	β-selineno	1,49
27.260	1478	1492	δ-selineno	1,31
27.523	1484	1496	<b>viridifloreno</b>	<b>5,14</b>
27.653	1487	1500	α-muuroloeno	1,21
27.907	1493	1502	trans-β-guaieno	0,57
28.013	1496	1505	(E,E)-α-farneseno	0,59
28.113	1498	1505	β-bisaboleno	1,75
28.343	1504	1521	trans-calameneno	3,82
28.573	1510	1522	δ-cadineno	3,32
28.880	1517	1533	trans-cadina-1,4-dieno	0,41
28.997	1520	1544	α-caracoleno (impuro)	0,54
29.093	1523	1537	α-cadineno	0,41
29.340	1529	1545	selina-3,7(11)-dieno	0,57
29.813	1541	1559	germacreno B	1,65
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>				<b>28,68</b>
30.017	1546		NI (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)**	1,29

(conclusão)				
Tempo de retenção (min)	RI (encontrado)	RI (teórico)	Constituinte químico	Área relativa (%)
30.373	1555	1577	espatulenol	3,41
30.537	1559	1582	óxido de cariofileno	2,03
30.757	1565	1590	globulol	3,79
31.027	1571	1592	viridiflorol	2,64
31.137	1574	1595	cubeban-11-ol	1,44
31.273	1577	1600	guaiol	0,53
31.400	1581	1600	rosifoliol	2,46
31.760	1590		NI (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)**	0,80
31.910	1593		NI (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)**	0,52
32.010	1596	1616	Junenol	0,53
32.203	1601		NI**	1,92
32.420	1606	1627	1-epi-cubenol	0,83
32.493	1608		NI (eudesmol estereoisomero)**	0,63
32.663	1613	1639	allo-aromadendreno epóxido	1,26
32.893	1619	1640	τ-muurolol	2,84
33.007	1622	1644	α-muurolol	1,53
33.240	1628	1651	pogostol	2,63
33.337	1631	1652	α-cadinol	2,28
33.460	1634		NI**	1,10
33.830	1644		NI**	0,81
34.027	1649		NI**	0,53
34.350	1657		NI**	0,56
34.570	1663	1683	epi- α-bisabolol	0,48
<b>Diterpeno oxigenado</b>				<b>6,19</b>
49.497	2100	1942	<b>fitol</b>	<b>6,19</b>
<b>Outros</b>				<b>4,73</b>
10.497	1081	1100	n-nonanal	0,09
12.550	1133	1149	(ZZ)-nonen-1-al	0,07
35.037	1675	*	heptadeceno	1,12
36.300	1709	1740	4,8-epithioazuleno	1,56
40.567	1828	*	hexahidrofarnesilacetona	0,47
44.627	1947	1959	ácido n-hexadecanóico	0,56
53.467	2232		alcano (>C <sub>30</sub> )	0,86
<b>Total identificado</b>				<b>93,85</b>

FONTE: A autora (2018).

\*Biblioteca NIST14

\*\* NI: não identificado

Apenas um tipo de monoterpeneo foi encontrado, o limoneno com 0,12%; e apenas um tipo de diterpeno, o fitol com 6,19%.

Em uma análise quimiotaconômica realizada por Nakamura et al. (2010) sobre algumas espécies dos gêneros *Myrcia* sp. e *Eugenia* sp. da família Myrtaceae, houve a predominância de compostos sesquiterpenos (>90%) no óleos essenciais.

Este é o principal grupo de terpenos encontrado em óleos essenciais do gênero *Myrceugenia* sp. (STEFANELLO et al., 2011). Em um estudo de Limberger et al. (2002) com espécies do gênero, os óleos ricos em sesquiterpenos cíclicos pertenciam as vias de ciclização do cariofileno e germacreno, sendo que do grupo do cariofileno, os compostos mais abundantes foram o β-cariofileno e óxido de

cariofileno e do grupo do germacreno foram o espatulenol, globulol e epiglobulol, corroborando os dados encontrados na análise do óleo essencial de *Myrceugenia acutiflora*.

Os sesquiterpenos são formados por 3 unidades de 5 carbonos (C<sub>5</sub>). Devido o aumento na cadeia carbônica e adição de dupla ligação durante a síntese de terpenos, aumenta a possibilidade de ciclizações na molécula. Como consequência, o número de sesquiterpenos conhecidos é muito maior que o número de monoterpenos (DEWICK, 2007).

Os sesquiterpenos podem ser monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos, possuem odor mais acentuado e são menos voláteis que os monoterpenos, possuindo grande potencial estereoquímico (BUCKLE, 2015).

O componente majoritário do óleo essencial foi o (E)-cariofileno, também conhecido como  $\beta$ -cariofileno (ADAMS, 2007), com 8,6% da composição total da amostra. Este é um sesquiterpeno bicíclico presente em óleos essenciais de várias plantas, como *Eugenia caryophyllata*, *Piper nigrum* e no óleo de copaíba, *Copaifera reticulata*. Possui odor amadeirado e picante característico, permitindo seu uso em alimentos e bebidas, conferindo sabor cítrico. Também é utilizado como aromatizante em detergentes, sabões, loções e cremes (FERREIRA, 2014).

Possui muitas propriedades terapêuticas como atividade antimicrobiana, antiespasmódica, ansiolítica, protetora da mucosa gástrica (NEVES et al., 2018), antiviral contra o vírus do herpes HSV1 (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011), anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica e anestésica local (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Esta última é dependente da estrutura química da molécula, pois seu derivado óxido de cariofileno não possui atividade anestésica (XIAO et al., 2006).

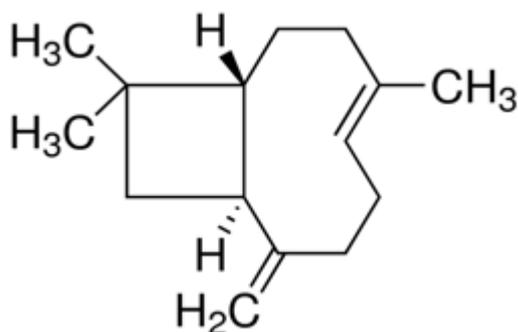
Na natureza, é encontrado junto com pequenas quantidades dos seus isômeros (Z)- $\beta$ -cariofileno (isocariofileno) e  $\alpha$ -humuleno (anteriormente chamado de  $\alpha$ -cariofileno), ou em uma mistura com seus produtos de oxidação, como o óxido de cariofileno (GERTSCH et al., 2008).

O  $\beta$ -cariofileno é um canabinóide natural (fitocannabinóide) sem ação psicoativa, o qual atua seletivamente nos receptores endógenos do tipo 2 (CB<sub>2</sub>), diminuindo a resposta inflamatória. Possui efeitos citoprotetores e ação antialérgica, com baixa irritação cutânea e toxicidade. É lipossolúvel, o que poderia diminuir sua biodisponibilidade, limitando sua aplicação médica. Por isso alguns estudos tem sido

feitos associando o  $\beta$ -cariofileno e ciclodextrina para aumentar sua solubilidade e absorção (MEZA; LEHMANN, 2018).

Apesar das suas conhecidas atividades biológicas, poucos estudos sobre síntese química tem sido feitos. A molécula de  $\beta$ -cariofileno tem uma estrutura química na qual um anel de 9 membros é fundido na conformação trans com um ciclobutano, de acordo com FIGURA 12. A estrutura é impedida estericamente e entra em rearranjos com facilidade. Isso torna o  $\beta$ -cariofileno uma molécula difícil de se obter sinteticamente (FARIA et al., 2017).

FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO  $\beta$ -CARIOFILENO



FONTE: A autora (2018).

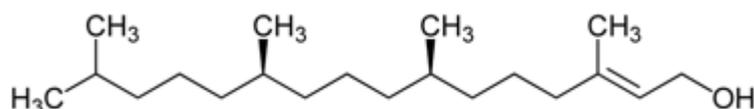
O segundo composto presente em maior quantidade é o fitol. Este é um álcool diterpênico insaturado, ilustrado na FIGURA 13. Os diterpenos não são muito encontrados em óleos essenciais, uma vez que sua molécula é grande e possui ponto de ebulição elevado, sendo difícil de encontrá-los após o processo de extração por arraste a vapor (BUCKLE, 2015).

O fitol é constituinte da molécula de clorofila (COSTA et al., 2012) e está presente em óleos essenciais de diferentes plantas aromáticas (SILVA et al., 2013). É um produto do metabolismo da clorofila, por isso está bastante disponível na natureza (SANTOS et al., 2013). Está ligado a clorofila por meio de uma ligação éster na sua cadeia lateral, tornando a clorofila uma molécula lipofílica (RONTANI; VOLKMAN, 2003). Quando o fitol está na sua forma livre, é tóxico para proteínas e membranas (LIPPOLD et al., 2012).

O fitol é um líquido viscoso, incolor e odor floral. Ingrediente de fragrâncias, utilizado em cosméticos como xampus, sabonetes, produtos de limpeza (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010) e precursor na síntese de vitamina E e vitamina K (POLATOĞLU et al., 2015).

Possui atividades antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antialérgica, imunoestimulante (DE MORAES et al., 2014), anticonvulsivante, antiespasmódica (DA SILVA et al., 2015), antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*; antiparasitária contra *Schistosoma mansoni*, citotóxica contra diferentes linhagens tumorais (ISLAM et al., 2015), antidepressiva e antidiabética (COSTA et al., 2016). Devido às suas atividades farmacológicas, sua molécula tem produzido vários análogos com o intuito de aumentar sua atividade (SAIKIA et al., 2010) e diminuir sua toxicidade (CHOWDHURY; FITCH; GHOSH, 2012).

FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO FITOL



FONTE: A autora (2018).

#### 4.4 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O peso e rendimento das frações de folhas e caules encontram-se nas TABELA 4 e 5, respectivamente. O particionamento dos extratos vegetais tem como objetivo a concentração de compostos bioativos em frações, para posterior isolamento e identificação de metabólitos por processos cromatográficos e espectroscópicos (SIMÕES et al., 2017).

TABELA 4 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS

Fração	Peso da Amostra	Rendimento em relação ao material vegetal	Rendimento em relação ao extrato bruto
Hexano	19,9058g	1,45%	17,24%
Clorofórmio	33,4766g	2,44%	29,00%
Acetato de Etila	1,6299g	0,12%	1,41%
Remanescente	11,6616g	0,85%	10,10%

FONTE: A autora (2018).

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE CAULES

<b>Fração</b>	<b>Peso da Amostra</b>	<b>Rendimento em relação ao material vegetal</b>	<b>Rendimento em relação ao extrato bruto</b>
Hexano	8,4904g	0,75%	21,18%
Clorofórmio	3,5937g	0,32%	8,96%
Acetato de Etila	1,36g	0,12%	3,39%
Remanescente	15,9521g	1,40%	39,80%

FONTE: A autora (2018).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO

Do extrato aquoso das folhas foi obtido volume de 2,1L. O extrato foi congelado e posteriormente seco no liofilizador. O rendimento do extrato aquoso das folhas foi 4,64%. A média do teor de resíduo seco, realizado em triplicata, foi 12,84%  $\pm$  0,057. Do extrato aquoso dos caules foi obtido volume de 1,5L. O rendimento foi 3,05. A média do teor de resíduo seco, realizado em triplicata foi 12,16%  $\pm$  0,009; de acordo com TABELA 3.

TABELA 6 – ANÁLISES DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULES

<b>Análises</b>	<b>Folhas</b>	<b>Caules</b>
Teor de Resíduo Seco (%) $\pm$ DP*	12,84 $\pm$ 0,057	12,16 $\pm$ 0,009
Rendimento (%)	4,64	3,05

FONTE: A autora (2018).

\*Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Do extrato bruto das folhas com volume igual a 7,5L foi calculado o teor de resíduo seco e após foi concentrado no rotaevaporador. O rendimento do extrato bruto foi equivalente a 8,43%. A média do teor de resíduo, realizado em triplicata, obteve como resultado 15,60%  $\pm$  0,045. Do extrato bruto dos caules foi obtido volume de 6,98L, com rendimento de 3,54%. A média do teor de resíduo seco teve como resultado 5,81%  $\pm$  0,036, conforme TABELA 7.

O extrato etanólico de folhas obteve melhor rendimento quando comparado ao extrato aquoso, indicando quantidade maior de compostos menos polares.

TABELA 7 – ANÁLISES DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E CAULES

<b>Análises</b>	<b>Folhas</b>	<b>Caules</b>
Teor de Resíduo Seco (%) ± DP*	15,60 ± 0,045	5,81± 0,036
Rendimento (%)	8,43	3,54

FONTE: A autora (2018).

\*Valores expressos como média ± desvio padrão.

#### 4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A análise fitoquímica preliminar é baseada em reações químicas que resultam no aparecimento de coloração e/ou precipitação das amostras analisadas, com o intuito de se identificar os principais grupos de metabólitos (SIMÕES et al., 2017).

A análise fitoquímica preliminar dos extratos aquosos de caules e folhas, mostrou a presença de grupos amino, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos e taninos para ambas as partes da planta, descrita na TABELA 8. Não houve reação positiva para pesquisa de ácidos voláteis e heterosídeos antociânicos.

TABELA 8 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULES

<b>Grupos Químicos</b>	<b>Caules</b>	<b>Folhas</b>
Heterosídeos Saponínicos	+	+
Heterosídeos Cianogênicos	+	+
Taninos	+	+
Grupos Amino	+	+

FONTE: A autora (2018).

Nas análises dos extratos hidroalcoólicos e frações de clorofórmio, acetato de etila e hexano foram obtidos resultado positivo para flavonoides e iridoides nas frações de folhas (TABELA 9); e positivo para esteroides, triterpenos e iridoides nas frações de caules (TABELA 10). Foi obtido resultado negativo para pesquisa de

alcaloides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, cumarinas e heterosídeos antraquinônicos.

TABELA 9 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS

<b>Grupos Químicos</b>	<b>Fração Hexano</b>	<b>Fração Clorofórmio</b>	<b>Fração Acetato de Etila</b>	<b>Fração Hidroalcoólica</b>
Flavonoides	-	-	-	+
Iridoides	+	+	-	-

FONTE: A autora (2018).

TABELA 10 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DE CAULES

<b>Grupos Químicos</b>	<b>Fração Hexano</b>	<b>Fração Clorofórmio</b>	<b>Fração Acetato de Etila</b>	<b>Fração Hidroalcoólica</b>
Esteroides	+	-	-	-
Triterpenos	-	+	-	-
Iridoides	+	+	-	-

FONTE: A autora (2018).

As mirtáceas são conhecidas pela presença de taninos, flavonoide e triterpenos em suas espécies (KATO; BACHI; HERNANDES, 2011). Glicosídeos cianogênicos foram poucos descritos na família (EVANS, 2009).

## 4.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

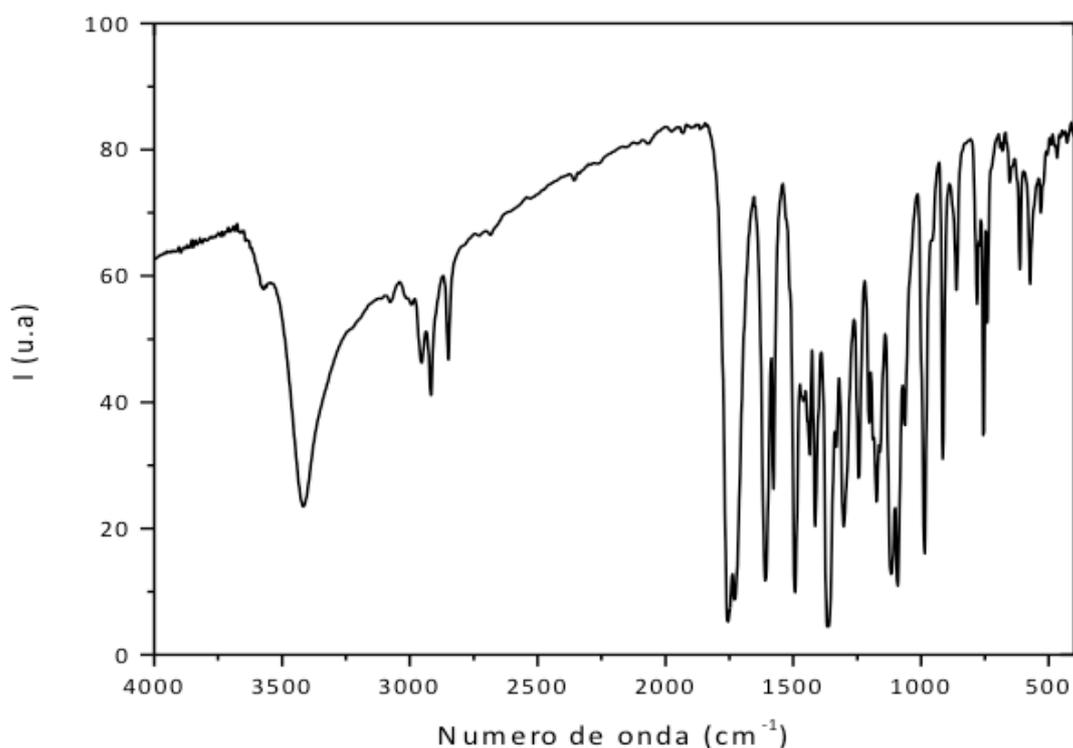
### 4.7.1 Resíduo Sólido de Caules

A amostra RSC, retirada do extrato bruto etanólico, é um sólido branco e insolúvel em uma variedade de solventes como hexano, clorofórmio, etanol, água e pouco solúvel em DMSO. O sólido, de peso 6,97g; possui rendimento de 0,58%. Para auxiliar na identificação do composto foram utilizadas 2 técnicas espectroscópicas: infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e ressonância magnética nuclear (RMN).

#### 4.7.1.1 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier

A amostra foi analisada por espectroscopia de infravermelho na faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro da amostra RSC apresentou absorções em 3417,55  $\text{cm}^{-1}$  e 1363,55  $\text{cm}^{-1}$  características de deformação axial de hidroxilas. Os estiramentos em 1755,06  $\text{cm}^{-1}$  e 1729,99  $\text{cm}^{-1}$  indicam presença de 2 lactonas. Estiramentos na faixa de 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  juntamente com estiramento em 756,03  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de C=C de anel aromático, conforme FIGURA 14.

FIGURA 14 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA RSC



FONTE: A autora (2018).

Os dados do espectro de infravermelho obtidos comparados com dados da literatura, conforme TABELA 11; juntamente com os dados de RMN, sugerem que a amostra RSC é o ácido 3,3', 4 tri-o-metil elágico.

TABELA 11 – VALORES DAS BANDAS DE ABSORÇÃO NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (CM<sup>-1</sup>) DO ÁCIDO 3,3',4-TRI-O-METILELÁGICO

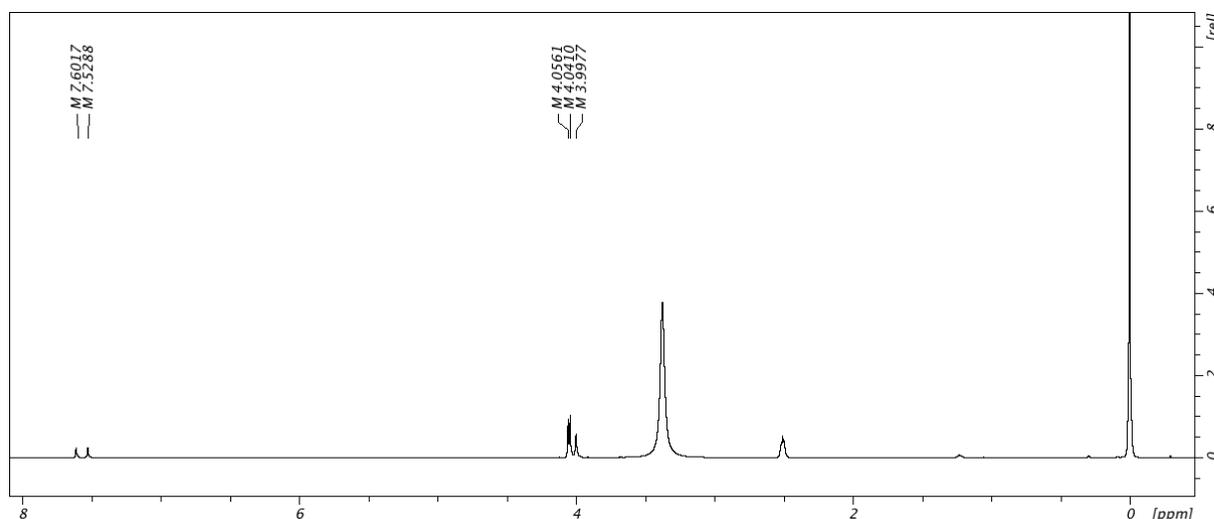
Ácido 3,3',4-tri-o-metilelágico	
Autora (2017)	Alam;Tsuboi (2007)
3417,55 cm <sup>-1</sup>	3414 cm <sup>-1</sup>
1755,06 cm <sup>-1</sup>	1755 cm <sup>-1</sup>
1729,99 cm <sup>-1</sup>	1727 cm <sup>-1</sup>
1608,49 cm <sup>-1</sup>	1607 cm <sup>-1</sup>
1492,77 cm <sup>-1</sup>	1492 cm <sup>-1</sup>
1413,69 cm <sup>-1</sup>	1414 cm <sup>-1</sup>
1363,55 cm <sup>-1</sup>	1359 cm <sup>-1</sup>
1301,83 cm <sup>-1</sup>	1304 cm <sup>-1</sup>
1174,54 cm <sup>-1</sup>	1174 cm <sup>-1</sup>
1101,25 cm <sup>-1</sup>	1090 cm <sup>-1</sup>
756,03 cm <sup>-1</sup>	755 cm <sup>-1</sup>

FONTE: A autora (2018).

#### 4.7.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

A amostra RSC foi solubilizada em DMSO-d<sub>6</sub> e enviada para RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC e HSQC. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostrou a presença de 2 singletos de deslocamentos químicos de δ7,53 e δ7,60; característico de hidrogênios ligados a anel aromático. Há a presença de 3 singletos nos deslocamentos δ4,06; δ4,04 e δ4,00; indicando a presença de 3 metoxilas; conforme FIGURA 15.

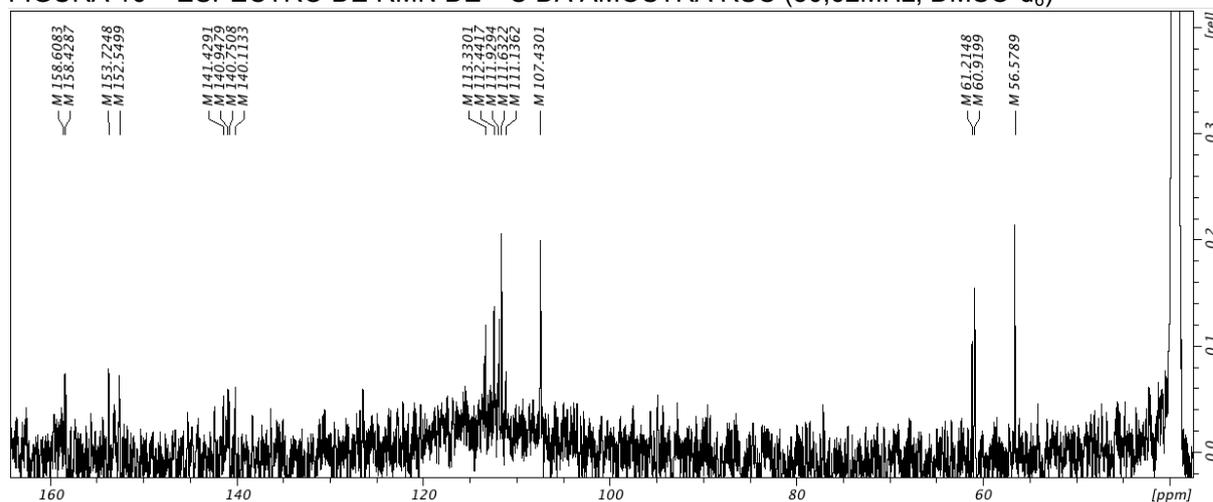
FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DA AMOSTRA RSC (200,13MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)



FONTE: A autora (2018).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os sinais em  $\delta 56,6$ ;  $\delta 60,9$  e  $\delta 61,2$  indicam a presença de 3 carbonos de metoxilas, já os sinais em  $\delta 158,6$  e  $\delta 158,4$  sugerem a presença de 2 carbonilas na estrutura química, de acordo com a FIGURA 16.

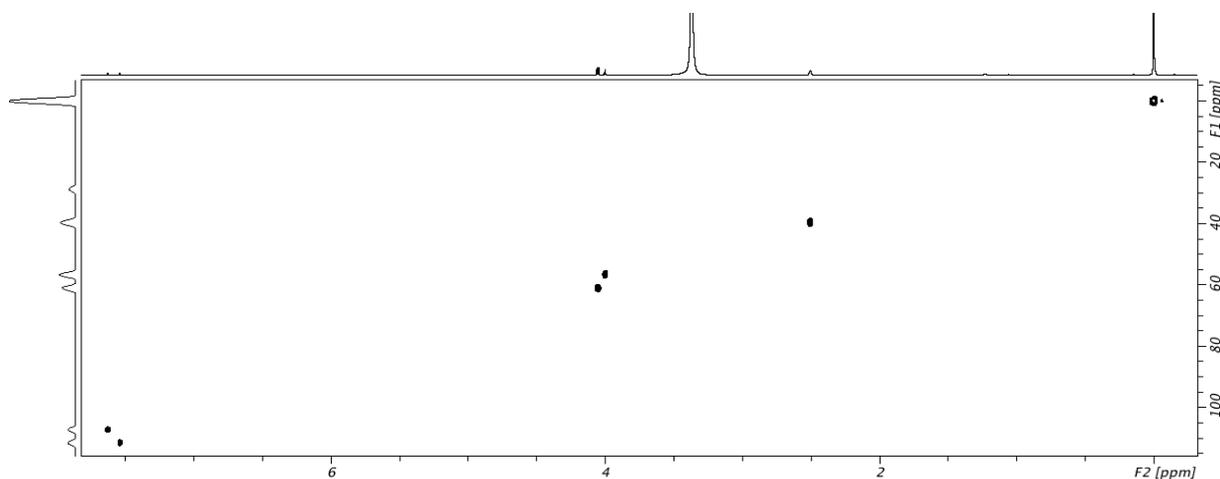
FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA AMOSTRA RSC (50,62MHz; DMSO- $d_6$ )



FONTE: A autora (2018).

No experimento de HSQC, observa-se a correlação direta entre os hidrogênios e os carbonos. Os hidrogênios das 3 metoxilas a  $\delta 4,06$ ; a  $\delta 4,00$  e a  $\delta 4,04$  estão correlacionados, respectivamente, com os carbonos a  $\delta 61,2$ ; a  $\delta 56,6$  e a  $\delta 60,9$ . Já os hidrogênios ligados a anel aromático a  $\delta 7,60$  e  $\delta 7,53$  estão correlacionados, respectivamente, aos carbonos  $\delta 107,4$  e  $\delta 111,6$ ; demonstrado na FIGURA 17.

FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN HETERONUCLEAR HSQC DA AMOSTRA RSC (400MHz; DMSO- $d_6$ )

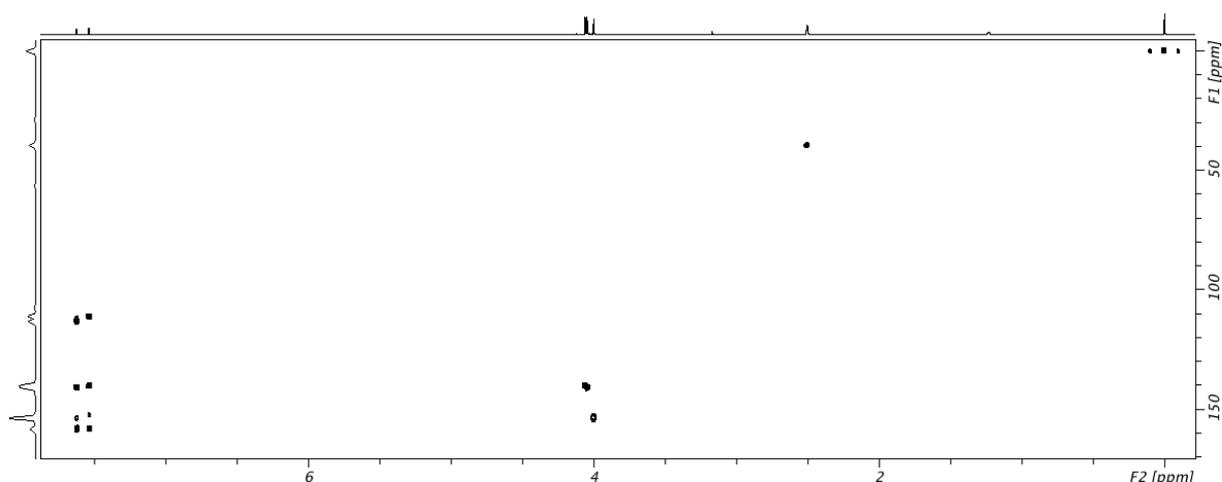


FONTE: A autora (2018).

Os dados obtidos pelo HMBC corroboram os achados dos experimentos anteriores. No experimento de HMBC, observa-se a correlação entre hidrogênios e carbonos a longa distância (até 3 ligações). Desta forma podemos confirmar que o hidrogênio aromático a  $\delta 7,60$  está correlacionado a longa distância com os carbonos  $\delta 111,9$ ;  $\delta 140,9$  e  $\delta 158,6$ .

Também observa-se um ponto no espectro não tão forte, característico de correlação a 2 ligações, confirmando a ligação com o carbono  $\delta 153,7$ . O segundo hidrogênio aromático a  $\delta 7,53$  também está correlacionado a longa distância com 3 carbonos a  $\delta 111,1$ ;  $\delta 140,1$  e  $\delta 158,4$ ; e a média distância ao carbono  $\delta 152,5$ . Os hidrogênios das metoxilas  $\delta 4,00$ ;  $\delta 4,06$  e  $\delta 4,04$  possuem uma correlação a longa distância, respectivamente,  $\delta 152,5$ ;  $\delta 140,1$  e  $\delta 140,9$ ; de acordo com FIGURA 18.

FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN HETERONUCLEAR HMBC DA AMOSTRA RSC (400MHz, DMSO- $d_6$ )



FONTE: A autora (2018).

A substância proposta para a amostra RSC é o ácido 3,3',4 tri-*o*-metil elágico. Sua estrutura química está demonstrada na FIGURA 19. Os valores encontrados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , assim como os valores obtidos pelos autores Nduwke e Zhao (2007), encontram-se na TABELA 12.

TABELA 12 – DADOS ESPECTRAIS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) COMPARADOS COM A LITERATURA

<b>Ácido 3,3',4-tri-o-metilelágico</b>				
Posição C	Autora (2018)		Ndukwe; Zhao (2007)	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	111,1		111,2	
2	140,7		140,6	
3	140,1		140,2	
4	152,5		152,6	
5	111,6	7,53 (s)	111,6	7,55 (s)
6	112,5		112,5	
7	158,4		158,3	
1'	111,9		111,9	
2'	141,4		141,4	
3'	140,9		140,8	
4'	153,7		153,8	
5'	107,4	7,60 (s)	107,4	7,65 (s)
6'	113,3		113,3	
7'	158,6		158,5	
3-OCH <sub>3</sub>	61,2	4,04 (s)	61,3	4,04 (s)
3'-OCH <sub>3</sub>	60,9	4,06 (s)	61,0	4,06 (s)
4'-OCH <sub>3</sub>	56,6	4,00 (s)	56,7	4,01 (s)

FONTE: A autora (2018).

O ácido 3,3',4-tri-o-metil elágico é um tipo de metabólito secundário estável, insolúvel e geralmente encontrado em tecidos mortos como casca e madeira; e já foi encontrado em espécies de mirtáceas como *Campomanesia xanthocarpa*; *Syzygium maire*; *Kunzea ericoides* (LOWRY, 1968). No passado, os derivados O-alquilados do ácido elágico foram utilizados como marcador taxonômico, uma vez que sua ocorrência é mais restrita que o seu ácido precursor (FILHO et al., 1984). Também conhecido como nasutin B, a substância está presente na hemolinfa de cupins e secreção glandular de castores (MOORE, 1964).

O ácido elágico e seus análogos são utilizados como ingredientes anti-idade, clareadores de pele (ALAM; TSUBOI, 2007) e anticaspa (DERKX, 2011).

Algumas atividades farmacológicas já foram atribuídas a esta substância como antimicrobiana (NDUKWE; ZHAO, 2007), imunomodulatória, antiproliferativa (ELHASSAN et al., 2015), antioxidante (WANG et al., 2004) e antihemorrágica (BROOKES; DUTTON, 2007), sendo que esta pode estar associada a capacidade do composto em promover a proliferação de megacariócitos (GAO et al., 2014), células responsáveis pela produção de plaquetas.

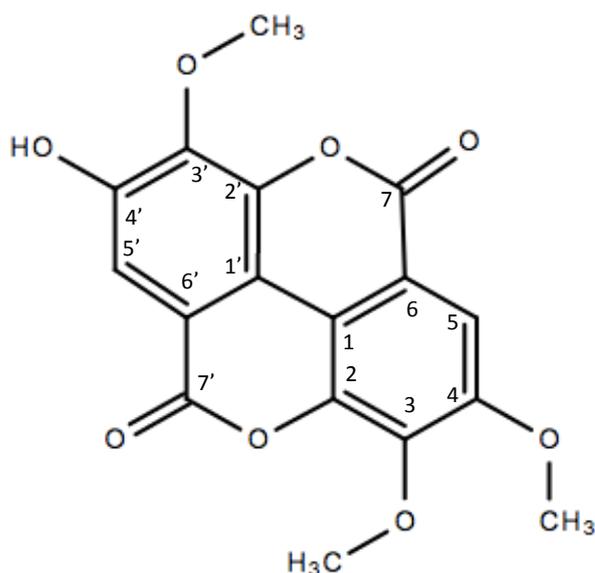
Bai et al. (2008) estudaram atividade do ácido elágico e derivados, na inibição da diferenciação de adipócitos e redução da absorção de glicose. O ácido 3,3',4-tri-

o-metil elágico obteve baixa atividade na inibição de células de gordura, porém demonstrou atividade acentuada na redução da absorção de açúcar.

De acordo com Nasser et al. (2008), foi sugerido que a citotoxicidade do ácido elágico e derivados está relacionada às hidroxilas pertencentes a posições 3 e 3', sendo que os derivados mais alquilados, como ácido 3,3',4-tri-o-metil elágico, não apresentou atividade tóxica.

A síntese química de derivados simétricos como o 2,2-di-o-metil elágico é satisfatória, porém não é adequada para ácido 3,3',4-tri-o-metil elágico, uma vez que vários compostos metilados são formados, dificultando sua separação (ALAM; TSUBOI, 2007). O estudo dos derivados do ácido elágico tem como obstáculo a baixa solubilidade dos compostos, limitando seu isolamento, purificação e identificação (HILLIS; YAZAKI, 1973).

FIGURA 19 – ESTRUTURA DO ÁCIDO 3,3',4 TRI-O-METIL ELÁGICO



FONTE: A autora (2018).

#### 4.7.2 Resíduo Sólido de Folhas (RSF)

A amostra RSF, recuperado do extrato bruto de folhas, é um sólido bege e insolúvel em alguns solventes orgânicos e pouco solúvel em DMSO. A amostra resultou em 5,9g e rendimento de 0,43%. Foi solubilizada em DMSO-d<sub>6</sub> e feita

análise por RMN de  $^1\text{H}$ . Suas características físico-químicas (sólido branco pouco solúvel), juntamente com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , auxiliou na identificação desta substância como sendo a mesma substância da amostra RSC, o derivado do ácido elágico, identificado na amostra RSC.

#### 4.7.3 Fração Remanescente de Caules (FRC)

Foram feitas CCDs das amostras obtidas da FRC. As placas foram visualizadas no UV de comprimento de onda longo (365nm), apresentando fluorescência verde para amostra 0 e fluorescência azul para as amostras 1 a 5, o que demonstra a presença de anel aromático ou duplas ligações conjugadas. As placas foram reveladas com NEU e posteriormente com cloreto férrico, dando negativo para presença de flavonoides e taninos. As amostras 1 a 5 foram reunidas, totalizando 6,9mg. Esta amostra foi denominada FRC-02 e foi enviada para ressonância magnética nuclear, para observação dos núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

As outras frações da coluna foram reunidas de acordo com suas características apresentadas na CCD. Foi utilizada como fase móvel tolueno 85%, acetato de etila 8% e acetona 7%. As placas foram reveladas com cloreto férrico, dando positivo para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Os frascos 13 ao 40 foram reunidos; totalizando 7,41g. Com esta amostra, foi feita cromatografia por exclusão molecular utilizando sephadex LH 20 como fase estacionária, metanol/água destilada (90/10) como fase móvel. A cromatografia resultou em 49 frascos e foi acompanhada por CCD, utilizando cloreto férrico como revelador.

Embora estas amostras demonstrem a presença de taninos, não foi possível o isolamento e identificação das estruturas químicas.

##### 4.7.3.1 Amostra FRC-02

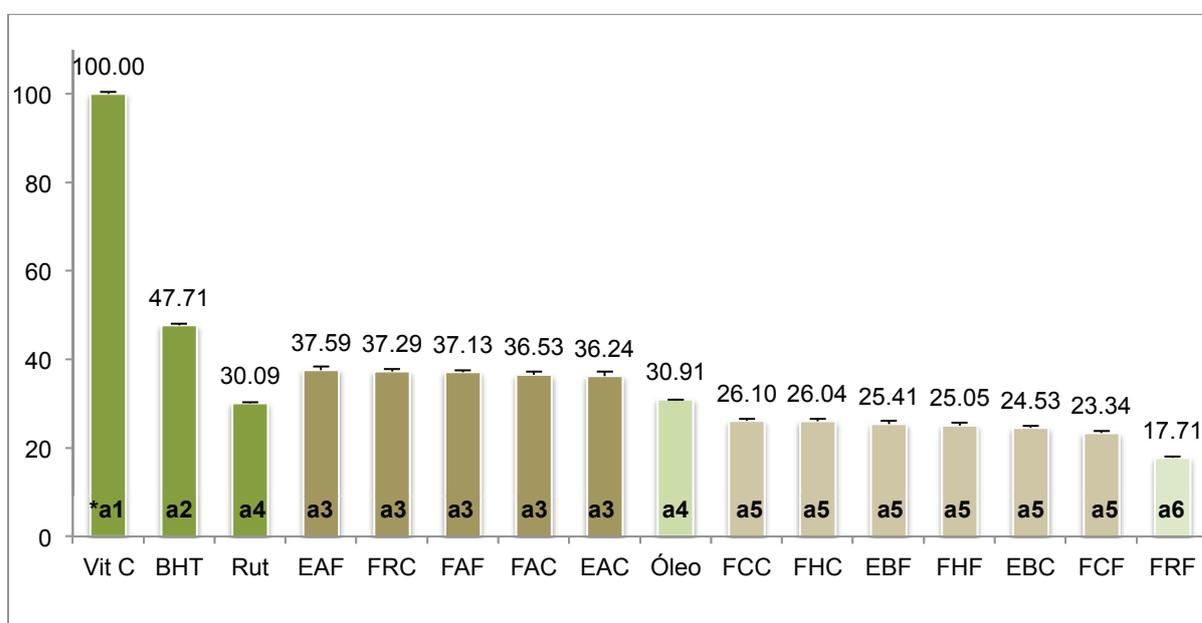
A amostra fração remanescente de caules FRC-02, da junção dos frascos 1 ao 5 da coluna cromatográfica, é um sólido branco pouco solúvel em solventes orgânicos. Da mesma forma que a amostra RSF, a amostra mostrou as mesmas características do ácido 3,3',4-tri-o-metilelágico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

## 4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.8.1 Método do Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante dos extratos aquosos, brutos e frações de folhas e caules foi avaliada pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio, utilizando como padrões BHT, rutina e vitamina C, sendo a última utilizada para o cálculo da atividade antioxidante relativa, conforme demonstrado no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO



FONTE: A autora (2018).

\* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Vit C: vitamina C, BHT: butilhidroxitolueno, Rut: rutina, FHF: fração hexano folhas, FHC: fração hexano caules, FCF: fração clorofórmio folhas, FCC: fração clorofórmio caules, FAF: fração acetato folhas, FAC: fração acetato caules, FRF: fração remanescente folhas, FRC: fração remanescente caules, EAF: extrato aquoso folhas, EAC: extrato aquoso caules.

O método do fosfomolibdênio é um método espectroscópico utilizado para determinação quantitativa da atividade antioxidante (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Baseia-se na redução do molibdênio  $\text{Mo}^{6+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$  pela amostra e a consequente formação do complexo fosfomolibdênio, o qual apresenta coloração verde em pH ácido. Esse teste avalia a capacidade antioxidante total de extratos vegetais (PHATAK; HENDRE, 2014).

Os extratos e frações EAF, EAC, FAF, FAC, FRC apresentaram as melhores atividades antioxidantes em comparação com outras frações, superando a atividade do padrão rutina (30,09%), um flavonoide de reconhecida atividade antioxidante.

A atividade destas amostras pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos, normalmente presentes nas frações mais polares, em concordância com os resultados obtidos na análise fitoquímica preliminar, a qual deu positivo para a presença de flavonoides para folhas e taninos hidrolisáveis para ambas as partes vegetais. Embora não tenham sido identificados, os taninos hidrolisáveis foram encontrados na coluna cromatográfica da fração remanescente da caules. Os compostos fenólicos são capazes de reduzir o molibdato e foram encontrados em grandes quantidades nos pecíolos das folhas, conforme estudo morfoanatômico da espécie *Myrceugenia acutiflora*.

Foi isolado o ácido 3,3',4-tri-*o*-metil elágico da fração remanescente de caules, extrato bruto de caules e folhas. Essa substância possui uma hidroxila em sua molécula, a qual pode reagir com o molibdênio, mudando seu estado de oxidação. Isso pode indicar que o ácido participa da atividade antioxidante, embora não seja o único responsável pela ação, uma vez que a atividade antioxidante da fração remanescente é maior que a atividade dos extratos brutos.

O óleo essencial apresentou boa atividade antioxidante, igual a atividade da rutina. Este resultado deve-se, provavelmente, a presença de sesquiterpenos oxigenados; como globulol, (-)-espatulenol e  $\tau$ -muurulol, os quais possuem hidroxilas capazes de reduzir o molibdato do reagente. Esta atividade também pode estar relacionada ao segundo composto majoritário do óleo, o fitol, o qual possui elevada atividade antioxidante (COSTA et al., 2016).

#### 4.8.2 Método do DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O DPPH• é um radical livre estável devido à deslocalização de seu elétron na molécula, o qual é responsável pela coloração violeta do reagente (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Em meio alcoólico, é reduzido por espécie doadora de hidrogênio e a absorbância da solução vai diminuindo a medida em que a reação se processa (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Um decréscimo na absorbância da solução do DPPH• indica um aumento da capacidade antioxidante da substância

analisada (SINGH et al., 2012). O método do DPPH• é simples e não requer tratamento prévio da amostra (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

A TABELA 13 mostra as equações de reta utilizadas para calcular a  $CI_{50}$  dos extratos brutos, frações, óleo essencial e padrões pelo método do DPPH•. Várias concentrações foram testadas para o óleo essencial, porém não foi possível avaliar sua  $CI_{50}$ , sendo o seu valor maior que 500 $\mu$ g/ml.

As amostras com maior atividade antioxidante foram a fração acetato de etila de caules, possuindo  $CI_{50}$  5,61 $\mu$ g/ml; e fração acetato folhas com  $CI_{50}$  6,71 $\mu$ g/ml. Ambas não diferem estatisticamente, apresentando a mesma capacidade antioxidante. Tanto para o ensaio do fosfomolibdênio quanto para o DPPH•, as atividades antioxidantes estão relacionadas às frações mais polares, com exceção da fração remanescente de folhas, para ambos os testes.

A substância isolada não possui atividade antioxidante acentuada pelo método do DPPH•. Em um estudo de Tukiran et al. (2017), o ácido 3,3',4-tri-*o*-metil elágico obteve valor de  $CI_{50}$  72,1 $\mu$ g/ml; valor considerado alto em comparação com os valores obtidos para extratos e frações neste trabalho.

Algumas frações obtiveram atividade antioxidante pronunciada no teste do fosfomolibdênio e baixa atividade no teste do DPPH•. Uma das razões pode ser devido ao mecanismo de ação antioxidante envolvido.

O teste fosfomolibdênio avalia a capacidade redutora das amostras através do mecanismo de transferência de elétron (PHATAK; HENDRE, 2014), reagindo inespecificamente. No DPPH•, há 2 mecanismos de ação para neutralizar o radical: doação de elétrons e transferência de átomo de hidrogênio. O último mecanismo acredita-se que contribui para a atividade antioxidante de forma menos significativa (SHAHIDI; ZHONG, 2015), uma vez que esta reação se processa mais lentamente em solventes que fazem ligação de hidrogênio intermolecular, como metanol e etanol (MAGALHÃES et al., 2008).

A atividade antioxidante também depende da estrutura química compostos (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009), pois o impedimento estérico do radical DPPH• é determinante na velocidade de reação, sendo que moléculas pequenas tem maior acesso ao radical e conseqüentemente, maior atividade antioxidante (MAGALHÃES et al., 2008).

As frações hexânicas e o óleo essencial apresentaram atividades muito inferiores no teste do DPPH•. O BHT apresentou diferentes atividades quando

comparado aos padrões rutina e vitamina C no teste do DPPH• e do fosfomolibdênio. Isso pode ser devido a sua cinética de reação mais lenta (DAVID et al., 2010) enquanto a vitamina C e a rutina tem uma cinética de reação mais rápida (DE OLIVEIRA, 2011).

TABELA 13 – VALORES DE  $CI_{50}$  PARA EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DO DPPH•

Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Teste de Tukey*	Equação da reta	$R^2$
Vit C	2,06	a1	$y = -3,5873x + 57,375$	0,99045
Rut	6,78	a2	$y = -5,5483x + 87,616$	0,99039
BHT	8,55	a3	$y = -4,2779x + 86,576$	0,99107
FAC	5,61	a1 a2	$y = -8,7763x + 98,853$	0,99239
FAF	6,71	a1 a2	$y = -7,7102x + 102,71$	0,99212
EAF	10,41	a3	$y = -4,4674x + 96,509$	0,98759
FRC	12,01	a3 a4	$y = -4,3491x + 101,85$	0,99942
EAC	13,82	a4	$y = -1,3706x + 70,231$	0,98203
EBC	25,29	a5	$y = -1,8821x + 99,728$	0,99737
FRF	26,42	a5	$y = -1,8146x + 97,795$	0,99515
EBF	26,5	a5	$y = -1,6581x + 94,631$	0,99773
FCF	34,97	a6	$y = -1,0876x + 87,639$	0,99953
FCC	61,95	a7	$y = -0,7887x + 98,866$	0,99067
FHC	101,63	a8	$y = -4,281x + 90,645$	0,98852
FHF	330,68	a9	$y = -0,1151x + 88,027$	0,99355
Óleo	>500	a10	-	-

FONTE: A autora (2018).

\* amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

Vit C: vitamina C, Rut: rutina, BHT: butilhidroxitolueno, FAC: fração acetato caules, FAF: fração acetato folhas, EAF: extrato aquoso folhas, FRC: fração remanescente caules, EAC: extrato aquoso caules, EBC: extrato bruto caules, FRF: fração remanescente folhas, EBF: extrato bruto folhas, FCF: fração clorofórmio folhas, FCC: fração clorofórmio caules, FHC: fração hexano caules, FHF: fração hexano folhas.

#### 4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco apresentou resultado positivo somente para a amostra do óleo essencial, os extratos e frações não apresentaram atividade inibitória. O óleo essencial demonstrou atividade apenas contra a bactéria gram positiva *S. aureus*, sem inibição do

crescimento contra a bactéria gram negativa *E. coli* e contra a levedura *C. albicans*, conforme TABELA 14.

A média dos halos de inibição para esta bactéria foi  $13,52\text{mm} \pm 0,36$ . Amostras com halo superior a 13mm são consideradas ativas (ALVES et al., 2000; DE CERQUEIRA et al., 2007), devendo sua atividade ser quantificada por outro teste, como Concentração Mínima Inibitória (CIM); porém devido ao baixo rendimento do óleo, não foi possível realizar esta análise.

TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. acutiflora*

Micro-organismo	Diâmetro dos halos (mm)		
	Óleo essencial	Cloranfenicol	Cetoconazol
<i>Staphylococcus aureus</i>	$13,52 \pm 0,36$	$21,07 \pm 0,82$	-
<i>Escherichia coli</i>	-	$22,41 \pm 0,23$	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	$11,44 \pm 0,41$

FONTE: A autora (2018).

De acordo com Soković et al. (2010), cepas bacterianas respondem diferentemente aos óleos essenciais e seus componentes, sugerindo que diferentes compostos possuem mecanismos de ação distintos; ou que o metabolismo de alguns micro-organismos é capaz de se adaptar aos efeitos deletérios. Porém, o mecanismo da ação antimicrobiana de óleos essenciais normalmente aceito é que, devido a sua característica lipofílica, consegue atravessar a membrana de micro-organismos, causando sua ruptura (BAKKALI et al., 2007).

Bactérias gram positivas como *S. aureus* são mais suscetíveis aos óleos essenciais que bactérias gram negativas, pois sua parede celular permite que compostos lipofílicos entrem com mais facilidade (NAZZARO et al., 2013).

Outro fator que colabora para a atividade inibitória do óleo essencial frente a cepa *S. aureus* é o fato do composto majoritário  $\beta$ -cariofileno ter atividade antimicrobiana comprovada contra a bactéria (BERGERON; CARRIER; RAMASWAMY, 2012). Entretanto, não só compostos majoritários influenciam a resposta, a participação de componentes em menor quantidade e o sinergismo entre eles também favorecem o resultado final (JUDZENTIENE et al., 2010). Assim, o composto principal também contribui para esta atividade através do sinergismo com outros componentes presentes na mistura do óleo essencial. Em estudo publicado

por Neta et al. (2016), a atividade antimicrobiana do  $\beta$ -cariofileno é maior na mistura do óleo essencial que a substância pura.

Um fator que altera a resposta do teste de difusão em disco é a solubilidade dos constituintes, pois substâncias lipofílicas presentes no óleo tem dificuldade de se difundir uniformemente no ágar (CHORIANOPOULOS et al., 2004; DE CERQUEIRA et al., 2007), dando valores menores de inibição que o teste quantitativo CIM (SOKOVIĆ et al. 2010). Desta forma, atividade antimicrobiana do óleo essencial pode ser ainda maior que a encontrada neste teste preliminar para a cepa de *S. aureus*.

#### 4.9 TOXICIDADE UTILIZANDO *Artemia salina*

Toxicidade frente à *Artemia salina* é um teste de amplo espectro capaz de detectar a presença de compostos bioativos (GEETHAA et al., 2013), demonstrar atividade biológica e inferir a segurança de extratos de plantas (OGUGU et al., 2012). De acordo com Amarante et al. (2011), substâncias que apresentam  $CL_{50}$  maior que  $500\mu\text{g/ml}$  são consideradas pouco tóxicas, substâncias que apresentam  $CL_{50}$  entre  $500\mu\text{g/ml}$  a  $100\mu\text{g/ml}$ , possuem toxicidade intermediária e substâncias com  $CL_{50}$  menor que  $100\mu\text{g/ml}$  tem toxicidade elevada.

As frações que apresentaram atividade tóxica foram extrato bruto de folhas (EBF) e óleo essencial. O EBF demonstrou leve toxicidade, com concentração letal  $CL_{50}$   $797,74\mu\text{g/ml}$  enquanto o óleo demonstrou alta toxicidade, concentração letal de  $CL_{50}$   $46,68\mu\text{g/ml}$ , apresentando o dobro de letalidade quando comparada ao controle positivo sulfato de quinidina, sendo sua concentração letal de  $CL_{50}$   $101,03\mu\text{g/ml}$ , demonstrado na TABELA 15.

Toxicidade elevada de óleo essencial já foi encontrada em outras espécies de mirtáceas como *Psidium myrsinites*, a qual possui o mesmo composto majoritário  $\beta$ -cariofileno e com  $CL_{50}$   $95,30\mu\text{g/ml}$  (DURÃES et al., 2017).

Devido ao seu caráter lipofílico, o óleo consegue atravessar membranas celulares. Um mecanismo de ação proposto por Raut e Karuppayil (2014) é a permeabilização da célula, causando a perda de íons e outros componentes, levando a morte celular. O efeito tóxico deve-se provavelmente ao sinergismo dos constituintes químicos presentes no óleo essencial, uma vez que o componente majoritário contribui com apenas 8,6% da concentração do óleo.

Em um estudo de citotoxicidade realizado por Adorjan e Buchbauer (2010), o  $\beta$ -cariofileno em baixas concentrações aumentou em mais de 20% as atividades citotóxicas de outros compostos –  $\alpha$ -humuleno e isocariofileno, e aumentou 10 vezes a atividade antitumoral do paclitaxel. Foi sugerido no estudo que o  $\beta$ -cariofileno facilita a entrada do medicamento na célula, causando seu acúmulo e morte celular.

O segundo composto majoritário, fitol, também apresenta atividade citotóxica, inclusive sobre *Artemia salina* (ISLAM et al., 2017). Sua toxicidade é resultado de sua característica anfótera, atuando como detergente em membranas biológicas (SPICHER et al., 2017).

Embora o óleo essencial de *M. acutiflora* tenha acentuada atividade antioxidante no teste do fosfomolibdênio, este também possui atividade tóxica. De acordo com González-Coloma et al. (2013), muitos testes físico-químicos *in vitro* de óleos essenciais boa atividade antioxidante, porém estudos recentes mostram que os óleos, dependendo da concentração, podem atuar como pró-oxidantes em células eucarióticas, afetando membranas e organelas.

Segundo Bakkali et al. (2007), a citotoxicidade dos óleos essenciais depende da composição química e do conteúdo de compostos fenólicos. Um mecanismo de ação sugerido é que os óleos essenciais penetram na membrana mitocondrial e; através da cadeia transportadora de elétrons, geram radicais livres, os quais oxidam e danificam lipídios, proteínas e DNA. Alguns constituintes dos óleos essenciais permeiam a membrana mitocondrial, entram em contato com espécies reativas de oxigênio (EROs) e são oxidados, gerando radicais fenoxil altamente reativos. Assim, alguns produtos naturais como vitaminas A, C, E, flavonoides e compostos fenólicos de reconhecida atividade antioxidante *in vitro*, se tornam pró-oxidantes, causando danos e levando a morte celular por apoptose e/ou necrose.

A atividade tóxica de substâncias frente à *Artemia salina* já foi correlacionada com atividade inseticida e citotóxica contra tumores sólidos humanos (LEITE et al., 2009).

Devido a volatilidade do óleo, seu baixo rendimento e sua imiscibilidade com a água, o uso popular de infusão ou decocção não traria riscos, uma vez que o extrato aquoso não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*.

TABELA 15 – ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* E CL<sub>50</sub> UTILIZANDO EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEO DE FOLHAS DE *M. acutiflora*

<b>Amostra</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/ml)</b>	<b>Intervalo de confiança 95%</b>
Extrato Bruto Folhas	797,74	601,59 – 1179,51
Óleo Essencial Folhas	46,68	36,56 – 54,19
Sulfato de Quinidina	101,03	59,52 – 154,92

FONTE: A autora (2018).

## 5 CONCLUSÃO

Na análise fitoquímica preliminar foram observados nos extratos aquosos taninos, heterosídeos cianogênicos, aminogrupos e saponinas; e nos extratos alcóolicos e frações iridoides, flavonoides, esteroides e/ou triterpenos. Esses grupos direcionam o estudo químico da espécie.

O óleo essencial se mostrou promissor nos testes biológicos, possuindo elevada toxicidade no teste contra *Artemia salina*, atividade antimicrobiana frente a bactéria *S. aureus* e boa atividade antioxidante no teste do fosfomolibdênio.

Sugere-se testes adicionais como atividade antimicrobiana quantitativa através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), cultivo celular e outros modelos biológicos para testar a toxicidade, uma vez que estas atividades são empregadas no tratamento de infecções e diversas neoplasias. Embora o método de extração do óleo essencial utilizado neste trabalho seja preconizado pela Farmacopeia Brasileira, outros métodos podem ser testados com o objetivo de aumentar o rendimento da extração. Também podem ser realizados estudos de sazonalidade da produção deste metabólito secundário, o que poderia indicar a melhor época para a extração.

Na análise morfológica e anatômica das partes aéreas de *M. acutiflora* foram encontradas características universais presentes na família Myrtaceae como floema interno ao xilema, grandes quantidades de cristais de oxalato de cálcio e compostos fenólicos. Também foram encontradas características incomuns como presença de 1 tricoma glandular e ausência de cavidades secretoras. A presença de estruturas semelhantes a tricomas dibrâquiados corroboram os estudos morfoanatômicos do gênero. O estudo de anatomia e morfologia vegetal contribui para a correta identificação da espécie e pesquisa de substâncias bioativas.

A atividade antioxidante de extratos e frações se mostrou promissora. No teste do fosfomolibdênio, das 13 amostras testadas, 5 amostras tiveram atividade maior que o padrão rotina e o óleo mostrou atividade próxima ao flavonoide. No teste do DPPH•, as mesmas amostras obtiveram os melhores resultados, exceto o óleo essencial. As outras frações tiveram resultados muito inferiores neste teste, o que pode indicar mecanismos de reação diferentes. Pode-se realizar estudo cinético das amostras com o reagente DPPH• para avaliar se, de fato estas frações não possuem atividade, ou se sua atividade antioxidante é lenta.

No teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, o extrato bruto de folhas teve baixa toxicidade, enquanto os outros extratos e frações não demonstraram qualquer atividade tóxica, mesmo com resultados positivos na análise fitoquímica preliminar para heterosídeos cianogênicos e saponinas, grupos químicos que podem ser tóxicos. Embora este teste seja preliminar e mais testes sejam necessários, estes resultados sugerem que o uso de extratos da planta não oferece riscos à saúde.

No ensaio de atividade antimicrobiana, nenhum extrato ou fração mostrou atividade relevante frente às cepas testadas.

A presença do ácido 3,3',4-tri-*o*-metilelágico foi descrita pela primeira vez para a espécie *Myrceugenia acutiflora*. Esta substância possui várias atividades biológicas documentadas e já foi encontrada em outras plantas da família Myrtaceae. Este achado está em concordância com a característica da família de possuir elevado conteúdo de taninos e sua presença pode indicar que a espécie possui o ácido elágico e/ou outros derivados, os quais poderiam justificar os bons resultados encontrados nos testes antioxidantes *in vitro* dos extratos e frações. No entanto, estes compostos não foram encontrados no neste trabalho, devendo ser procurados em estudos futuros. O ácido 3,3',4-tri-*o*-metilelágico foi encontrado em grande quantidade nos extratos de caules e folhas desta espécie, e na fração remanescente de caules, porém sua pouca solubilidade restringe seu estudo e uso. Outros estudos de derivatização química podem ser realizados com o intuito de contornar este problema.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Myrceugenia acutiflora* possui diversos metabólitos secundários, demonstrando seu potencial farmacológico. Os resultados obtidos de identificação de compostos químicos e atividades biológicas preliminares da espécie são promissores, devendo ter seu estudo continuado. Este trabalho contribuiu para o conhecimento da espécie *Myrceugenia acutiflora*.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1. ed. Illinois: Allured publishing, 2007.
- ADJORDAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407-426, 2010.
- ALAM, A.; TSUBOI, S. Total synthesis of 3,3',4-tri-O-methylellagic acid from gallic acid. **Tetrahedron**, v. 63, p.10454-10465, 2007.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2001.
- ARMSTRONG, L. **Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* CAMBESS., Myrtaceae**. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ARRUDA, M. F. C. **Estudos Morfoanatômico, Fitoquímico e de Atividades Biológicas de *Camponesia guazumifolia* (CAMBESS) O. Berg, Myrtaceae**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2009.
- BAI, N. et al. Active Compounds from *Lagerstroemia speciosa*, Insulin-like Glucose Uptake-Stimulatory/Inhibitory and Adipocyte Differentiation-Inhibitory Activities in 3T3-L1 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11668-11674,

2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.157, p. 257-267, 2014.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERGERON, C.; CARRIER, D. J.; RAMASWAMY, S. **Biorefinery Co-products**. Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing. 1 ed, editora Willey, West Sussex, United Kingdom, 382 p., 2012.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University, Ames, 1976.

BEZERRA, K. M. G. **Estudos taxonômicos e anatômicos dos gêneros *Calyptanthus* SW., *Marlierea* Cambess., *Myrceugenia* O Berg e *Myrcia* Sect. *Aulomyrcia* (O. Berg) Griseb (Myrtaceae) no Distrito Federal**. 200 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BOBEK, V. B. **Análise farmacobotânica comparativa de espécies de *Baccharis* L. (Asteraceae) da região dos Campos Gerais**. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

BOXI, M. et al. Extraction, Phytochemical Screening and *in-vitro* evaluation of antioxidant properties of *Commicarpus chinensis* (aqueous leaf extract). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 4, p. 537-547, 2010.

BRASIL, **Farmacopeia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5 ed, v. 2, 545 p., 2010.

BUCKLE, J. **Clinical Aromatherapy – Essential Oils in Healthcare**, 3 ed, Londres: Elsevier, 2015.

BÜNGER, M. D. O.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Myrtaceae throughout the Espinhaço Mountain Range of central- eastern Brazil : floristic relationships and geoclimatic controls. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n.1, p. 109-119, 2014.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARDOSO, C. M. V.; PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Foliar anatomy of the subfamily Myrtoideae (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 148-161, 2009.

- CASCAES, M. M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 23881-23904, 2015.
- CHENG, S. S. et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.
- CHOWDHURY, R. R.; FITCH, R. W.; GHOSH, S. K. Efficacy of phytol-derived diterpenoid immunoadjuvants over alum in shaping the murine host's immune response to *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 31, p. 1178-1186, 2013.
- CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.
- COLUSSI, J.; PRESTES, N. P. Frugivoria realizada por aves em *Myrciaria trunciflora* (Mart) O. Berg. (Myrtaceae), *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae e *Ilex paraguayensis* St. Hil. no norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.
- COSMO, N. L. et al. Morfologia de fruto, semente e plântula, e germinação de sementes de *Myrceugenia euosma* (O. Berg) D. Legrand (Myrtaceae). **Floresta**, v. 47, n. 4, p. 479-488, 2017.
- COSTA, J. P. et al. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience letters**, v. 523, p. 115-118, 2012.
- COSTA, J. P. et al. Evaluation of Antioxidant Activity of Phytol Using Non- and Pre-Clinical Models. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, p. 1278-1284, 2016.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.
- CRUZ, A. V. de M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 47-52, 2004.
- DA SILVA, J. N. et al. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 143-150, 2015.
- DA SILVA, J. K. R. et al. Chemical Composition of Four Essential Oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and Their Cytotoxicity and Antioxidant Activity. **Medicines**, v. 4, n. 51, p. 2-10, 2017.
- DAULA, A.; BASHER, M. Phytochemical Screening, Plant Growth Inhibition, and Antimicrobial Activity Studies of. **Malaysian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.

7, n. 1, p. 9-21, 2009.

DE CERQUEIRA, M. D. et al. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

DE FARIAS, V. et al. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2008.

DE LUNA, B. N. **Anatomia foliar, ontogenia das estruturas secretoras foliares e composição do óleo essencial de *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex. Roem. & Shult. e *Myrsine venosa* A.DC. (Myrsinoideae - Primulaceae)**. 78 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2013.

DE MORAES, J. et al. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis Mansoni. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2014.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Plantas medicinais da flora brasileira utilizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares. In: DE SOUZA, G. H. B.; DE MELLO, J. C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia**. Coletânea Científica, Ouro Preto: UFOP, 2011. p. 251-269.

DE OLIVEIRA, S. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE SOUZA, A. et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 175-179, 2010.

DE SOUZA, A. M. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae e estudo da associação sinérgica com agentes antibacterianos e antifúngicos de uso clínico**. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DE SOUZA, S. P. et al. Óleos essenciais como inibidores de acetilcolinesterase. **Revista Fitos**, v. 7, n. 4, 2012.

DERKX, T. **Cosmetic antidandruff composition based on ellagic acid or a derivative thereof and a second, different active compound in a specific weight ratio**. WO 201107468 A2, 9 set 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. A Biosynthetic Approach. 3 ed. Nottingham: J. Wiley, 2009.

- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002.
- DIAS, C. N. et al. Caracterização Farmacobotânica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em São Luís – MA, Brasil. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 14, p. 95-102, 2012.
- DO COUTO, R. O. et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B.L. Estudo anatômico das folhas de *Psidium widgrenianum* Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 2, p. 65-70, 2005.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B.L. Morfo-anatomia foliar de *Myrcia multiflora* (LAM.) DC. - Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 43-51, 2011.
- DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n.10, p. 1564-1572, 2010.
- DURÃES, E. R. B. et al. Phytochemical study, toxicity and antimicrobial activity of *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae). **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, p. 1305-1313, 2017.
- ELHASSAN, G. O. M. et al. Chemical constituents of *Euphorbia polyacantha* Boiss. and their immunomodulatory properties. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 1, p. 146-152, 2015.
- ERBANO, M. et al. Morphoanatomical and Phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1737-1744, 2012.
- EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. 16 ed. Edinburg: Saunders, 2009.
- FARIA, A. C. et al. Palladium catalyzed aerobic oxidation for the incorporation of an olfactory group on naturally occurring  $\beta$ -caryophyllene. **Applied Catalysis A, General**, v. 548, p. 33-38, 2017.
- FERREIRA, D. A. S. **Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas**. 71p. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- FILHO, W. W. et al. Ellagic acid derivatives from *Rhabdodendron macrophyllum*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1991-1993, 1985.

**Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10632>>. Acesso em 02 fev 2018.

FRAUCHES, N. S. et al. Brazilian Myrtaceae Fruits: A Review of Anticancer Properties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2016.

GAO, X. et al. Two Ellagic Acids Isolated from Roots of *Sanguisorba officinalis* L. Promote Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation and Megakaryocyte Differentiation. **Molecules**, v. 19, p. 5448-5458, 2014.

GEETHAA, S. et al. Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 4, n. 4, p. 179-182, 2013.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografia de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas**. 1 ed. Curitiba: Sépia, 2005.

GOMES, S. M. et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. **Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control**. 55p. Tenerife: Elsevier, 2013.

GONZÁLEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia silcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 413-418, 2014.

GREINWALD, R. et al. Distribution and taxonomic significance of major alkaloids in the genus *Virgilia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.17, n. 3, p. 231-238, 1989.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes de Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUIMARÃES, A. G. et al. Atividade farmacológica de monoterpenos. In: DE SOUZA, G. H. B.; DE MELLO, J. C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia**. Coletânea Científica, Ouro Preto: UFOP, 2011. p. 219-250.

GUIZZO, P. L. et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 259-265, 2015.

HENRIQUES, A. M. Vinte e cinco anos de pesquisas nos laboratórios de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia - UFRGS. In: DE SOUZA, G. H. B.; DE

MELLO, J. C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia**. Coletânea Científica, Ouro Preto: UFOP, 2011, p. 69-116.

HILLIS, W. E.; YAZAKI, Y. Properties of some methylellagic acids and their glycosides. **Phytochemistry**, v. 12, p. 2963-2968, 1973.

HO, K. Y. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p.127-130, 2001.

IMATOMI, M. et al. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, 2013.

IQBAL, E.; SALIM, K. A.; LIM, L. B. L. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 3, p. 224-232, 2015.

ISLAM, M. T. et al. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M. T. et al. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 117, p. 93-101, 2017.

JAYAPRAKASHA, G. K.; GIRENNAVAR, B.; PATIL, B. S. Radical Scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4484-4494, 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* - Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2000.

JUDZENTIENE, A. et al. Caryophyllene Oxide-rich Essential Oils of Lithuanian *Artemisia campestris* spp. *campestris* and Their Toxicity. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1981-1984, 2010.

KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M.; HERNANDES, L. S. Farmacobotânica e atividade antiúlcera de plantas medicinais brasileiras. In: DE SOUZA, G. H. B.; DE MELLO, J. C.P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia**. Coletânea Científica, Ouro Preto: UFOP, 2011. p. 177-196.

LANDRUM, L. R. A Monograph of the Genus *Myrceugenia* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, v. 29, p.1-135, 1981.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic treatment and identification keys, **Brittonia**, v. 9, n. 4, p. 508-536, 1997.

LAPČÍK, O. et al. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium*

species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 10, p. 983-992, 2005.

LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 842-846, 2009.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. Alternatives to Laboratory Animals: **ATLA**, v. 20, n. 2, p. 297-301, 1992.

LIMA, W. G.; GUEDES-BRUNI, R. R. *Myrceugenia* (Myrtaceae) ocorrentes no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 55, n. 85, p. 73-94, 2004.

LIMBERGER, R. P. et al. Essential oils from some *Myrceugenia* species (Myrtaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 5, p. 341-344, 2002.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Intraspecific volatile oil variation in *Myrceugenia cucullata* (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 3, p. 287-293, 2005.

LIPPONLD, F. et al. Fatty Acid Phytyl Ester Synthesis in Chloroplasts of Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, p. 2001-2014, 2012.

LOWRY, J. B. The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1803-1813, Pergamon Press, England, 1968.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. S59-S63, 2010.

MENDES, S. et al. Óleo essencial de *Baccharis semiserrata*, um fonte de espatulenol. **Revista UEPG Ciências Exatas e da Terra**, v. 14, n. 3, p. 241-245, 2008.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method, **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons**, v 1. London: Oxford; 1972. Disponível em: <<https://archive.org/details/anatomyofthedico033552mbp>>. Acesso em: 05 nov 2017.

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEZA, A.; LEHMANN, C. Betacaryophyllene – A phytocannabinoid as potential

therapeutic modality for human sepsis? **Medical Hypotheses**, v. 110, p. 68-70, 2018.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise fitoquímica. *Apostila Da Disciplina de Fitoquímica Do Curso de Farmácia Da UFPR*, 2003.

MOORE, B. P. The chemistry of nasutins. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 901-907, 1964.

MORAIS, L. M. F.; DA CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014.

MOSQUERA, O. M. et al. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 631-634, 2007.

MURILLO-ALDANA, J. C. et al. Phylogenetic relationships in *Myrceugenia* (Myrtaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 2, p. 764-776, 2012.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oil of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170-1175, 2010.

NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

NASSER, A. L. M. et al. Identification of Ellagic Acid Derivatives in Methanolic Extracts from *Qualea* Species. **A Journal of Biosciences**, Zeitschrift für Naturforschung C, v. 63c, p. 794-800, 2008.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NDUKWE, G. I.; ZHAO, Y. Pharmacological activity of 2,3,8-tri-o-methyl ellagic acid isolated from the stem bark of *Irvingia gabonensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 16, p. 1910-1912, 2007.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of ara-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NETA, M. C. S. et al. Effects of  $\beta$ -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24h time kill curve studies. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2016.

NEVES, J. K. O. et al. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for  $\beta$ -caryophyllene delivery. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

NEVES, L. C.; DE ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p.107-110, 2009.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OGUGU, S. et al. Assessment of Cytotoxic Effects of Methanol Extract of *Calliandra Portoricensis* Using Brine Shrimp (*Artemia Salina*). **Global Journal of Bio-Science & Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 257-260, 2012.

OIKAWA, N. et al. Inhibitory effects of compounds isolated from the dried branches and leaves of murta (*Myrceugenia euosma*) on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 70, n. 3, p. 502-509, 2016.

OLIVEIRA, C. F. **Morfoanatomia, Caracterização Fitoquímica e Avaliação das Atividades Biológicas de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE)**. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**, 412 p., São Paulo, Atheneu, 1991.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**, 2ed. , São Paulo, Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n. 2, p. 502-510, 2016.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*, **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 32-35, 2014.

POLATOĞLU, K. et al. DPPH scavenging, PRAP Activities and Essential Oil Composition of Edible *Lathyrus ochrus* L. (Cyprus Vetch, Luvana) from Cyprus. **Journal of Oil Science**, v. 64, n. 3, p. 309-314, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RABE, P.; SCHMITZ, T.; DICKSCHAT, J. S. Mechanistic investigations on six

bacterial terpene cyclases. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 1839-1850, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REGO, S. S. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de Myrtaceae *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg e *Myrceugenia gertii* Landrum - Myrtaceae**. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RETAMALES, H. A. et al. Leaf micromorphology and anatomy of *Myrceugenia rufa* (Myrtaceae). An endemic coastal shrub of north-central Chile. **Gayana Botanica**, v. 72, n. 1, p. 76-83, 2015.

RETAMALES, H. A; SCHARASCHKIN, T. A Staining Protocol for Identifying Secondary Compounds in Myrtaceae. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2014.

RETAMALES, H. A; SCHARASCHKIN, T. Comparative leaf anatomy and micromorphology of three Chilean Myrtaceae: Taxonomic and ecological implications. **Flora**, v. 217, p. 138-154, 2015.

RETAMALES, H. A; SCHERSON, R.; SCHARASCHKIN, T. Foliar micromorphology and anatomy of *Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae), with particular reference to schizogenous secretory cavities, **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 87, n. 27, p. 1-7, 2014.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environment. **Organic Chemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.

RODRIGUES, R. R. et al. **Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo**. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica, 2008.

ROSA, P. O. **Subtribo Myrciinae DC. e *Myrceugenia* O. Berg: Tratamento taxonômico, flora e adequações nomenclaturais da coleção de Glaziou para os estados Goiás e Tocantins**. 205 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RUIZ, E. et al. Flavonoid chemistry of the endemic species of *Myrceugenia* (Myrtaceae) of the Juan Fernandez Islands and relatives in continental South America. **Brittonia**, v. 46, n. 3, p. 187-193, 1994.

RUIZ, E.; SILVA, M. Metabolitos secundarios y macromoléculas en el estudio evolutivo de la flora vascular endémica del archipiélago Juan Fernández. **Revista de**

la **Sociedad Química de México**, v. 43, ns. 3, 4; p. 88-92, 1999.

SAIKIA, D. et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SANTOS, C. C. M. P. et al. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *In Vivo* and *In Vitro* Models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, n. 949452, p. 1-9, 2013.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**, 2 ed, Iowa State College, Ames, 1951.

SETUBAL, R. B. et al. Taxonomic and Ecological aspects of *Myrceugenia mesomischa* (Myrtaceae), an endemic tree from southern Brazil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 445-457, 2011.

SHAHIDI, F.; ZHONG, YING. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SILVA, A. N. **Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de espécies do gênero *Myrcia* DC. (Myrtaceae)**. 171 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Feira de Santana, Bahia, 2010.

SILVA, R. et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 1-10, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**. Do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, H. P. et al. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 237-241, 2012.

SINGH, I. P.; BHARATE, S. B.; BHUTANI, K. K. Anti-HIV natural products. **Current Science**, v. 89, n. 2, p. 269-290, 2005.

SMITH, R. M.; SIWATIBAU, S. Sesquiterpene hydrocarbons of Fijian guavas. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2013-2015, 1975.

SOBRAL, M. Flora do Brasil 2020 em construção. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>>. Acesso em: 02 fev 2018.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. **Molecules**, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**, 2 ed, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 357p., 2007.

- SPICHER, L. et al. Essential role for phyto kinase and tocopherol in tolerance to combined light and temperature stress in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 21-22, p. 5845-5856, 2017.
- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties, **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73-94, 2011.
- THEODULOZ, C.; PACHECO, P.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Chilean Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 253-255, 1991.
- The Plant List. Disponível em:< <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>>. Acesso em: 14 fev 2018.
- Tropicos**. Missouri Botanical Garden. Disponível em:<<https://www.tropicos.org>>. Acesso em: 02 fev 2018.
- TUKIRAN, T. et al. An Ellagic Acid Derivative and Its Antioxidant Activity of Chloroform Extract of Stem Bark of *Syzygium polycephalum* Miq (Myrtaceae). **Indonesian Journal of Chemistry**, aceito em 23 ago 2017.
- VERBINENN, J. R. **Estudo anatômico e análise da composição química do óleo essencial de folhas de *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk) D. Legrand & Kausel e *Myrceugenia pilotantha* (Kiaersk) Landru (Myrtaceae)**. 55 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.
- VOLK, G. M. et al. The Role of Druse and Raphide Calcium Oxalate Crystals in Tissue Calcium Regulation in *Pistia stratiotes* Leaves. **Plant Biology**, v. 4, p. 34-45, 2002.
- XIAO, J. B. et al. Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 731-738, 2006.
- WAGNER, G. J. Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. **Plant Physiology**, v. 96, p. 675-679, 1991.
- WANG, R. F. et al. Bioactive Compounds from the Seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2096-2098, 2004.
- WILSON, G. P. et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3-19, 2005.

WOSCH, L. et al. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 328-343, 2015.

## ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA PARA ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

### AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades: 2000 a 2019.**

**Validade da Autorização: Cinco anos**, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior  
Presidente