

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ FERNANDO CORREA DO NASCIMENTO NETO

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa* DC,
MYRTACEAE

CURITIBA

2019

LUIZ FERNANDO CORREA DO NASCIMENTO NETO

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa* DC,
MYRTACEAE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2019

Nascimento Neto, Luiz Fernando Correa do
Estudo fitoquímico, atividades biológicas, propriedades antioxidantes e antimicrobiana da espécie *Myrcia venulosa* DC, Myrtaceae [recurso eletrônico] / Luiz Fernando Correa do Nascimento Neto – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

1. *Myrcia*. 2. Óleo essencial. 3. Toxicidade. 4. Hemólise. 5. Antioxidante. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.42



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUIZ FERNANDO CORREA DO NASCIMENTO NETO** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa* DC, MYRTACEAE**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Inovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2019.


OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


RANIERI CAMPOS
Avaliador Externo (UFAM)


ANA FLAVIA SCHWABE DUARTE
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A família. A minha base formadora de respeito ao próximo, minha mãe Roseni, meu pai Adriano e meus irmãos Ana e Gabriel.

Ao meu amor, que dispensa comentários já que sua importância é imensurável.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela oportunidade de orientação e condução dessa tese.

À, Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel, pela correção e orientação da escrita desse trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais, professores, técnicos e alunos de mestrado e doutorado, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos, contribuições científicas e pelos momentos que estivemos juntos.

A Profa. Dra. Rosiane Mello e Prof. Dr. Christian Boller cujo exemplo eu sigo na minha caminhada profissional.

As Profas. Dra. Maria Rosa e Dra. Graziella Franco, pois sem a ajuda delas esse mestrado seria completamente diferente.

A Profa. Dra. Tania por toda a ajuda na parte estatística.

A Profa. Mestre Janaica Câmara e Prof Mestre Rogerio Vilas Boas pelos conselhos e conversas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por todos os conhecimentos transmitidos

Ao grupo de guerreiros que começou essa jornada juntos Ana, Rose, Cinta e Maika.

Aos servidores e funcionários da UFPR. A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa

Levo todos os rostos carismáticos comigo.

Muito obrigado.

“A vida é como uma viagem para gente como eu e você: uma viagem na qual nos nunca sabemos para onde estamos indo. Você vê um novo destino no caminho, depois outro, depois outro e assim por diante, até o local que pretendia chegar inicialmente cair no esquecimento. Somos como alquimistas que começam buscando ouro e, durante o processo, descobrem novos remédios, uma maneira lógica de ordenar as coisas e fogos de artifícios: a única coisa que não descobrem é o ouro.”

Paul Hoffman em: A mão esquerda de Deus

RESUMO

A espécie *Myrcia venulosa* (Myrtaceae) é nativa e endêmica do Brasil, com ocorrência na Mata Atlântica. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas. O material vegetal foi coletado em Curitiba, Paraná, Brasil e identificado no setor de engenharia florestal da UFPR. As folhas secas foram utilizadas para o preparo do extrato hidroalcoólico e suas respectivas frações. Na triagem fitoquímica foi observada a presença de compostos fenólicos e esteroides e/ou triterpenos. O óleo essencial foi extraído por Clevenger, resultou em um rendimento de 0,22%, cujo compostos majoritários foram Germacreno-B (13,77%), óxido de cariofileno (16,23%) e β -cariofileno (6,12%). A extração das folhas e galhos foi realizada por Soxhlet e após o fracionamento, resultaram-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. No teste antioxidante por formação do complexo fosfomolibdênio as amostras folha acetato de etila, folha remanescente e óleo essencial apresentaram atividade superior ao BHT e rutina. No teste redução do radical DPPH a amostra com melhor resultado foi o óleo essencial (CL 50 5,88 $\mu\text{g/mL}$). A determinação de fenóis totais e doseamento de flavonoides apontou significativo resultado para fração folha acetato de etila (51,15 mg.EAG/g) e óleo essencial (57,17 mg.EAG/g), sendo essas as amostras que mais se destacaram. No ensaio de toxicidade in vitro frente à *Artemia salina* foi constatado toxicidade moderada do óleo essencial (CL50 372,28 $\mu\text{g/mL}$) e baixa da fração folha acetato de etila (CL50 679,25 $\mu\text{g/mL}$) e fração galho acetato de etila (CL50 953,09 $\mu\text{g/mL}$). Obteve-se atividade hemolítica em relação ao óleo essencial de 57,46% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter aerogenes* ocorreu inibição do crescimento bacteriológico. Pela metodologia da microdiluição, os extratos também exibiram atividade antimicrobiana, mas com valores de CIM demonstrando uma atividade moderada a fraca.

Palavras-chaves: Óleo essencial. Toxicidade. Hemólise. Antioxidante. *Myrcia*.

ABSTRACT

The species *Myrcia venulosa* (Myrtaceae) is native and endemic to Brazil, occurring in the Atlantic Forest. The objective of this work was to perform the phytochemical study and to evaluate the antioxidant properties and biological activities. The plant material was collected in Curitiba, Paraná, Brazil and identified in the forest engineering sector of UFPR. The dry leaves were used for the preparation of the hydroalcoholic extract and their respective fractions. In phytochemical screening the presence of phenolic compounds and steroids and / or triterpenes were observed. The essential oil was extracted by Clevenger, resulting in a yield of 0.22%, whose major compounds were Germacrene-B (13.77%), caryophyllene oxide (16.23%) and β -caryophyllene (6.12%). Leaf and branch extraction was performed by Soxhlet and after fractionation the hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder fractions resulted. In the antioxidant test due to the formation of the phosphomolybdenum complex the ethyl acetate leaf, remnant leaf and essential oil samples showed superior activity to BHT and routine. In the DPPH radical reduction test the best-performing sample was essential oil (LC 50 5.88 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The determination of total phenols and flavonoid assay showed a significant result for ethyl acetate leaf fraction (51.15 mg.EAG / g) and essential oil (57.17 mg.EAG / g), which were the most outstanding samples. In the in vitro toxicity test against *Artemia salina*, moderate toxicity of essential oil (LC50 372.28 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and low fraction of ethyl acetate sheet (LC50 679.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and fraction ethyl acetate LC50 953.09 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Hemolytic activity was obtained in relation to the essential oil of 57.46% in the concentration of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In the evaluation of the antimicrobial activity against the bacteria *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter aerogenes* occurred inhibition of bacteriological growth. By microdilution methodology, the extracts also showed antimicrobial activity, but with MIC values demonstrating a moderate to weak activity.

Key-words: Essential oil. Toxicity. Hemolysis. Antioxidant. *Myrcia*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUICAO DA ESPECIE <i>Myrcia venulosa</i> NO BRASIL	28
FIGURA 2 – ILUSTRACAO DA ESPÉCIE <i>Myrcia Venulosa</i> DC.....	29
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA.....	30
FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DAS FOLHAS E GALHOS COLETADOS DE <i>Myrcia Venulosa</i> DC.	31
FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DAS FLORES DE <i>Myrcia Venulosa</i> DC.	31
FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Myrcia Venulosa</i> DC. NÚMERO 415144	32
FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DO PROCESSO DE SECAGEM DA <i>Myrcia Venulosa</i>	33
FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DA FOLHA TRITURADA DA ESPÉCIE <i>Myrcia Venulosa</i>	33
FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DO FUNIL DE SEPARAÇÃO.....	36
FIGURA 10 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MOLIBDÊNIO POR UM COMPOSTO ANTIOXIDANTE.....	50
FIGURA 11 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL DPPH POR UM ANTIOXIDANTE	51
FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia venulosa</i>	70
FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MARJORITARIOS PRESENTES NO OLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia venulosa</i>	72

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT.....	80
GRÁFICO 2 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA.....	80
GRÁFICO 3 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A Vit. C.	81
GRÁFICO 4 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCORBICO PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....	82
GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCORBICO PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....	83
GRÁFICO 6 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....	83
GRÁFICO 7 - CAPACIDADE DE SEQUESTRAR O RADICAL LIVRE DPPH DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PADRÕES.....	87
GRÁFICO 8 - TEOR DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTES EM ACIDO GÁLICO -EAG) NOS EXTRATOS BRUTOS, FAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM <i>Myrcia Vanulosa</i>	90
GRÁFICO 9 - TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (EQUIVALENTES EM CATEQUINA/MG) NOS EXTRATOS BRUTOS E FAÇÕES EM <i>Myrcia Vanulosa</i>	93
GRÁFICO 10 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS DE FOLHA E ÓLEO ESSENCIAL COMPARADAS AO TRITON 1%.....	99
GRÁFICO 11 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS DE GALHO COMPARADAS AO TRITON 1%.....	99

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROPRIEDADES MEDICINAIS E NOMES POPULARES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE	23
QUADRO 2 - TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Myrcia</i> DC	24
QUADRO 3 - PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO MYRCIA E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
QUADRO 4 - PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO MYRCIA E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE DA ESPÉCIE <i>Myrcia venulosa</i> DC	63
TABELA 2 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS DA ESPÉCIE <i>Myrcia venulosa</i>	63
TABELA 3 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Myrcia venulosa</i>	64
TABELA 4 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GALHOS DA ESPÉCIE <i>Myrcia venulosa</i>	65
TABELA 5 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO AQUOSO	68
TABELA 6 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL <i>Myrcia venulosa</i> DC.....	69
TABELA 7 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS BRUTOS <i>Myrcia venulosa</i> DC	73
TABELA 8 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET ..	74
TABELA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT	76
TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA	77
TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À VITAMINA C	78
TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA e CAULE DE <i>Myrcia venulosa</i> DC PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH.....	84

TABELA 13 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTES EM ACIDO GÁLICO -EAG) NOS EXTRATOS BRUTOS, FAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM <i>Myrcia Vanulosa</i>	88
TABELA 14 - QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS (EQUIVALENTES EM CATEQUINA/MG) NOS EXTRATOS BRUTOS E FAÇÕES EM <i>Myrcia Vanulosa</i>	91
TABELA 15 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia venulosa</i> EM <i>Artemia salina</i>	94
TABELA 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES DA FOLHA E ÓLEO ESSENCIAL <i>Myrcia venulosa</i> DC.....	96
TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES DO GALHON DE <i>Myrcia venulosa</i> DC.....	97
TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Myrcia venulosa</i> A PARTIR DO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM) PARA CEPAS GRAM POSITIVAS.....	100
Tabela 19 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>Myrcia venulosa</i> A PARTIR DO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM) PARA CEPAS GRAM NEGATIVAS	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	-	Atividade antioxidante
AAR	-	Atividade antioxidante relativa
Abs	-	Absorbância
AH	-	Atividade hemolítica
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	-	Cromatografia gasosa / Espectrometria de massas
CGEN	-	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CL50	-	Concentração letal 50%
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	-	Clinical Laboratory Standards Institute
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EBF	-	Extrato bruto folha
EBG	-	Extrato bruto galho
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
DMSO	-	Dimetilsulfoxido
FFA	-	Fração folha acetato de etila
FFC	-	Fração folha clorofórmio
FFH	-	Fração folha hexano
FFR	-	Fração folha remanescente
FGA	-	Fração galho acetato de etila
FGC	-	Fração galho clorofórmio
FGH	-	Fração galho hexano
FGR	-	Fração galho remanescente
g	-	Gramas
g/L	-	Grama por litro
H ₂ SO ₄	-	Ácido sulfúrico
HCL	-	Ácido clorídrico
HC50	-	Concentração hemolítica média
IC50	-	Concentração inibitória média
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INPI	-	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitros
m/m	-	Massa/ Massa
m/v	-	Massa/ Volume
n°	-	Numero
N	-	Normal
M.	-	Myrcia
OE	-	Óleo essencial
ORTEP	-	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

PBS	-	Tempão fosfato salino
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	-	Tetrametilsilano
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UV	-	Ultravioleta
v/v	-	Volume/ Volume
%	-	Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVO GERAL.....	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	FAMILIA MYRTACEAE	21
2.2	GÊNERO <i>Myrcia</i> DC.	24
2.3	ESPÉCIE <i>Myrcia venulosa</i> DC	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	MATERIAL VEGETAL	31
3.2	ANALISES FISÍCO-QUIMÍCAS	34
3.2.1	Determinação do teor de umidade	34
3.2.2	Determinação do teor de cinzas totais	34
3.3	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA	35
3.3.1	Extrato hidroalcoólico	36
3.3.1.1	Pesquisa de alcaloides.....	37
3.3.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	37
3.3.1.2	Pesquisa de heterosideos flavônicos	38
3.3.1.4	Pesquisa de cumarinas	38
3.3.1.5	Pesquisa de compostos iridoides	39
3.3.1.6	Pesquisa de antraquinonas	40
3.3.1.7	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos	40
3.3.2	Extrato aquoso	41
3.3.2.1	Pesquisa de heterosideos antocianicos	41
3.3.2.2	Pesquisa de heterosideos saponinicos	42
3.3.2.3	Pesquisa de heterosideos cianogênios	42
3.3.2.4	Pesquisa de taninos	43
3.3.2.5	Pesquisa de ácidos voláteis	44
3.3.2.6	Pesquisa de ácidos fixos.....	44
3.3.2.7	Pesquisa de amino grupo.....	45
3.4	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Myrcia venulosa</i>	45

3.4.1	Densidade relativa.....	46
3.4.2	Identificação dos constituintes do óleo essencial	46
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACÇÕES	47
3.5.1	Preparo do Extrato bruto	47
3.5.1.1	Teor de sólidos.....	47
3.5.1.2	Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico	48
3.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
3.6.1	Formação do complexo fosfomolibdenio	49
3.6.2	Redução do radical DPPH.....	51
3.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICO	53
3.7.1	Determinação de fenólicos totais	53
3.7.2	Quantificação de flavonoides	54
3.8	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	55
3.8.1	Toxicidade preliminar.....	55
3.8.2	Atividade hemolítica.....	56
3.8.3	Atividade Antimicrobiana.....	58
3.8.3.1	Meio de cultura.....	58
3.8.3.1	Preparo do inóculo	59
3.8.3.2	Difusão em meio sólido a partir de orifício.	59
3.8.3.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	MATERIAL VEGETAL	62
4.2	ANALISES FISÍCO-QUÍMICAS	62
4.2.1	Umidade.....	62
4.2.2	Cinzas totais.....	63
4.3	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA	64
4.3.1	Extrato hidro alcoólico	64
4.3.2	Extrato aquoso	67
4.4	ÓLEO ESSENCIAL.....	69
4.4.1	Identificação dos constituintes do óleo essencial	69
4.5	ANÁLISE FITOQUÍMICA: EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	73
4.5.1	Preparo do extrato bruto e determinação do teor de sólidos das partes aéreas.....	73

4.5.2	Preparo das frações.....	74
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	75
4.6.1	Formação do complexo fosfomolibdenio.....	75
4.6.2	Redução do radical DPPH	81
4.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICA	87
4.7.1	Determinação de fenólicos totais	87
4.7.2	Quantificação de flavonoides	90
4.8	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	93
4.8.1	Toxicidade preliminar in vitro.....	93
4.8.2	Atividade hemolítica	95
4.8.3	Atividade antibacteriana	100
5	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS	116

1. INTRODUÇÃO

No Brasil pode-se encontrar 23 gêneros e 990 espécies pertencentes à família Myrtaceae. Em relação ao mundo, a literatura estima cerca de 130 gêneros e 5760 espécies constituintes desta família (SOBRAL *et al.*, 2015). Segundo Stadnik e colaboradores (2016) essa é uma família pantropical e é encontrada em diversas regiões do globo terrestre com destaque para Austrália e América tropical.

Estudos sobre esta família já comprovaram diversidade de espécies com propriedades medicinais como destaque o efeito diurético ação anti-hemorrágica, adstringente, hipoglicêmico e anti-hipertensivo (BORGES *et al.*, 2014). No Brasil, o maior uso das plantas dessa família se relaciona com o consumo de frutos, pois apresentam sabor e aroma adocicados (MORAIS RODRIGUES, DE *et al.*, 2016).

Em relação ao gênero *Myrcia* DC, encontra-se em literatura seu uso popular e podem se destacar propriedades hipoglicemiantes, diuréticos, adstringentes e em tratamentos de hipertensão, ulcera e hemorragia (SERPELONI *et al.*, 2015).

O uso das plantas como fitoterapia se mostra importante dentro da medicina brasileira e ocupa lugar de destaque na prevenção e tratamento de enfermidades. No Brasil existe uso de plantas medicinais, pois as plantas são naturais, ao contrário das drogas sintéticas, evidenciando a crença popular de uma suposta segurança em seu uso (UNSAL, 2018). Porém, para garantir o uso seguro das plantas com atividades terapêuticas é necessário que estudos sejam realizados em relação a suas propriedades tóxicas (SOUSA, 2018).

Tendo isso em mente a pesquisa de espécies vegetais, ainda sem estudo, como o caso *Myrcia venulosa*, apresenta grande importância, pois se tratar de uma família com quimiotaxonomia de interesse científico. A pesquisa de *Myrcia venulosa* é uma forma de contribuir com o estudo de componentes químicos já que a planta não apresenta descrição fitoquímica de seus metabólitos e estudos de suas propriedades biológicas e antioxidantes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico aplicado às atividades biológicas e propriedades antioxidantes das folhas e galhos de *Myrcia venulosa* (Myrtaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Solicitar autorização de pesquisa e exsicata para identificação da espécie.
- Realizar estudo fitoquímico preliminar das folhas e galhos.
- Obter óleo essencial das folhas e identificar os constituintes químicos.
- Obter os extratos e frações das folhas e galhos
- Avaliar a atividade antioxidante de folhas, galhos e óleo essencial.
- Avaliar o teor fenólico de folhas, galhos e óleo essencial.
- Avaliar a toxicidade preliminar de folhas, galhos e óleo essencial.
- Avaliar a atividade hemolítica de folhas, galhos e óleo essencial.
- Avaliar a atividade antibacteriana de folhas, galhos e óleo essencial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMILIA MYRTACEAE

Snow 2000, descreve a família como sendo predominantemente do hemisfério sul com ampla diversidade na América do Sul e Australásia. No Brasil, a família apresenta 927 espécies distribuídas em 24 gêneros observados prioritariamente nos biomas do Cerrado e Mata Atlântica (ROSA; ROMERO, 2012)

Anteriormente a família era dividida em duas subfamílias: Leptospermoideae, predominante na Oceania no qual era descrita pelos frutos secos, e Myrtoideae, com frutos carnosos, que era predominante na América do Sul. Contudo, através de estudos filogenéticos, os caracteres usados para a distinção entre as duas subfamílias, não eram consistentes, pois as características dos frutos tinham relação independentemente de sua linhagem familiar (GOVAERTS, 2008). Atualmente está classificada em grupos ao redor dos gêneros *Plinia*L., *Myrcia* DC., *Myrceugenia* O. Berg, *Myrteola* O. Berg, *Pimenta*Lindl. e *Eugenia*L. (LUCAS et al., 2007).

As espécies da família Myrtaceae apresentam caracteres morfológicos semelhantes entre seus exemplares e portanto apresentam uma complexa taxonomia para sua precisa identificação. Esse fato torna necessário o uso de caracteres de diagnósticos crípticos, podendo citar como exemplo: o número de estames no botão floral, o número de lóculos e de óvulos no ovário, o tipo de semente e de embrião (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

As flores da mirtáceas brasileiras são hermafroditas, com estames numerosos, predominantemente brancas, e com cálice e ovário ínfero. Geralmente de cor branca, com estames numerosos, corola e cálice 4-5-mero e ovário ínfero (NIC LUGHADHA, PROENÇA, 1996). A estrutura geral das flores apresenta ínfima variação se comparada com espécies de outras grandes famílias. Flores menores são mais comuns, embora o tamanho varie de pequeno (GRESSLER et al., 2006).

Em relação aos locais onde a família Myrtaceae está presente em abundância, pode ser citada a serra do Espinhaço, sendo considerada a segunda formação rochosa mais extensa do Brasil, constituída por dois blocos principais: a Chapada Diamantina, na Bahia, e a Serra do Espinhaço, em Minas Gerais (GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997).

Outro Levantamento florístico de importância foi realizado na região da Ilha do Mel que encontrou 31 espécies de Myrtaceae, com destaque para as formações arbustivas e arbóreo-arbustivas, ressaltando o fato que ela representa até 40% do total de espécies lenhosas amostradas (MENEZES-SILVA, 1998). No Paraná estão catalogadas cerca de 230 espécies de Myrtaceae (SOBRAL *et al.*, 2015).

Segundo Lorenzi *et al.*, (2006) a família Myrtaceae apresenta como destaque no cenário brasileiro, pois apresenta potencial econômico. *Psidium guajava*L. e *Eugenia uniflora* L., respectivamente conhecidas como goiaba e pitanga, consumidas em forma de suco, doces, geleias e sorvete, são exemplos do uso desta família como fonte de alimentos

A importância dos frutos também deve ser ressaltada do ponto de vista ecológico, pois frutos são fontes de alimento à fauna silvestre, contendo sementes envolvidas por uma polpa carnosa rica em água e carboidratos e com poucos lipídeos e proteínas. Muitos animais que se alimentam desses frutos acabam veiculando a dispersão das sementes e favorecendo a sobrevivência e permanência dessas espécies (GRESSLER *et al.*, 2006). Moraes Rodrigues *et al.*, 2016 resalta a importância dos metabolitos secundários presentes em mirtáceas, destacando a presença de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) e óleo essencial. A atividade antioxidante dos flavonoides, encontrados na maioria das frutas e vegetais, está relacionada com prevenção de doenças cardiovasculares (HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), já em relação aos taninos é constatado relevante ação antibacteriana, anti protozoários e reparação de tecidos (MELO; SANTOS, 2010).

As Myrtaceae apresentam relatos na literatura descrevendo atividade contra distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos, doenças infecciosas, podendo sua ação estar relacionada à propriedade adstringente presentes na planta. Outras ações com destaque são antimicrobianas, antimutagênica,

hipoglicêmica, antioxidante, anti-inflamatória e diurética. As partes da planta utilizadas pelas propriedades biológicas são as folhas, casca e os frutos. O resumo das atividades da família estão destacadas no quadro 1 (CRUZ; KAPLAN, 2004; IHA et al., 2008).

QUADRO 1 PROPRIEDADES MEDICINAIS E NOMES POPULARES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Espécie	Nome popular	Uso popular
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	Guabiroba,	Diarreia, leucorreia, uretrite e prolapso retal
<i>Calyptranthes aromatica</i>	Craveiro-da-terra	Antiespasmódico e vermífugo
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	Guabiroba	Colesterol, circulação, diurético, diarreia, males da bexiga e gripe
<i>Campomanesia aurea</i>	Araçá-rasteiro	Diarreia e males da bexiga
<i>Eucalyptus sp.</i>	Eucalipto	Febre, dor de estomago, bronquite, bexiga, expectorante, gripe e tosse
<i>Eugenia cauliflora</i>	Jaboticaba	Asma, diarreia e dor de garganta
<i>Eugenia dysenterica</i>	Cagaiteira	Prisão de ventre, rins e cicatrizante
<i>Eugenia jambos</i>	Jambo	Diabetes e adstringente
<i>Eugenia jambolana</i>	Jambolão	Diabetes
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Diarreia, gota, reumatismo, febre, gripe e colesterol
<i>Myrtus rubra</i>	Cambuí verdadeiro	Piorrêia, tártaro
<i>Plinia trunciflora</i>	Jaboticaba	Males da visão e asma
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Diarreia, dor de garganta, ferimentos, fígado, hemorroida e desordens menstruais
<i>Stenocalyx sp.</i>	Picanga	Febre, hipertensão, diurético e diarreia

FONTE: Adaptada de CRUZ; KAPLAN (2004).

2.2 GÊNERO *Myrcia* DC.

O gênero apresenta plantas em forma de arbusto, árvore, trepadeira, subarbusto e sendo encontrado nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal. No Brasil, o gênero possui aproximadamente 262 espécies nativas, sendo mais frequente nas regiões Sudoeste e Nordeste (SOBRAL et al., 2015).

Segundo Silva (2012) apresenta como características:

Paniculas mircióides, constituídas de ramos opostos decussados (em forma de cruz) ou verticilados (inseridas em um só nó caulinar), sendo os inferiores geralmente mais longos, eretos ou patentes. Suas flores geralmente se dispõem em grupos de três em três, todas sésseis ou com pedicelo curto. Apresentam hispânico mais ou menos desenvolvido, formado pela parede do receptáculo floral que pode ser campanulado, afunilado, globoso, anguloso ou liso, prolongado ou não acima do ovário (SILVA, 2012, p. 6).

Os níveis de organização do gênero são apresentados no QUADRO 2.

QUADRO 2 - TAXONOMIA DO GÊNERO *Myrcia* DC

HIERARQUIA	TAXONOMIA
Gênero	<i>Myrcia</i>
Subtribo	Myrciinae
Tribo	Myrteae
Subfamília	Myrtoideae
Família	Myrtaceae
Ordem	Myrtales
Reino	Plantae

FONTE: SOBRAL (2003); LIMBERGER et al. (2004).

O extrato bruto etanólico de *Myrcia rostrata* apresentou atividade para os fungos dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. A fração aquosa das cascas com inibição do crescimento de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*. Já a fração diclorometano foi ativa para as bactérias *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis* (ALCÂNTARA, 2012).

Para estudo da composição do óleo essencial Limberger (2014) utilizou folhas de *Myrcia richardiana*, *Myrcia. arborescens*, *Myrcia. selloi*, *Myrcia. oligantha*, *Myrcia. rostrata*, *Myrcia. lajeana*, *Myrcia. obtecta*, *Myrcia. pubipetala* e *Myrcia. hatschbachii*. Foi constatado que todas as espécies analisadas apresentaram predominância de sesquiterpenos cíclicos, principalmente os derivados das vias de ciclização do cadinano, germacrano e cariofilano, exceto *M Myrcia. obtecta*, a qual foi caracterizada por substâncias do grupo bisabolano.

Para o óleo de *Myrcia gigantea* foram identificado 30 compostos, representando 90,1% do teor de voláteis. Este óleo foi caracterizado pela predominância de sesquiterpenos oxigenados, em especial do grupo germacrano, cujo composto majoritário foi o espatulenol (28,9%) seguido, em menor quantidade, de seu isômero, iso-espatulenol (9,5%) (APEL et al., 2006).

Apel et al., (2016) também realizaram teste com o óleo essencial de *Myrcia cisplatensis*, cuja caracterização apresentou predominância de monoterpenos oxigenados (35,5%), em especial 1,8-cineol (29,8%), seguido pelos hidrocarbonetos monoterpênicos (20,8%) limoneno (10,9%), e α -pineno (8,9%). Os autores também observaram também destacou a presença de β -cariofileno (10,8%), um hidrocarboneto sesquiterpênico do grupo dos cariofilanos.

Foi encontrado óleo essencial Citral nas folhas de *Myrcia ovata*, apresentando em testes, contra larvas de *Aedes aegypti* a atividade larvicida. Ressaltando que seu uso pode ser um aliado no combate de pestes que possuam fase larval (LIMA et al., 2011).

A partir da obtenção do óleo essencial de *Myrcia pubiflora*, Andrade et al., (2012) constatou a diminuição do número de contorções induzidas pelo ácido acético e a nocicepção na segunda fase do teste de formalina. Exibiu efeito inibitório na resposta induzida por carragenina, porém foi ineficaz ao inibir o tempo de reação ao estímulo térmico.

O óleo essencial de frutos de *Myrcia laruotteana* foi testado por Stefanello e colaboradores (2011), para verificação da atividade antiproliferativa. Ele obteve resultados favoráveis quando a amostra foi testada contra células de câncer humano in vivo (glioma, melanoma, mama, ovário e ovário-resistente, rim, pulmão, próstata, cólon e leucemia). Destacando-se que a única amostra a não obter resultado favorável foi a pulmonar.

Estudo realizado por Lima e colaboradores (2011) com *Myrcia ovata*, mostrou efeito significativo no controle da dor aguda e nos testes de inflamação sem efeitos adversos e intoxicação durante os ensaios. Esse resultado forneceu subsídio para comprovação do uso tradicional desta espécie. O óleo essencial de folhas de *Myrcia ovata* apresenta a ação antimicrobiana contra a lava do *Aedes aegypti*.

A atividade antimicrobiana foi encontrada por Nene e colaboradores (2016), na espécie *Myrcia bella*, apresentando resultado positivo ao inibir o crescimento da bactéria gram-positiva *S. aureus*.

A maioria dos artigos científicos em relação ao gênero *Myrcia* descreve os óleos essenciais como principal material de trabalho (STEFANELLO, 2011). Os principais compostos dos óleos essenciais de *Myrcia* (> 5%) estão resumidos no QUADRO 3.

QUADRO 3- PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO MYRCIA E ÓLEOS ESSENCIAIS

<i>Espécie</i>	Parte da Planta	Compostos (Abundância Relativa)
<i>M. acuminatissima</i> O.Berg	Folhas	β -pineno, linalol, terpinen-4-ol, β -cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno
<i>M. alagoensis</i> O.Berg	Folhas	β -cariofileno, germacreno D, ácido germacreno B e (2E, 6E)-farnesóico
<i>M. amazonica</i> DC.	Folhas	germacrene D, germacrene B, 1-epi-cubenol e α -muurolo
<i>M. bracteata</i> DC.	Folhas	óxido de α -bisabolol e α -bisabolol
<i>M. cuprea</i> (O.Berg) Kiaersk	Folhas	mirreno, β -cariofileno e δ -cadineno
<i>M. fallax</i> (Rich.) DC	Folhas	α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, carotol e, guaiol

FONTE: Adaptada de CASCAES *et al.*, 2015

QUADRO 4- PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO MYRCIA E ÓLEOS ESSENCIAIS

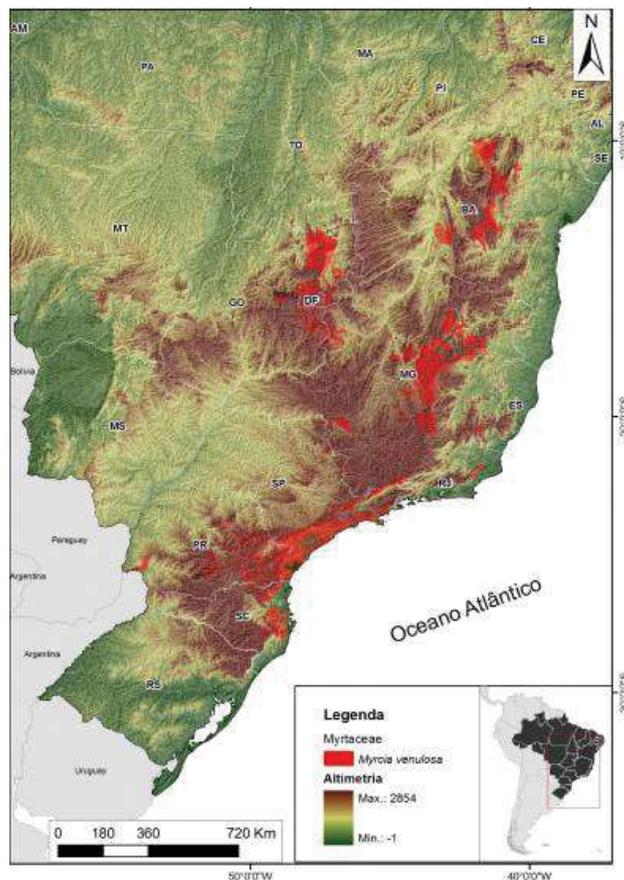
. (continuação)

<i>M. glabra</i> (O.Berg) <i>D.Legrand</i>	Folhas	α -copaene, β -cariofileno, β -selinene, α -selinene e valerianol
<i>M. laruotteana</i> Camb.	Frutos verdes	espatulenol, globulol, óxido de α -bisabolol B, α -bisabolol, globulol, (2E, 6E)-metil farnesato
<i>M. multiflora</i> (Lam) DC.	Folhas	β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, MW 222 e cubenol.
<i>M. myrtillifolia</i> DC.	Frutos	α -pineno
<i>M. obtecta</i> (O.Berg) <i>Kiaersk.</i>	Folhas	α -pineno, ar-curcumeno, β -bisaboleno, α -copaeno e α -humuleno
<i>M. ovata</i> Cambess.	Folhas	neral e geraniale
<i>M. pubiflora</i> DC.	Folhas	triciclono, 1,8-cineole, óxido de cariofileno e mustakone
<i>M. salzmanni</i> O.Berg	Flores	β -cariofileno, α -humuleno, PM 222, PM 220 e cis- β -elemona

FONTE: Adaptada de CASCAES et al., 2015

2.3 ESPÉCIE *Myrcia venulosa* DC

Myrcia venulosa ocorre nos estados da Bahia, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e Santa Catarina. *Myrcia venulosa* (FIGURA 1) (SOBRAL, 2010). Está espécie apresenta grande semelhança com *M. rufipes*, mas de diferença, pois apresenta hábito essencialmente arbóreo e indumento ocráceo, denso nos ramos e folhas (FIGURA 2) (ROSA; ROMERO, 2012)

FIGURA 1 – DISTRIBUICAO DA ESPECIE *Myrcia venulosa* NO BRASIL

FONTE: NCFlora (2018)

É uma árvore que apresentam de 2–8 metros de altura, com amos não nodosos, cilíndricos, não descamantes, indumento ocráceo, persistente, gema apical não recoberta por catafilos. Suas folhas apresentam como característica de serem opostas, concolores, não congestas no ápice dos ramos, pecíolo canaliculado, 4–6 mm comprimento; lâmina 0,5–7 × 0,3–2,5 cm, coriácea, elíptica a obovada, ápice agudo a arredondado, margem não revoluta, base cuneada, face adaxial glabrescente, com pontuações nigrescentes, face abaxial com indumento ocráceo. Panículas multifloras, axilares ou terminais, flores não aglomeradas no ápice da inflorescência; botões florais 2–4 × 2–3 mm, obovados, pilosos; brácteas e bractéolas caducas; pétalas alvas; cálice aberto no botão, 5-metros, sépalas até 2 mm comprimentos, ápice arredondado, interna e externamente com indumento, margem ciliada; hipanto prolongado acima do ovário, externamente piloso. Baga madura 6–7 × 5–7 mm, globosa, glabrescente (ROSA; ROMERO, 2012, p.615).

FIGURA 2 – ILUSTRACAO DA ESPÉCIE *Myrcia Venulosa* DC.

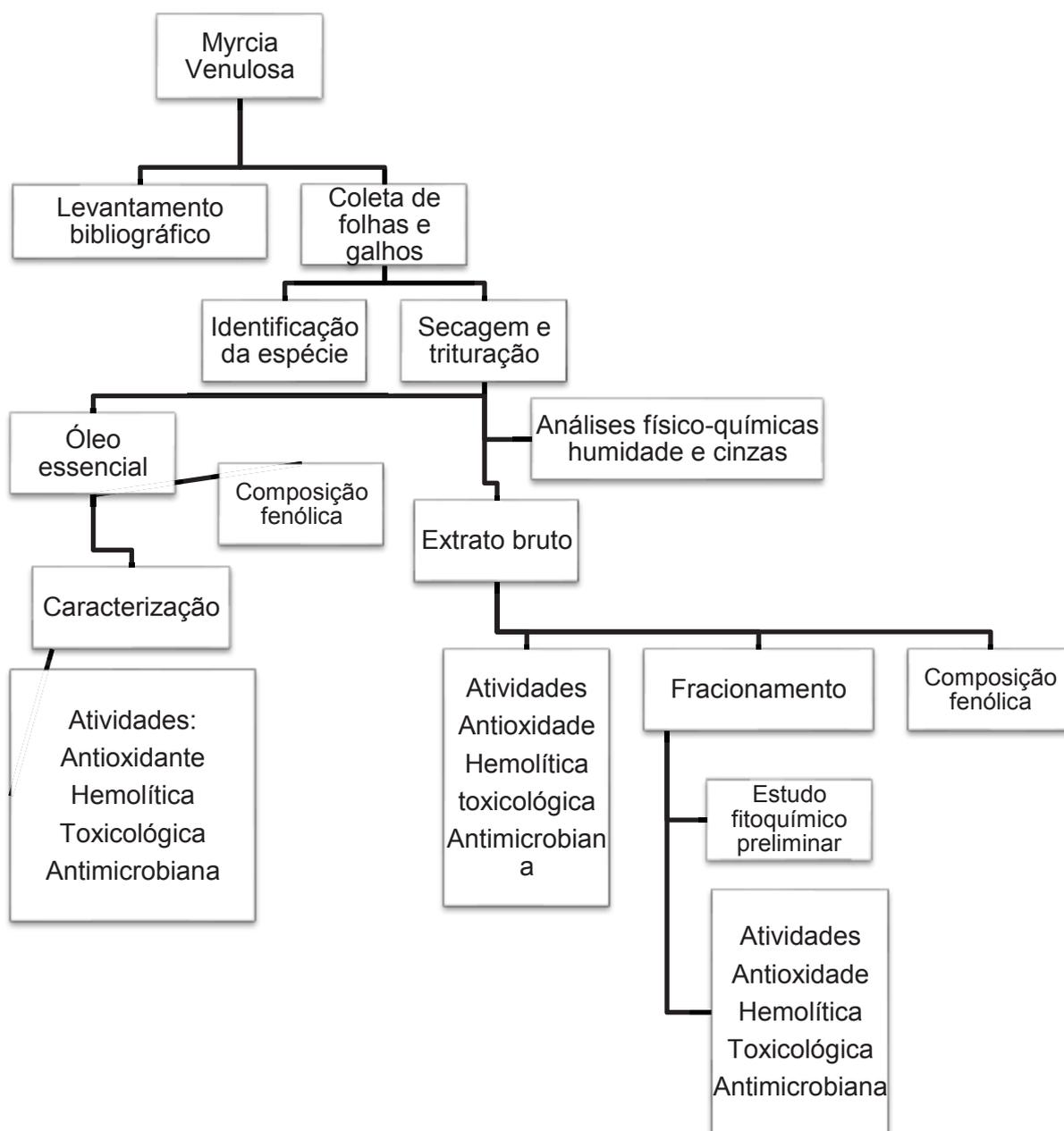


FONTE STADNIK, OLIVEIRA, ROQUE (2018)

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir é apresentado um fluxograma resumido, FIGURA 3, com as etapas de procedimentos e execuções da pesquisa a partir da espécie vegetal.

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: O autor (2019)

3.1 MATERIAL VEGETAL

A espécie *Myrcia venulosa* foi coletada entre os meses de novembro de 2017 a fevereiro de 2018, de floração e frutificação na cidade de Curitiba. A identificação da espécie vegetal foi realizada no departamento de Engenharia Florestal da UFPR. A FIGURA 4 mostra as folha e galhos e a FIGURA 5 as flores da espécie *Myrcia venulosa*.

FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DAS FOLHAS E GALHOS COLETADOS DE *Myrcia Venulosa* DC.



FONTE: O autor (2019)

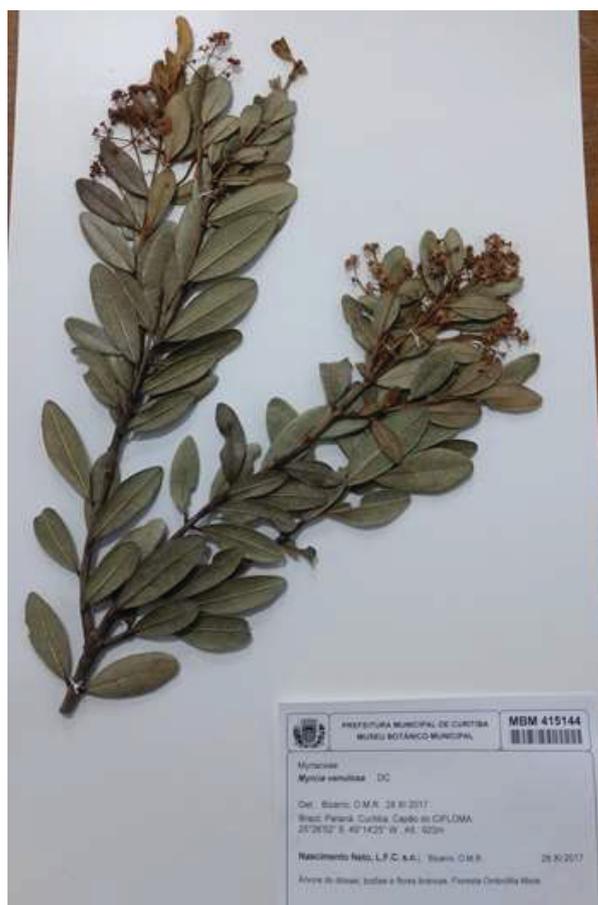
FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DAS FLORES DE *Myrcia Venulosa* DC.



FONTE STADNIK, OLIVEIRA, ROQUE (2018)

Foram coletadas Folhas (1,3 Kg) e Galhos (2,8 Kg), todas as amostras são do mesmo indivíduo de *Myrcia venulosa* localizada no capão do Cifloma, campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (UFPR), município de Curitiba, Paraná, nas coordenadas geográficas 25°26'52"S, 49°14'25"W, Alt 920m, sob o número, tombado no Herbário 415144 (FIGURA 6) e posterior realizado o registro no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.

FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Myrcia Venulosa* DC. NÚMERO 415144



FONTE: O autor (2019)

A espécie coletada passou por secagem em uma sala com circulação de ar fechada – à temperatura de 18°C – por aproximadamente 1 semana (FIGURA 7). Esse procedimento foi realizado de modo lento, em baixa temperatura, para preservar o óleo essencial da planta. A próxima etapa foi realização da trituração de folha (FIGURA 8) e caule em moimho de facas e martelos, sua posterior armazenagem foi em local seco, com temperatura controlada em 19°C para

evitar variações térmicas que possam afetar a composição da planta (BÜTER *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 1999 CALIXTO, 2000; MING 1994).

FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DO PROCESSO DE SECAGEM DA *Myrcia Venulosa*



FONTE: O autor (2019).

FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DA FOLHA TRITURADA DA ESPÉCIE *Myrcia Venulosa*



FONTE: O autor (2019).

3.2 ANALISES FISÍCO-QUIMÍCAS

3.2.1 Determinação do teor de umidade

A umidade foi realizada com a finalidade de determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada. O método de escolha para avaliação de umidade na espécie *Myrcia Venulosa* está descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Previamente a realização das análises, 3 cadinhos foram identificados e Dessecados. Amostras de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), totalizando 3 g, foram colocadas nos cadinhos dessecados, e posteriormente pesados. Estes cadinhos foram levados a estufa por 2 horas em temperatura de 100°C. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados até observação de peso constante.

O teor de umidade foi determinado a partir da diferença (em massa) entre a umidade do material estabilizado e a umidade do material seco em estufa, caracterizando a perda por umidade.

Posteriormente, foi calculado a porcentagem de umidade em relação ao material vegetal original (1):

$$(1) \% \text{ de umidade} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

Onde:

P1 = Peso do cadinho com amostra após a dessecação em estufa;

P2 = Peso do cadinho com amostra antes da dessecação em estufa;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.2.2 Determinação do teor de cinzas totais

Utilizando o mesmo material avaliado na determinação do teor de umidade, em sequência foi realizada a determinação do teor de cinzas totais de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram pesadas 3g da droga pulverizada e transferida para um cadinho de porcelana previamente

calcinado, resfriado e pesado. Após distribuir a amostra uniformemente no cadinho passou por incineração, aumentando paulatinamente a temperatura – não ultrapassando 600°C – até que todo o carvão seja eliminado. O cadinho foi posteriormente resfriado em dessecador e pesado. Calcular-se-á então, a porcentagem de cinzas em amostra triplicada (2) (LONGHINI *et. al.*, 2007).

$$(2) \% \text{ de cinzas totais} = [(P2 - P1) / P3] \times 100.$$

Onde:

P1 = Peso do cadinho após a dessecação e resfriamento em dessecador;

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e resfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica foi realizado com a finalidade de caracterizar qualitativamente os principais grupos do metabolismo secundário da espécie vegetal em estudo.

Para realização destes testes, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003). A partir do material vegetal seco e triturado, foram preparados extratos hidroalcoólico e aquoso de folhas e galhos, os quais passaram por reações colorimétricas ou precipitação.

Os componentes químicos pesquisados no extrato hidroalcoólico foram: alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, compostos iridoides, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenos. Já no extrato aquoso: heterosídeos antocianicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos, taninos, amino grupos, ácidos fixos, ácidos voláteis.

3.3.1 Extrato hidroalcoólico

O preparo do extrato hidroalcoólico foi realizado a partir de 40g de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), o qual foi macerado com 200 mL de etanol 70%, em banho-maria a 70°C por 1 hora. Este macerado resultante foi filtrado em papel de filtro.

Em seguida o extrato hidroalcoólico foi fracionado. Esta partição ocorreu em funil de separação, com solventes de polaridade crescente (FIGURA 9): hexano, clorofórmio e acetato de etila. Por meio da solubilidade, estes solventes utilizados no particionamento orientam a pesquisa dos compostos químicos, em relação a sua estrutura molecular.

No funil de separação, contendo o extrato hidroalcoólico, foram adicionados 40 mL do primeiro solvente, hexano. O funil foi agitado e então ocorre a separação da fração dissolvida. Esta etapa foi repetida por 5 vezes; e completou-se o volume da fração com o solvente extrator para 200 mL. Este procedimento foi repetido com o clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se 200 mL de cada fração. O resíduo do extrato foi chamado de fração hidroalcoólica remanescente, e seu volume completado para 200 mL com etanol 70%. As frações foram mantidas refrigeradas até a realização das pesquisas de cada constituinte químico.

FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DO FUNIL DE SEPARAÇÃO



FONTE: O autor (2019).

3.3.1.1 Pesquisa de alcaloides

Os alcaloides são compostos básicos e sua solubilidade varia de acordo com variações no pH. A pesquisa qualitativa se baseia na capacidade de combinação dos alcaloides, em estado de sal (extratos ácidos), com o iodo e metais pesados (bismuto, mercúrio, tungstênio), formando precipitados coloridos.

Nesta técnica, 50 mL de cada uma das frações foi levada a secar em banho maria à 70°C e os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico 1%. Para cada fração testada, foi transferido 1 mL para 4 tubos de ensaio.

O quarto tubo foi utilizado como controle negativo, contendo somente o extrato clorídrico. Nos demais tubos, foram adicionadas duas gotas dos reativos gerais para alcaloides: Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) e Bouchardat (iodo-iodeto de potássio).

O aparecimento de precipitado de diferentes colorações indica reação positiva para alcaloides, sendo branco para o reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

3.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são flavonoides monoméricos 3,4-diois. A reação se explica pela redução da leucoantocianidina em antocianidina, na presença de ácido clorídrico, com alteração de coloração de amarelo para vermelho.

Para esta reação, foram transferidos 10 mL de frações hexano, clorofórmio e acetato de etila para cápsulas de porcelana, as quais foram levadas a secar. A fração remanescente hidroalcoólica também teve seu volume transferido, porém não necessitava de concentração. Em seguida, foram adicionados 5 mL de etanol, 5 gotas de ácido clorídrico e as 4 cápsulas foram levadas a ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

3.3.1.2 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Foram realizadas duas técnicas para identificação de flavonoides.

a) Pesquisa de flavonoides

Em banho-maria, capsulas contendo 20 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas a secar e posteriormente, redissolvidas com 10 mL de etanol. Em seguida, foram transferidos 5 mL de cada uma das frações, inclusive a remanescente hidroalcoólica que não necessita ser seca, para tubos de ensaio.

Os tubos de ensaio foram colocados na capela em um béquer contendo gelo, devido a ocorrência de uma reação exotérmica na etapa posterior. Assim, foram adicionados 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante, lentamente.

A reação positiva desenvolve coloração rosa.

b) Teste do oxálico bórico ou Reação de Taubock

Em banho-maria, capsulas contendo 10 mL das frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas a secar.

Ao resíduo, foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg de mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), os quais foram levados a secar e redissolvidos com 5 mL de éter etílico. Este volume foi transferido para tubos de ensaio para visualização de fluorescência em câmara de luz ultravioleta.

A reação positiva desenvolve fluorescência amarela esverdeada, explicada pela formação de quelatos.

3.3.1.4 Pesquisa de cumarinas

Para esta análise, 30 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram concentradas em banho-maria até volume de 5 mL cada. Na remanescente hidroalcoólica, 30 mL da fração foi acidificada até pH 1,0 com ácido clorídrico e posteriormente, foi também concentrada até volume de 5 mL.

Após o resfriamento, a fração remanescente concentrada foi transferida para funil de separação e extraída com 2 porções de 10 mL de éter etílico. As frações etéreas das duas extrações foram misturadas e evaporadas em banho-maria até volume de 5 mL.

Foram colocados 3 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etérea) em tubos de ensaio e posteriormente, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 1N recém preparado. Os tubos foram levados para uma câmara de luz ultravioleta em 366nm, ficando expostos em repouso por 15 minutos.

Para reação positiva e observada o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

3.3.1.5 Pesquisa de compostos iridoides

Os iridoides são substâncias que normalmente apresentam dez átomos de carbono e podem ser divididos em iridoides glicosídeos, secoiridoide glicosídeo e iridoides não glicosídeos. Para a pesquisa qualitativa, foram preparadas 3 reações de identificação.

Na primeira reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionados pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de ácido clorídrico reagente. O desenvolvimento de coloração verde escura indica reação positiva.

Na segunda reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico reagente e o desenvolvimento de coloração rosa violáceo indica reação positiva.

Na terceira reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionados 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% e duas gotas de ácido sulfúrico reagente.

O desenvolvimento de coloração rosa cereja indica reação positiva.

3.3.1.6 Pesquisa de antraquinonas

Antraquinonas e naftoquinonas são polifenóis que em solução alcalina formam fenolatos hidrossolúveis com coloração rósea, devido a presença de hidrogênio ácido nas hidroxilas fenólicas que reagem com a solução alcalina. Balões de fundo chato foram levados à fervura contendo 30 mL de cada fração e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 10%. As soluções contidas nos balões, acoplados a um condensador de bolas, foram deixadas em refluxo por 30 minutos e decorrido este tempo, foram adicionados em cada balão, 30 mL de água destilada.

A fração remanescente hidroalcoólica foi transferida para funil de separação para extração com 2 porções de 10 mL de éter etílico. O extrato etéreo e as demais frações foram concentradas em banho-maria, até um volume de 5 mL, os quais foram transferidos para tubos de ensaio. Nos tubos foram adicionados 5 mL de hidróxido de amônia, sob lenta agitação para realização da Reação de Borntraeger.

A reação é considerada positiva para antraquinonas e/ou naftoquinonas com observação de coloração vermelha.

3.3.1.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Para a pesquisa de esteroides e/ou triterpenos foram realizados duas técnicas.

a) Reação de Liberman-Bouchard

Foram evaporadas até secura em banho-maria, 30 mL de cada fração.

Os resíduos foram, posteriormente, redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e em seguida, foram pipetados 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio. Os volumes foram completados para 2 mL com clorofórmio. Para esta reação, na capela, foram adicionados aos tubos de ensaio, 1 mL de anidrido acético e, lentamente, 2 mL de ácido sulfúrico

concentrado. O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6 do anel aromático. A coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre 5 e 6 do anel aromático. O desenvolvimento de coloração amarela possivelmente indica um grupamento metila no carbono de posição 14.

b) Reação de Keller Kelliani

Em quatro tubos de ensaio, foram transferidos 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e remanescente hidroalcoólica, os quais foram levados a secura. Após os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1% e transferidos para tubos de ensaio já contendo 2 mL de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxiacucares, sendo azul para esteroides e verde para triterpenos.

3.3.2 Extrato aquoso

O preparo do extrato aquoso foi realizado a partir de 40 g de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), o qual foi macerado com 200 mL de água destilada, em banho-maria a 70°C por 1 hora. Este macerado resultante foi filtrado e completado o volume para 200 mL do mesmo solvente extrator, lavando o material.

3.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos antocianicos

As antocianinas estão presentes nas plantas na forma de sais como pigmentos hidrossolúveis, os quais são encontrados principalmente nas flores, frutos e tecidos. Apresentam colorações que se modificam com variações no pH. Em presença de base, as antocianinas reagem com as hidroxilas fenólicas livres e apresentam coloração azul, devido a estrutura quinoide. Já com ácidos, há a formação de sais de oxônio que são corados em vermelho.

Nesta técnica, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para 3 tubos de ensaio. O primeiro tubo foi acidificado até pH 4,0. O desenvolvimento de coloração em tons avermelhados indica reação positiva. O segundo tubo foi alcalinizado até pH 10,0. O desenvolvimento de coloração em tons azulados indica reação positiva. O terceiro tubo de ensaio foi neutralizado até pH 7,0. O desenvolvimento de coloração em tons violáceos indica reação positiva.

O desenvolvimento de coloração verde em algum dos 3 tubos indica a presença de flavonoides.

3.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

As saponinas esteroidais possuem características de formação de espuma estável devido a elevada tensão superficial e propriedades de hemolizar os glóbulos vermelhos. Elas são esteroides glicosídeos com presença de um núcleo epirostano.

Para a pesquisa qualitativa, foi colocada a mesma quantidade de extrato aquoso em 2 tubos de ensaio. Os tubos foram agitados energeticamente com movimentos succionais por 5 minutos, e deixados em repouso por 30 minutos. A altura do anel de espuma formada e medida após a agitação e após o repouso. A reação é considerada positiva quando a altura do anel for persistente e superior a 1 cm.

3.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Nesta técnica, foi utilizada a reação de isopurpurato de sódio, a qual se baseia na formação de isopurpurato alcalino, a partir do ácido picrico, na presença de liberação de ácido cianídrico.

Foram transferidos para tubo de ensaio, cuidando para não umedecer as paredes do tubo, 5 mL do extrato aquoso e 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Uma tira de papel picro sódio foi suspensa com o auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que a tira não entrasse em contato com o extrato.

O papel picro sódio é preparado a partir de tiras de papel de filtro embebidas em ácido picrico 1%, as quais são secas ao abrigo da luz. Em

seguida, as tiras são embebidas em solução de carbonato de sódio 10% e secas ao abrigo de luz.

O tubo de ensaio contendo o extrato aquoso e reagentes foi levado a banho-maria a 60°C por 30 minutos. O desenvolvimento de coloração avermelhada no papel picro-sódico indica reação positiva.

3.3.2.4 Pesquisa de taninos

Para a pesquisa de taninos, foi realizada a reação de Cloreto férrico (a) e a reação com formol clorídrico (Ensaio de Staniasny b), onde são identificados a presença de taninos condensados e hidrolisáveis.

Taninos condensados ou proantocianidinas são derivados de catecois, produtos do metabolismo do fenilpropanol e possuem a característica de não serem hidrolisados por ácidos. Taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos fenólicos, como ácido gálico e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato.

a) Cloreto férrico

Os taninos são facilmente oxidados por influência de metais, como o cloreto férrico. Para esta pesquisa, 1 mL de extrato aquoso e 5 gotas de cloreto férrico 1% foram adicionados em tubo de ensaio. O desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos, coloração verde indica flavonoides e marrom indica poli fenóis.

b) Reação com formol clorídrico (Reacao de Staniasny)

Em balão de fundo chato, foram adicionados 30 mL do extrato aquoso, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. O balão foi acoplado ao condensador de bolas e levado a refluxo por 1 hora. Após resfriamento, o extrato formol-clorídrico foi filtrado e reservado para a pesquisa de taninos hidrolisáveis.

O material retido no filtro foi lavado com uma solução de etanol 50% e acrescido de gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Ao gotejar

o hidróxido de potássio, o desenvolvimento de coloração verde indica reação positiva para taninos condensados.

No filtrado reservado, foi adicionado excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Ao adicionar o cloreto férrico, o desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

3.3.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Ácidos voláteis são líquidos voláteis ou gases, os quais podem ser evaporados e caracterizados por destilação. Nesta técnica, 10 mL de extrato aquoso foram acidificadas com 1 mL de ácido sulfúrico 1N em tubo de ensaio, cuidando para não umedecer a parede do tubo. Uma tira de papel tornassol foi suspensa com o auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que a tira não entrasse em contato com o extrato. O tubo foi levado em banho-maria a 60°C por 30 minutos e a presença de ácidos voláteis e observada em coloração avermelhada na fita.

3.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Ácidos fixos são líquidos ou sólidos pouco voláteis. Nesta técnica, foi transferido para um balão de fundo chato, 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo por 30 minutos. Decorrido o tempo, o balão foi resfriado, seu conteúdo acidificado com ácido sulfúrico 1N e extraído, em funil de separação, com 3 porções de 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, sendo posteriormente filtrados e levados a secura em banho-maria a 50°C. O resíduo foi deixado em estufa a 100°C por 10 minutos. Em seguida, foi resfriado, 5 mL de hidróxido de amônio 1N foram adicionados, e a solução foi filtrada.

Em uma tira de papel de filtro, foram feitas 3 manchas. A primeira continha apenas o extrato amoniacal, a segunda continha extrato amoniacal e reativo de Nessler e a terceira continha apenas reativo de Nessler. O desenvolvimento de

coloração diferente na segunda mancha, em relação a primeira e a terceira, indica reação positiva para a presença de ácidos fixos.

3.3.2.7 Pesquisa de amino grupo

Nesta técnica, 10 mL de extrato aquoso foram concentrados até 5 mL, em banho-maria a 60°C. Em uma tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas de extrato aquoso concentrado e em cima da mancha, foi gotejado reativo de Ninhidrina.

Uma segunda mancha foi feita no papel apenas com o reativo de Ninhidrina, utilizado para controle. A fita foi levada a estufa a 100°C por 10 minutos e o desenvolvimento de coloração azul violácea indica reação positiva para a presença de amino grupos. A ninhidrina, um agente oxidante, transforma o grupo amino de alfa amino ácido, oxidando-o, em grupo amino e hidrindantina. O imino ácido formado se decompõe em amônia. A hidrindantina reage com a amônia formando um complexo de coloração purpura, o qual reage com outra amônia formando o complexo final de coloração azul escuro.

3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa*

Para a extração e obtenção do óleo essencial (OE) das folhas de *Myrcia venulosa*, foi utilizada a técnica de hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparelho de Clevenger (BRASIL, 2010). As folhas secas a temperatura ambiente (500g). Foram trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo de 3000mL, adicionando-se água até que toda a mostra esteja em imersão no líquido. O balão estava conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, com tempo de extração de 8 horas. Após a ebulição, os vapores de água e os voláteis são conduzidos em direção ao condensador, onde ocorre a troca de calor, condensando os vapores com a água de refrigeração. Nessa etapa podemos visualizar a separação das fases líquidas da água e óleo essencial, em seguida a amostra é removido do sistema fechado e acondicionado em freezer para não ocorrer sua volatilização (VIANA *et al.*, 1998).

Decorrido o tempo da extração foi realizada a leitura do volume do óleo

essencial diretamente na escala do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente calculado o rendimento (3) em mililitros (mL%) de óleo essencial por 100 g da droga:

$$(3) \text{ Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume obtido de óleo essencial em mL}}{\text{Massa de material vegetal moído em g}} \times 100$$

3.4.1 densidade relativa

Para a determinação da densidade relativa foi utilizado um tubo capilar. Primeiramente foi realizada a calibração do tubo constituindo pela determinação da massa do tubo capilar vazio e do volume de água destilada a 20°C usado para completa-lo. Após esse procedimento o tubo foi colocado para secar em mufla e depois preenchido com o óleo essencial para verificar seu peso com o óleo. Então foi feita a diferença de peso do tubo capilar com água e com óleo essencial o que possibilitou calcular a densidade relativa da amostra.

3.4.2 Identificação dos constituintes do óleo essencial

O óleo essencial foi submetido a análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massa, na cromatografia da marca Variam modelo 400. A detecção por massa foi feita por ionização eletrônica (70eV) e o analisador do tipo Ion Trap. A coluna utilizada para separação dos componentes foi VF5-MS de 30m X 0,25mm com injetor na temperatura de 250°C. O forno inicialmente foi ligado a 50°C e mantido por 2 mim, então foi aquecido até 300°C a uma taxa de 5°C por minuto, totalizando 80 minutos de análise.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada através da comparação dos índices de retenção de Kovats obtidos nos espectros, com os documentados na literatura (ADAMS, 2007).

3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACÇÕES

3.5.1 Preparo do Extrato bruto

O extrato bruto folha (EBF) e extrato bruto galho (EBG) foram obtidos através do aparelho Soxhlet modificado por Carvalho (2009), este possui patente de modelo industrial no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o no 0601703-7 A2.

A planta triturada foi pesada, 600 g para galhos e 500g para folhas, e colocada no aparelho Soxhlet em duas vezes, o qual continha uma placa porosa e algodão para conter o material vegetal. Este aparelho foi acoplado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato contendo perolas de vidro. O solvente utilizado para a extração foi o etanol 80°GL, em um volume de 2,2 a 3,5 litros. Então, foi deixado em refluxo, por aproximadamente 4 períodos de 4 horas para galhos e 10 à 11 períodos de 4 horas para folhas, para a obtenção do extrato hidro alcoólico, que foi recolhido no balão de fundo chato, por extração do meio solvatado.

Através do aquecimento, o solvente é evaporado e o condensador de bolas faz com que esse solvente volte e percorra novamente o material vegetal.

O aparelho de Soxhlet é economicamente viável, visto que o solvente é reutilizado em toda a extração (CARVALHO et al., 2009).

Este processo foi realizado separadamente para folhas e galhos, obtendo-se assim o extrato bruto de folhas e o extrato bruto de galhos. Partindo-se destes extratos brutos, foram realizadas as análises de teor de sólidos, fracionamento e atividades biológicas.

3.5.1.1 Teor de sólidos

O teor de sólidos se baseia na eliminação da fase líquida do extrato bruto para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Em 3 placas de Petri, previamente dessecadas e taradas, foram adicionados 10 mL de extrato bruto hidroalcoólico (folhas ou galhos). As placas foram levadas a estufa a 100°C por 2 horas e posteriormente pesadas,

após resfriamento no dessecador, até a observação de peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo sólido do extrato e a placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

O teor de sólidos também permite o cálculo do rendimento dos extratos brutos (4):

$$(4) \text{ Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume EB ml} \times \text{Teor de sólidos \%}}{\text{Planta seca g}} \times 100$$

Onde:

Volume EB = Volume de extrato bruto obtido em mL.

Planta seca = Quantidade de planta seca e triturada em g utilizada para a obtenção do extrato bruto.

3.5.1.2 Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico

Os extratos brutos hidroalcoólico de folhas e galhos foram concentrados em rotaevaporador até que se obteve aspecto de extrato fluido e a partir deste, a obtenção de frações foi realizada pelo sistema de partição líquido-líquido. Foram utilizados solventes que apresentam padrão analítico e polaridades diferentes, na seguinte ordem crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar na identificação das classes de metabolitos com atividades nos bioensaios.

Para o fracionamento, foi utilizado o aparelho de Soxhlet modificado (PI0601703-7 A2). O aparelho contendo o extrato bruto concentrado foi conectado ao condensador de bolas e ao balão de fundo chato contendo perlas de vidro. Após ser adicionado o primeiro solvente, hexano, este sistema foi então levado a refluxo, para que os solventes pudessem realizar uma adequada extração. Este processo foi repetido com os demais solventes. Os extratos resultantes foram: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração

galho remanescente (FGR). Estas frações foram avaliadas nos bioensaios e demais testes juntamente com os próprios extratos brutos, totalizando dez amostras analisadas (5):

$$(5) \text{ Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa da fração obtida em g} \times 100}{\text{Planta seca em g}}$$

Onde:

Planta seca = Quantidade de planta seca e triturada utilizada no fracionamento.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

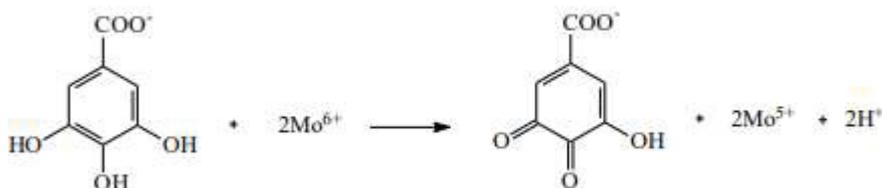
A avaliação de uma possível atividade antioxidante exercida pela espécie *Myrcia venulosa* foi testada pelo método de redução do radical DPPH e formação do complexo fosfomolibdenio

3.6.1 Formação do complexo fosfomolibdenio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. Possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999).

É fundamentado na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) (FIGURA 10) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente. Esse complexo possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz, sendo mais intensa quando maior for a atividade antioxidante da amostra (BORA et al., 2005; BALESTRIN, 2006)

FIGURA 10 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MOLIBDÊNIO POR UM COMPOSTO ANTIOXIDANTE



FONTE: SANTIAGO (2015)

O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28 mL, 0,1 mol.L) com solução de Tetra-hidrato de heptamolibdato de amônio (12 mL, 0,03 mol.L⁻¹) e solução de H_2SO_4 (20 mL, 3 mol.L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H_2O destilada para 100 mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz. As amostras para efeitos deste estudo foram levadas à secura em banho-maria (40°C), e a partir do material seco, foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200 mg/ml. Destas, 0,3 mL foram adicionados à 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio.

Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C, por 90 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorvâncias, usando 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200 µg. mL) usada como padrão, vitamina C (200 µg. mL) E BHT (200 µg. mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 100%, sendo os resultados expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%).

A equação (6) demonstra o cálculo de atividade antioxidante frente a estes padrões:

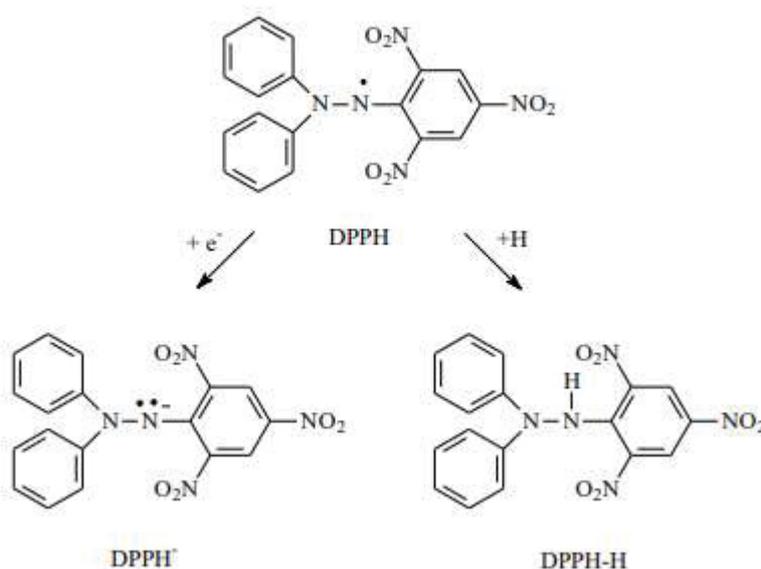
$$(6) \text{ AAR\%} = \frac{[\text{Concentração Padrão mg/mL} \times (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})]}{[\text{Concentração Amostra mg/mL} \times (\text{Abs padrão} - \text{Abs branco})]} \times 100$$

3.6.2 Redução do radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. O método de controle mais utilizado é o decaimento da absorbância no comprimento de onda observado entre 515 à 528nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH.

A estabilidade do radical ocorre devido à deslocalização do elétron desemparelhado (FIGURA 11) por toda a molécula, conferindo a ela, uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol ou metanol (ALVES, et al, 2010).

FIGURA 11 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL DPPH POR UM ANTIOXIDANTE



Fonte: SANTIAGO (2015)

Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (ALVES, et al, 2010).

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente a 518nm (Mensor et al., 2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas diferentes de cada amostra e interpoladas em gráfico para determinação da equação da reta. Em tubo de ensaio, foram adicionados 2,5mL da amostra a ser testada e depois adicionado 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi preparado um controle com 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina, vitamina C e BHT.

A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi calculada a partir da equação (7):

$$(7) \text{ AA\%} = 100 - \frac{[(\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}) \times 100]}{(\text{Absorbância controle})}$$

Para cada concentração de amostra e padrão testados foram calculados a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Por regressão linear foi plotado um gráfico, em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada e a média da AA% das amostras de cada concentração.

A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serviu de base para determinação do valor da concentração letal (CL₅₀.)

Para amostras de óleo essencial, foram preparadas soluções amostras e padrões na concentração de 200 µg/mL em metanol, com adição de Polisorbato 80 ao óleo na proporção de 1:1 (m/m). O controle foi constituído de Polisorbato 80 a 0,1% em metanol e reativo DPPH. A reação e o cálculo seguiram-se conforme já descrito. O resultado de porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial foi comparado aos resultados encontrados para os padrões na mesma concentração.

3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICO

3.7.1 Determinação de fenólicos totais

A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® a 760nm, utilizando reagente FolinCiocalteau, segundo a metodologia descrita por Roesler e colaboradores (2007), com modificações.

O método colorimétrico Folin-Ciocalteau envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente.

Uma curva de referência nas concentrações de 0,0 a 17,5 mg/ml em metanol 50% foi construída utilizando-se como padrão o ácido gálico 100 mg/ml-1. Para a determinação de compostos fenólicos, os extratos com concentrações conhecidas (mg.mL⁻¹) em metanol 50%, foram homogeneizados em banho ultrassom por 30 minutos e a partir deles, diluições seriadas em solução de metanol 50% foram realizadas e, assim, determinada a melhor concentração para se obter o teor de compostos fenólicos nos extratos (localizada na faixa mediana ao centro da curva analítica). Para a reação colorimétrica, uma alíquota 3,4 ml (amostra 0,32mL + metanol 3,1mL metanol) da solução metanólica de extrato foi homogeneizada em agitador de placas por 2 minutos com 0,2 mL de solução Folin Ciocalteau, posteriormente homogeneizada com 0,4 mL de solução de carbonato de sódio 5% e mantida em incubação a 50°C por 5 minutos em banho maria para desenvolvimento de cor. O sistema foi resfriado rapidamente em banho de gelo e realizado a leitura em espectrofotômetro a 760 nm a temperatura ambiente (25°C±2).

A quantificação de compostos fenólicos nos extratos foi determinada por meio da curva analítica e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) - mg de ácido gálico pelo equivalente em g da concentração usado nos extratos e óleo essencial.

A porcentagem dos fenóis totais (AA%) foi calculada a partir da formula (8):

$$(8) c = \text{Absorbância} - A/B$$

$$\% \text{Fenóis totais} = c \times 250 \times 10^{-3} \times 100 / m(g)$$

Onde:

c = concentração de ácido gálico em mg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta

B = coeficiente angular da equação da reta

3.7.2 Quantificação de flavonoides

A quantificação dos flavonoides foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Zhishen e colaboradores (1999), com modificações em a espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu® a 510 nm. A curva de referência foi construída utilizando-se o padrão catequina 500 µM nas concentrações de 10 a 200 µmol. Para a determinação dos flavonoides, extratos com concentrações conhecidas (mg/ml) em água destilada foram homogeneizados por 30 minutos em banho ultrassom e a partir deles, diluições seriadas em água deionizada foram realizadas e, assim determinada a melhor concentração para se obter o teor de flavonoides nos extratos. A reação colorimétrica ocorreu com a homogeneização de 0,1mL do extrato com 0,39 µL de água destilada em agitador de placas por 1 minuto, posteriormente outras séries de homogeneização com soluções foram realizadas – 0,02mL de NaNO₂ por 4 minutos, 0,02mL de AlCl₃ por 6 minutos e 0,2 de NaOH mais 0,24mL de água destilada por 1 minuto. Para o branco o extrato foi substituído por 0,1 µL de água destilada. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 510 nm a temperatura ambiente (25°C±2) e os resultados expressos em equivalente de catequina - mg pelo equivalente em g da concentração nos extratos.

A porcentagem dos flavonoides (AA%) foi calculada a partir da fórmula (9):

$$(9) \ c = \text{Absorbância} - A/B \text{ m(g)}$$

$$\% \text{ AA Flavonoides} = c \times 500 \times 10^{-3} \times 100 / \text{m(g)}$$

onde:

c = concentração de catequina em mg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta

B = coeficiente angular da equação da reta (ROLIM et al. 2005)

3.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.8.1 Toxicidade preliminar

A avaliação da toxicidade preliminar *in vitro* dos extratos brutos, frações e óleo essencial foi realizada frente ao micro crustáceo *Artemia salina*. O método executado foi baseado no método descrito por Meyer (1982) e é considerado com custo baixo e de rápida execução.

Para a eclosão dos ovos, foi preparada uma solução salina (água do mar artificial) a partir da dissolução de 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) em 400 mL de água destilada. Esta solução foi aerada por 30 minutos e, durante a incubação, seu pH foi mantido entre 8,0 e 10,0 para evitar a morte dos crustáceos que são sensíveis ao pH abaixo de 6 ou acima de 10,5 (LEWAN et al., 1992).

Ovos de microcrustáceo da espécie *Artemia salina*, 200 mg, foram colocados para eclodir em 400 mL de solução salina. A temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C e a solução foi mantida sob agitação e iluminação (20 W) constantes por 48 horas.

Foram preparadas soluções com os extratos brutos e frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica) em concentrações

de 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 10 µl/ml em metanol, todos em triplicata. As mesmas concentrações foram preparadas para o controle positivo Sulfato de quinidina e óleo essencial, sendo que as amostras de óleo foram solubilizadas em Polisorbato 80 na proporção de 1:1 (m/m).

Os frascos contendo as soluções amostras e controles foram colocados em estufa a 40°C para total eliminação do solvente de diluição, inclusive o frasco controle negativo, contendo apenas o solvente da diluição (metanol e Polisorbato 80 a 0,1% em metanol para o óleo essencial).

Após evaporação: os frascos contendo as amostras e controles, foram ressuspensos com 1 mL de solução salina e a incubação de 10 nauplios foi realizada na sequência. O volume dos frascos foi completado com solução salina para 5 mL e após 24 horas, realizou-se a contagem dos nauplios vivos e mortos em presença das concentrações analisadas, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa.

Procedeu-se a avaliação dos resultados a partir da aplicação de testes estatísticos pelo método Probitos (FINNEY, 1956) através do software SPSS versão 23.0. Nestes testes, foram determinadas as doses letais capazes de matar 50% e 90% dos nauplios, CL₅₀ e CL₉₀ respectivamente, bem como o intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas tóxicas quando CL₅₀ forem menor que 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982).

3.8.2 Atividade hemolítica

O método da atividade hemolítica *in vitro* foi baseado no método descrito por Banerjee e colaboradores (2008) com modificações. Anteriormente a realização do teste, foram preparados em solução tampão fosfato-salino (PBS), sangue, soluções amostras e controles.

A solução tampão PBS foi obtida a partir de Cloreto de sódio (8,0 g/L), Cloreto de potássio (0,2 g/L), Fosfato dissódico (1,15 g/L), Fosfato monopotássico (0,2 g/L) e Água (q.s.p. 1000 mL). Após o preparo, o pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi armazenada em geladeira, pois ao longo do teste, ela deve ser utilizada gelada.

No momento dos ensaios, o frasco de sangue de carneiro foi homogeneizado realizando leve agitação manual e foram transferidos 3 mL a um tubo de falcon para centrifugação durante 5 minutos a 3000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado lavado com cerca de 5 mL de PBS gelado. O processo se repetiu até a obtenção de sobrenadante incolor. Em seguida, a papa de hemácias foi diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2% (v/v).

As amostras de extrato bruto e frações foram obtidas a partir do preparo de uma solução mãe a 1000 µg/mL, solubilizando-as em metanol 10% em PBS. A solução mãe de óleo essencial seguiu o mesmo preparo, com a adição de 50 µL de dimetilsulfoxido (DMSO). A partir das soluções mãe, foram realizadas diluições em PBS até a obtenção das concentrações 250, 500, 750 e 1000 µg/ml. Como controles positivos foram utilizados Triton 1% em PBS (200 µL de Triton 1% + 200 µL de Hemácias 2%), como controle negativo foi utilizado 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%.

Após as pipetagens, os tubos de eppendorfs foram incubados em estufa a temperatura de 37°C durante 3 horas. Decorrido este tempo, foram levados para centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido, 160 µL, para microplaca com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', para posterior leitura em espectrofotometro Multiscan FC, Thermo Scientific[®] na faixa de 540nm.

A porcentagem da atividade hemolítica (AH%) foi calculada, em relação ao Triton 1%, a partir da equação (9)

$$(9) \text{ AH \%} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco cor} - \text{Abs branco solvente})}{(\text{Abs triton} - \text{Abs branco cor} - \text{Abs branco solvente})} \times 100$$

Na realização do cálculo, são subtraídas das absorbâncias do teste: as absorbâncias correspondentes ao branco, para descontar a influência da cor dos extratos brutos, frações e óleo essencial; e as absorbâncias do branco solvente, para descontar a influência dos solventes de preparo das soluções.

A análise de variância foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de

$p < 0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6

3.8.3 Atividade Antimicrobiana

Foi testado o potencial antibacteriano dos extratos pesquisados, frente às oito cepas padrões de bactérias, dentro destas, quatro bactérias Gram positivas e quatro bactérias Gram-negativas, servindo como triagem iniciado para direcionar quais amostras seriam submetidas ao teste de micro diluição em caldo (AYRES et al., 2008).

Esse teste se baseia na difusão radial das substâncias, e a possível presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada não interfere na difusão da substância antimicrobiana no Agar, tornando este método apropriado para testar a difusão de substâncias em extratos etanólicos de plantas (SILVEIRA et al., 2009).

Foram selecionadas para os testes as cepas de micro-organismos *Enterococcus faecalis* ATCC 28312, *Streptococcus pyogenes* ATCC 18017, *Staphylococcus aureus* ATCC 30850 e *Bacillus subtilis* ATCC 7823. Das Gram negativas, as bactérias de estudo foram *Salmonella typhimurium* ATCC 17118, *Escherichia coli* ATCC 24202, *Enterobacter aerogenes* ATCC 15089 e *Proteus mirabilis* ATCC 26644.

Os materiais utilizados (vidrarias, pinças) foram esterilizados em autoclave 120°C, por 30 minutos.

3.8.3.1 Meio de cultura

Para a realização dos testes antimicrobianos foram utilizados os seguintes meios de cultura: Mueller-Hinton Agar e Mueller-Hinton caldo, para o crescimento das bactérias. Todos os meios de cultura foram preparados conforme instruções do fabricante, e logo após levados para a autoclavagem durante 20 min a 121°C.

3.8.3.1 Preparo do inóculo

As bactérias foram inoculadas em placas de Petri pequenas (90 mmX15 mm) contendo meio de cultura de acordo com o micro-organismo. Para as bactérias foi utilizado Agar Mueller-Hinton, levando-se para a estufa a 35°C por 24 horas. Após o crescimento nas placas, as bactérias foram inoculadas em solução salina estéril (0,9%), com turbidez ajustada com a solução padrão de MacFarland n°0,5 para obtenção de uma concentração padrão de micro-organismos ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL).

3.8.3.2 Difusão em meio sólido a partir de orifício.

Para uma investigação preliminar da capacidade antimicrobiana do extrato e frações das folhas e galho, assim como do óleo essencial, foi utilizada a técnica da difusão em meio sólido a partir de orifício (BAUER et al., 1966; ALVES et al., 2000; ANTUNES et al., 2006; AYRES et al., 2008) com algumas modificações, seguindo as recomendações do CLSI (2016).

O extrato das folhas e galho foram analisados em seis concentrações, partindo de uma concentração inicial de 2000 µg/mL, obtendo as demais concentrações pelo processo de diluição seriada (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL) utilizando como solvente etanol a 70%. O óleo essencial foi analisado em quatro concentrações diferentes pelo mesmo processo de diluição seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), utilizando Dimetil-Sulfóxido (DMSO) como solvente. A semeadura dos inóculos, previamente padronizados na concentração de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL foi realizada com o auxílio de um swab estéril e de forma homogênea nos meios de cultura Agar Mueller-Hiton e Agar Sabouraud. Com o auxílio de ponteiras descartáveis estéreis realizou-se a perfuração do meio sólido, obtendo cavidades com 8 milímetros de diâmetro. Nestas cavidades foram adicionados 20 µL de cada amostra e dos controles negativos (solventes utilizados).

Paralelamente, em placas separadas, foram inoculados os padrões de referência. Para as bactérias, discos de antibióticos padrões da empresa NEWPROV (Ampicilina 10 µg, Eritromicina 15 µg, Gentamicina 10 µg, Penicilina

10 µg, Tetraciclina 30 µg e Vancomicina 30 µg) foram utilizados como controles positivos, aplicando-se a metodologia da difusão em disco (BAUER et al., 1966) para avaliar o potencial destes. Após 30 min, as placas de Petri com as amostras foram incubadas, sem inversão, em estufa a 35°C por 24 horas. As placas contendo os discos de antibióticos padrões foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A mensuração do halo de inibição do crescimento bacteriano foi realizada com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, segundo a USP XXVIII (2005).

3.8.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato do extrato hidro alcoólico das folha, galho e do óleo essencial frente às oito cepas padrão de bactérias foi realizada em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços, conforme metodologias descritas (AYRES et al., 2008; HANAMANTHAGOUDA et al., 2010; SILVA et al., 2011) com algumas modificações. As recomendações da CLSI (2016) foram novamente aplicadas.

Inicialmente, são depositados 100 µL de caldo Müller-Hinton em todos os poços envolvidos no teste. Na coluna 1 – linha A acrescentou-se 100 µL do extrato galhos na concentração de 2000 µg/mL. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato (2000 µg/mL a 15,625 µg/mL) por meio da diluição seriada com o próprio meio de cultura. Posteriormente, é adicionado 10 µL do inóculo bacteriano, de crescimento recente (24 horas). Este inóculo foi preparado através da comparação da turvação à escala de MacFarland n° 0,5, após, diluído na proporção 1:10 com solução salina estéril (0,9 %), de modo a obter uma concentração final da suspensão bacteriana de 10⁴ UFC/mL.

As placas são tampadas e incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido este período, é acrescentado 20 µL do indicador TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5 % (p/v), e a placa re-incubada por 1 hora na referida temperatura. A CIM é

definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, ou seja, inibir o crescimento bacteriano.

Este teste foi realizado em triplicata. Nas colunas 4, 5 e 6 adicionou-se o extrato das folhas, na mesma concentração inicial do extrato do galho, repetindo o mesmo procedimento. Nas colunas 7, 8 e 9 foi adicionado o óleo essencial, na diluição inicial de 1:2 com o solvente Tween 80 a 10 % (solução aquosa).

É repetido o mesmo procedimento de diluição seriada com o óleo essencial, obtendo concentrações de 1:2 até 1:256, assim como, as demais etapas desta técnica. Nas colunas 10, 11 e 12 foi adicionado o controle positivos (Eritromicina 30 µg/mL) os controles negativos (etanol 70 % e Tween 80 a 10%) e o controle de esterilidade do meio de cultura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos da espécie *Myrcia venulosa* foram coletados, secas em ambiente fechado a 19°C durante duas semanas e, posteriormente, trituradas separadamente. A retirada de água da planta fresca é importante para manter uma maior estabilidade e evitar reações de hidrólise e contaminação microbiológica (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SIMÕES, et al., 2017).

As quantidades de droga vegetal seca e triturada foram de 1489,3 g para folhas e 2040,9 g para galhos, as quais foram utilizados para análises físico-químicas (umidade e cinzas totais), ensaio sistemático em análise fitoquímica, obtenção de extrato bruto e óleo essencial, sendo este último realizado apenas para as folhas.

4.2 ANALISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os ensaios físico-químicos são importantes parâmetros a se estabelecer. Pois definem e confirmam padrões de controle de qualidade para determinada espécie, uma vez que denunciam adulterações ou falsificações de materiais. No caso de *Myrcia venulosa*, foram estabelecidos pela primeira vez, agregando dados inéditos ao compilado da espécie. Esta análise tem grande importância uma vez que pode auxiliar na identificação botânica e identificação de impurezas na amostra (BRASIL, 2010; SIMÕES, et al., 2017).

4.2.1 Umidade

Para assegurar a qualidade de um material vegetal é realizado o teste do teor de umidade de planta, pois a contaminação por fungos e bactéria pode ocorrer, gerando alteração no material vegetal o que, além de representar riscos devido à produção de substâncias tóxicas, podem levar a destruição e/ou alteração dos princípios ativos tornando o material impróprio para análises (BRAGA, 2007)

A TABELA 1 apresenta os resultados encontrados para a análise de umidade na espécie pesquisada.

TABELA 1 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa* DC

ANÁLISE	UMIDADE (%)	DESVIO PADRÃO %
Folha	10,02	0,07
Galho	13,75	0,15

FONTE: O autor (2019).

4.2.2 Cinzas totais

A determinação do conteúdo de cinzas é um parâmetro que permite a verificação de impurezas não voláteis que podem estar presentes na amostra vegetal. A quantificação destes compostos é avaliada por meio da determinação do resíduo por incineração, onde a planta calcinada a alta temperatura, resulta em compostos minerais na forma de cinzas. Ao exceder os limites propostos, a análise pode detectar possibilidades de adulteração e contaminação presentes na droga vegetal (ALMEIDA, 2003; SIMÕES, et al., 2017).

A TABELA 2 apresenta os resultados encontrados para a análise de cinzas totais na espécie pesquisada.

TABELA 2 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa*.

ANÁLISE	CINZAS (%)	DESVIO PADRÃO
Folha	4,23	0,13
Galho	7,7	0,78

FONTE: O autor (2019).

4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica dos metabólitos secundários foi realizada nos extratos hidro alcoólicos e aquoso.

A classificação dos grupos de metabólitos secundários foi realizada por meio de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de cor e/ou formação de precipitado. Esta etapa indicou os grupos de metabolitos secundários e substancias majoritárias presentes na *Myrcia venulosa*.

4.3.1 Extrato hidro alcoólico

O extrato hidroalcoólico foi preparado separadamente para folhas e galhos, posteriormente, os extratos foram fracionados, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a fração remanescente hidro alcoólica. A pesquisa dos constituintes químicos foi realizada em todas as frações e os resultados estão apresentados na TABELA 3 para galhos e na TABELA 4 para folhas.

TABELA 3 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa*.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	AMOSTRAS			
	FOLHA			
	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração. Remanescente
Alcaloides	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Heterosídeos Flavonoides	+	-	+	+
Flavonoides	-	+	+	+
Cumarinas	-	-	+	-
Compostos iridoides	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Terpenos/ Esteroides	+	-	+	-

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

TABELA 4 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUIMÍCO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GALHOS DA ESPÉCIE *Myrcia venulosa*.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	AMOSTRAS			
	GALHO			
	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração Remanescente
Alcaloides	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Heterosídeos Flavonoides	+	-	+	+
Flavonoides	-	-	+	-
Cumarinas	-	-	-	-
Compostos iridoides	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Terpenos/ Esteroides	+	-	+	-

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

A espécie *Myrcia Vanulosa* apresentou resultado positivo para flavonoide. Eles são sintetizados a partir de uma molécula de fenilalanina e 3 malonil-CoA, uma via que é conhecida como biossintética dos flavonoides. Os flavonoides são um famílias muito diversas de compostos, embora todos os produtos finais sejam caracterizados por ser polifenólico e solúvel em água (GARCÍA-TIRADO, RIEGER-REYES, SAZ-PEIRO, 2012)

Como comparativo na literatura pode ser citada a triagem fitoquímica do pó das folhas de *Eugenia uniflora L.* (Myrtaceae), que evidenciou a presença de heterosídeos antraquinônicos, esteróides, triterpenos, taninos, heterosídeos flavonóides e saponínicos (FIUZA *et. al*, 2008).

Quimicamente, a maioria dos flavonoides baseia-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno ligado por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo. Podem ser encontrados com dentre os grupos de metabólitos secundários de plantas, sendo subdivididos em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonois, flavanois e antocianinas (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Flavonoides também foram encontrados em *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae, em exemplares da região de Minas Gerais e em Brasília. Os autores descrevem variabilidade nos teores de metabólitos secundários, especialmente no que se refere aos flavonoides, da matéria prima vegetal de *P. pseudocaryophyllus* relacionada a fatores fenológicos e geográficos, (PAULA et. al, 2008).

Levando-se em conta o estudo apresentado por Paula e colaboradores (2008) pode se concluir que mesmas espécies que tiveram seu desenvolvimento em locais diferentes apresentam características fitoquímicas distintas, portanto estudos com *Myrcia venulosa* de outras regiões irão enriquecer os dados apresentados.

A presença de cumarinas foi evidenciada na folha acetato de etila com o aparecimento de fluorescência azul e verde quando visualizadas no ultravioleta. Esse grupo químico é amplamente distribuídas nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2- benzopirona) (SIMÕES; SPITZER, 2010).

Dentre o uso terapêutico das cumarinas pode ser destacado a atividade anti-HIV, isolados das folhas de uma árvore de floresta tropical, *Calophyllum lanigenum* Miq. var. *austrocoriaceum*, família *Clusiaceae*, encontrada na Malásia. Apresentando capacidade de inibiram a replicação in vitro do HIV-1, provavelmente, por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase dependente de DNA e da DNA-polimerase dependente de RNA presentes no vírus (RADÜNZ et, al, 2012).

Pesquisas evidenciam que as cumarinas apresentam atividades biológicas, sendo as mais comuns: anti-neoplásica, efeito narcótico, hemostático, sedativo, espasmolítico, anticoagulante, analgésico, regulador hormonal e vaso dilatador. Além disso, as cumarinas possuem ainda um efeito regulador que, em concentrações diminutas da substância, promove o crescimento vegetativo (SOUZA, 2011).

A pesquisa de esteroides e/ou triterpenos foi realizada pela reação de Libermann Bouchard, em que os resultados apresentaram-se positivos exceto

para as frações de folha e galho de clorofórmio, com o desenvolvimento de coloração verde, a qual indica função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre as posições 5 e 6 do anel aromático. Na reação positiva de Keller Kelliani, houve o desenvolvimento de coloração na zona de contato das amostras, em todas as frações.

Santos e colaboradores (2018) encontraram resultados similares em *Eugenia mattosii* (Myrtaceae), popularmente conhecida no Brasil como “cerejinha”, constatando a presença de compostos fenólicos, terpenos e/ou esteroides, assim como foram encontrados na *Myrcia venulosa*.

Eugenia mattosii foi testada em modelo de úlcera gástrica induzido pelo etanol, foi evidenciada redução significativa de áreas danificadas para doses de 50 e 250 mg/kg do extrato das sementes, enquanto no modelo de úlcera induzida por indometacina, todas as partes do fruto apresentaram capacidade de defesa da mucosa gástrica ao reduzir as lesões nas doses de 50, 125 e 250 mg/kg (SANTOS et al., 2018)

Foi encontrado flavonoides, saponinas, triterpenos e/ou esteroides em estudo fitoquímico de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), podendo estarem diretamente relacionados à analgesia periférica induzida (ALVARENDA, et al, 2015)

4.3.2 Extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado separadamente para folhas e galhos. A pesquisa dos constituintes químicos foi realizada e os resultados estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO AQUOSO

GRUPO FITOQUÍMICO	EXTRATO AQUOSO GALHOS	EXTRATO AQUOSO FOLHAS
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	+	+
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Taninos Reação Cloreto férrico	+	-
Taninos condensados	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	-
Ácidos voláteis	+	-
Ácidos fixos	-	+
Amino grupos	+	+

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

No extrato aquoso de galhos da espécie *Myrcia venulosa*, foi observado a formação de espuma, sendo indicativo da presença de heterosídeos saponínicos.

A pesquisa de taninos, pela reação com o cloreto férrico, foi considerada positiva com o desenvolvimento de coloração azul para o extrato aquoso de galhos. O extrato de galhos também apresentou taninos condensados com o desenvolvimento de coloração verde e taninos hidrolisáveis com o aparecimento de coloração azul na reação com formol clorídrico (Ensaio de Staniasny), enquanto o extrato de folhas apresentou apenas resultado positivo para taninos condensados.

O extrato aquoso galho apresentou resultado positivo para ácidos fixos através do reativo de Nessler e o extrato aquoso de folha apresentou resultado positivo para ácidos voláteis mediante a presença de vermelho no indicador universal de pH 0-14.

Em estudo realizado em *Psidium cattleianum* Sabine e *Campomanesia guazumaefolia* (CAMB.) BERG, ambas pertencentes a família Myrtaceae, apresentou resultado positivo para taninos e saponinas (MÜLLER, et al, 2012).

4.4 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais também podem ser nomeados como óleos etéreos, pois apresentam solubilidade em solventes orgânicos apolares além de possuírem essências pelo aroma, sendo ainda categorizados como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e com densidade menor do que a da água (BAKKALI *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais são formados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, sendo possível encontrar em suas propriedades efeitos antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antinociceptivas, antivirais e antiflogísticas, entre outras. (MARTINS *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2016).

A TABELA 6 apresenta os resultados do volume obtido do óleo essencial, sua densidade e rendimento.

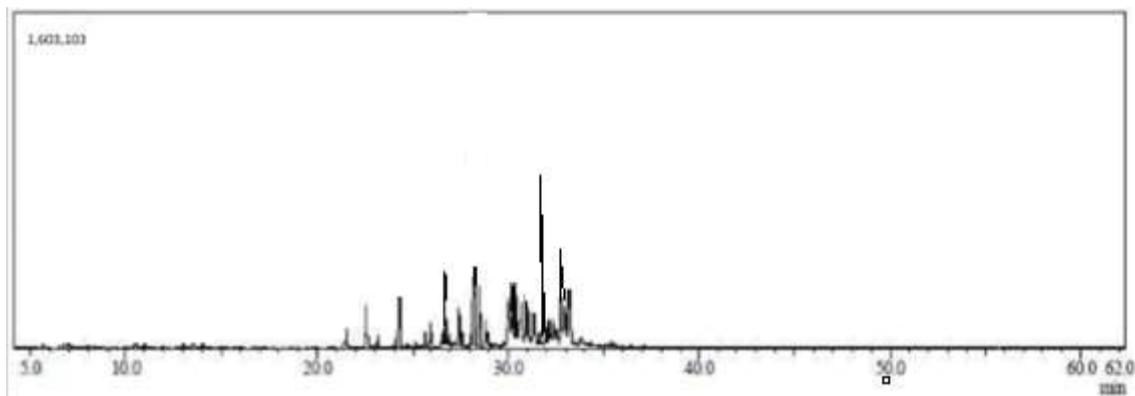
TABELA 6 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL *Myrcia venulosa* DC

Quantidade de amostra	100g
Volume obtido	0,28ml
Densidade do óleo essencial	0,841
Rendimento do óleo essencial	0,22%

FONTE: O autor (2019).

4.4.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial

A caracterização dos componentes do óleo essencial de *Myrcia venulosa* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, pelo departamento de química da UFPR. O cromatograma de análise resultante está representado na FIGURA 12.

FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa*

FONTE: O autor (2019).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas e Índices de Kovats obtidos com os espectros descritos por Adams (2007). A composição química do óleo essencial, bem como seus respectivos tempos de retenção, índices de retenção e porcentagens estão descritos na TABELA 7

TABELA 7 – COMPOSICAO QUIMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa*
DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

TEMPO DE RETENÇÃO	INDICE DE KOVATS	COMPOSTO	PORCENTAGEM RELATIVA %
23,613	1378	α -Ylangeno	3,22
23,235	1382	β -Elemeno	4,84
24,033	1385	β -cariofileno	6,12
25,131	1388	α -Cubebene	0,88
25,435	1396	Cyclosativene	1,02
25,852	1431	(E)-Cariofileno	0,74
25,907	1450	Allo-aromadendreno	0,66
26,288	1456	Sibirene	0,97
26,334	1384	α -Copaene	1,5
26,553	1443	α -Humeleno	0,53
26,717	1452	9-epi-(E)-Cariofileno	1,09
26,874	1456	β -Cubebene	1,03
28,165	1486	β -Caryophyllene	6,12
28,166	1502	Germacreno-B	13,77

FONTE: O autor (2019).

TABELA 7 – COMPOSICAO QUIMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa*
DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (continuação)

29.396	1556	(+)-Epibicyclosesquipelandene	1,2
29.814	1466	(+)-Aromadendrene	0,93
28,493	1508	δ-Amorfenol	2,37
28,653	1520	α-Calacoreno	1,09
30,269	1526	β-Costol	1,76
31.308	1542	Elixene	1,89
31,346	1568	Spathulenol	1,53
32.251	1558	Cadinene	1,68
32,602	1580	Óxido de cariofileno	16,23
32,766	1621	Amorpha-4,7(11)-dieno-2-α-hidróxi	1,77
32,833	1601	Ledol	2,76
33,222	1644	α-Muurolol	3,12
33,439	1639	Espatulol	3,33
34,819	1656	Cariofileno -14-hidroxi-9-epi-(E)	1,55
35,778	1671	α-Eudesmol-10-Epi	0,63
35.762	1677	Humulene Epoxide II	1,23
36,127	1683	Mustakone	1,04
37,371	1717	Nootkatol	0,83

FONTE: O autor (2019).

Através da análise de CG/EM foram detectados 39 compostos, e dentre estes, 32 foram identificados totalizando 82,05% dos componentes presentes no óleo essencial de *Myrcia venulosa*.

Segundo Rosa e colaboradores (2016) alguns autores destacam que o polimorfismo químico de óleos essenciais pode estar relacionado à influência de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, duração e intensidade das radiações solares; fatores edáficos e variabilidade genética.

O processo de secagem de plantas produtoras de óleos essenciais deve ser criterioso devido à volatilidade dos constituintes químicos que compõem estes óleos. Portanto diferentes metodologias de secagem da planta podem apresentar diferença no teor do óleo essencial analisado (OLIVEIRA, et al., 2016)

Machado et al (2013) descreve que o processo de secagem de *Piper hispidinervum* levou a alteração na composição química de monoterpenos e

sesquiterpenos do óleo essencial, demonstrando que a concentração de alguns constituintes diminuía enquanto de outros aumentava.

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial foram Germacreno-B (13,77), óxido de cariofileno (16,23%) e β -cariofileno(6,12%) cuja estruturas esta representada na FIGURA 13.

FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MARJORITARIOS PRESENTES NO OLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa*.



FONTE: O autor (2019).

O Germacreno- B aparece como constituinte principal na espécie *Myrcia alagoensis* O.Berg com 26.7% presente em folhas frescas e 23.1% em folhas secas (SILVA et al., 2013) . Outra espécie que também se destaca pela presença desse componente é a *Myrcia amazonica* DC com 9.59% do óleo presente na folha fresca e 11,09% na folha seca (CALAO 2014).

Estes estudos evidenciam a diferença de Germacreno- B encontrada em espécies de *Myrcia* em diferentes tipos de materiais estudados, ressaltando que a composição dos óleos pode variar em relação as metodologias de estudos.

O Oxido de cariofileno foi o componente principal encontrado em espécies de *Myrcia arborescens* (26,3%) (LIMBERGER, 2004), *Myrcia Pubiflora* (22,16%) (ANDRADE, 2012) *Myrcia Sylvatica* (16,6%) (ZOGHBI, 2013).

O β -Caryophyllene foi o principal componte encontrado na *M. Cuprea* 39.1% (ZOGHBI, 2013). e *M. Splendens* 23,08% (JIMÉNEZ, 2012).

Quintans-júnior et al., (2011) escreve que varios constituintes dos óleos essenciais de *Myrcia* mostram atividades que poderiam contribuir para as propriedades biológicas, porém a influência sinérgica e antagonista dos vários

componentes deve ser considerada. Entre eles o β -caryophyllene como componente antimicrobiano.

4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA: EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

4.5.1 Preparo do extrato bruto e determinação do teor de sólidos das partes aéreas

Os extratos brutos de folhas e de galhos de *Myrcia hatschbachii* foram realizados através do aparelho Soxhlet modificado utilizando etanol 96°GL como solvente extrator.

A extração das folhas e galhos foi realizada em 2 etapas e a de galhos, devido a quantidade de material vegetal triturado ser superior a capacidade do Soxhlet. Após todas as extrações serem realizadas, os extratos resultantes das folhas foram homogeneizados, assim como todos os dos galhos. Para o extrato bruto a partir das folhas, foram utilizados 1200 g de folhas de planta triturada, obtendo 7,32 litros de extrato, já para o extrato bruto a partir dos galhos foram utilizados 1200 g de galhos de planta triturada, obtendo 6,76 litros de extrato.

A partir do extrato bruto foi realizado a análise de teor de sólidos e os resultados estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS BRUTOS *Myrcia venulosa* DC

AMOSTRA	TEOR DE SÓLIDOS %	DESVIO PADRÃO %
FOLHAS	0,1282	0,31
CAULE	0,1866	0,28

FONTE: O autor (2019).

O teor de sólidos permite calcular o rendimento do extrato hidroalcoólico, já que sua fase líquida é eliminada. Para o extrato a partir das folhas o rendimento encontrado foi de 10,67% e para o extrato a partir de galhos foi de 1,97%. Após esta etapa, uma pequena parte de extrato bruto de folhas e galhos foi separada, e posteriormente evaporada, para a realização das atividades

biológicas. A maioria restante dos extratos foi concentrada em rotaevaporador para dar sequência ao fracionamento.

4.5.2 Preparo das frações

A partição líquido-líquido das frações foi realizada separadamente para folhas e galhos de *Myrcia venulosa*, em aparelho Soxhlet modificado após obtenção dos extratos brutos. Os solventes utilizados para a obtenção das frações foram de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila), até a obtenção da fração hidroalcoólica remanescente.

Na TABELA 8 está representado a quantidade das frações evaporadas, em grama, e o rendimento em % em relação a quantidade de planta seca utilizada no extrato bruto, a qual foi destinada para o fracionamento (1200g de galhos secos e 1200g de folhas secas).

TABELA 8 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

PARTE AÉREA	FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
FOLHA	Hexano	20,1746	1,48
	Clorofórmio	9,2141	0,68
	Acetato de etila	36,5664	2,7
	Hidroalcoólica remanescente	4,8037	0,35
GALHOS	Hexano	2,578	0,19
	Clorofórmio	4,1953	0,3
	Acetato de etila	3,2098	0,23
	Hidroalcoólica remanescente	7,8324	0,57

FONTE: O autor (2019).

A amostra que obteve o maior rendimento foi folha acetato de etila com massa final de 36,5664 g seguida de folha hexano com massa igual a 20,1746. Essas amostras de galho hexano e galho acetato de etila foram as amostras com menor rendimento, sendo 2,578g e 3,2098g respectivamente.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O desequilíbrio causado pelo estresse oxidativo em sistemas fisiológicos está associado a doenças cardiovasculares, Alzheimer e Parkinson e distúrbios inflamatórios. Esses mecanismos geralmente envolvem alterações oxidativas em moléculas consideradas críticas (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico e das frações das folhas, assim como, do extrato hidroalcoólico e frações das cascas e caule foi determinada por duas metodologias: o método do fosfomolibdênio e o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

O presente estudo empregou mais de um método para avaliação da atividade antioxidante, pois deve ser levado em conta a complexo arranjo químico dos extratos vegetais e a complexidade dos processos de oxidação dos sistemas antioxidantes (CHOU et al., 2013; CAMPOS; FRASSON, 2012).

Para que ocorra atividade antioxidante é necessário a reatividade química do antioxidante, assim como sitio alostérico na reação, interação com outros componentes e condições ambientais. É improvável que apenas uma metodologia de avaliação antioxidante seja eficaz na representação da atividade do composto, pois devem ser considerados diversos tipos de radicais em diferentes alvos de oxidação (ALVES et al., 2010).

4.6.1 Formação do complexo fosfomolibdenio

Nesta metodologia, a capacidade antioxidante da amostra pode ser visualizada através da mudança da coloração do meio reacional para uma solução esverdeada, que ocorre devido à redução do molibdênio VI a molibdênio V em pH ácido.

Os resultados são apresentados nas TABELAS 9, TABELA 10 E TABELA 11.

TABELA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT

AMOSTRA	AAR% (BHT) \pm DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
EBF	97,62 \pm 1,78 a7	a7
FFH	80,85 \pm 1,75 a5	a5
FFC	44,07 \pm 2,15 a2	a2
FFA	111,62 \pm 1,52 a8	a8
FFR	103,55 \pm 2,67 a7	a7
OE	143,55 \pm 1,31 a9	a9
EBG	73,04 \pm 0,71 a4	a4
FGH	54,23 \pm 0,91 a3	a3
FGC	35,57 \pm 2,88 a1	a1
FGA	93,18 \pm 2,19 a6	a6
FGR	88,48 \pm 0,07 a6	a6
BHT	100 a7	a7

FONTE: O autor (2019)

NOTA1: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA

AMOSTRA	AAR% (Rutina) \pm DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
EBF	112,35 \pm 0,98	a5
FFH	88,75 \pm 2,35	a3
FFC	60,21 \pm 1,45	a1
FFA	180,85 \pm 1,65	a8
AFR	172,65 \pm 0,64	a8
OE	196,95 \pm 1,05	a9
EBG	131,13 \pm 1,87	a6
FGH	112,33 \pm 0,46	a5
FGC	95,02 \pm 2,61	a3
FGA	160,99 \pm 2,70	a7
FGR	144,73 \pm 0,21	a7
Rutina	100	a4

FONTE: O autor (2019)

NOTA1: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À VITAMINA C

AMOSTRA	AAR% (Vit. C) \pm DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
EBF	22,44 \pm 0,97	a5
FFH	15,40 \pm 0,81	a2
FFC	8,85 \pm 3,56	a1
FFA	48,40 \pm 0,86	a7
AFR	37,55 \pm 0,54	a3
OE	62,70 \pm 1,46	a8
EBG	27,95 \pm 0,98	a4
FGH	14,06 \pm 0,08	a2
FGC	5,82 \pm 2,21	a1
FGA	41,88 \pm 1,29	a6
FGR	36,35 \pm 1,68	a3
Vit. C	100	a9

FONTE: O autor (2019)

NOTA1: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

A metodologia do fosfomolibdênio permite avaliar dois mecanismos presentes na amostra: 1º Mecanismo redox, substâncias que possuem a habilidade de doar um par de elétrons, que são os compostos com anéis fenólicos contendo duplas ligações; 2º Mecanismo radicalar, substâncias que conseguem doar um elétron ou um hidrogênio, ou seja, compostos com hidroxilas disponíveis, podem provocar a redução do complexo do fosfomolibdênio (MALINOWSKI, 2010).

De acordo com os resultados, todas as amostras testadas, demonstraram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio. As amostras demonstraram menor atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico, do que para a rutina e BHT. No entanto pelo fato da rutina ser um flavonoide e

estruturalmente se aproximar mais das amostras testadas do que o ácido ascórbico traz um comparativo melhor nessa atividade.

O óleo essencial foi a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante, obtendo resultados expressivos: 196,95% frente à Rutina, frente ao 143,55% BHT e 62,70% frente ao Ácido ascórbico, demonstrando assim a aplicabilidade do óleo para a atividade testada.

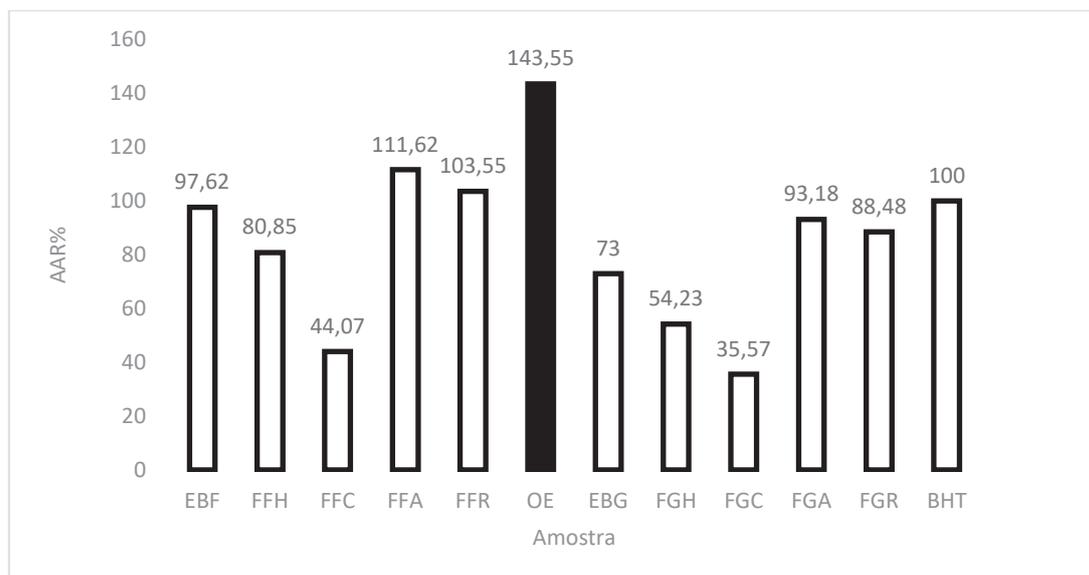
A correlação das espécies "Myrcias" com a atividade antioxidante é bem documentada em literatura, o óleo essencial de folhas de *Myrcia amazonica* apresentou maior atividade antioxidante que o BHT (CALAO et al, 2014), as frações acetato de etila e butanol da folha de *Myrcia splendens*, demonstraram grande atividade antioxidante e capacidade de quelar metais pesados (MORESCO et al., 2011) , óleo essência de *Myrcia oblongata* apresentou atividade antioxidante e repelente na concentração de 7,000 mg/ml (SANTANA et al., 2018).

Quando comparadas ao padrão rutina apenas três amostras: fração folha hexano, fração folha clorofórmio e fração galho clorofórmio tiveram resultados estatisticamente menores que a rutina. As demais amostras apresentaram resultados similares e até maiores que o padrão testado.

Embora os resultados em relação ao Ácido ascórbico tenham sido menores do que os obtidos em comparação a Rutina e BHT, a fração folha acetato de etila demonstrou bom resultado, com 48,40%, evidenciando atividade melhor apenas que o padrão e o óleo essencial.

O GRÁFICO 1, GRÁFICO 2 e GRÁFICO 3 apresentam os resultados do ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, onde a barra em preto representa a amostra de *Myrcia venulosa* com melhor atividade frente ao padrão.

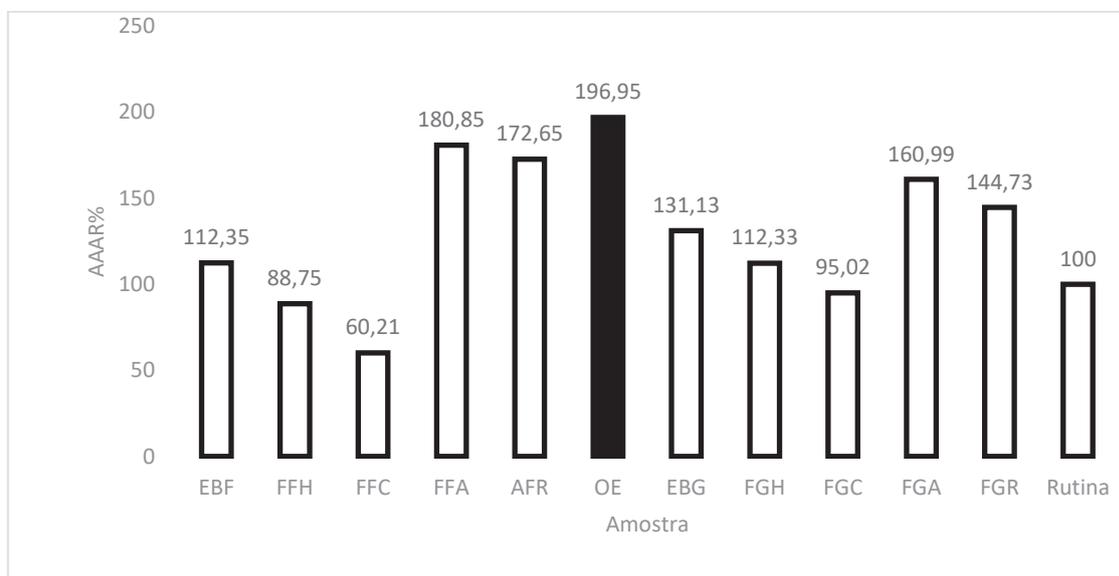
GRÁFICO 1 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT



FONTE: O autor (2019).

NOTA1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

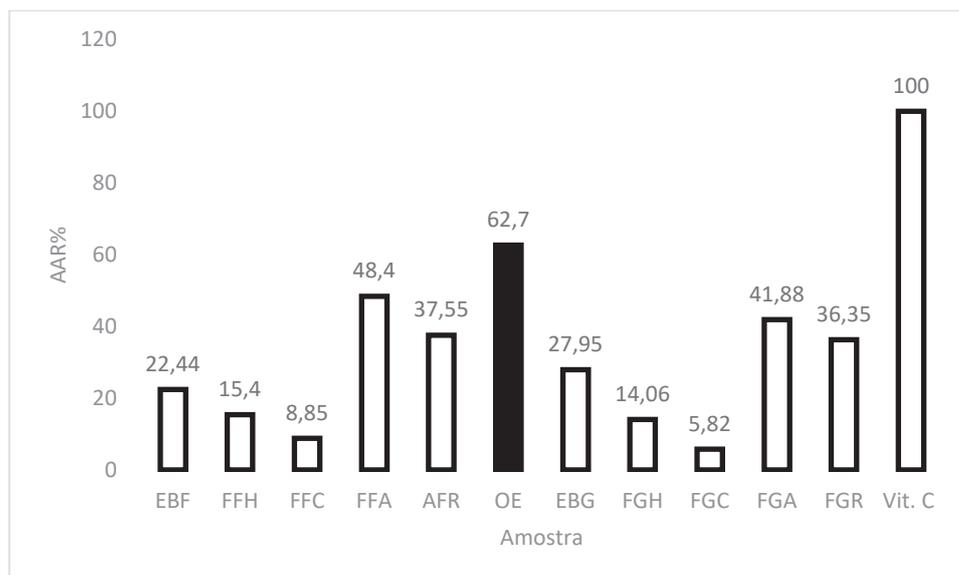
GRÁFICO 2 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A RUTINA



FONTE: O autor (2019).

NOTA1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

GRÁFICO 3 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS A Vit. C.



FONTE: O autor (2019).

NOTA1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

4.6.2 Redução do radical DPPH

O DPPH é proposto como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm.¹⁷ (ALVES et al., 2010).

Determinadas substâncias possuem a capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, doando para ele um átomo de hidrogênio, e conseqüentemente reduzindo-o a hidrazina (coloração amarela). Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Dessa forma ocorre a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (MOLYNEUX, 2004).

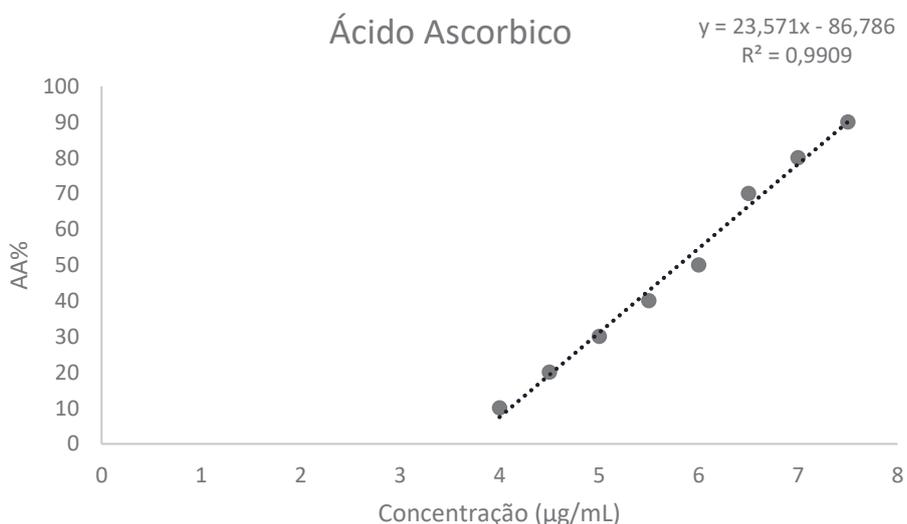
A avaliação do potencial antioxidante por este método é determinada em amostras que demonstraram ter capacidade de reduzir 50% do DPPH• presente, determinando por regressão linear (MOLYNEUX, 2004).

Este método é considerado um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de compostos que apresentem flavonoides e terpenoides (ALVES et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (% de DPPH• que não foi reduzida a hidrazina). Para cada amostra e padrão testados foram calculados a IC₅₀ por regressão linear, onde foi plotado um gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada e a média da atividade antioxidante (AA%) das amostras de cada concentração.

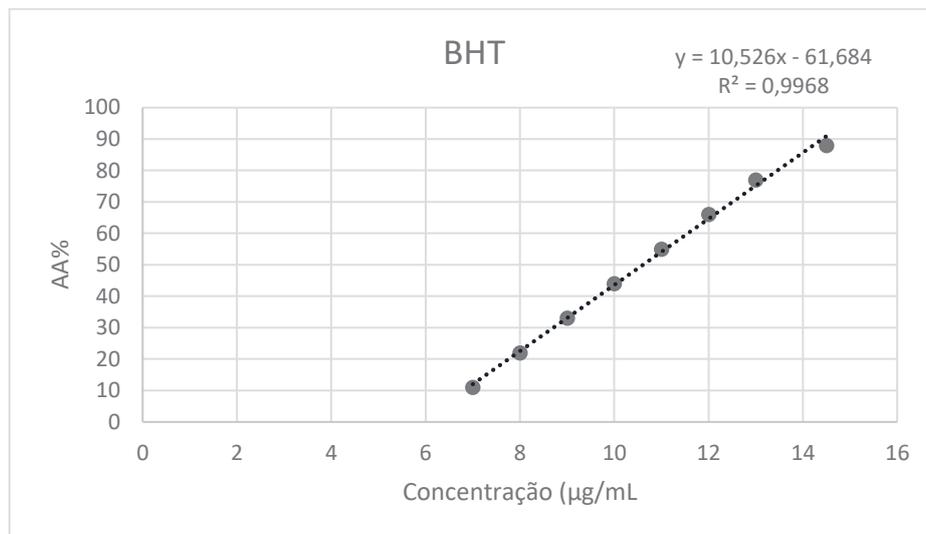
O GRÁFICOS 4 mostra a curva padrão do Ácido ascórbico, o gráfico 5 mostra a curva padrão em relação a rutina e o gráfico 6 mostra a curva padrão em relação ao BHT, os gráficos respectivos as frações de folha e galho se encontram em ANEXO 2.

GRÁFICO 4 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCORBICO PELA REDUÇÃO DO DPPH•



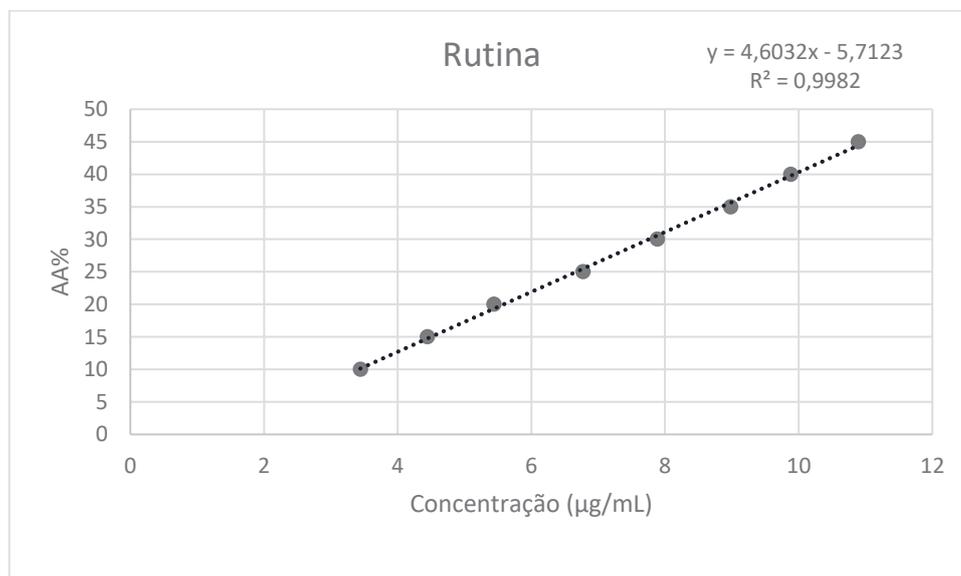
FONTE: O autor (2019).

GRÁFICO 5 CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCORBICO PELA REDUÇÃO DO DPPH•



FONTE: O autor (2019).

GRÁFICO 6 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH•



FONTE: O autor (2019).

A TABELA 12 apresenta os resultados do perfil antioxidante pelo método de redução do DPPH

TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA e CAULE DE *Myrcia venulosa* DC PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

AMOSTRA	IC50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
BHT	10,33 \pm 0,05	a1
Rutina	7,88 \pm 0,02	a1
Vit. C	5,34 \pm 0,2	a1
EBF	19,06 \pm 0,35	a2
FFH	15,56 \pm 0,14	a2
FFC	87,78 \pm 1,71	a6
FFA	6,26 \pm 1,09	a1
FFR	18,43 \pm 0,05	a2
OE	5,88 \pm 0,32	a1
EBG	37,09 \pm 0,41	a4
FGH	55,12 \pm 0,27	a5
FGC	120,07 \pm 0,91	a7
FGA	26,59 \pm 0,09	a3
FGR	32,12 \pm 0,83	a4

FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR) e Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

A interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, para a maioria das substâncias testadas o mecanismo parece ser muito mais complexo (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

É importante considerando que a acessibilidade estérica é fator limitante da reação, ou seja, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical tendem a apresentar uma maior atividade aparente quando comparada às moléculas maiores (PRIOR et al., 2015).

As amostras foram comparadas aos padrões Rutina, BHT e Ácido ascórbico e através dos testes estatísticos de análise de variância – Tukey e Anova – chegou-se em 7 grupos que se diferem entre si das 13 amostras testadas.

A amostra que apresentou maior resultado foi o óleo essencial (5,88 µg/mL), apresentando resultado inferior apenas ao ácido ascórbico (5,34 µg/mL).

A Fração folha acetato de etila apresentou IC50 (6,26 µg/mL), apresentando valor superior apenas ao ácido ascórbico (5,34 µg/mL) e o óleo essencial (5,88 µg/mL). Assim, em baixas concentrações, a fração é capaz de reduzir 50% de DPPH do meio reacional, evidenciando sua relevante atividade antioxidante.

As frações extrato bruto folha (19,06 µg/mL) fração folha hexano (15,56 µg/mL) e folha fração remanescente (18,43 µg/mL) apresentaram resultado similar em relação ao sequestro do radical DPPH. As demais amostras também apresentaram atividade antioxidante, no entanto é necessária uma maior concentração das mesmas para reduzir 50% da concentração do radical DPPH•.

Compostos que apresentam interações do tipo ligação hidrogênio, como metanol e etanol, favorecem a abstração do hidrogênio de forma lenta. Esse princípio também é observado de modo similar aos ácidos ou as bases presentes nos solventes, pois estes podem influenciar o equilíbrio de ionização dos fenóis. Propondo-se então que esses aspectos afetem a reação que envolve a transferência de elétrons ou transferência de átomo de hidrogênio no teste DPPH• (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004; SANTIAGO, 2015).

Foi observada atividade antioxidante em espécimes pertencentes a família myrtaceae pelo ensaio de DPPH•, no extrato etanólico das folhas de *Eugenia pyriformis* (1,70 µg / mL), seguido dos extratos de *Myrcia laruotteana* (3,38 µg / mL) e *Myrcia obtecta* (6,66 mcg / mL), em comparação com controles, no ensaio DPPH (SALVADOR et al., 2011)

Estudo publicado por TAKAO e colaboradores (2015) descreve a atividade antioxidante frente ao método de DPPH para as espécies de *Myrcia tomentosa* (7.46 µg / mL), *Myrcia bela* (7.73 µg / mL) e *Myrcia língua* (7.80 µg / mL). O autor ainda traça como um dos parâmetros de comparação a atividade antioxidante do chá verde (7.45 µg/mL) e Quercitina (2.99 µg/mL).

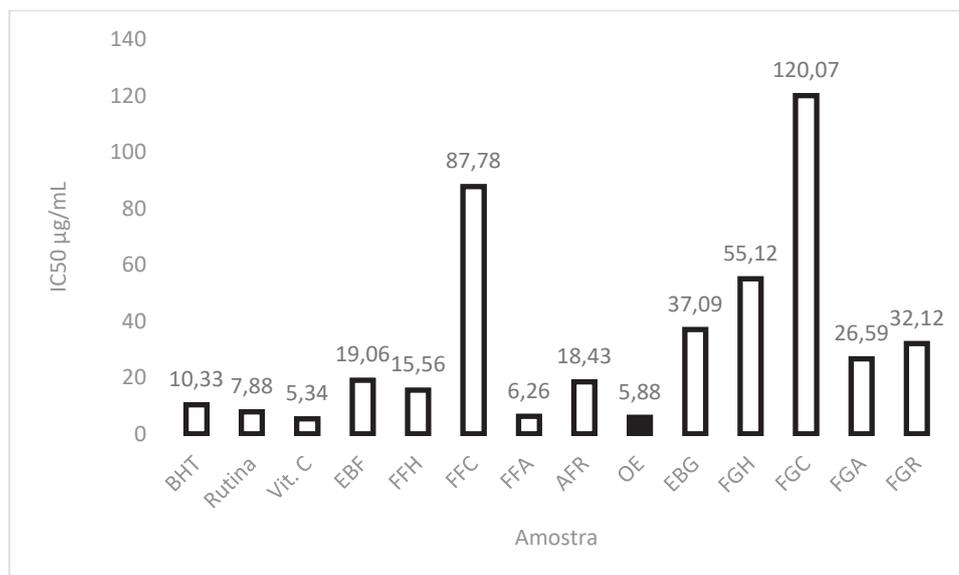
Levando-se esses resultados em consideração é possível concluir que a fração folha acetato de etila e o óleo essencial de *Myrcia venulosa* apresentam atividade antioxidante superior quando comparadas com amostras de outras espécies de *Myrcia bela*, *Myrcia língua* e *Myrcia obtecta*, porém inferiores em relação a *Myrcia laruotteana*.

Os extratos etanólicos das folhas de *Myrcia laruotteana*, *Myrcia obtecta* (SALVADOR et al., 2011), *Myrcia splendens* e *Myrcia palustris* (LUCAS et al., 2011) apresentaram efeitos antioxidantes nos ensaios de DPPH superiores aos padrões testados.

Plantas com antioxidantes têm efeitos benéficos sobre a saúde humana, estando essa atividade geralmente relacionada a compostos fenólicos (SHIN et al., 2015). Os resultados do doseamento de fenóis totais e flavonoides serão discutidos posteriormente nesse trabalho.

O GRÁFICO 7 mostra os resultados, onde o melhor resultado frente a comparação dos padrões aparece em preto.

GRÁFICO 7 - CAPACIDADE DE SEQUESTRAR O RADICAL LIVRE DPPH DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PADRÕES



FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICA

4.7.1 Determinação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos são produtos aromáticos do metabolismo secundário dos vegetais. Por serem sintetizados durante as fases de desenvolvimento e em condições de estresse, são essenciais no desenvolvimento e reprodução, na promoção de ação antipatogênica nas plantas, na produção de pigmentação, na síntese de lignina e na formação de características sensoriais e nutricionais dos vegetais (SOUSA, 2009). Além disso, os perfis fenolicos podem representar uma instrumento de controle de qualidade sobre a origem botânica das plantas preparações medicinais, como a adulterações (TAKAO et al., 2015)

Dentro do grupo dos fenólicos encontram-se os compostos fenóis simples, ácidos fenólicos (benzoico e derivados do ácido cinâmico), flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas, estilbenos, lignanas e ligninas, os quais

se encontram na natureza em pequena ou grande escala, sendo os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos de grande escala (PRADO, 2009).

O teor de fenois totais foi determinado em miligramas de ácido gálico por grama da amostra com a utilização da curva de calibração com o seguinte resultado: $y=0,0126x + 0,0019$; $R^2= 0,9971$

A TABELA 13 apresenta os resultados da determinação de fenois totais.

TABELA 13 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTES EM ACIDO GÁLICO -EAG) NOS EXTRATOS BRUTOS, FAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM *Myrcia Vanulosa*.

Amostra	Concentração de fenois totais (mg EAG/g de amostra) \pm DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
EBF	36,67 \pm 0,22	a3
FFH	29,07 \pm 0,53	a4
FFC	18,92 \pm 0,90	a5
FFA	51,15 \pm 0,17	a2
FFR	38,45 \pm 0,27	a2
OE	57,17 \pm 0,84	a1
EBG	28,81 \pm 0,53	a4
FGH	20,12 \pm 0,71	a5
FGC	13,92 \pm 0,90	a6
FGA	30,67 \pm 0,42	a4
FGR	29,67 \pm 0,51	a4

FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR) e Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

Segundo Allothman e colaboradores (2009) deve ser levado em conta a polaridade do solvente e solubilidade do composto no mesmo. Resaltando que os procedimentos de extração apresentam variações de tempo e temperatura, acarretando em diferença de quantificações precisas do teor e capacidade antioxidante do composto, bem como no tipo de composto fenólico extraído.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos vem sendo estudados, pois já apresentaram capacidade de inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOARES, 2002).

A relação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante pode depender de fatores como método escolhido e também das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes testados (OLIVEIRA et al. 2011). Porém, para que os resultados sejam considerados antioxidantes é necessário que mesmo presentes em baixas concentrações apresentem a capacidade de impedir, retardar ou prevenir a auto-oxidação ou oxidação promovidas pelos radicais livres (SOUSA, 2009).

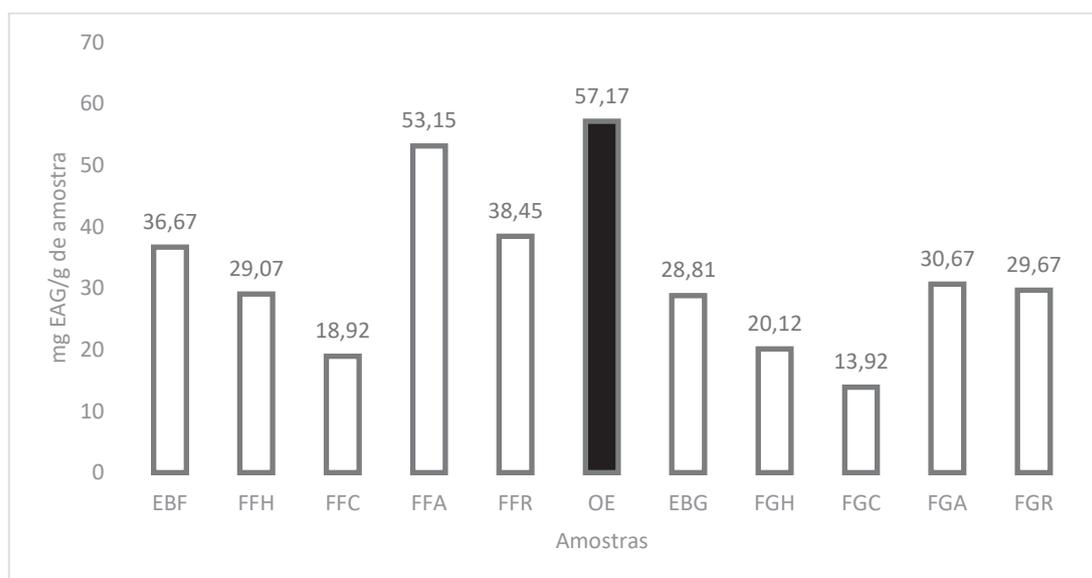
As concentrações de fenóis totais acima de 50 mg.EAG/g são consideradas altas e entre 50 mg.EAG/g e 30 mg.EAG/g intermediarias (CHEW et al., 2011). Portanto as amostras que apresentaram melhor resultado foram fração folha acetato (53,15 mg.EAG/g) e óleo essencial (57,17 mg.EAG/g), sendo considerando também como as amostras que melhor apresentem resultado antioxidante frente aos testes de DPPH e formação do complexo fosfomolibdenio.

Em contrapartida as amostras fração galho clorofórmio (13,92 mg.EAG/g) e fração folha clorofórmio (18,92 mg.EAG/g) apresentaram os menores teores de fenóis totais, assim como menor capacidade antioxidante.

A correlação entre fenóis e atividade antioxidante na espécie das Myrtaceae já é descrita na literatura como exemplo podem ser citados os espécimes de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia beaurepaireana*, onde foi constatado significativa relação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos, indicando que estes compostos são os principais contribuintes para as propriedades antioxidantes nestas plantas (MAGINA et al., 2010).

O GRÁFICO 8 apresenta o teor dos compostos fenólicos totais nos extratos brutos, fações e óleo essencial em *Myrcia vanulosa*, sendo o melhor resultado destacado em preto.

GRÁFICO 8 - TEOR DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTES EM ACIDO GÁLICO -EAG) NOS EXTRATOS BRUTOS, FAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM *Myrcia Vanulosa*.



FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR) e Óleo essencial (OE).

4.7.2 Quantificação de flavonoides

Os estudos químicos relativos aos compostos não voláteis identificados a partir das espécies de *Myrcia* descrevem principalmente o isolamento de glucósidos de flavonol. Juntamente com flavonoides, terpenoides, ácidos orgânicos e acetofenonas (CASCAES et al., 2015).

A estrutura conformacional influencia diretamente nas propriedades bioativas do metabolito secundário da planta, por exemplo, a atividade antioxidante é maior em flavonoides que possuem grupos hidroxila vizinhos em seu anel C fenil (JUNQUEIRA-GONÇALVES et al., 2015).

A TABELA 14 mostra o resultado da quantificação de flavonoides.

TABELA 14 - QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS (EQUIVALENTES EM CATEQUINA/MG) NOS EXTRATOS BRUTOS E FAÇÕES EM *Myrcia Vanulosa*.

Amostra	Equivalente de catequina/mg pelo equivalente em g na amostra	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
EBF	24,72 ± 0,09	a4
FFH	18,68 ± 0,41	a3
FFC	08,02 ± 0,7	a1
FFA	31,08 ± 0,67	a5
FFR	19,05 ± 0,34	a3
EBG	16,81 ± 1,03	a2
FGH	11,89 ± 0,91	a2
FGC	05,04 ± 1,88	a1
FGA	14,08 ± 0,09	a2
FGR	19,21 ± 0,69	a3

FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR) e Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

As amostras que apresentaram melhor resultado foram fração folha acetato (31,08 catequina/mg) e extrato bruto folha (24,72 catequina/mg), sendo considerando também como as amostras que melhor apresentem resultado antioxidante frente aos testes de DPPH e formação do complexo fosfomolibdenio.

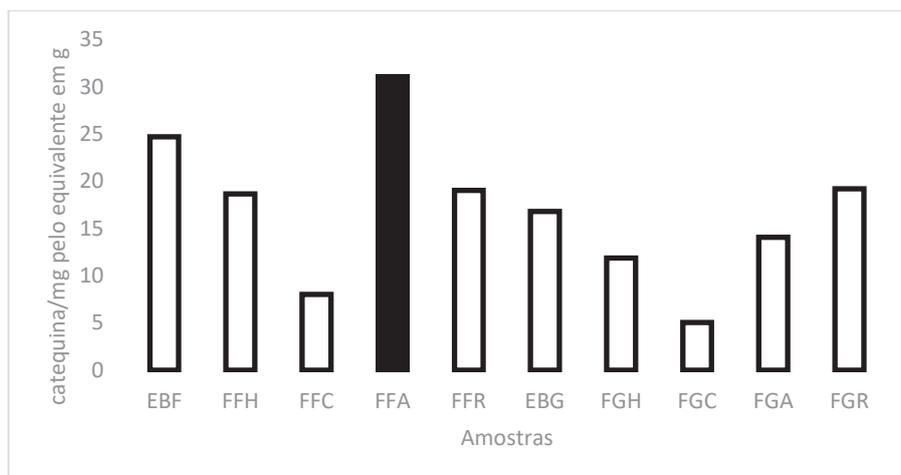
É possível estabelecer uma relação entre o teor de flavonóis totais e flavonoides quando analisamos os resultados da dosagem de flavonoides das amostras fração galho clorofórmio (05,04 catequina/mg) e fração folha clorofórmio (08,02 catequina/mg), pois neste teste eles também apresentaram os menores valores do doseamento, bem como menor poder antioxidativo frente aos testes de DPPH e formação do complexo fosfomolibdenio.

Flavonoides apresentam atividade antioxidante pelo fato de serem quelantes de metais, neutralizarem espécies oxidantes como o ânion superóxido (O_2^-) e atuarem em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Essa atividade antioxidante também está ligada a inibição de enzimas ciclo, lipoxigenase, NADPHoxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxidodismutase (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Estudos com *Myrcia rostrata* e *Myrcia Tomentosa*, que apresentam atividade antioxidante, mostraram que o teor de flavonoides é influenciado por fatores ambientais como micronutrientes do solo, pluviosidade e pH (BORGES et al, 2013; SANTOS; RODRIGUES, 2017). Portanto a *Myrcia venulosa* pode apresentar teor de flavonoides e capacidade antioxidante variante no decorrer do ano e em outras regiões onde é encontrada.

O gráfico 9 apresenta o teor de flavonoides totais (equivalentes em catequina/mg) nos extratos brutos e fações em *Myrcia vanulosa*, sendo o melhor resultado destacado na cor preta.

GRÁFICO 9 - TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (EQUIVALENTES EM CATEQUINA/MG) NOS EXTRATOS BRUTOS E FAÇÕES EM *Myrcia Vanulosa*.



FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA) e Fração galho remanescente (FGR).

4.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.8.1 Toxicidade preliminar in vitro

O teste de toxicidade preliminar *in vitro* foi realizado frente à *Artemia salina*, para extratos brutos, frações e óleo essencial, pois a possibilidade de se prever uma atividade específica de uma determinada substância a partir de um bioensaio geral facilita o direcionamento de estudos futuros (ROSA et al., 2016)

A *Artemia salina* é um organismo animal com baixa complexidade e pode ser considerado um parâmetro de monitoramento relevante para o funcionamento dos extratos, pois compostos bioativos em doses elevadas quase sempre são tóxicos (LHULLIER, HORTA, FALKENBERG, 2006). Os ensaios de letalidade funcionam como teste preliminar para toxicologia, podendo-se obter a concentração letal mediana (CL50), que indica a morte em metade de uma amostra (BEDNARCZUK, 2010).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo utilizado na alimentação de peixes e é bastante empregado em estudos (ALVES et al. 2000), sendo ainda possível indicar ações biológicas como anticancerígena, inseticida, moluscicida e antifúngica (LUNA, 2005).

Segundo Meyer e colaboradores (1982), amostras que apresentam CL50 < 1000 µg/mL podem ser consideradas como tóxicas. Porém, uma relação entre o grau de toxicidade e CL50 foi descrita por Amarante e colaboradores (2011), apresenta uma classificação melhor delimitada: considera-se baixa toxicidade quando a concentração letal 50% (CL50) for superior a 500 µg/mL; moderada para CL50 entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL50 for inferior 100 µg/mL.

A TABELA 15 apresenta os resultados referente a toxicidade preliminar nos extratos e óleo essencial.

TABELA 15 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia venulosa* EM *Artemia salina*

AMOSTRA	CL50 µg/mL	IC µg/mL	CL90 µg/mL	IC 95 µg/mL
SQ	120,03	90,52 – 159,02	457,14	376,05 – 921,74
EBF	>1000		>1000	
FFH	>1000		>1000	
FFC	>1000		>1000	
FFA	679,25	513,23- 828,24	>1000	
AFR	>1000		>1000	
OE	372,28	235,76- 489,72	895,88	680,51-1050,09
EBG	>1000		>1000	
FGH	>1000		>1000	
FGC	>1000		>1000	
FGA	953,09	780,51- 1205-09	>1000	
FGR	>1000		>1000	

FONTE: O autor (2019)

NOTA: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE), (SQ) Sulfato de quinidina.

Segundo a classificação de proposta por Amarante e colaboradores (2011) o óleo essencial (372,28 µg/mL) apresenta toxicidade moderada enquanto a fração folha acetato de etila (679,25 µg/mL) e galho acetato de etila (953,09 µg/mL) apresentam toxicidade baixa. Todas as outras amostras apresentam toxicidade acima de 1000 µg/mL.

O extrato aquoso de *Myrcia sylvatica* (DL₅₀ = 213,79 µg/ml) foi considerado moderadamente tóxico e o óleo essencial mostrou-se altamente tóxico (DL₅₀ = 38,1 µg/ml) (BATISTA et al., 2010). Outro estudo com *Myrcia sylvatica* apresentou resultado de toxicidade CL50 de 79,44 µg/mL, sendo considerado altamente tóxico (ROSA et al., 2016). Ambos os estudos salientam a alta toxicidade do óleo essencial da espécie de *Myrcia sylvatica*, porém com diferenças encontradas nos resultados finais.

A amostra de Batista e colaboradores (2010) foi colida em Santarém - Pará e a amostra de Rosa e colaboradores (2016) foi coletada no Parque Nacional da Chapada das Mesas, no município de Carolina (MA) evidenciando as diferenças no potencial tóxico da uma mesma espécie em diferentes regiões.

Outra espécie analisada frente a toxicidade por *Artemia salina* foi a *Myrcia myrtifolia*, cujo óleo essencial apresentou CL50 de 479,16 µg/mL, (CERQUEIRA et al., 2007).

Os trabalhos apresentados por Rosa e colaboradores (2016) e Cerqueira e colaboradores (2007) sugerem que a atividade toxicológica é um indicativo de potencial atividade antimicrobiano. Os resultados antimicrobianos da *Myrcia venulosa* serão discutidos posteriormente nesse trabalho.

4.8.2 Atividade hemolítica

O ensaio de hemólise *in vitro*, realizado para extratos brutos e frações de folhas e galhos e óleo essencial de folhas, e um teste de triagem de toxicidade, pois podemos avaliar a ação da amostra sobre o rompimento de eritrócitos. A porcentagem de hemólise foi calculada frente ao Triton 1% e apresentados na TABELA 16 e TABELA 17 (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

O teste da hemólise é preconizado pela OMS no seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais (1998), e também é encontrado como parte dos ensaios toxicológicos recomendados no Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003).

TABELA 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES DA FOLHA E ÓLEO ESSENCIAL *Myrcia venulosa* DC

Amostras	CONCENTRAÇÃO µg/mL	%HEMOLISE DA FOLHA ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
Controle	Tritón 1%	100%	a7
EBF	100	17,30 ± 0,10	a3
	200	23,09 ± 0,19	a4
	500	30,98 ± 0,25	a5
	1000	36,50 ± 0,49	a5
FFH	100	4,04 ± 0,13	a1
	200	8,98 ± 0,09	a1
	500	12,04 ± 0,37	a2
	1000	20,33 ± 0,38	a3
FFC	100	2,33 ± 0,08	a1
	200	4,88 ± 0,98	a1
	500	7,69 ± 0,45	a1
	1000	12,04 ± 0,54	a2
FFA	100	7,88 ± 0,17	a1
	200	15,76 ± 0,87	a2
	500	20,12 ± 0,21	a3
	1000	27,45 ± 0,02	a4
FFR	100	12,88 ± 0,14	a2
	200	17,76 ± 0,24	a2
	500	20,12 ± 0,65	a3
	1000	28,98 ± 0,09	a4
OE	100	15,80 ± 0,93	a2
	200	32,04 ± 1,12	a5
	500	44,90 ± 1,90	a6
	1000	57,46 ± 1,77	a6

FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES DO GALHON DE *Myrcia venulosa* DC

Amostras	CONCENTRAÇÃO µg/mL	% HEMOLISE DA GALHO ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
Controle	Tritón 1%	100%	a7
EBG	100	6,20 ± 0,31	a2
	200	10,03 ± 0,20	a2
	500	13,78 ± 0,15	a3
	1000	16,01 ± 0,28	a4
FGH	100	1,04 ± 0,08	a1
	200	1,98 ± 0,19	a1
	500	2,12 ± 0,87	a1
	1000	2,50 ± 0,05	a1
FGC	100	0,99 ± 0,14	a1
	200	1,08 ± 0,68	a1
	500	1,89 ± 0,75	a1
	1000	1,93 ± 0,52	a1
FGA	100	3,19 ± 0,72	a1
	200	7,05 ± 0,07	a2
	500	12,80 ± 0,23	a3
	1000	23,45 ± 0,42	a5
FGR	100	7,78 ± 0,14	a2
	200	12,66 ± 0,24	a3
	500	14,02 ± 0,65	a4
	1000	18,88 ± 0,09	a5

FONTE: O autor (2019).

NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA) e Fração galho remanescente (FGR).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

A atividade hemolítica in vitro pode ser considerada um bom teste preliminar de toxicidade de extratos e frações vegetais visto que através da avaliação da estabilidade mecânica da membrana do eritrócito de carneiro podemos caracterizar os danos que o composto provoca (hemólise) e correlacionar a toxicidade dos extratos ou frações com potencial de atividade terapêutica (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Os resultados encontrados neste teste conduzem a uma avaliação preliminar e complementar da toxicidade dos extratos, frações e do óleo

essencial de *Myrcia venulosa*. Este dado é relevante, pois a presença de toxicidade restringe a sua utilização, sendo então necessária a determinação da dose letal (DL50) para o seu uso.

A hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia (CARVALHO et al., 2007).

A hemólise pode ocorrer como consequência de substâncias ou compostos utilizados como medicamentos ou presentes nas plantas (PAULA et al., 2014). Desta forma, resultados positivos obtidos nestes modelos com o extrato, frações e óleo essencial das folhas de *Myrcia venulosa* confirmam toxicidade para membrana do eritrócito no modelo utilizado.

Analisando as tabelas é possível concluir que a amostra que mais resultou em atividade hemolítica foi o óleo essencial (57,46%) na concentração de 1000 µg/mL. Esse resultado corrobora com os dados encontrados frente ao teste de toxicidade preliminar em *Artemia salina*, onde a amostra do óleo também se mostrou mais tóxica.

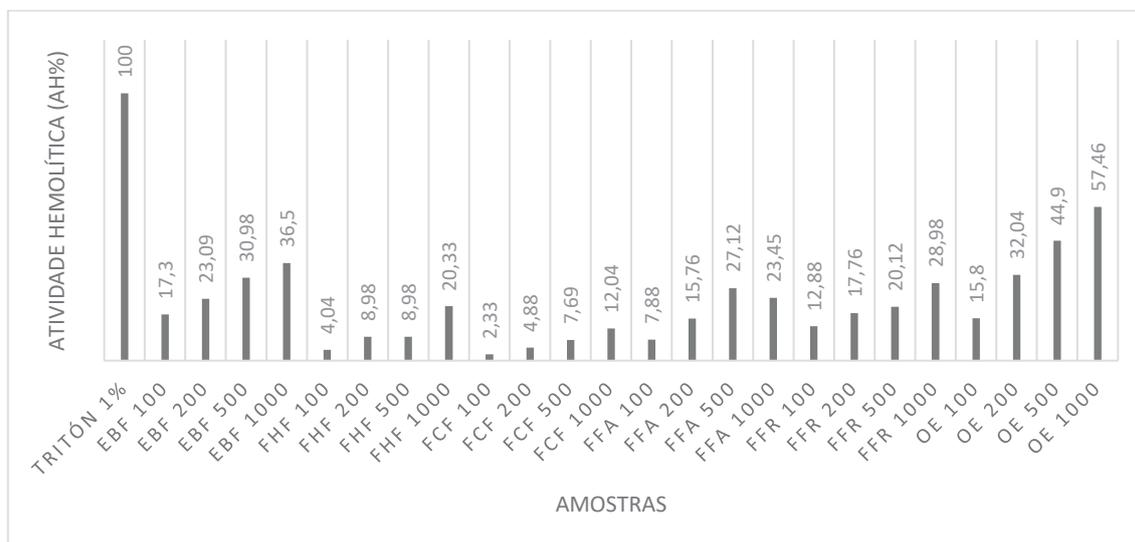
Segundo Bakkali e colaboradores (2008) a lipofilidade dos componentes presentes no óleo essencial são os responsáveis pela atividade hemolítica, pois a membrana eritrocitária compreende uma dupla camada lipídica, sendo constituída por proteínas integrais e carboidratos. Essa composição lipídica favorece a interação do eritrócito com os compostos lipofílicos dos óleos essenciais, tornando-a mais permeável e promovendo sua hemólise. Entretanto os compostos de caráter não lipofílico podem interagir com proteínas da membrana.

Em relação aos extratos foi observado que o extrato bruto folha apresentou a maior porcentagem de hemólise nas concentrações 500 µg/mL (30,98%) e 1000 µg/mL (36,50%) e a fração galho hexano apresentou os menores resultados nas concentrações de 100 µg/mL (0,99%) juntamente com a fração galho hexano 100 µg/mL (1,04%).

Santiago (2015) relata ocorrência de hemólise em meio sólido nas amostras de óleos essenciais das folhas e frutos de *Myrcia alternifolia* nas concentrações de 200 e 400 µg mL⁻¹, enquanto os óleos obtidos das folhas e frutos de *Myrcia quinquenervia* não promoveram a formação de halos no meio

Os resultados estão apresentados no GRÁFICO 10 e GRÁFICO 11 para melhor visualização.

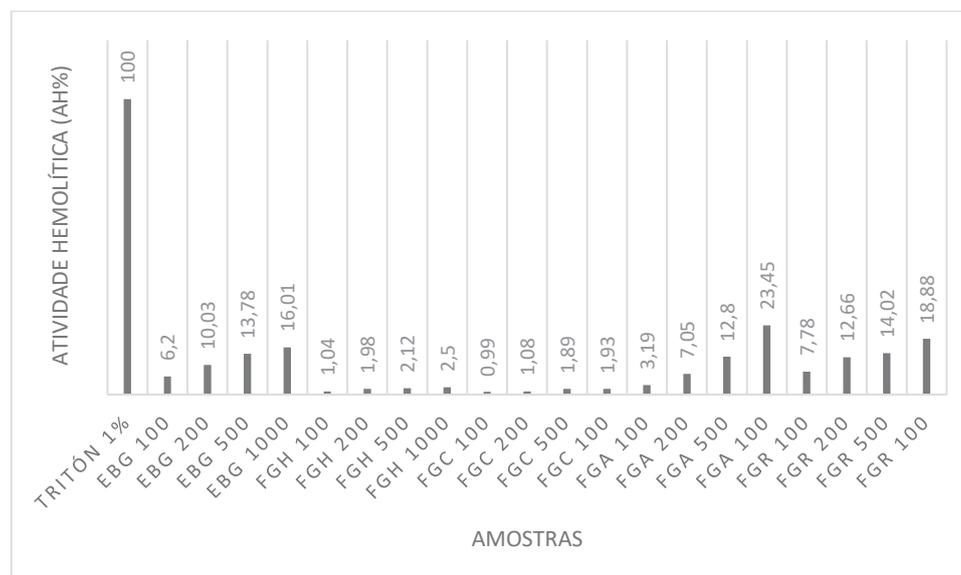
GRÁFICO 10 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS DE FOLHA E ÓLEO ESSENCIAL COMPARADAS AO TRITON 1%



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

GRÁFICO 11 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS DE GALHO COMPARADAS AO TRITON 1%



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA) e Fração galho remanescente (FGR) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

4.8.3 Atividade antibacteriana

Apresentaram inibição de crescimento bacteriano as seguintes amostras: extrato bruto folha, fração folha acetato, extrato bruto galho e óleo essencial para cepas gram positivas. Para as cepas gram negativas foi evidenciado formação de alo inibitório: extrato bruto folha, fração folha hexano, fração folha acetato de etila, extrato bruto galho, fração galho remanescente e óleo essencial. Após esses resultados se procedeu a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e os resultados estão representados na TABELA 18 E TABELA 19.

TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Myrcia venulosa* A PARTIR DO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PARA CEPAS GRAM POSITIVAS

Amostra	Microrganismo Gram-positivos			
	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Bacillus
	<i>faecalis</i>	<i>pyogenes</i>	<i>aureus</i>	subtilis
	ATCC 28312	ATCC 18017	ATCC 30850	ATCC 7823
Amostra	-	-	-	-
EBF	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	-
FFH	-	-	-	-
FFC	-	-	-	-
FFA	1000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	-
AFR	-	-	-	-
OE	-	250 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
EBG	1000 µg/mL	-	-	-
FGH	-	-	-	-
FGC	-	-	-	-
FGA	-	-	1000 µg/mL	-
FGR	-	-	-	-

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial.

Tabela 19 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Myrcia venulosa* A PARTIR DO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PARA CEPAS GRAM NEGATIVAS

	Microrganismo Gram-negativos			
	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Proteus</i>
	<i>typhimurium</i>	<i>coli</i>	<i>aerogenes</i>	<i>mirabilis</i>
	ATCC 17118	ATCC 24202	ATCC 15089	ATCC 26644
Amostra	-	-	-	-
EBF	1000 µg/mL	-	-	1000 µg/mL
FFH	-	-	-	-
FFC	-	-	-	-
FFA	1000 µg/mL	-	-	1000 µg/mL
AFR	-	-	-	-
OE	500 µg/mL	-	250 µg/mL	1000 µg/mL
EBG	1000 µg/mL	-	1000 µg/mL	-
FGH	-	-	-	-
FGC	-	-	-	-
FGA	-	-	-	-
FGR	1000 µg/mL	-	-	-

FONTE: O autor (2019)

NOTA: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR) e Óleo essencial (OE).

O teste da microdiluição em caldo é um método quantitativo, diferentemente das metodologias de difusão em disco ou em cavidade e pode ser utilizado tanto para amostras solúveis em água quanto para aquelas lipossolúveis. Com o emprego de microplacas e indicadores químicos de crescimento microbiano, conseguiu-se reduzir o excessivo trabalho envolvido na realização desta técnica, além do consumo de material utilizado (ZACCHINO, 2002). Porém dentre as limitações da técnica pode ocorrer precipitação de compostos presentes em alguns extratos, e a coloração do extrato em concentração alta que pode interferir na análise e adesão de células de alguns microorganismos à base do poço (OSTROSKY et al., 2008).

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativos (maiores que 1000 µg/mL) (TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Entre as cepas gram positivas o *S. aureus* foi a cepa que apresentou maior grau de inibição, extrato bruto folha e fração galho acetato mostraram ser efetivas nas concentrações de 1000 µg/mL. O óleo essencial se mostrou mais efetivo em relação a CIM, apresentando igual 100 µg/mL seguido pela fração folha acetato 500 µg/mL.

O óleo essencial apresentou atividade moderada (250 µg/mL) em relação ao *S. pyogenes*, sendo a amostra mais efetiva em relação a essa cepa.

Apenas o óleo essencial foi cepas de exercer atividade inibitória até 1000 µg/mL em relação ao *Bacillus subtilis*, as demais amostras apresentaram CIM superior a esse valor.

Conforme observado na TABELA 18 e TABELA 19, ao avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e frações e também do óleo essencial, foi observado que há um potencial inibitório contra micro-organismos gram-positivos e bactérias gram-negativas, com exceção a *E. coli*. Há sugestão que os compostos terpenoides e seus derivados oxigenados apresentem uma inibição mais efetiva sobre os micro-organismos gram-positivos que em gram-negativos (TIWARI et al., 2009)

Em relação a cepas gram negativas o óleo essencial também se mostrou mais efetivo, resultando em CIM de 500 µg/mL para *Salmonella typhimurium*, 250 µg/mL para *Enterobacter aerogenes* e 1000 µg/mL para *Proteus mirabilis*.

Componentes majoritários geralmente estão atrelados a atividade antimicrobiana na maioria dos óleos essenciais, mas em alguns estudos, foi verificado que o óleo essencial como um todo exibiu uma maior atividade antimicrobiana do que os compostos majoritários isolados, indicando que os compostos minoritários podem ser críticos para esta atividade, provavelmente produzindo um efeito sinérgico (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Avaliando os resultados de CIM para as cepas gram negativas pode ser observado que a melhor atividade está relacionado a *Salmonella typhimurium*, cuja inibição do crescimento foi observada em extrato bruto folha (1000 µg/mL),

fração folha acetato de etila (1000 µg/mL), extrato bruto galho (1000 µg/mL), fração galho remanescente (1000 µg/mL), além do já citado óleo essencial.

As bactérias gram-positivas costumam ser mais susceptíveis a ação dos extratos vegetais do que bactérias gram-negativas. Pois, as cepas gram-negativas apresentam maior resistência a ação de agentes antimicrobianos por terem uma superfície hidrofílica na membrana rica em lipopolissacarídeos, o que forma uma barreira contra as macromoléculas hidrofóbicas presentes em alguns compostos vegetais e antibióticos (OETTING, 2005; CLEMENTINO et al., 2016)

5 CONCLUSÃO

Com o trabalho realizado no âmbito desta dissertação incrementou-se o conhecimento sobre *Myrcia venulosa* (MYRTACEAE). Pode-se considerá-lo como inédito, uma vez que não foram encontradas publicações sobre a espécie estudada.

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica apresentou resultados positivos para heterosídeos flavonoides, flavonoides e terpenos/ Esteroides, indicando a possível atividade antioxidante da *Myrcia venulosa*.

A atividade antioxidante apresentou resultados nas duas metodologias empregadas. Na Formação do complexo fosfomolibdênio o óleo essencial apresentou os melhores resultados em relação a rutina (196,95%), BHT (143,55%) e ácido ascórbico (62,70%). Em relação ao teste do DPPH• A amostra que apresentou melhor resultado também foi o óleo essencial (5,88 µg/mL) seguido pela fração folha acetato de etila (6,26 µg/mL). Evidenciando a atividade antioxidante da *Myrcia venulosa* por mais um mecanismo antioxidante.

A determinação de fenólicos totais e quantificação de flavonoides sustentam os resultados apresentados pelos testes de formação do complexo fosfomolibdênio e redução do radical DPPH•, pois compostos com o grupamento fenol apresentam muitos relatos na literatura de atividade antioxidante.

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* apresentou níveis de toxicidade baixos nas frações de acetato de etila da folha (679,25 µg/mL) e galho (953,09 µg/mL), entretanto o óleo essencial apresentou resultados de toxicidade moderada (372,28 µg/mL) e maior resultando frente ao teste de hemólise (57,46%), na concentração de 1000 µg/mL.

O extrato das folhas e o extrato das cascas e caule apresentaram atividade antimicrobiana moderada, porém, o óleo essencial exibiu resultados promissores, com atividade diante de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream IL: Allured Publishing, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2003.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. **Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais**. Boletim do Centro de Processamento de Alimentos, v.21, n.2, p.343-350, 2003.
- ALOTHMAN, M., BHAT, R., KARIM, A.A.; **Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents**. Food chemistry, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. ; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.: AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina* e de atividade antiplasmodica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*)**. Acta Amazonica, v. 41, n.3, p.431-434, 2011.
- ALVES, C. A.; DAVID, J. M.; BRASIL, M. V.; AGUIAR, R. M.; **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. Mem I Oswaldo Cruz, v.95, p. 367-373, 2000.
- ALVARENDA, F.Q. *et al* . **Atividade Antinociceptiva e Antimicrobiana da Casca do Caule de *Psidium Cattleianum Sabine***. Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1125-1133, 2015 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000701125&lng=en&nrm=iso>. access on 04 Feb. 2019. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_146
- AMARANTE, C.B. *et al*. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmodica do caule de aninga (*Montrichardialinifera*)**. Acta Amazonica, v. 41, n.3, p.431 – 434, 2011.

ANDRADE, G.S.; GUIMARÃES, A.G.; SANTANA, M.T.; SIQUEIRA, R.S.; PASSOS, L.O.; MACHADO, S.M.F.; RIBEIRO, A.S.; SOBRAL, M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. **Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora***. Braz. J. Pharmacogn, 2012.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. **Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.4, p.517-524, 2006.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. **Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil**. Brazilian Journal of Pharmacognosy16(3): 402-407, Jul./Set, 2006

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. **Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera***. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.90-97, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK; D., IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils – a review**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p.446–475, 2008.

BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** –Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. **Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs**. Chemico-biological interactions, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method**. American Journal Clinical Pathology, v.45, p.493-496, 1966.

BATISTA N. Y.; PEDROSO R. S.; ARANHA E. S. P.; SOUSA L. A. F.; OLIVEIRA R. B.; MOURÃO R. H. V.; AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO E ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia sylvatica* D.C. FRENTE AO BIOENSAIO EM *Artemia salina*. **Anais/Resumos** da 62ª Reunião Anual da SBPC. Natal, RN. 2010

BEDNARCZUK, V.O. et al. **Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais**. Visão Acadêmica. Curitiba, v. 11, n. 2, p. 44, 2010.

- BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. Borges LL, Conceicao EC, SILVEIRA D. **Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus**. Food Chem, 2014.
- BORGES, L.L.; ALVES, S.F.; SAMPAIO, B.L.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F.B.; PAULA, J.R. **Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves**. Braz. J. Pharmacogn. 2013.
- BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, J.T.; DORES, R.G.R.; NAGEM, T.J. **Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.28, p.287-290. 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 28.25-30 (1995)
- BÜTER, B. *et al.* **Significance of Genetic and Environmental Aspects in the Field Cultivation of *Hypericum perforatum***. *Planta Medica*, New York, v. 64, n. 05, p.431-437, jun. 1998.
- CALAO, V.Y.P. **Physical-chemical characterization, composition and antioxidant capacity of the essential oil of *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)**. Master's Thesis, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Brazil, April 2014.
- CALIXTO, J.B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p.179-189, fev. 2000.
- CAMPOS, J.S.; FRASSON, A. P. Z. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2012.
- CARVALHO, E.B. *et al.* **Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.29, n.2, p. 149-152, 2007
- CARVALHO, J. L. DE S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. DE F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado**. *Quimica Nova*, v. 32, n. 4, p. 1031–1035, 2009.

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTOS, L. S.; **Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants.** International Journal of Molecular Sciences, 16, 23881-23904, 2015

CERQUEIRA, M. D. DE; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. **Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CHEW Y.L., GOH J.K., LIM Y.Y.; **Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia.** Food Chem. 119: 373-378, 2011

CLEMENTINO C. O.; DURÃES E. R. B.; FARIA L. R.; PAULA J. A. M.; NAVES P. L.F.; ESTUDO DE TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Psidium myrsinites* D.C. (MYRTACEAE). **Congresso de ensino, pesquisa, e extensão UEG; ANAIS, 2016.**

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed.** CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016

CHOU, S. T. *et al.* **Cinnamomum cassia essential oil inhibits α -MSH-induced melanin production and oxidative stress in murine B16 melanoma cells.** International journal of molecular sciences, v. 14, n. 9, p. 19186-19201, 2013.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T.: **Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE.** Visão Acadêmica, v 6, n 2, p 6-16, 2005.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R.. **Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações.** Rev. bras. farmacogn., Curitiba, v. 20, n. 4, p. 641-650, Sept, 2010.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis.** Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA M. T. F. LEONICE M. F. TRESVENZOL L. M. F.; PAULA, J. R.; **Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).** Revista Eletrônica de Farmácia Vol 5(2), 21-31, 2008

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. **Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions.** The Journal of Organic Chemistry, Washington, v. 69, n. 7, p. 2309–2314, Feb, 2004

GARCÍA-TIRADO, J; RIEGER-REYES, C; SAZ-PEIRO, P. **Efecto de los flavonoides en la prevencion del cancer de pulmon: revision sistemática.** Med Clin (Barc). 139(8):358–363, 2012

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

HANAMANTHAGOUDA, M. S.; KAKKALAMELI, S. B.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H. R.; MURTHY, H.N. **Essential oils of Lavandula bipinnata and their antimicrobial activities.** Food Chemistry, v.118, p.836-839, 2010

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D . B. **Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta.** Quim. Nova, Vol. 31, No. 6, 1378-1384, 2008

IHA, S. M.; KETYLIN F. MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V.S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. **Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética.** Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 3, p. 387-393, jul./set. 2008.

JIMÉNEZ, D.; ARAQUE, M.; ROJAS, L.; CORDERO, A.; BRICEÑO, B. **Volatiles and antibacterial activity of the stems of Myrcia splendens (Sw.) DC.** Rev. Fac. Farm, 2012

JUNQUEIRA-GONÇALVES M.P., YÁÑEZ L., MORALES C., NAVARRO M., CONTRERAS R.A., ZÚÑIGA G.E. **Isolation and characterization of phenolic compounds and anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity.** Molecules, 2015.

KOROCH, A.; JULIANI, H.R.; ZYGADLO, J.A. **Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.** Springer Verlag: Berlin, Germany; pp. 87–115, 2007.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. **Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges.** Progress in Lipid Research, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES, P. G. **The use of *Artemia salina* in toxicity test.** ATLA - Alternatives to laboratory animals, v. 20, p. 297-301, 1992.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. **Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 158-163, 2006.

- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. **Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul**. QuimicaNova, v. 27, n. 6, p. 916–919, 2004.
- LONGHINI, R. *et al.* **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Maringá, v. 17, n. 3, p.388-395, set. 2007.
- LUCAS, E.J.; MATSUMOTO, K.; HARRIS, S.A.; NIC LUGHADHA, E.M.; BENARDINI, B.; CHASE, M.W. **Phylogenetics, morphology, and evolution of the large genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae)**. Plant Sci. 172, 915–934, 2011.
- LUNA, J.S. *et al.*, **A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil**. Journal of Ethnopharmacology, v.97, n.2, p.199-206, 2005.
- MAGINA M.A.; GILIOLI A.; MORESCO H. H.; COLLA G.; PIZZOLATTI M. G.; BRIGHENTE I. M. C.; **Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae)**. Lat. Am. J. Pharm. 29 (3): 376-82 (2010)
- MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, Fitoquímica e Atividades Biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* LABILL. subespécie *bicostata* (MAIDEN *et al.*) J. B. KIRKPAT., MYRTACEAE**. 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- MARTINS, C.M., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A., OLIVEIRA, A., CHANG, R., CUNHA, L.C., MARTINS, M.M., MARTINS, C.H., MORAES, T.S., RODRIGUES, P.V., SILVA, C.V. and AQUINO, F.J.; **Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.** Essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol, no. 1, pp, 2015.
- MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: cap. 24, p.517-543, 2010.
- MENSOR, L. L.; *et al.* **Screening of brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method**. Phytoterapy Research, v.15, p.127-130, 2001.
- MEYER, B. N.; *et al.* **Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**. Planta Medica, v.45, p.31-34, 1982.
- MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

- MING, L.C. **Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 12, n. 1, p.3-9, maio 1994.
- MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.** Songklanakarin Journal of Science Technology, v.26, n.3, p.211-219, 2004.
- MORAIS RODRIGUES, M. C. DE; BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; MOURAO, R.H. V.; CONCEICAO, E. C. DA. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) leaves.** Pharmacognosy Magazine, v. 12, n. 45, p. 9–12, 2016.
- MORESCO, H.H.; COLLA, G.; OLIVEIRA, A.S.; BRIGHENTE, I.M.C.; **Atividade antioxidante de *Myrcia splendens* por três diferentes métodos. 51º congresso de brasileiro de química. São Luis, 2011**
- MÜLLER, N.T. G.; FASOLO, D.; BERTÊ, R.; ELY, C. V.; HOLZ, D. T.; **ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE MYRTACEAE: *Psidium cattleianum* SABINE E *Campomanesia guazumaefolia* (CAMB.) BERG.** Vivências. Vol.8, N.14: p.65-71, 2012
- MURADOR P.; DEFFUNE E.; **Structural aspects of the erythrocyte membrane.** Rev. bras. hematol. Hemoter ;29(2):168-178, 2007
- NCFlora. *Myrcia venulosa* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora.** Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/profile/Myrcia_venulosa>. Acesso em 14 novembro 2018.
- NIC LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C. **A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae).** Annals of the Missouri Botanical Garden 83:480-503, 1996
- OETTING, L.L. Extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém desmamados. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2005
- 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.** Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 18, n. 2, p. 502-510, June 2016 .
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. **Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

- OSTROSKY, E. A., *et al.* **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008
- PAULA, A. M. J., JOSÉ R. PAULA, MARIA T. F. BARA, MARIA H. REZENDE, HELENO D. FERREIRA. **Pharmacognostic study about *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum leaves – Myrtaceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(2): 265-278, 2008
- PAULA, C.S.; CANTELI, V.C.D.; VERDAM, M.C.S. ; KALEGARI, M.; CAMPOS, R. ; HIROTA, B.C.K.; MIGUEL, O.G.M.; MIGUEL, M.D; **Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, p.189-195, 2014.
- PEREIRA, A.M.S. *et al.* **Seasonal Variation in Coumarin Content *Mikania glomerata*.** Journal Of Herbs, Spices & Medicinal Plants, [s.l.], v. 7, n. 2, p.1-10, 4 ago, 2000.
- PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2009.**
- 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.
- PRIOR, R.L., WU, X.; SCHAICH, K.; **Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics.** Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290-4302. 2015
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUIMARÃES, A.G.; SANTANA, M.T.; ARAÚJO, B.E.S.; MOREIRA, F.V.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S.; SIQUEIRA, J.S.; ANTONIOLLI, A.R.; BOTELHO, M.A.; *et al.* **Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents.** Rev. Bras. Plantas Med. 2011, 21, 497–502.
- RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.2; BARBOSA, L.C.A; ROCHA, R.P. ; BERBERT, P.A.; **Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.453-457, 2012
- REZENDE, W. P.; BORGES, L. L.; ALVES, N. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. **Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 3, p. 433–440, 2013.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. **Atividade antioxidante de frutas do cerrado.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROLIM, A.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADOSANTOS, I. M. N.; VELASCO, M. V. R. **Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract.** Journal of AOAC International, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005

ROSA, P. O.; ROMERO, R. **O genero *Myrcia* (Myrtaceae) nos campos rupestres de Minas Gerais.** Brasil. Rodriguésia, v. 63, n. 3, p. 613–633, 2012.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. **Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.18, n.1, p.19-26, 2016

SALVADOR, M. J.; DE LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C. R. F.; STEFANELLO, M. E. A.; **Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil.** Natural product communications 6(7):977-82. 2011

SANTOS, A. O. et al. **Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, Mai 2008.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F.; **Pharmacological activities of flavonoids: a review study.** Estação Científica (UNIFAP), v. 7, n. 3, p. 29-35. 2017

SANTOS L.; CAMPOS A., CECHINEL F. V.;, NESELLO L.; **Phytochemical profile and gastroprotective activity of *Eugenia mattosii* fruit.** Arq Gastroenterol • v. 55 nº 2 abr/jun, 2018.

SANTANA, C. B. et al; **Chemical composition of essential oil from *myrcia oblongata* dc and potencial antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (DEGEER, 1778).** Biosci. J., Uberlândia, v. 34, n. 4, p. 996-1009, July/Aug, 2018

SANTIAGO J. A.; Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotogênica e citogenotóxica. **Tese (doutorado)**—Universidade Federal de Lavras, 2015.

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; VILEGAS, W.; LOPEZ, W. M.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; COLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. **Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess, In normal and tumor gastric cells.** Journal of Ethnopharmacology, v. 176, p. 345-355, 2015.

SHIN, H.S., SATSU, H., BAE, M.J., ZHAO, Z., OGIWARA, H., TOTSUKA, M. and SHIMIZU, M.; **Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice.** Food Chemistry, vol. 168, pp. 167-175, 2015

SILVA, A.N.; UETANABARO, A.P.T.; LUCCHESI, A.M. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae).** Nat. Prod. Commun. 2013, 8, 269–271

SILVA, M.G.V. *et al.* **Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves.** Fitoterapia, [s.l.], v. 70, n. 1, p.32-34, fev. 1999.

SILVA, S. M.; ABE, S. Y.; MURAKAMI, F. S.; FRENCH, G.; MARQUES, F. A.; NAKASHIMA, T. **Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities.** Pharmaceuticals, v.4, n.12, p.1535-1550, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010
Snow, N.; Systematic conspectus of Australasian Myrtinae (Myrtaceae). KewBull. 55, 647–654, 2000.

SOARES S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Rev. Nutrição, 15(1):7181. 2002

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINI, F.; LUCAS, E. **A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul.** Myrtaceae *In*: Forzza, R.C. *et al.* (ed.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010

SOUSA, B.A.A. Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.). **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2009.

SOUSA, C. DE *et al.* **In vivo assessment of cyto/genotoxic, antigenotoxic and antifungal potential of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves and stems.** An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro , v. 90, n. 2, p. 1565-1577, Apr. 2018.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M. S.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V.; **Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas.** Revista Biotemas, 24 (3), 2011.

STADNIK, A.; OLIVEIRA, M. I. U.; ROQUE, N.; **Myrtaceae na Serra Geral de Licínio de Almeida, Bahia, Brasil.** Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 69, n. 2, p. 515-552, June 2018.

STEFANELLO, M.E.A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. **Essential oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties.** *Chem. Biodivers*, 8, 73–94, 2011.

TANAKA, J. C. A. S. et al. **Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae).** Química Nova, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, Jul 2005.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, L.; GUALTIERI, S. C. J. **Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna).** Brazilian Journal of Biology, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TIWARI, B.K., VALDRAMIDIS, V.P. AND DONNEL, C.P.O., MUTHUKUMARAPPAN, K., BOURKE, P. AND CULLEN, P.J.; **Application of natural antimicrobials for food preservation.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 5987–6000, 2009.

UNSAI, V. **Natural Phytotherapeutic Antioxidants in the Treatment of Mercury Intoxication-A Review.** Advertised farmarcological bulletin. v 8(3, P. 365–376, 2018

VIANA, M. J. G. *et al.* Visualização de acesso às informações sobre plantas aromáticas da Amazônia: construção de banco de dados de espécies investigadas quanto a composição química de seus óleos essenciais. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 47, n. 1, p. 57-63, 1998.

ZACCHINO, S. **Estratégias para a descoberta de novo agentes antifúngicos.** In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: ARGOS, p.435-479, 2002.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** Food Chemistry, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, M.H.L.; CARREIRA, L.M.M.; MAIA, J.G.S. **Essential oils from three *Myrcia* species.** Flavour Fragr. J. 2003, 8, 421–424

ANEXOS

ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE 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*".

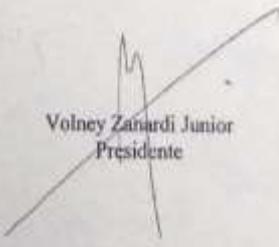
Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

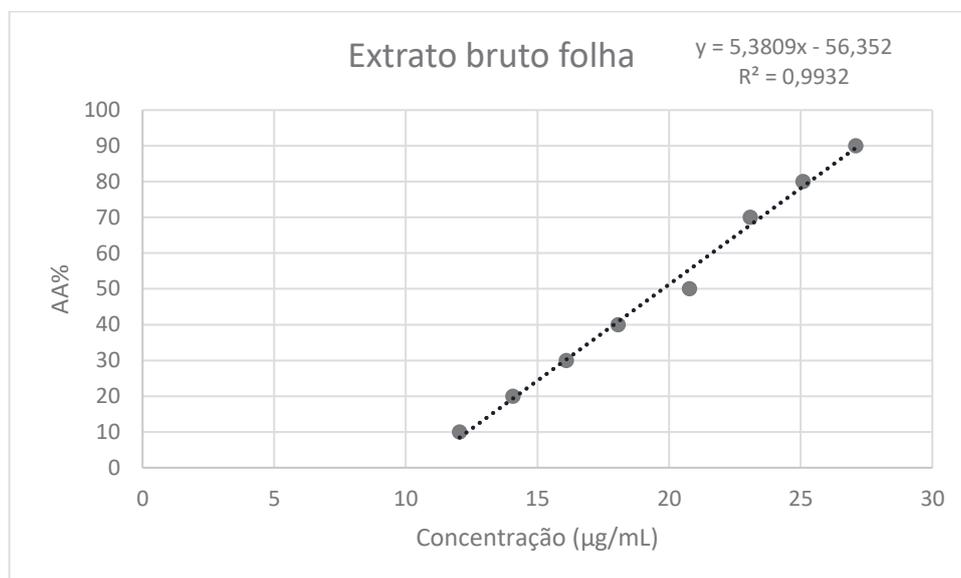
Período das atividades: 2000 a 2019.

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 n.º 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.

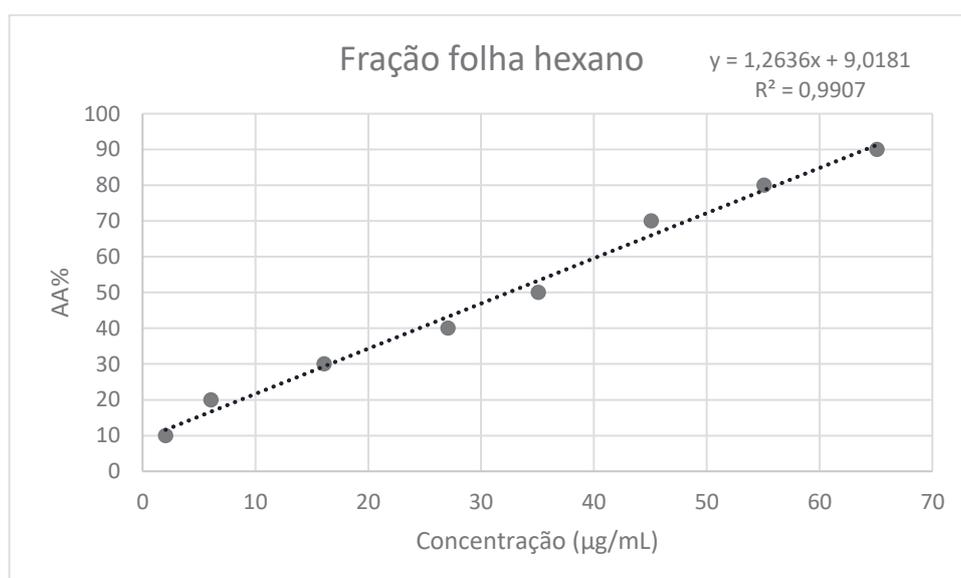
Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Brasília, 17 de março de 2014.

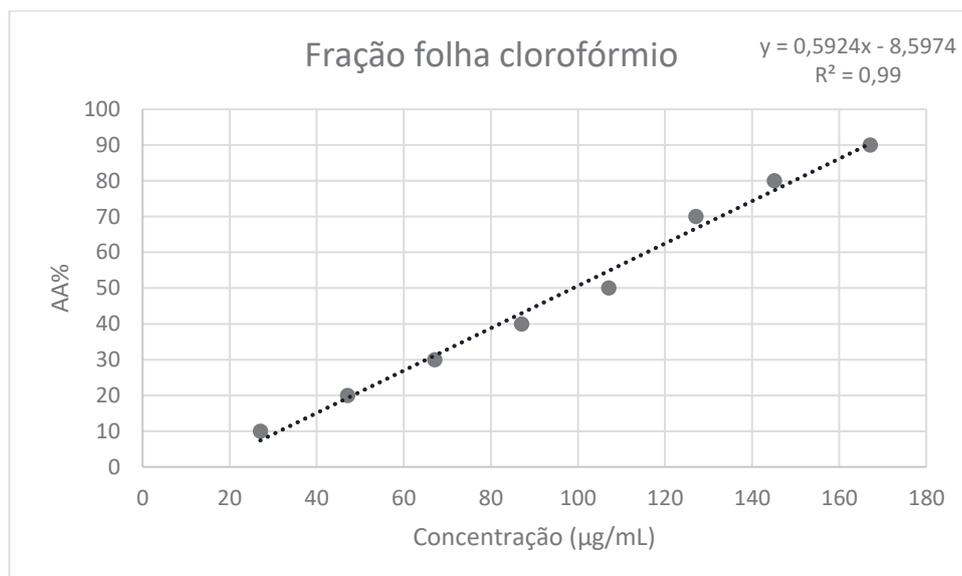

Volney Zanardi Junior
Presidente

ANEXO 2 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELA REDUÇÃO DO DPPH

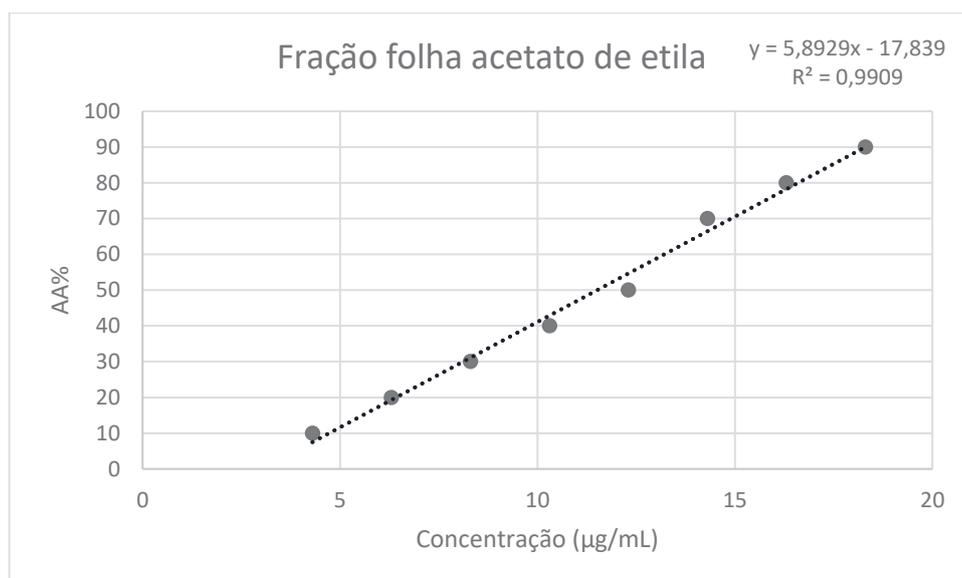
FONTE: O autor (2019).



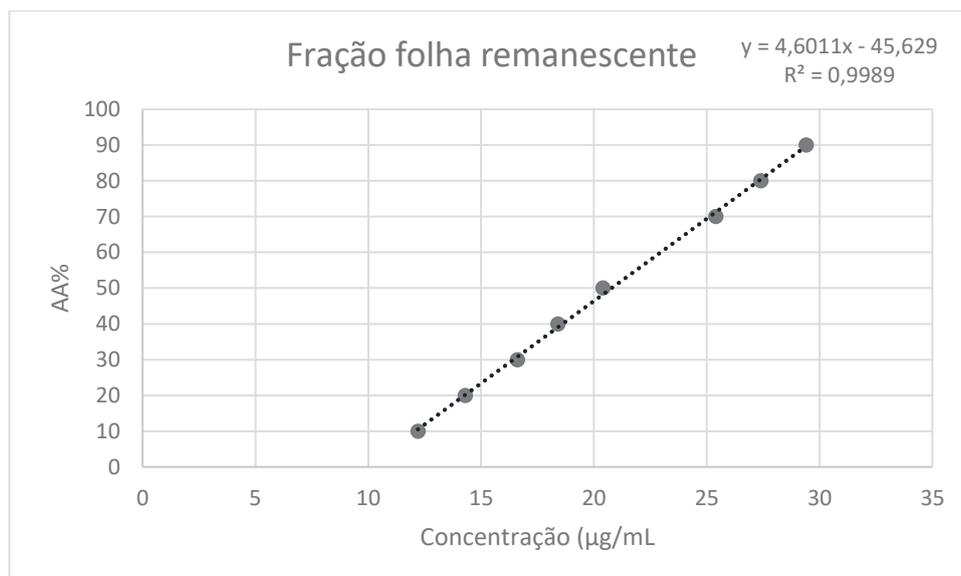
FONTE: O autor (2019).



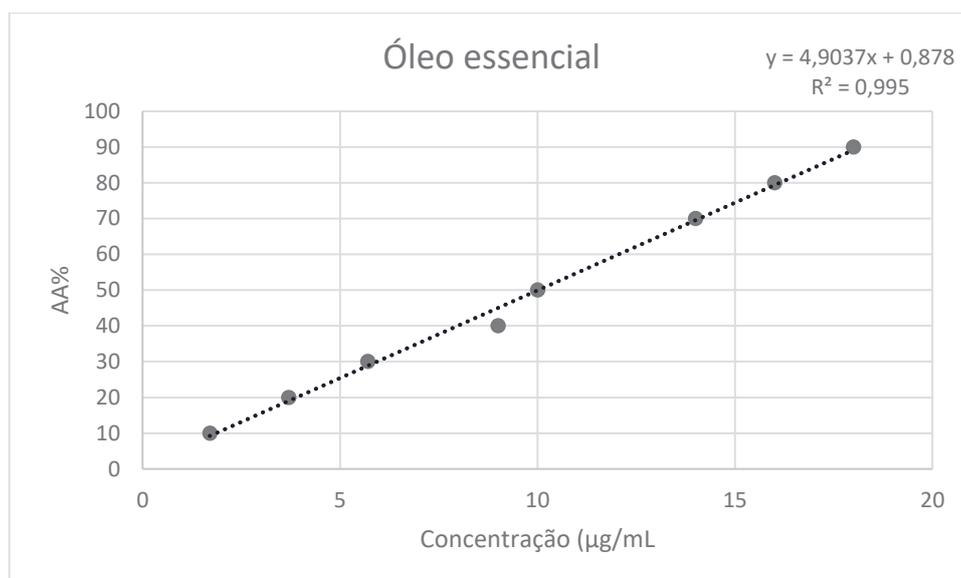
FONTE: O autor (2019).



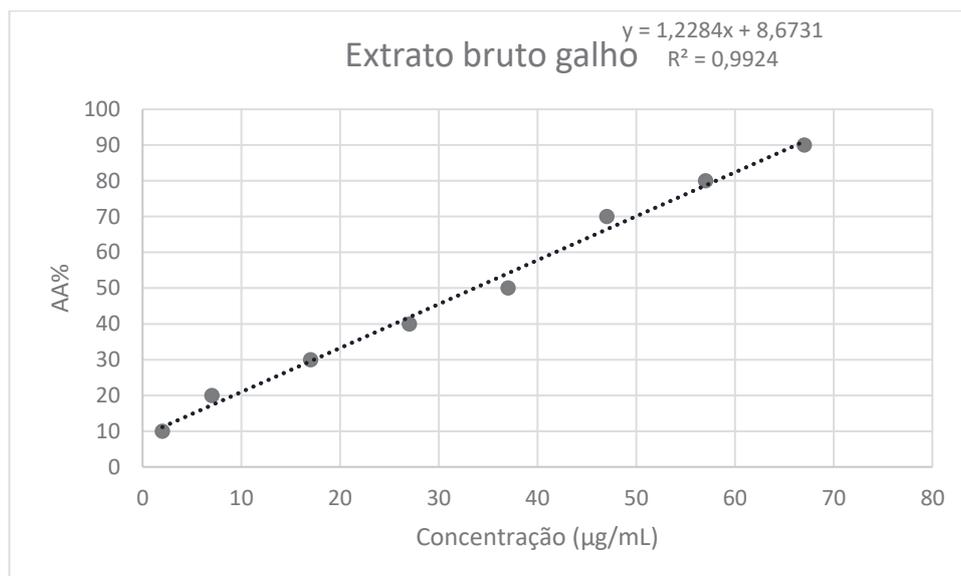
FONTE: O autor (2019).



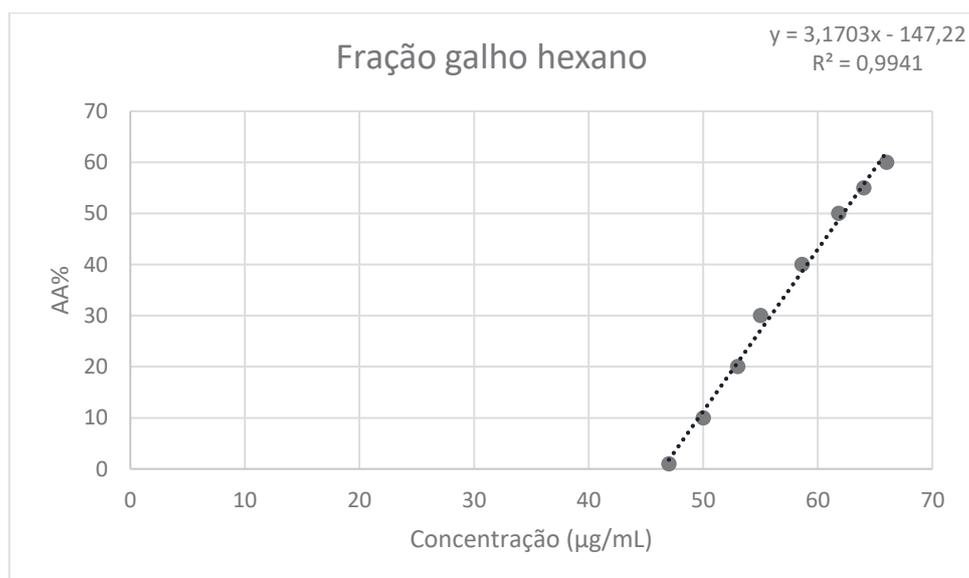
FONTE: O autor (2019).



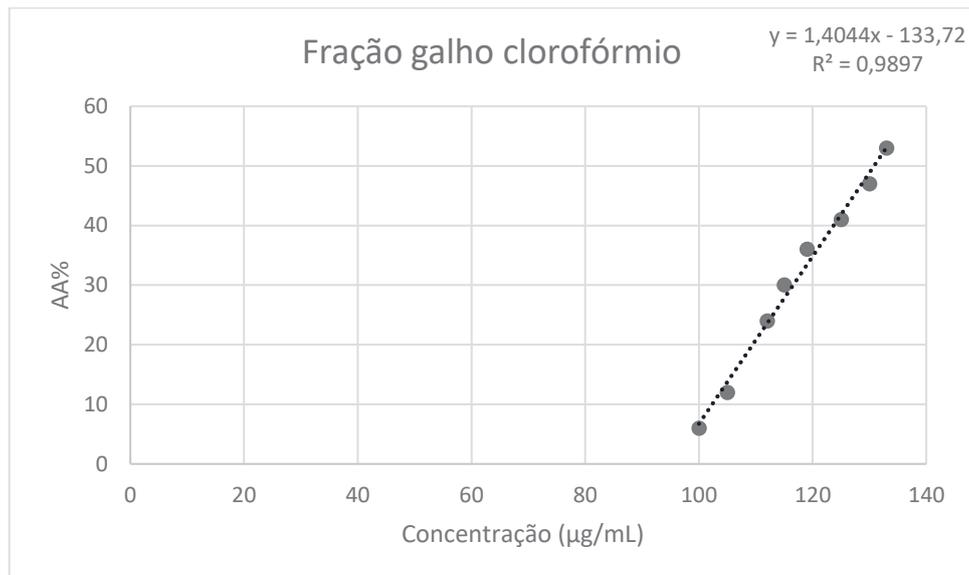
FONTE: O autor (2019).



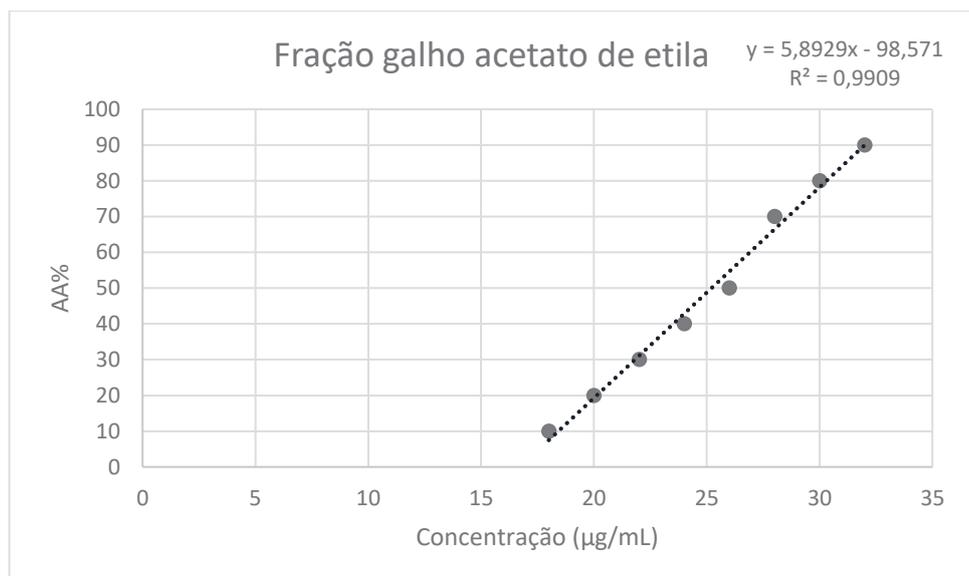
FONTE: O autor (2019).



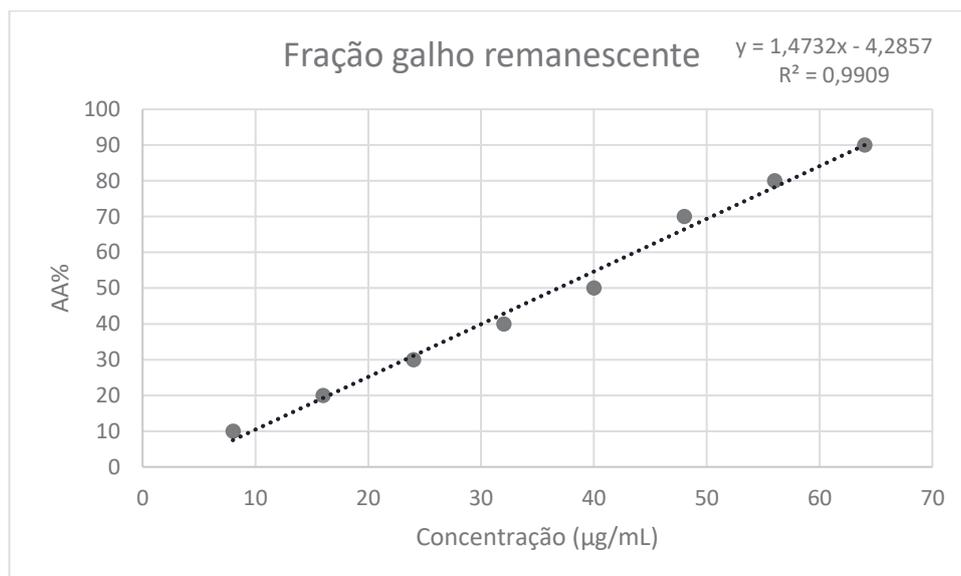
FONTE: O autor (2019).



FONTE: O autor (2019).



FONTE: O autor (2019).



FONTE: O autor (2019).