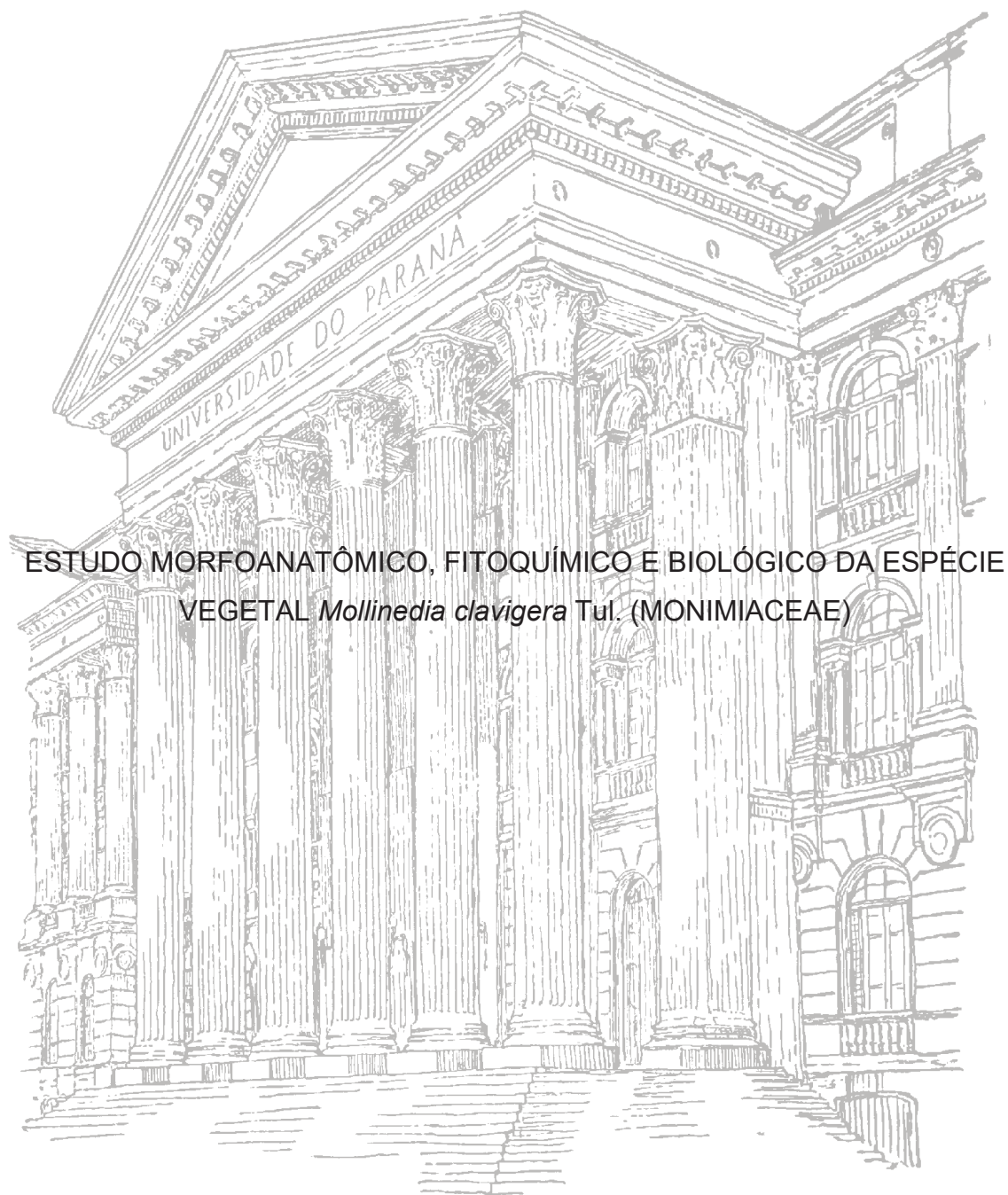


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM



ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE
VEGETAL *Mollinedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)

CURITIBA

2019

ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE
VEGETAL *Mollinedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius B. de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Giovanni B. Appendino

CURITIBA

2019

Homem, Isabel Christina Mignoni

Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico da espécie vegetal
Mollinedioclavigera Tul [recurso eletrônico] / Isabel Christina Mignoni Homem –
Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius B. de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Giovanni B. Appendino
Natasha Pacheco de Mello Oliveira CRB 9/1889

1. α -selineno. 2. β -selineno. 3. Óxido decariofileno. 4. Espatuleno. 5. Feofitina
a. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Oliveira, Vinícius B. de. III. Appendino, Giovanni B.
IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.



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

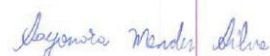
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ISABEL CHRISTINA MIGNONI HOMEM** intitulada: **Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico da espécie vegetal *Mollinedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)**, sob orientação do Prof. Dr. **OBDULIO GOMES MIGUEL**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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.

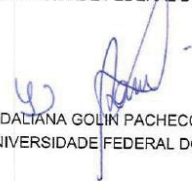
CURITIBA, 04 de Novembro de 2019.

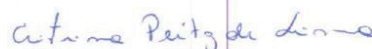

OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora


SAYONARA MENDES SILVA
Avaliador Externo (FACULDADE CATHEDRAL)


ANA FLAVIA SCHVABE DUARTE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


CRISTINA PEITZ DE LIMA
Avaliador Externo (FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL)

Dedico este trabalho aos meus pais, Aílto e Tânia. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos.

À minha família, pelo apoio, confiança e amor de uma vida inteira. Vocês são fundamentais na minha vida. Pai, Mãe, Mano, Augusto, Vanessa, Sanny e Marcella: Amo vocês. Obrigada por tudo.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Obdulio G. Miguel e co-orientadores Prof. Dr. Vinicius B. de Oliveira e Prof. Dr. Giovanni B. Appendino pelos ensinamentos e confiança.

Aos professores, técnicos e colegas do grupo de pesquisa de Produtos Naturais, pelas sugestões e auxílio na realização de alguns ensaios.

À Università del Piemonte Orientale pelo acolhimento e ensinamentos durante os seis meses que lá permaneci. Em especial a Federica Pollastro, Simone Gaeta e Patrizia Marotta.

À UEPG, pelo auxílio no desenvolvimento do estudo morfoanatômico, em especial a Prof^a Dra. Jane Manfron.

À Univali, pela realização da análise cromatográfica em CG/EM, em especial ao Prof. Dr. Clóvis Rodrigues.

À Jéssica Domingues, Flávia Deffert, Vanessa Bobek, Juliane Nadal e Giane Favretto pelo auxílio essencial.

Aos amigos que levo comigo além da pós-graduação, Jéssica, Fernando e Vanessa. Da UFPR para à vida.

Aos amigos de longa data Patricia Camargo e Lediel Kautnick. Obrigada por sempre estarem presentes, apesar da distância. Amo vocês.

Aos amigos Bruno Gabriel, Rodriane Dellê e Marcelo Cavadinha. Melhor encontro da vida. Agradeço pela amizade e felicidade que vocês me proporcionam e por tudo que ainda virá. Amo vocês.

Em especial, à Ellis Marina Szabo. De colega de laboratório à irmã de alma. Agradeço pela fundamental ajuda durante todas as etapas de desenvolvimento desta tese e principalmente pela ajuda no meu desenvolvimento pessoal. Você é essencial e indispensável na minha vida, hoje e sempre. Amo você.

Aos meus vizinhos, Sr. Luiz e Sra. Ademilde. Minha família Curitibana. Agradeço, imensamente, pelo zelo e carinho de sempre.

E a todos aqueles que eventualmente não foram citados, mas que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo” (Albert Einstein)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule da espécie *Mollinedia clavigera* Tul.(Monimiaceae). No estudo morfoanatômico observou-se a presença de estômatos do tipo paracítico na fase abaxial, caracterizando-a como hipoestomática. A espécie apresentou dois tipos de tricomas não glandulares unicelulares, simples e longos; curtos e ramificados. A nervura central mostrou-se plano-convexa apresentando feixes vasculares abertos em forma de arco. O pecíolo apresentou-se ligeiramente plano-convexo e os caules em formato circular. Cristais de oxalato foram encontrados na nervura central, pecíolos e caules. Ensaios histoquímicos detectaram compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido e elementos lignificantes. Nas folhas cinco substâncias foram identificadas e relatadas pela primeira vez na espécie, os sesquiterpenos α -selineno, β -selineno, óxido de cariofileno e espatulenol e o derivado porfirínico feofitina *a*. Na análise sazonal do óleo essencial das folhas, percebeu-se uma composição exclusiva de sesquiterpenos, que sofrem interferência direta das estações do ano em relação à composição e quantidades de compostos majoritários. O óleo essencial dos caules indicou o sesquiterpeno espatulenol (3,95%) como composto majoritário, seguido do óxido de cariofileno (1,25%). Na avaliação da atividade alelopática em *Lactuca sativa* não foi detectada influência das amostras na germinação, mas observou-se que EBF100 favoreceu o crescimento de radícula e hipocótilo, enquanto EBC1000 os inibiu. Em *Alium cepa* foi observado o favorecimento na germinação por óleo essencial 0,001% e no crescimento da radícula por EBF100. Houve inibição na germinação por EBF100 e EBF750, assim como no hipocótilo exposto a óleo essencial 1%, EBF1000 e EBC1000 e as radículas expostas a EBC750 e EBC1000. A avaliação da atividade citotóxica mostrou viabilidade reduzida para o óleo essencial (10 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao extrato bruto etanólico das folhas (100 $\mu\text{g/mL}$). No ensaio de proliferação celular houve um aumento estaticamente significativo na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e uma diminuição da proliferação na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: *Mollinedia clavigera*. Monimiaceae. α -selineno. β -selineno. Óxido de cariofileno. Espatulenol. Feofitina *a*.

ABSTRACT

This study aimed to perform anatomical characterization, phytochemical and biological activities evaluation on *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae) leaves and stems. Anatomic features like abaxial paracitic stomata (hypostomatic leaves), unicellular non-glandular trichomes (long simple and short branched) and calcium oxalate crystals (central nervure, petiole and stems) were observed. Central nervure is plan-convex, presenting open arch-shaped vascular bundles. Petiole is slightly plane-convex and stems are circular. Histochemical evaluation revealed lipophilic and phenolic compounds, starch grains and lignified elements. Leaves presented unprecedented substances: sesquiterpenes α -selinene, β -selinene, caryophyllene oxide, spathulenol and porphyrinic derivate pheophytin *a*, which were never reported for this species. Leaves essential oil seasonal analysis revealed an exclusive sesquiterpene composition altering between seasons, mainly in composition and major compounds amounts. Stems essential oil major compound is sesquiterpene spathulenol (3,95%), followed by caryophyllen oxide (1,25%). Allelopathy evaluation revealed no influence in *Lactuca sativa* germination, yet radicle and hypocotyle growth was favored by leaves crude extract (100 $\mu\text{g/mL}$) while stems crude extract (1000 $\mu\text{g/mL}$) inhibited it. Essential oil (0,001%) favored *Allium cepa* germination, as observed in radicle growth with leaves crude extract (100 $\mu\text{g/mL}$). Inhibition was observed in onion seeds germination when exposed to leaves crude extract (100 and 750 $\mu\text{g/mL}$), as well as hypocotyle growth when exposed to essential oil (1%) and crude extracts (1000 $\mu\text{g/mL}$). Citotoxic activity evaluation pointed reduced cell viability on essential oil (10 $\mu\text{g/mL}$) when compared to leaves crude extract (100 $\mu\text{g/mL}$). Cell proliferation essay showed statistically significant influences in leaves essential oil solutions: proliferation increase in 10 $\mu\text{g/mL}$ and proliferation decrease in 100 $\mu\text{g/mL}$.

Key-words: *Mollinedia clavigera*. Monimiaceae. α -selinene. β -selinene. Caryophyllen oxide. Spathulenol. Pheophytin *a*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DA FAMÍLIA MONIMIACEAE.....	23
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA MONIMIACEAE NO BRASIL	24
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>M. clavigera</i> TUL.....	27
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM HOMEM (2015)	28
FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS TERPÊNICOS: VIA CLÁSSICA (MVA) E VIA ALTERNATIVA (MEP).....	31
FIGURA 6 - EXSICATA DE <i>M. clavigera</i> DEPOSITADA NO MBM DE CURITIBA SOB O REGISTRO MBM 384847.....	32
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PRESENTE TRABALHO	33
FIGURA 8 - PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DE FOLHAS E CAULES SECOS DE <i>M. clavigera</i>	46
FIGURA 9 - CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	48
FIGURA 10 - ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	49
FIGURA 11 – MORFOANATOMIA FOLIAR DE <i>M. clavigera</i>	52
FIGURA 12 – ANATOMIA DO CAULE DE <i>M. clavigera</i>	53
FIGURA 13 – HISTOQUÍMICA DE <i>M. clavigera</i>	54
FIGURA 14 - ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS).....	55
FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	58
FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÓXIDO DE CARIOFILENO	59
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DE IM21E (ÓXIDO DE CARIOFILENO).....	59

FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DE IM21E (ÓXIDO DE CARIOFILENO)	60
FIGURA 19 - ESTRUTURA QUÍMICA DO A-SELINENO E B SELINENO ...	61
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DE IM22A (A-SELINENO E B-SELINENO)	62
FIGURA 21 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ESPATULENOL.....	63
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DE IM29D (ESPATULENOL).....	64
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DE IM29 D (ESPATULENOL).....	64
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H DE IM28E (FEOFITINA A).....	66
FIGURA 25 - ESTRUTURA QUÍMICA DA FEOFITINA A	67
FIGURA 26 - ANÁLISE DE PCA DA SAZONALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	74
FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COEFICIENTE DE CORRLEÇÃO DE PEARSON	78
FIGURA 28 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DOS CAULES DE <i>M. clavigera</i>	78
FIGURA 29 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i> EM SEMENTES DE <i>L. sativa</i>	86
FIGURA 30 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. clavigera</i> EM SEMENTES DE <i>A. cepa</i>	90
FIGURA 31 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM FEVEREIRO DE 2015	104
FIGURA 32 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM MARÇO DE 2015	104
FIGURA 33 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM ABRIL DE 2015	105
FIGURA 34 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM MAIO DE 2015.....	105
FIGURA 35 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM JUNHO DE 2015	106

FIGURA 36 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM JULHO DE 2015	107
FIGURA 37 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM AGOSTO DE 2015	108
FIGURA 38 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM SETEMBRO DE 2015.....	109
FIGURA 39 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM OUTUBRO DE 2015.....	110
FIGURA 40 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM NOVEMBRO DE 2015.....	111
FIGURA 41 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM DEZEMBRO DE 2015.....	112
FIGURA 42 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> EM JANEIRO DE 2016.....	113
FIGURA 43 - AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO CONCEDIDA PELO IBAMA.....	114

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICAS DA FAMÍLIA MONIMIACEAE	24
QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO GÊNERO <i>Mollinedia</i>	26
QUADRO 3 - TAXONOMIA DA ESPÉCIE <i>Mollinedia clavigera</i> TUL.	27
QUADRO 4 - REATIVOS UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DOS TESTES HISTOQUÍMICOS	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	45
TABELA 2 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DE ANÁLISE DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	47
TABELA 3 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	56
TABELA 4 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	56
TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C DO COMPOSTO IM21E (ÓXIDO DE CARIOFILENO)	58
TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H DO COMPOSTO IM22A (A-SELINENO E B-SELINENO)	61
TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C DO COMPOSTO IM29D (ESPATULENOL).....	63
TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H DO COMPOSTO IM28E (FEOFITINA A).....	65
TABELA 9 – RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	68
TABELA 10 – TEMPERATURA MÉDIA DURANTE O PERÍODO DE COLETA (SIMEPAR).....	69
TABELA 11 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	69
TABELA 12 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA SAZONAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	71
TABELA 13 – COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NA COMPOSIÇÃO SAZONAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	73
TABELA 14 – COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DOS CAULES DE <i>M. clavigera</i>	77

TABELA 15 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE <i>M. clavigera</i> NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i>	81
TABELA 16 - ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i>	82
TABELA 17 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE <i>M. clavigera</i> NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>A. cepa</i>	83
TABELA 18 - ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i> NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>A. cepa</i>	84
TABELA 19 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> EM EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	87
TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>L. sativa</i> EM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	87
TABELA 21 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>A. cepa</i> EM EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. clavigera</i>	88
TABELA 22 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>A. cepa</i> EM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	68
GRÁFICO 2 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	75
GRÁFICO 3 - INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CAULES EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE <i>L. sativa</i>	80
GRÁFICO 4 - INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS EM TMG,VMG E IVG EM SEMENTES DE <i>L.sativa</i>	81
GRÁFICO 5 - INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CAULES EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE <i>A. cepa</i>	82
GRÁFICO 6 - INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE <i>A.cepa</i>	84
GRÁFICO 7 - VIABILIDADE CELULAR DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	91
GRÁFICO 8 - VIABILIDADE CELULAR DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	92
GRÁFICO 9 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS FIBROBLASTOS NIH 3T3 DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>M. clavigera</i>	93

LISTA DE SIGLAS

CC -	Cromatografia em coluna
CDCl ₃ -	Clorofórmio deuterado
CG/EM -	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMEM -	Meio Eagle Modificado por Dulbeco
DMSO -	Dimetilsufóxido
DPIP -	Difosfato de isopentinila
DPDMA-	Difosfato de dimetilalila
DSC -	Análise de calorimetria exploratória diferencial
EDS -	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
EI -	Impacto de elétrons
FAA -	Formaldeído, ácido acético, álcool etílico
FEG-	Emissão de campo
IVG -	Índice de velocidade de germinação
MC -	Média de alongamento do controle
MEP -	Via do Metileritritol fosfato
MEV -	Microscopia eletrônica de varredura
MT -	Média de alongamento dos tratamentos
MTT -	3 - (4,5 – dimetiltiazol -2 – ilo) – 2,5 – difeniltetrazólico
MVA -	Via do mevalonato
PBS -	Tampão fosfato-salino
RMN -	Ressonância Magnética nuclear
SFB -	Soro fetal bovino
THF -	Tetrahidrofurano
TMG -	Tempo médio de germinação
TMS -	Tetrametilsilano
VMG -	Velocidade média de germinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	GERAL.....	22
2.2	ESPECÍFICOS.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1	FAMÍLIA MONIMIACEAE JUSS.....	23
3.2	GÊNERO <i>Mollinedia</i> Ruiz & Pav.....	25
3.3	ESPÉCIE <i>Mollinedia clavigera</i> Tul.....	26
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	32
4.2	ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS.....	33
4.2.1	Perda por dessecação.....	33
4.2.2	Cinzas totais.....	34
4.3	ANÁLISE TÉRMICA.....	34
4.4	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	35
4.4.1	Preparo das lâminas semipermanentes.....	35
4.4.2	Testes histoquímicos.....	35
4.4.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	35
4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS E CAULES.....	36
4.6	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES.....	36
4.6.1	Extrato bruto cetônico (EBC).....	36
4.6.2	Frações orgânicas.....	36
4.6.2.1	Folhas.....	36
4.6.2.2	Caules.....	37
4.7	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	37
4.7.1	Purificação e isolamento das frações.....	37
4.7.2	Identificação de compostos isolados.....	38
4.8	OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES.....	38

4.8.1	Obtenção do óleo essencial das folhas e caules.....	38
4.8.2	Caracterização físico-química do óleo essencial das folhas.....	38
4.8.2.1	Determinação da densidade.....	38
4.8.2.2	Determinação do índice de refração $^{20}n_D$	39
4.8.3	Análise da composição química do óleo essencial das folhas e caules por CG/EM.....	39
4.8.4	Análise estatística.....	40
4.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	40
4.9.1	Avaliação da atividade alelopática.....	40
4.9.1.1	Teste de Germinação.....	40
4.9.1.2	Teste de Crescimento.....	41
4.9.2	Avaliação da atividade citotóxica.....	42
4.9.2.1	..Linhagem Celular.....	42
4.9.2.2	Cultivo celular.....	42
4.9.2.3	Ensaio de viabilidade celular.....	43
4.9.2.4	Ensaio de Proliferação Celular.....	43
4.9.2.5	Análise Estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS.....	45
5.2	ANÁLISE TÉRMICA.....	45
5.3	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	49
5.3.1	Análise morfológica macroscópica.....	49
5.3.2	Análise morfológica microscópica.....	49
5.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E CETÔNICOS DAS FOLHAS E CAULES.....	56
5.5	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS.....	56
5.6	ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS.....	57
5.6.1	Purificação e isolamento de compostos.....	57
5.6.1.1	Fração éter de petróleo das folhas (IM18A).....	57
5.6.2	Identificação dos compostos IM22A, IM21E, IM29D e IM28E.....	57
5.6.2.1	Composto IM21E.....	58
5.6.2.2	Composto IM22A.....	61
5.6.2.3	Composto IM29D.....	62
5.6.2.4	CompostoIM28.....	65

5.7	OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES.....	67
5.7.1	Folhas.....	67
5.7.1.1	Rendimento do óleo essencial das folhas.....	67
5.7.1.2	Caracterização físico-química do óleo essencial das folhas.....	69
5.7.1.3	Análise da composição química sazonal do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM).....	70
5.7.1.4	Análise estatística.....	73
5.7.1.4.1	Análise de componentes principais (PCA).....	73
5.7.1.4.2	Coeficiente de correlação de Pearson.....	75
5.7.2	Caules.....	76
5.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	79
5.8.1	Avaliação da atividade alelopática.....	79
5.8.1.1	Teste de Germinação.....	79
5.8.1.1.1	Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas de <i>M. clavigera</i> na germinação de <i>L. sativa</i>	80
5.8.1.1.2	Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas de <i>M. clavigera</i> na germinação de <i>A. cepa</i>	82
5.8.1.2	Teste de Crescimento.....	84
5.8.1.2.1	Influência dos extratos brutos etanólicos de folhas e caules e óleo essencial de folhas no crescimento de <i>L. sativa</i>	85
5.8.1.2.2	Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas no crescimento de <i>A. cepa</i>	87
5.8.2	Avaliação da atividade citotóxica.....	91
5.8.2.1	Ensaio de viabilidade celular.....	91
5.8.2.2	Ensaio de Proliferação Celular.....	92
6.	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXOS.....	104

1 INTRODUÇÃO

O isolamento e a elucidação de estruturas moleculares de substâncias orgânicas de origem vegetal impulsionam o desenvolvimento científico, social e econômico do nosso país (BRAZ FILHO, 2010). Metabólitos secundários, compostos que garantem vantagens à sobrevivência e perpetuação das plantas, são largamente produzidos por espécies vegetais em grande variabilidade e complexidade (SANTOS, 2010). Esta condição garante abundante probabilidade de obtenção de substâncias biologicamente ativas, tornando-se modelos viáveis para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação terapêutica desde o combate do câncer até microrganismos patógenos (BRAZ FILHO, 2010, SANDES; DI BIASI, 2000).

As primeiras substâncias puras extraídas e isoladas do reino vegetal datam do século XIX. O isolamento de alcaloides como a morfina (analgésico extraído da *Papaver somniferum*), quinina (antimalárico extraído da *Cinchona*) e estriquinina (pesticida em desuso, extraído de *Strychnos* e *Chondodendron*) ocorreu neste período, durante os anos de 1806 e 1820 (PINTO et al., 2002).

Um importante marco na utilização de produtos naturais para a produção de medicamentos sintéticos foi o descobrimento de salicilatos em *Salix alba*. Após o isolamento de salicilina foram realizadas pesquisas que visavam aumentar o rendimento e a qualidade da mesma. Foi assim que em 1860 sintetizou-se o ácido salicílico, fármaco precursor do ácido acetil salicílico (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

Espécies vegetais apresentam a capacidade de produzir substâncias enantiomericamente puras, o que não é tão simples de se reproduzir sinteticamente em laboratórios. A importância da produção de produtos quirais pode ser exemplificada através do fármaco talidomida, em que o enantiômero S apresenta ação teratogênica, enquanto o enantiômero R é responsável pela sua ação farmacológica (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

A eficácia e segurança da utilização de drogas vegetais não podem ser baseadas apenas no conhecimento do uso popular. Esta avaliação deve ser complementada com avaliação de substâncias isoladas, extratos e frações através da elucidação de seus mecanismos químicos, de ensaios biológicos, fitotóxicos e determinação de concentração ativa (ARAÚJO et al., 2014). Grande parte da biodiversidade concentra-se em florestas tropicais, especificamente no Brasil, entre

estas espécies podemos citar a *Mollinedia clavigera* Tul. pertencente à família Monimiaceae, nativa da vegetação de Mata Atlântica, objeto de trabalho desta pesquisa. Os resultados obtidos em pesquisa fitoquímica preliminar, caracterização química do óleo essencial, perfil de toxicidade e atividade antioxidante com folhas e caules da espécie em Homem (2015) motivaram a continuidade de investigação de *Mollinedia clavigera* Tul., principalmente por tratar-se de estudo inédito.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar estudo morfoanatômico, fitoquímico e atividades biológicas das partes aéreas da espécie *Mollinedia clavigera* Tul., assim como a caracterização e composição sazonal do óleo essencial.

2.2 ESPECÍFICOS

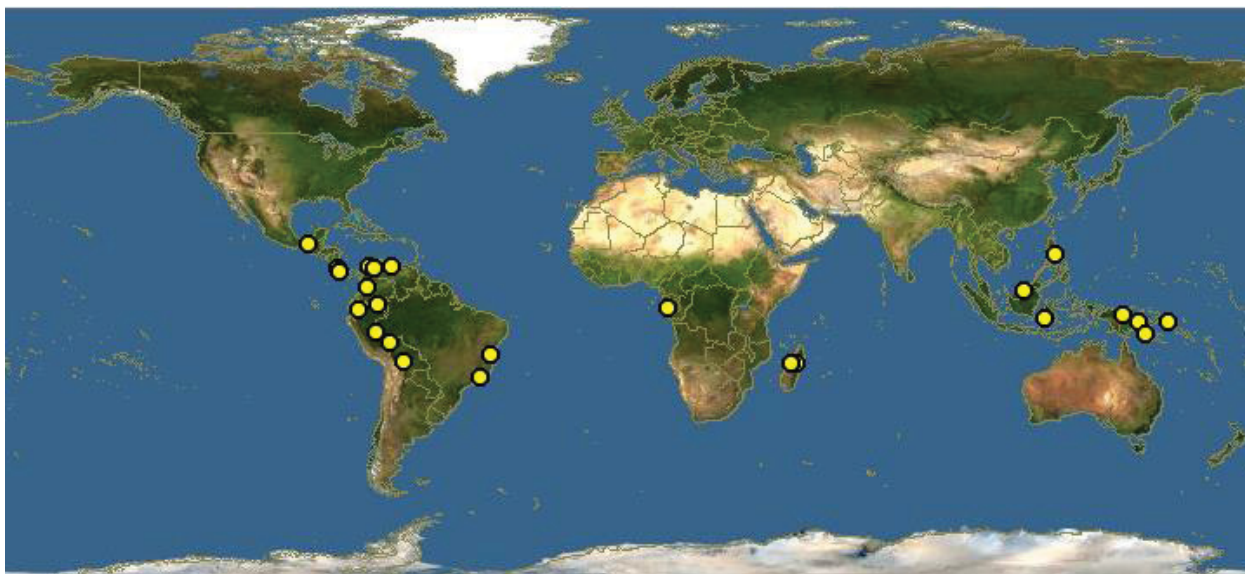
- Determinar parâmetros físico-químicos das folhas e caules;
- Realizar análise térmica das folhas e caules;
- Realizar estudo morfoanatômico das folhas e caules;
- Isolar e identificar os constituintes químicos presentes na espécie;
- Realizar a caracterização e análise da composição química sazonal do óleo essencial das folhas;
- Realizar análise da composição química do óleo essencial dos caules;
- Avaliar atividade alelopática dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas;
- Avaliar atividade citotóxica do extrato bruto etanólico e óleo essencial das folhas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MONIMIACEAE JUSS

Monimiaceae (Laurales) engloba 28 gêneros e cerca de 220 espécies, distribuídas em regiões tropicais da América Central, América do Sul, África e Arquipélago Malaio (FIGURA 1) (RENNER, 2010).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DA FAMÍLIA MONIMIACEAE



FONTE: TRÓPICOS (2018).

A família foi descrita inicialmente por Jussieu (1809) e tratava-se de uma família polifilética, de difícil delimitação. Alguns membros foram realocados e segregados formando novas famílias: Atherospermataceae, Trimeniaceae, Amborellaceae e Siparunaceae (RENNER et al., 2010, APG III 2009).

Monimiaceae é atualmente composta por três subfamílias: Hortonioideae (monotípico: *Hortonia* Wight&Arn), Monimioideae (*Peumus* Molina, *Palmeria* F. Muell e *Monimia* Thouars) e Mollinedioideae (demais gêneros) (PHILIPSON, 1988; RENNER et al., 2010, STAEDLER; ENDRESS, 2009). No neotrópico, a família é representada por seis gêneros: quatro monoespecíficos - *Grazielanthus*, *Macrotorus*, *Hennecartia*, *Peumus* e dois poliespecíficos – *Mollinedia* e *Macropheplus* (RENNER et al., 2010; SANTOS; PEIXOTO, 2001).

No Brasil ocorrem cinco gêneros neotropicais (com exceção de *Peumus*) e cerca de 40 espécies, presentes em todas as regiões brasileiras, (FIGURA 2) com

predomínio no bioma Mata Atlântica, um dos centros de diversidade da família (PEIXOTO; LIRIO, 2016).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA MONIMIACEAE NO BRASIL



FONTE: REFLORA (2018).

A família é caracterizada pela presença de metabólitos secundários como alcaloides (benzilisoquinolínicos), flavonoides, terpenoides, derivados no ácido cinâmico e óleos essenciais (SANTOS; PEIXOTO, 2001; LEITÃO et al., 1999). O QUADRO 1 apresenta a caracterização fitoquímica e atividades biológicas de gêneros pertencentes à família Monimiaceae.

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICAS DA FAMÍLIA MONIMIACEAE

GÊNEROS	METABÓLITOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS
<i>Peumus</i> Molina	- Alcaloides (boldina, isoboldina, isocoridina, laurotetamina, reticulina, laurolitisina, norisocoridina); - Taninos; - Óleo essencial; - Flavonoides (peumoside, kaempferol, boldoside); - Glicolipídios	- Atividade anti-inflamatória (RUIZ et al., 2008) - Tratamento de transtornos hepáticos (RUIZ et al., 2008) - Atividade antibacteriana (MAZUTTI et al., 2008; VALLE et al., 2005; VILA et al., 1999) - Atividade antifúngica (SANTOS, 2014; LIMA et al., 2006)
continua		

GÊNEROS	- METABÓLITOS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS
	- (RUIZ et al., 2008; BASILA; YUAN, 2005; SANTOS; PEIXOTO, 2001; VILA et al., 1999)	- Atividade anti-helmíntica (VOGEL et al., 1999) - Atividade antioxidante (FERNANDEZ et al., 2009; QUEZADA et al., 2004 YOUN et al., 2002)
<i>Hennecartia</i> J. Poiss.	- Óleo essencial (MARQUES et al., 2009)	- Atividade tóxica (frutos) (SCHENKEL et al., 2010; MARQUES et al., 2009)
<i>Hortonia</i> Wight & Arn.	- Lactonas (CARR et al., 2012)	- Atividade larvívora em <i>Aedes aegypti</i> (CARR et al., 2012)
<i>Tambourissa</i> Sonn.	- Óleo essencial (GALLORI et al., 2001) - Lactona (tambouranolide) (YODER et al., 2007) - Flavonoides (nicotiflorina, rutina, isoquercitrina) (LHUILLIER, 2007)	- Atividade antifúngica (GALLORI et al., 2001) - Atividade citotóxica (YODER et al., 2007)

Fonte: A autora (2019)

3.2 GÊNERO *Mollinedia* Ruiz & Pav.

O gênero *Mollinedia* compreende cerca de 70 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (MOREIRA; LEITÃO, 2001). Presente em todas as regiões brasileiras é o maior gênero da família Monimiaceae, tanto em complexidade quanto em número de espécies (PHILIPSON, 1988). Morfologicamente semelhante aos gêneros *Macropeplus* e *Macrotorus*, levando muitas vezes a identificação errada das espécies, geralmente classificadas como *Mollinedia* (COSTA et al., 2010).

Espécies do gênero são utilizadas na medicina popular, entre elas: *M. racemosa* (*M. lanciolata*) como analgésica, para tratamento de gripes e transtornos estomacais e as espécies *M. costaricensis*, *M. schottiana*, *M. brasiliensis*, empregadas por suas ações estomáquicas e antiespasmódicas (DUQUE et al., 2011; SANTOS; PEIXOTO, 2001; LEITÃO et al., 1999; LOPEZ et al., 1988). Em estudos realizados em *M. costaricensis*, isolou-se o alcaloide mollinedina, que apresentou possível efeito antiarrítmico, em testes farmacológicos preliminares em ratos e porquinhos da índia (LOPEZ et al., 1988). A fração acetato de etila das folhas

de *M. racemosa* (*M. lanciolata*) mostrou um possível efeito sobre marcadores enzimáticos da resposta anti-inflamatória *in vitro* (SANCHEZ-PERALTA et al., 2014).

Os alcaloides benzilisoquinolínicos, fenilamidas, óleo essencial e esteroides são os metabólitos secundários mais encontrados neste gênero, como demonstrado no QUADRO 2 (LOPEZ et al., 1988; CLAROS et al., 2000; MOREIRA; LEITÃO 2001; MARQUES et al., 2009; MURILLO et al., 2011).

QUADRO 2 – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO GÊNERO *Mollinedia*

ESPÉCIES	PARTES UTILIZADAS	METABÓLITOS IDENTIFICADOS	REFERÊNCIA
<i>M. schottiana</i>	Caule	- liriodenina (alcaloide benzilisoquinolínico) - moupinamida (fenilamida)	MOREIRA E LEITÃO, 2001
	Folha	- óleo essencial	MARQUES et al., 2009
<i>M. gilgiana</i>	Caule	- liriodenina (alcaloide benzilisoquinolínico) - moupinamida (fenilamida)	MOREIRA E LEITÃO, 2001
	Folha	- óleo essencial - estigmasterol, sitosterol e fitol (esteroides)	MARQUES et al., 2009 CLAROS et al., 2000
<i>M. glaziovii</i>	Caule	- liriodenina (alcaloide benzilisoquinolínico) - moupinamida (fenilamida)	MOREIRA E LEITÃO, 2001
	Folha	- óleo essencial	MARQUES et al., 2009
<i>M. marliae</i>	Caule	- liriodenina (alcaloide benzilisoquinolínico) - moupinamida (fenilamida)	MOREIRA E LEITÃO, 2001
	Folha	- marliolida (α -lactona) - estigmasterol, sitosterol e fitol (esteroides)	CLAROS et al., 2000
<i>M. salicifolia</i>	Caule	- liriodenina (alcaloide benzilisoquinolínico) - moupinamida (fenilamida)	MOREIRA E LEITÃO, 2001
	Folha	- óleo essencial	MARQUES et al., 2009
<i>M. costaricensis</i>	Raiz	- mollinedina (alcaloide benzilisoquinolínico) - vitexina (flavonoide)	LOPEZ et al., 1988
<i>M. racemosa</i>	Folhas	- óleo essencial	MURILLO et al., 2011

FONTE: A autora (2019).

3.3 ESPÉCIE *Mollinedia clavigera* Tul.

A espécie *Mollinedia clavigera* Tulasne conhecida popularmente como Pimenteira, Capixim-pimenteira ou Capixim, é caracterizada como arbusto que pode atingir até 4 metros de altura. Floresce no mês de outubro e frutifica durante o verão.

Trata-se de uma espécie nativa e endêmica da Mata Atlântica do Sul e Sudeste do Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina), encontrada em regiões elevadas e com temperaturas mais baixas, como mostra a FIGURA 3 (LIRIO et al., 2018).

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *M. clavigera* Tul.



FONTE: REFLORA (2018).

A taxonomia da espécie *Mollinedia clavigera* (APGIII, 2009) está descrita no QUADRO 3.

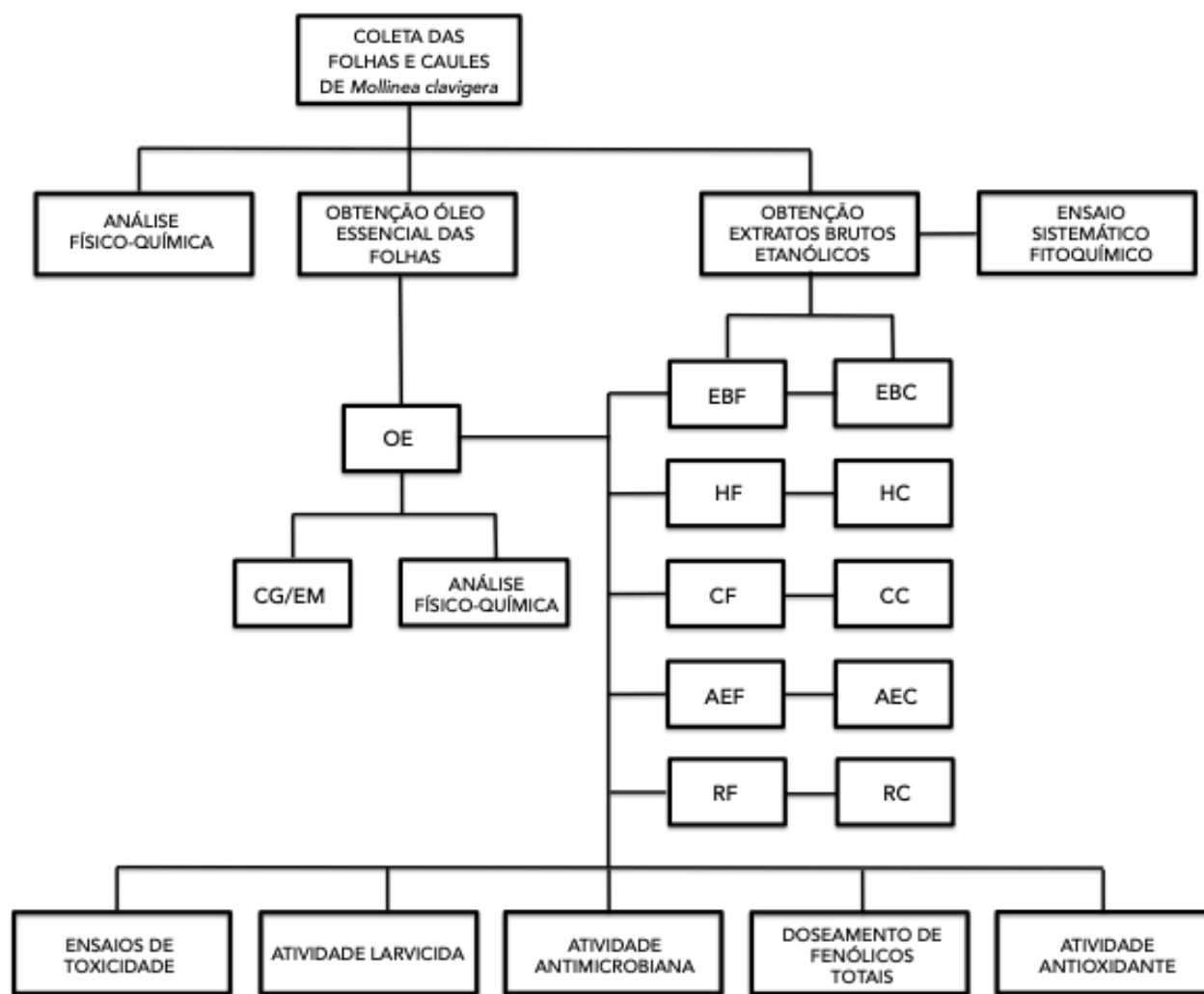
QUADRO 3 – TAXONOMIA DA ESPÉCIE *Mollinedia clavigera* Tul.

HIERARQUIA	TAXONOMIA
CLASSE	Equisetopsida
SUBCLASSE	Magnoliidae
SUPERORDEM	Magnolianaes
ORDEM	Laurales
FAMÍLIA	Monimiaceae
GÊNERO	<i>Mollinedia</i>
ESPÉCIE	<i>Mollinedia clavigera</i> Tul.

FONTE: TRÓPICOS (2018)

A espécie em questão foi objeto de estudo da dissertação intitulada “Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvica, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae)” (HOMEM, 2015). As atividades realizadas são apresentadas no fluxograma FIGURA 4.

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM HOMEM (2015)



Legenda:

EBF – extrato bruto folhas
 EBC – extrato bruto caules
 HF – hexano folhas
 HC – hexano caules
 CF – clorofórmio folhas
 CC – clorofórmio caules
 AEF – acetato de etila folhas
 AEC – acetato de etila caules
 RF – remanescente folha
 RC – remanescente caule
 OE – óleo essencial
 CG/EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

FONTE: A autora (2019).

Detalhando o fluxograma (FIGURA 4) das atividades desenvolvidas por Homem (2015), os resultados obtidos encontram-se brevemente descritos a seguir:

- A pesquisa fitoquímica preliminar da espécie evidenciou presença de grupos de metabólitos como: alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos e saponinas.

- Na análise cromatográfica (CG/EM) do óleo essencial extraído das folhas de *M. clavigera* identificou-se a presença majoritária dos sesquiterpenos β -lemeneno (14,38%), β -selineno (12,52%), α -selineno (9,79%), cariofileno (8,31%) e copaeno (6,48%). Realizou-se também a caracterização do óleo essencial pela definição de parâmetros como características organolépticas, densidade, solubilidade em etanol e índice de refração.

- O ensaio de toxicidade em *Artemia salina* mostrou níveis de toxicidade no extrato bruto etanólico das folhas e nas frações hexano, clorofórmio e no extrato bruto etanólico dos caules, mas destacaram-se os resultados obtidos na fração hexano (24,33 $\mu\text{g/mL}$) das folhas e no óleo essencial (24,33 $\mu\text{g/mL}$). Na avaliação da atividade hemolítica evidenciaram-se níveis expressivos de hemólise, principalmente na fração hexano dos caules nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (77,2%) e 250 $\mu\text{g/mL}$ (75,06%).

- A avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* inferiu que as frações hexano das folhas (24,33 $\mu\text{g/mL}$) e dos caules (31,71 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram resultados relevantes. Este ensaio apesar de avaliar a atividade larvicida também nos apresenta indícios que corroboram com os ensaios de toxicidade por avaliarem doses letais sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Observa-se que assim como os demais ensaios as frações hexano das folhas e caules apresentaram maior toxicidade.

- A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicou que a fração hexano das folhas apresentou boa atividade inibitória (15,625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em relação à bactéria gram positiva *Streptococcus epidermidis*, através do emprego da metodologia de microdiluição em caldo.

- A atividade antioxidante, em duas metodologias empregadas, mostrou resultados significativos. Pelo método da redução do fosfomolibdênio o óleo essencial apresentou atividade de 86,47% em relação ao padrão vitamina C. Já no método de sequestro de radicais livres (DPPH) as amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante foram a fração acetato de etila dos caules (34,16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o

extrato bruto etanólico dos caules (33,59 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A ação antioxidante destas duas amostras pode ser explicada por as mesmas terem apresentado maior quantidade de polifenóis no doseamento de fenólicos totais através do uso do reagente de Folin Ciocalteu.

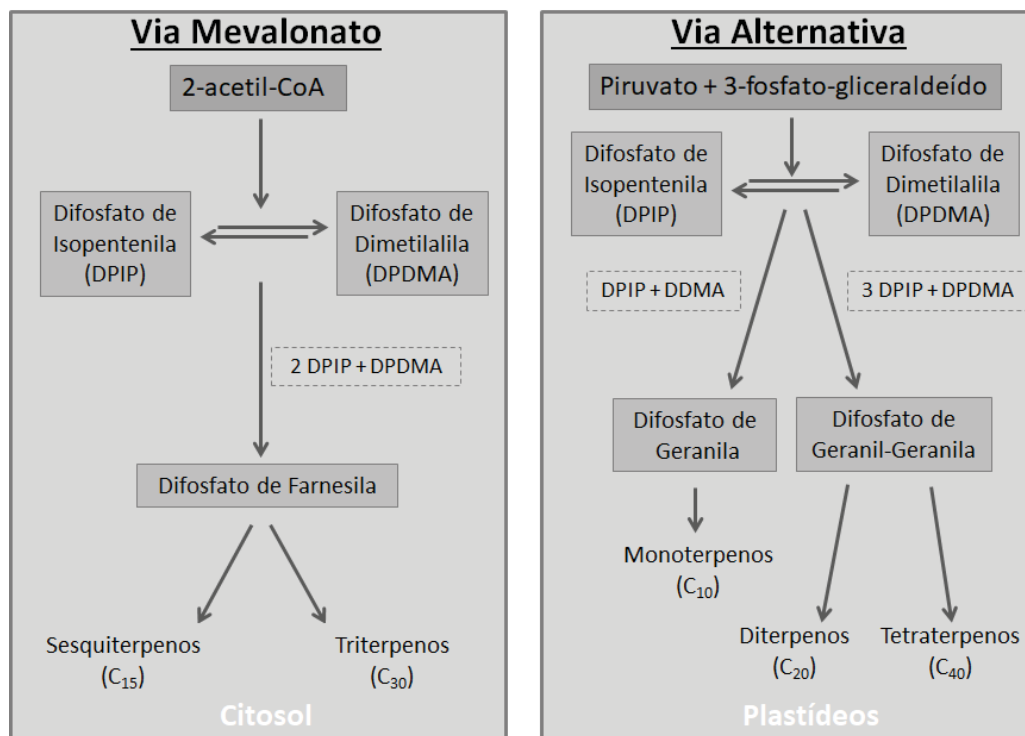
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Metabólitos vegetais secundários, óleos essenciais, são produzidos pelas plantas com função de nutrição, atração ou repelência de insetos e ação alelopática. Sua produção está integrada à fisiologia da espécie vegetal e sua composição e quantidade estão relacionadas à enzimas específicas e ao estágio de desenvolvimento do vegetal (SOUZA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008). Sofrem também variações na expressão da síntese de seu conteúdo através da interação com as condições ambientais como salinidade do solo, umidade e temperatura e local de coleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os constituintes dos óleos essenciais derivam de duas classes químicas distintas na sua origem biossintética: a aromática (constituída pelos fenilpropanoides) e a terpênica. Os fenilpropanoides são oriundos da via do ácido chiquímico, derivados de aminoácidos aromáticos. Os compostos terpenoides são sintetizados na condensação do difosfato de isopentenila (DPIP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DPDMA). A síntese do DPIP ocorre por duas vias biossintéticas (FIGURA 5): via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}), cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{30}) (OWEN; PEÑUELAS, 2005; AHARONI et al., 2006).

Apresentam larga aplicação em perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. As propriedades farmacológicas comumente atribuídas aos óleos essenciais são: antimicrobiana, germicida, cicatrizante, vermífuga, analgésica, expectorante, carminativa e antisséptica (BANDONI; CZEPAK, 2008; BIZZO et al., 2009).

FIGURA 5 – BIODÍNTENSE DE COMPOSTOS TERPÊNICOS: VIA DO MEVALONATO E VIA ALTERNATIVA (MEP)



FONTE: A autora (2019) adaptado de AHARONI et al.(2004).

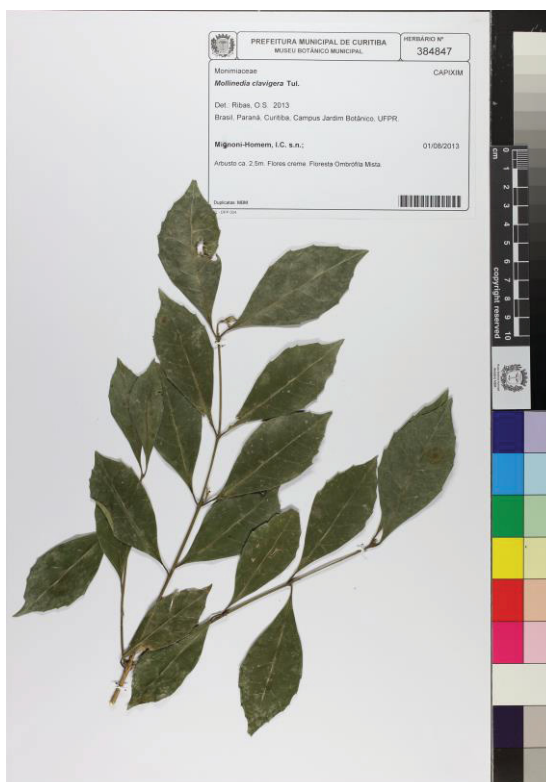
Com exceção das coníferas, os óleos essenciais não são comumente encontrados nas gimnospermas. Nas Angiospermas, ocorrem em menor frequência em monocotiledôneas, como *Cymbopogon winterianus*, popularmente conhecida como citronela e *Zingiber officinale*, o gengibre. A produção de óleos essenciais é mais abundante em angiospermas dicotiledôneas, destacando-se as famílias Asteraceae, Laminaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Myristicaceae e Apiaceae (OOTANI et al., 2013; SIMÕES; SPITZER, 2010; ALONSO, 1998; LAVABRE, 1997). São produzidos em todas as partes vegetais, nas flores (rosas), folhas (eucalipto), cascas (canela), rizomas (gengibre) e frutos (laranja) (BIZZO et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Mollinedia clavigera* Tul. (folhas e caules) foi coletado no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, na cidade de Curitiba, Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°26'52"S 49°14'21"W. A identificação botânica foi realizada no Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba por comparação com as exsicatas já existentes, onde foi depositada a exsicata sob o registro MBM 384847 (FIGURA 6). A autorização para acesso ao patrimônio genético foi concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” (Processo nº 020001.001165 / 2013-47), em anexo.

FIGURA 6 – EXSICATA DE *M. clavigera* DEPOSITADA NO MBM DE CURITIBA SOB O REGISTRO MBM 384847



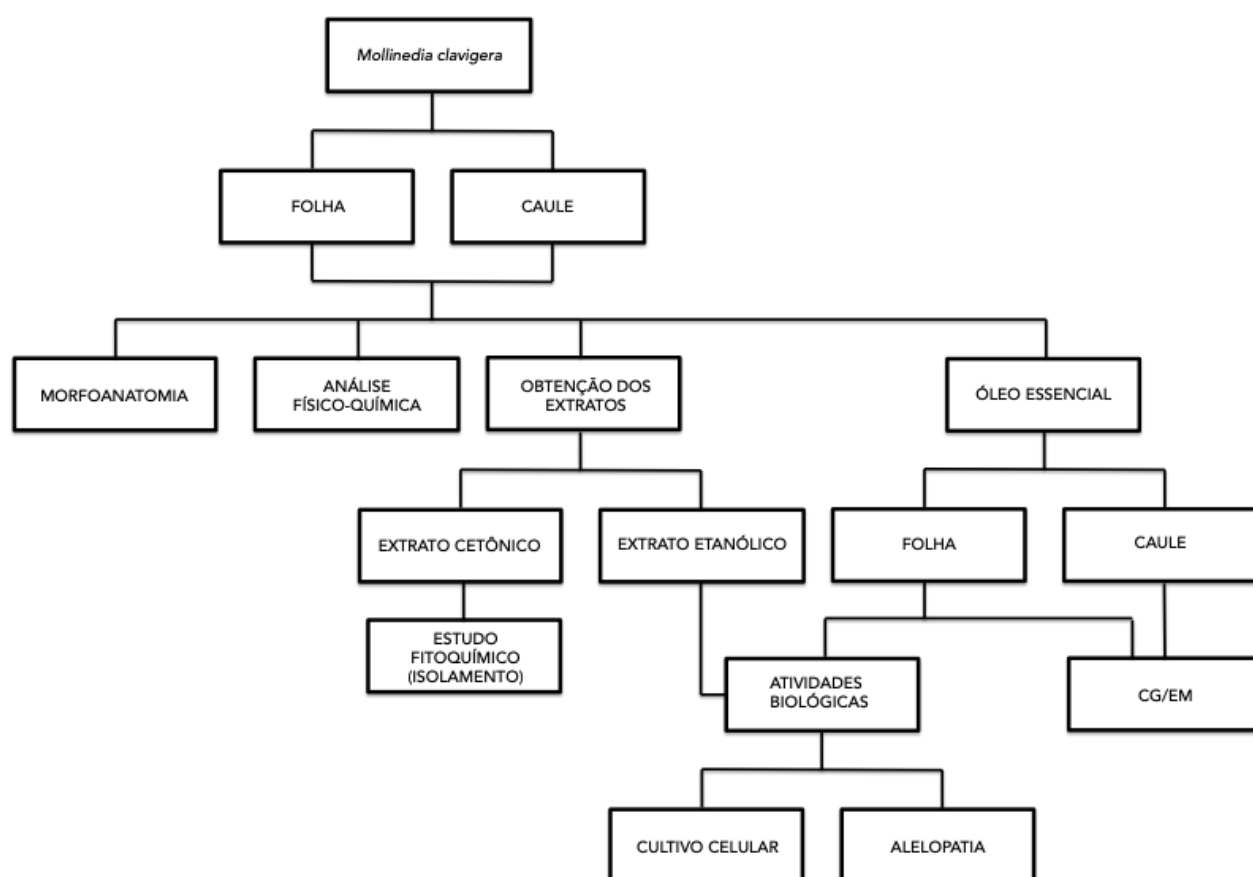
FONTE: MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA (2015)

Após separação das folhas e caules o material vegetal foi seco e estabilizado em estufa (35°C) com circulação de ar durante 24 horas (Farmacopeia

brasileira, 6ª edição, 2019). Os materiais foram então triturados em moinho de facas e martelos (marca TRAPP) para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração. Para a extração do óleo essencial foram coletados folhas e caules, posteriormente secos à sombra em temperatura ambiente. Os materiais vegetais resultantes foram triturados, pesados e armazenados em local fresco, baixa umidade e ao abrigo da luz.

A Figura 7 expõe os procedimentos práticos desenvolvidos nesta tese.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PRESENTE TRABALHO



Legenda:

CG/EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

FONTE: A autora (2018)

4.2 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS

4.2.1 Perda por dessecação

Para a realização do ensaio pesou-se 1 g de material vegetal de folha e caule em cadinhos de porcelana, previamente dessecados e tarados, e colocou-se em estufa a 100°C, até obtenção de peso constante. Retiraram-se os cadinhos com as amostras da estufa e colocou-se em dessecador para resfriamento (Farmacopeia Brasileira, 2019). Após este processo pesou-se a amostra e aplicou-se a fórmula a seguir. O resultado foi dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco. A análise foi realizada em triplicata.

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:

P_a = Peso da amostra

P_u = Peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação

P_s = Peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação

4.2.2 Cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais utilizou-se o mesmo material avaliado na determinação da perda por dessecação. Para a realização do ensaio adotou-se o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira (2019).

Os cadinhos recém-pesados na etapa final da determinação de perda por dessecação foram inseridos em mufla, com aumento de temperatura gradativo até (600±25)°C, para que todo o material fosse incinerado (aproximadamente 2 horas). Os cadinhos foram colocados em dessecador para então proceder-se à pesagem.

4.3 ANÁLISE TÉRMICA

O estudo termoanalítico de folhas e de caules de *M. clavigera* foi realizado por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizando o programa Origin 9.0.

As curvas de TG foram obtidas a partir de 10 mg de amostras de folhas e caules secos, aquecidas até taxa constante de 10°C/min, no intervalo de temperatura entre 20 e 600°C, sob fluxo de argônio (20 mL/min), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento LABSYS evo TGA/STA-EGA (SETARAN) foi calibrado utilizando Índio como padrão.

4.4 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As pesquisas referentes aos caracteres morfoanatômicos foram realizadas com o material vegetal de folhas e caules de *M. clavigera* Tul. fixados em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético, álcool etílico) (JOHANSEN, 1940) e estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

4.4.1 Preparo das lâminas semipermanentes

Para a produção das lâminas semipermanentes foram realizados secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Posteriormente corados com azul de astra e fucsina básica (O'BRIEN, et al., 1964). Para a montagem das lâminas utilizou-se glicerina a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e a lutagem feita com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976).

4.4.2 Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram realizadas secções transversais à mão livre do material fixado e utilizados os seguintes reativos descritos no QUADRO 4:

QUADRO 4 – REATIVOS UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DOS TESTES HISTOQUÍMICOS

PESQUISA	REAGENTES	REFERÊNCIA
Compostos fenólicos gerais	Cloreto férrico	JOHANSEN, 1940
Amido	Lugol	BERLYN; MIKSCHE, 1976
Lignina	Floroglucina clorídrica	FOSTER, 1949
Lipídios totais	Sudam III	SASS, 1951
Cristais	Ácido sulfúrico	OLIVEIRA; AKISSUE, 1997.

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície foi realizada com microscopia eletrônica de varredura com campo de emissão (FEG) (Mira3-Tescan) e microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Vega3-Tescan). Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico, com posterior metalização (Quorum Sputter Coater SC 7620) da amostra.

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS E CAULES

Folhas e caules, separadamente, foram submetidos à extração com etanol (96°GL) em refluxo contínuo por seis horas, em aparelho de Soxhlet. Terminada a extração, o material foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, concentrado em evaporador rotatório e levado a banho-maria a 70°C até secura. Obteve-se assim o extrato bruto etanólico das folhas (EBEF) e o extrato bruto etanólico dos caules (EBEC) de *M. clavigera*, destinados para realização de ensaios biológicos.

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO E FRAÇÕES ORGÂNICAS DAS FOLHAS E CAULES

4.6.1 Extrato bruto cetônico (EBC)

Folhas e caules, separadamente, foram submetidos à extração pelo processo de maceração em acetona por sete dias. O material foi então filtrado em funil de Büchner, concentrado em evaporador rotatório e levado a banho-maria a 70°C até secura. Obteve-se assim o extrato bruto cetônico das folhas (EBCF) e o extrato bruto cetônico dos caules (EBCC), destinados para posterior fracionamento em solventes de polaridade crescente, para a realização do estudo fitoquímico.

4.6.2 Frações orgânicas

4.6.2.1 Folhas

O extrato bruto cetônico das folhas foi submetido à particionamento sólido-líquido, onde 30 g de extrato foram incorporados a 90 g de sílica gel 60 (1:3),

formando uma pastilha. Esta foi submetida à filtração a vácuo com funil de Büchner através de uma camada de celite, utilizando solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF). As frações foram concentradas em evaporador rotatório e então nomeadas fração éter de petróleo (IM18A), acetato de etila (IM18B) e THF (IM18C).

4.6.2.2 Caules

O extrato bruto cetônico dos caules foi filtrado por cromatografia a vácuo através de fase estacionária octadecilsílica (RPC18) com metanol e posterior lavagem com acetona para remoção de substâncias lipofílicas, como clorofila, ceras e triglicerídeos. A fração metanólica foi então nomeada como IM46A.

4.7 ESTUDO FITOQUÍMICO

Realizou-se o processo de purificação, isolamento e identificação dos compostos presentes na espécie no laboratório de fitoquímica da Università del Piemonte Orientale, na cidade de Novara, Itália. Através do Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior (PDSE) fomentado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4.7.1 Purificação e isolamento das frações

Todas as amostras foram submetidas à cromatografia em coluna (CC) através de colunas de sílica gel 60 ou alumínio, utilizando como eluente diferentes proporções dos solventes éter de petróleo e acetato de etila. As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (Macherey-Nagel Alugram® Sil G/UV254 (0,20 mm)), controlada por lâmpada de ultravioleta (UV) e subsequente banho em solução de H₂SO₄ a 5% em MeOH e carbonização. Na sequência todas as frações originadas foram submetidas à Ressonância Magnética Nuclear (AMX Bruker 300) para auxiliar na elucidação estrutural.

A purificação das frações foi realizada através de Cromatografia em coluna; Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna semi-preparativa em equipamento Jasco (interface: LC netII/ADC, detector UV 2075 Plus e injetores

PU2080 Plus) e cromatografia flash em equipamento Reveleris X2, utilizando coluna de fase reversa C8.

4.7.2 Identificação de compostos isolados

Realizou-se a identificação dos compostos purificados e isolados através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em equipamento AMX Bruker 300 operando na frequência de 300 MHz e 50 MHz para os núcleos de H^1 e C^{13} , respectivamente. As amostras foram solubilizadas com clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna.

4.8 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES

4.8.1 Obtenção do óleo essencial das folhas e caules

O óleo essencial das folhas e caules de *M. clavigera* foi obtido, separadamente, através do método de hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparato de Clevenger (Farmacopeia Brasileira, 2019). Os materiais secos a temperatura ambiente foram triturados e acondicionados em balão de fundo redondo de 6000 mL. Adicionou-se 3000 mL de água destilada para cobrir o material e permitir o andamento da extração, sendo este então conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, com tempo de extração de 6 horas. As folhas foram coletadas mensalmente durante os meses de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016 e os caules coletados no mês de junho de 2015.

4.8.2 Caracterização físico-química do óleo essencial das folhas

4.8.2.1 Determinação da densidade

O ensaio de determinação da densidade foi realizado a partir da média aritmética das massas de alíquotas de 20 μ L (volume constante) de óleo essencial de *M. clavigera*, em 10 repetições, à temperatura de 25°C. A razão entre a massa do óleo (aferida em balança analítica) e o volume constante, foi determinada aplicando a seguinte equação:

$$d = \frac{m}{v}$$

Onde:

d = densidade;

m = massa do óleo essencial;

v = volume do óleo essencial

4.8.2.2 Determinação do índice de refração $^{20}_D n_D$

O índice de refração foi determinado em função da luz de sódio, em comprimento de onda 589,3 nm (raia D) e temperatura de $20 \pm 0,5$ °C, em refratômetro AusJena, segundo descrito na Farmacopeia Brasileira (2019).

4.8.3 Análise da composição química do óleo essencial das folhas e caules de *M. clavigera* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM)

Alíquotas do óleo essencial das folhas e caules foram armazenadas em frasco apropriado, devidamente refrigerados e reservados para análise em CG/EM. A análise cromatográfica foi executada em aparelho Shimadzu® modelo GCMS-QP 2010S e programa operacional GCMS solution, na Universidade do Vale do Itajaí UNIVALI, onde 20 µL de cada amostra foi adicionada em um vial e solubilizada em 1 mL de diclorometano, individualmente. Utilizou-se sistema de injeção automatizado Shimadzu modelo OAC 20i, o qual, coleta 1 µL da solução, e então, injeta em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu modelo QP2010S. A separação foi feita usando uma coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm, 0,10 µm) de fase estacionária 100% de dimetilpolisiloxano. O fluxo de gás hélio manteve-se constante em 0,75 mL/min e a temperatura do injetor em 280°C no modo splitless com divisão (Split) de 1:50. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 100°C por 2 minutos e velocidade de aquecimento de 10°C/min até 200°C, depois a velocidade de 25°C/min até 300°C permanecendo por 4 minutos. O detector de massas foi usado no modo SCAN com a razão massa/carga de 30 a 450 Da e no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV.

4.8.4 Análise estatística

Os resultados obtidos na composição sazonal do óleo essencial foram analisados através de procedimentos matemáticos: Análise de Componentes Principais (PCA) e Coeficiente de Correlação de Pearson, no software Statistica V.

4.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.9.1 Avaliação da atividade alelopática

A avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas, foi realizada em sementes de *Lactuca sativa* (alface) e sementes de *Allium cepa* (cebola). Empregando exemplares de dicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente, pode-se avaliar a influência das amostras em diferentes classes vegetais. Os extratos brutos etanólicos foram diluídos em solução aquosa de dimetilsufóxido 1% (DMSO) e o óleo essencial em solução com polissorbato 80 a 0,5% (Tween®).

As caixas de germinação (Gerbox) contendo dois papéis filtro receberam 5 mL da solução das amostras preparadas nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em quadruplicata. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente em cada caixa as sementes de alface (20) ou cebola (20). Como controle, as sementes receberam água destilada, solução de DMSO e solução de polissorbato 80. As caixas contendo as sementes foram levadas à câmara de germinação, com umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante ($\pm 25^\circ\text{C}$), conforme Brasil (2009).

4.9.1.1 Teste de Germinação

Para o bioensaio de germinação utilizou-se metodologia descrita por Macias et al., (2000). Realizou-se contagem diária do número de sementes germinadas, tendo como critério o crescimento da protrusão radicular. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos. A partir dos resultados obtidos neste ensaio, pode-se estimar, para as quadruplicatas, os seguintes índices, de acordo com as fórmulas:

- Índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962):

$$IVG = \frac{\sum ni}{\sum ti}$$

Onde:

ni= número de sementes germinadas em tempo i

ti= tempo em dias após tempo de ensaio

- Porcentagem de Germinação (%G) (BRASIL, 2009):

$$\%G = \left(\frac{ni}{N} \right) \cdot 100$$

Onde:

ni = número de sementes germinadas no tempo i

N = número total de sementes que foram empregadas para germinar

- Tempo Médio de Germinação (TMG) (LABOURIAU, 1983):

$$TMG = \frac{\sum (ni * ti)}{\sum ni}$$

Onde:

ni = número de sementes germinadas no tempo i

ti = tempo em dias após o início do ensaio

- Velocidade Média de Germinação (VMG) (LABOURIAU, 1983):

$$VMG = \frac{1}{TMG}$$

Onde:

TMG = Tempo Médio de Germinação (dias)

Os valores de porcentagem e de índice de velocidade de germinação foram comparados pelo teste de variância ANOVA e as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. O teste de Tukey apontou por meio de grupamentos as amostras estatisticamente semelhantes ou diferentes. Realizaram-se as análises estatísticas no software Minitab 18 e Microsoft Office 365 – Excel.

4.9.1.2 Teste de Crescimento

Para o bioensaio de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes et al., (1987) e Macias et al., (2000). Após sete dias de incubação para as sementes de alface e quinze dias para as sementes de cebola, mediu-se o

alongamento da raiz e do hipocótilo utilizando papel milimetrado, sendo submetido ao teste de normalidade de Ryan-Joiner, para que o emprego adequado do teste de ANOVA. Em seguida, as amostras de cada concentração ou controle foram submetidas ao teste para a verificação de *outliers* (valores discrepantes). Após o ajuste nos grupos, os resultados foram comparados pela análise de variância ANOVA e as médias verificadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Realizaram-se as análises estatísticas no software Minitab 18 e Microsoft Office 365 – Excel. O nível de atividade de crescimento foi expresso em porcentagem de inibição/estímulo de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade de Crescimento} = \frac{(\text{MT} - \text{MC}) \cdot 100\%}{\text{MC}}$$

Onde:

MT = média de alongamento dos tratamentos

MC = média de alongamento do controle

4.9.2 Avaliação da atividade citotóxica

4.9.2.1 Linhagem Celular

Para a avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas e extratos brutos etanólicos das folhas de *M. clavigera* foram utilizadas as linhagens comerciais de células de fibroblastos de camundongo NIH 3T3. Estabelecidas a partir de um embrião de camundongo NIH Swiss. As células foram gentilmente cedidas pelo departamento de análises clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.9.2.2 Cultivo Celular

As células NIH 3T3 foram mantidas em frascos de cultivo contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ambas suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, EUA) e 10 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA). Os frascos foram mantidos em incubadora à 37°C com 5% de CO₂, até atingir confluência. O meio foi trocado a cada 4 dias, quando as células foram submetidas à tripsinização. Foram incubadas com 1,5 mL de tripsina 0,25% durante 5 min a 37°C. Após o desprendimento dos tapetes celulares, as células foram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10%

de SFB e a suspensão celular obtida foi dividida em várias garrafas para subcultivo (GEORGE et al., 2010).

4.9.2.3 Ensaio da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico do sal brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) - 2,5 - difeniltetrazólico (MTT), de acordo com Mosmann, (1983). As células (3T3) foram semeadas em placa de 96 poços (0,14 x 10⁵ células/poço, quantidade de células no dia da leitura) com 200 µL de DMEM completo. Após 24 horas, o meio foi removido e os poços lavados duas vezes com PBS estéril. Em seguida adicionou-se 200 µL de meio contendo diferentes concentrações (10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL) das amostras testadas. Após 24 horas de exposição adicionou-se 200 µL da solução de MTT em cada poço e incubado por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. A seguir retirou-se o MTT e foram adicionados 200 µL de álcool P.A., homogeneizando lentamente até a completa dissolução. Realizou-se então a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 570 nm.

4.9.2.4 Ensaio de Proliferação Celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado através do emprego do corante cristal violeta, conforme Gillies et al. (1986). As células NIH 3T3 foram cultivadas em placa de 96 poços (105 células/poço). Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do extrato bruto etanólico das folhas de *M. clavigera* (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL), como controle utilizou-se células somente com meio de cultivo 10% de SFB (soro fetal bovino). Após o tempo de tratamento de 48 horas, o meio de cultivo foi retirado e os poços foram lavados com 200 µL de PBS à 37°C. Em seguida foram adicionados 50 µL de paraformaldeído 2% em cada poço e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos para a fixação das células. Após a remoção do fixador foi adicionado 100 µL da solução do corante cristal violeta e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Passado o tempo o corante foi removido e cada poço foi lavado com 120 µL de água destilada. Foram então adicionados 100 µL de ácido acético 33% e homogeneizado lentamente até a completa dissolução e feita a leitura da

absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 570 nm.

4.9.2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias $\pm$ erro padrão da média. Para avaliar o resultado entre os grupos foram realizados os testes t de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova on Rank's para dados não pareados. Os resultados foram considerados significativos para um valor de $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas com o uso dos pacotes estatísticos JMP Windows versão 8.0 e SigmaStat Windows version 3.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS

No ensaio de determinação da perda por dessecação é possível verificar se a secagem do material vegetal foi eficaz. A presença de umidade propicia a ação de enzimas que causam degradação de constituintes químicos, além de favorecer a contaminação microbiana do material (FARIAS, 2010). Na tabela 1 verifica-se que as amostras (folhas e caules) expressaram um teor de umidade inferior à faixa entre 8 e 14%, sendo este o limite máximo recomendado para drogas vegetais em diferentes farmacopeias (FARIAS, 2010).

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis presentes na amostra. Parâmetro este empregado no controle de qualidade de matéria-prima vegetal na produção de fitoterápicos, tendo como finalidade detectar possíveis adulterações do material. A determinação do teor de cinzas totais (TABELA 1) mostrou-se maior para as folhas do que para os caules, podendo-se afirmar que as folhas possuem maior quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis (ARAÚJO et al., 2006).

TABELA 1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS

PARTE VEGETAL	PERDA POR DESSECAÇÃO	CINZAS TOTAIS %
FOLHAS	7,5019 ± 0,1187	7,4019 ± 0,3270
CAULES	5,5832 ± 0,3875	2,2569 ± 0,1949

TOTAIS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

FONTE: A autora (2019).

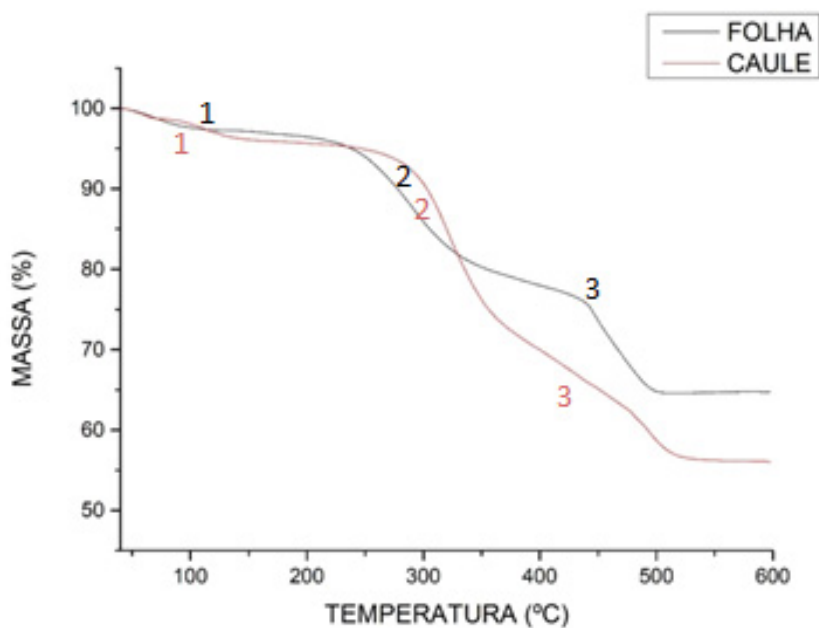
Ensaio físico-químico contribuem para o estabelecimento de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

5.2 ANÁLISE TÉRMICA

Na análise do perfil de degradação térmica das folhas e caules de *M. clavigera* observa-se que os processos de decomposição são diferentes, com uma degradação do caule mais acentuada, o que indica composições químicas diferentes (FIGURA 8). Houve grande diferença em relação aos polímeros e materiais lignificados que vão precisar de uma temperatura mais alta para decompor, este

resultado pode ser comprovado pelo que foi observado no estudo morfoanatômico da espécie.

FIGURA 8 – PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DE FOLHAS E CAULES SECOS DE *M. clavigera*



Fonte: A autora (2019).

Análises termogravimétricas de uma matriz vegetal são complexas, pois o comportamento cinético é comandado pelas substâncias majoritárias. Segundo Aragão et al. (2002), a grande quantidade de graxas e variedade de metabólitos secundários, resinas, ligninas e fibras (hemicelulose e celulose) que os vegetais contêm interferem diretamente no seu comportamento cinético. A perda percentual de massa de matéria orgânica através da análise térmica e as temperaturas iniciais (T_I) e finais (T_F) de cada etapa estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DE ANÁLISE DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

ATMOSFERA DE ARGÔNIO					
ETAPAS	(°C)	FOLHA	%	CAULE	%
1	T _I	20	3,75	20	4,05
	T _F	138		154	
2	T _I	138	17,93	154	22,69
	T _F	391		367	
3	T _I	391	13,56	367	17,02
	T _F	600		600	
4	T _I	---	64,76	---	56,24
	T _F				

Fonte: A autora (2019)

A perda de água (etapa1) ocorreu entre as temperaturas de 20°C e 138 °C para as folhas e entre 20°C e 154 °C para os caules. Notou-se uma perda de massa 3,75% para as folhas e 4,05% para os caules, em atmosfera de argônio, resultados um pouco abaixo do obtido pelo método gravimétrico convencional para determinação da umidade (7,5% e 5,5% respectivamente para folhas e caules). Observou-se que os teores de umidade encontrados para todas as amostras (obtidos por ambos os métodos), estão de acordo com os valores estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2019), para a maioria das drogas vegetais, sendo inferiores ao limite máximo de 14%.

No processo referente à etapa 2, observa-se uma maior perda de massa, devido à oxidação e decomposição da matéria orgânica (taninos e flavonoides), degradação térmica dos triglicerídeos (principalmente ácidos graxos poli-insaturados) (BENÍCIO et al., 2009), assim como carboidratos e demais compostos orgânicos (ARAÚJO et al., 2006). Pereira et al. (2013) relatam que a perda de massa que ocorre de 250 a 300°C pode também ser atribuída à degradação das hemiceluloses.

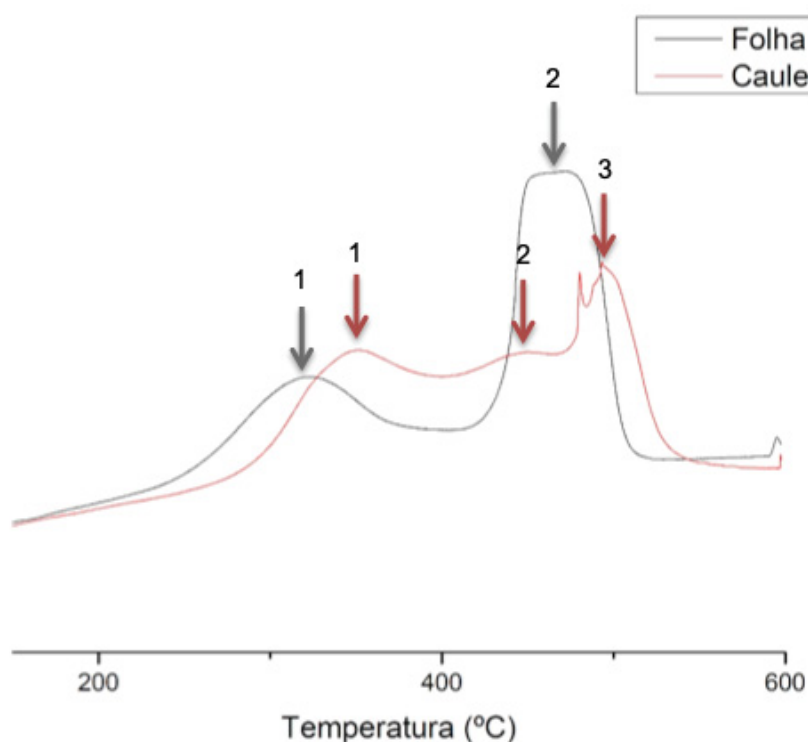
A perda de massa referente à celulose é posterior à degradação térmica das hemiceluloses, devido à maior quantidade de energia necessária para a despolimerização da cadeia de celulose e a quebra de seus monômeros. A lignina, componente identificado em *M. clavigera* através de testes histoquímicos, sofre degradação em um amplo intervalo de temperatura, é intensificada em temperaturas acima de 400 °C (etapa 3).

Na etapa 4 deveria acontecer a carbonização da matéria orgânica, o que não ocorre, devido ausência de oxigênio, logo esse é o chamado resíduo carbonífero.

Na análise do perfil de degradação térmica constatou-se que as folhas apresentaram boa estabilidade térmica até 138 °C, enquanto os caules permaneceram estáveis até 154 °C, o que garante confiabilidade térmica nos processos de extração a quente, como em aparelhos de Soxhlet.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) apresenta a característica das reações que ocorrem no decorrer da análise (FIGURA 9). Picos indicam reações exotérmicas e vales, reações endotérmicas, lembrando que não houve combustão uma vez que a atmosfera é inerte (argônio).

FIGURA 9 – CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*



Fonte: A autora (2019).

Nos caules observaram-se três picos indicando reações exotérmicas. O pico 1, entre 277 e 386 °C (mais intensa que nas folhas), que coincide com a segunda etapa de decomposição, outra etapa exotérmica muito branda (pico 2), entre 400 e

467 °C e outra, mais acentuada até 514 °C (pico 3), correspondendo a processos ocorridos na terceira etapa de degradação.

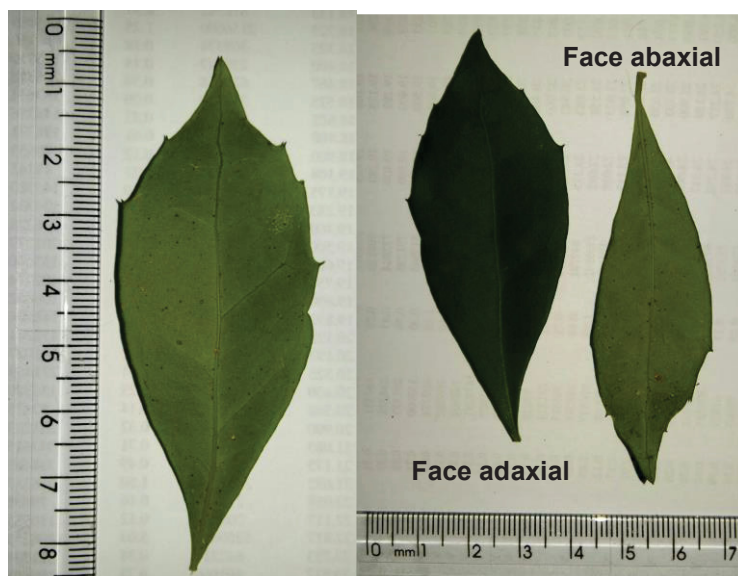
Nas folhas observaram-se dois picos indicando reações exotérmicas. O pico 1, entre 261 e 367 °C, que coincide com a segunda etapa de decomposição e outra etapa exotérmica muito intensa (pico 2), entre 416 e 515 °C, relacionada a processos ocorridos na terceira etapa de degradação.

5.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

5.3.1 Análise morfológica macroscópica

A filotaxia das folhas caracteriza a espécie como opostas dísticas, com superfície lisa, glabra, apresentando em média 8,5 cm de comprimento e 2-3 cm de largura. A margem mostra-se dentada em pecíolo, possui formato oblongo e ápice agudo, apresentando nervuras reticuladas proeminentes na face abaxial, onde verifica-se coloração mais clara quando comparada à face adaxial (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



FONTE: A autora (2019).

5.3.2 Análise morfológica microscópica

Na análise anatômica da lâmina foliar, em vista frontal, as células epidérmicas apresentam paredes anticlinais com formato reto a levemente curvos

em ambas as faces (FIGURA 11B), essa característica assemelha-se com o descrito para *Mollinedia gilgiana* e *Mollinedia marliae* (BATALHA, 2005). Para Barthlott (1981) o contorno das paredes e a escultura da superfície celular da epiderme são características importantes, podendo ter valor taxonômico. Segundo Esaú (1976), folhas de sombra exibem um formato mais sinuoso, enquanto que as de sol mostram um formato mais reto.

Várias formas de areia cristalina são observadas externamente em ambas as superfícies foliares (FIGURA 11D, E, F). É comum a presença de cristais em espécies de *Mollinedia* (METCALFE; CHALK, 1987).

Os estômatos são do tipo paracíticos, sendo encontrados apenas na face abaxial caracterizando a folha como hipoestomática (FIGURA 11C). Diferentes autores afirmam que em Monimiaceae os estômatos são paracíticos ou anomocíticos (SOLEREDER, 1908; MONEY et al., 1950; METCALFE; CHALK, 1987).

A espécie apresentou dois tipos de tricomas não glandulares unicelulares, i) simples e longos (FIGURA 11F) e ii) curtos e ramificados (FIGURA 11G). Metcalfe e Chalk (1987) relatam tricomas unicelulares com paredes espessas em vários gêneros de Monimiaceae. Em trabalho realizado por Batalha (2005) *Mollinedia schottiana* apresentou as mesmas características da espécie em estudo.

A descrição dos tricomas, bem como o tipo de estômato são características morfoanatômicas que facilitam o reconhecimento de espécies vegetais principalmente quando esta se apresenta fragmentada, triturada ou mesmo pulverizada, auxiliando no controle da qualidade da matéria prima (GUERREIRO et al., 2015).

Em secção transversal uma epiderme unisseriada é coberta por uma cutícula fina e levemente estriada em ambas as superfícies. Observou-se uma camada subepidérmica (FIGURA 11H), com células maiores que as vistas na epiderme, no lado adaxial. A presença de camada subepidérmica foi relatada por *M. gilgiana* Perkins e *M. marliae* Peixoto e V. Pereira (BARROS et al., 1997). Callado e colaboradores (2006) realizaram um estudo ontogenético das folhas de *M. oligantha* Perkins e relataram que a camada subepidérmica é formada por divisões periclinais de células protodérmicas, constituindo uma epiderme múltipla.

O mesofilo é característico de folha dorsiventral, composto por uma camada de células de parênquima paliçádico, uma camada de células de transição até oito

camadas de parênquima esponjoso (FIGURA 11 G, H, I). O parênquima paliçádico é composto por células curtas e o parênquima esponjoso é composto por células lobadas com paredes delgadas e espaços intracelulares onde são observados feixes vasculares de pequeno porte envolvidos por bainha parenquimatosa (FIGURA 11H). O parênquima paliçádico possui células com formato colunar para que a distribuição da luz seja mais eficiente para o interior da folha. Somado a isso, as células esféricas do parênquima esponjoso e os espaços de ar no interior da folha absorvem com mais eficiência a luz difusa, devido ao formato das suas células (TAIZ; ZEIGER, 2017). O mesofilo dorsiventral foi relatado para espécies de Monimiaceae (METCALFE; CHALK, 1987; BARROS et al., 1997).

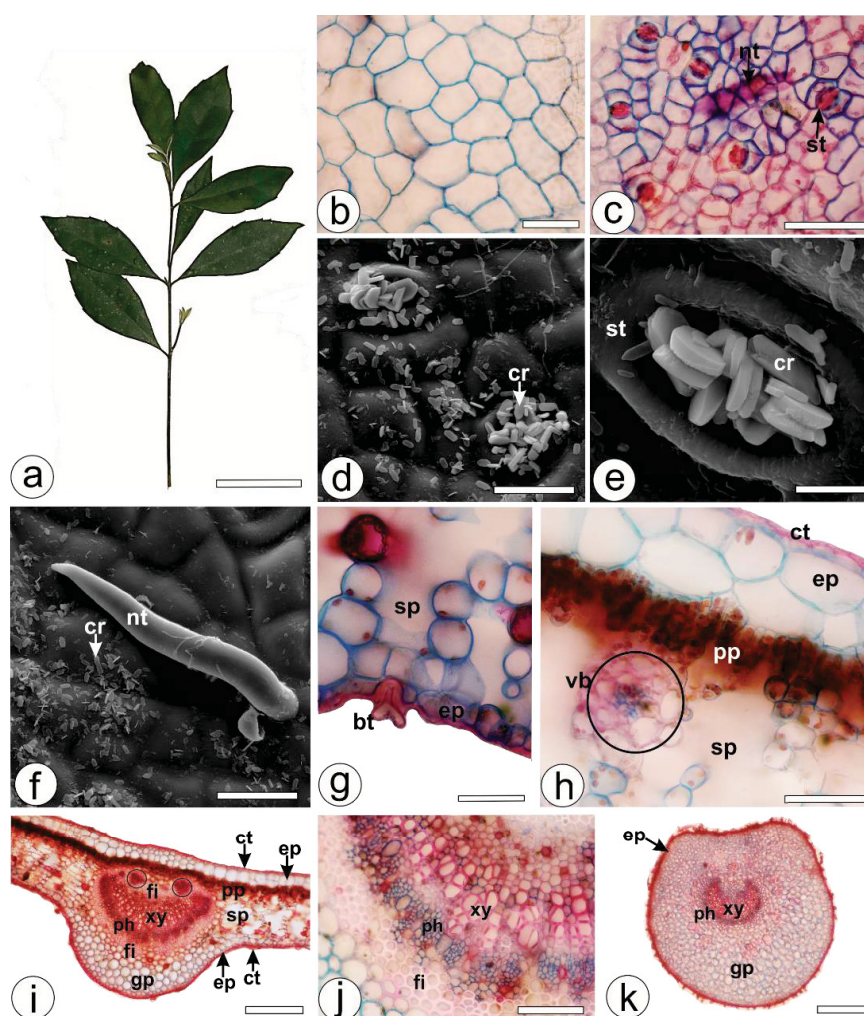
Em secção transversal, a nervura central mostra formato plano-convexo (FIGURA 11I). A forma da nervura central, em secção transversal constitui caráter importante na identificação de drogas vegetais (OLIVEIRA; AKISUE, 2005). Camadas epidérmicas, subepidérmicas e paliçádicas são contínuas no lado adaxial. Até cinco camadas de colênquima angular são encontradas no lado abaxial (FIGURA 11I). O sistema vascular encontra-se na forma de arco, seguido por células parenquimáticas e, estas, circundadas por fibras perivasculares que podem formar um anel, assim como em *M. schottiana* (BATALHA, 2005). Em espécies de *Monimia*, *Hortonia* e *Palmeria*, o sistema vascular pode se fechar em um cilindro pela concrecência das margens na face adaxial, mas em espécies de *Matthaea* e *Steganthra*, partes do arco atenuado podem se desprender na face adaxial, formando feixes menores, tal como foi observado em *H. omphalandra* e *M. schottiana* (MARQUES, 2009; BATALHA 2005). No estudo realizado por Batalha (2005) foi observado variações no sistema vascular de folhas de sol como de folhas de sombra.

O pecíolo apresenta contorno ligeiramente côncavo-convexo (FIGURA 11K). A mesma característica foi encontrada em *M. gilgiana* (CALLADO, et al., 1997). Segundo Marques et al. (2009), o pecíolo apresenta caracteres diagnósticos, os quais não devem ser desprezados na análise anatômica, uma vez que a lâmina foliar e o pecíolo são muitas vezes macerados, moídos ou pulverizados juntos.

Sua epiderme é unisseriada e coberta por uma cutícula fina e observa-se presença de tricomas não glandulares e dibragueados. Em *M. schottiana* foram encontrados tricomas unicelulares longos e curtos (BATALHA, 2005). Os tricomas são estruturas consideradas como anexos epidérmicos e se caracterizam por

apresentar formas e funções bem variáveis, podendo ser utilizados para finalidades taxonômicas (METCALFE; CHALK, 1988; OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Subjacente à epiderme ocorre um colênquima discreto com apenas um estrato. Dispersas no parênquima fundamental braquiesclereides são encontradas em grupos ou isoladas próximas aos feixes condutores assim como em *M. schottiana* e *M. marliae* (BATALHA, 2005).

FIGURA 11 – MORFOANATOMIA FOLIAR DE *M. clavigera*



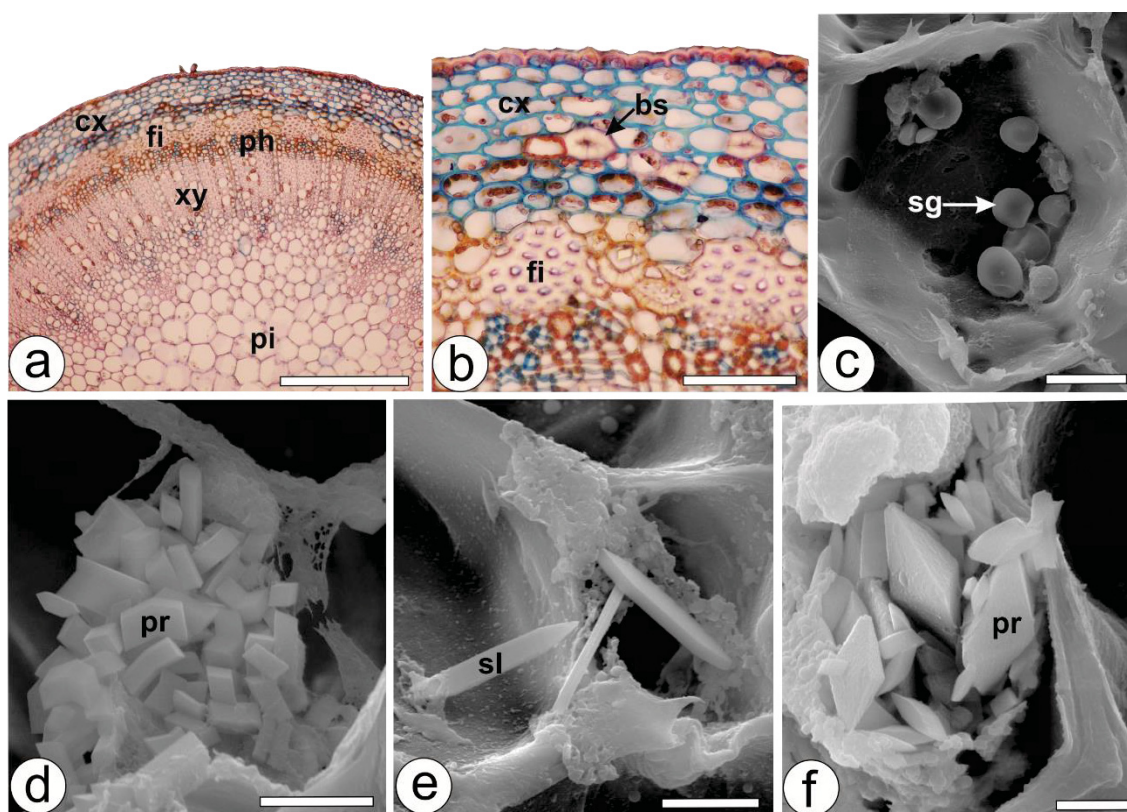
NOTA: [b, c, g, h, i, j, k: microscopia ótica; d-f: MEV]. (a) Ramos foliares. (b-f) Epiderme da folha em vista de superfície (b, d, f: lado adaxial; c, e: abaxial). (g-k) secção transversal. (g, h) lâmina foliar. (i, j) nervura central. (k) pecíolo. [bt, tricoma ramificado; cr, cristal; cu, cutícula; ep, epiderme; fi, fibra; gp, parênquima de preenchimento; tricoma não glandular; ph, floema; pp, parênquima paliçádico; pr, cristal prismático; sp, parênquima esponjoso; st estômato; vb, feixe vascular; xy, xilema]. Barras de escala: a = 5 cm; i, k = 300 µm; f-h, j = 50 µm; b-d = 25 µm; e = 10 µm.

FONTE: A autora (2019).

O sistema vascular é formado por um feixe vascular colateral disposto em arco aberto (FIGURA 11I). Por outro lado, *M. schottiana* apresentou até doze feixes vasculares colaterais organizados em arco aberto com extremidades invaginadas (BATALHA, 2005).

Vários cristais prismáticos em diferentes tamanhos foram encontrados no parênquima e identificados como oxalato de cálcio pela EDS. Cristais de oxalato de cálcio são freqüentemente distribuídos em espécies de Monimiaceae (METACALFE; CHALK, 1987). *M. schottiana* apresentou cristais de areia poliédricos em pecíolos e lâminas foliares (BATALHA, 2005), enquanto *M. marliae* apresentou cristais romboides no mesofilo (CALLADO et al., 1997). Características como composição, localização e tipo de cristal podem ser utilizadas em estudos taxonômicos (FAHN, 1982).

FIGURA 12 – ANATOMIA DO CAULE DE *M. clavigera*



NOTA: [a, b: microscopia ótica; c-f: MEV]. (a, b) Secções transversais; c) vista dos grãos de amido; (d-f) vista dos cristais [bs: braquiesclereides; cx: córtex; fi: fibras; ph: floema; pr: cristal prismático; sl: cristal estilóide; xy: xilema; pi: medula]. Barra de escala: a = 300 μ m, b = 50 μ m, c = 10 μ m, d, e = 5 μ m, f = 2 μ m.

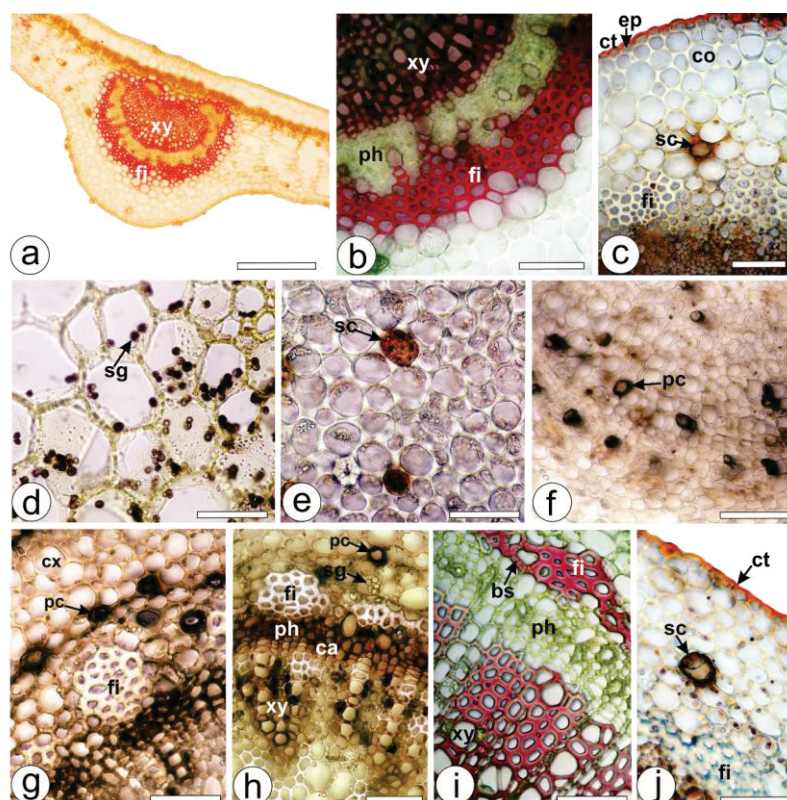
FONTE: A autora (2019).

O caule é o órgão de sustentação vegetal, inclui folhas e estruturas de reprodução, mantendo comunicação entre estes órgãos e as raízes. São escassos os estudos que tratam de morfoanatomia caulinar em *Mollinedia*. O caule apresenta-se de forma circular (FIGURA 12A). Assim como na folha, a epiderme é unisseriada e coberta por uma cutícula fina. O córtex é formado por até oito camadas de células parenquimáticas e homogêneas (FIGURA 12B).

No córtex, subjacentes à epiderme, são observadas braquiesclereídes isoladas ou em grupos. A endoderme, contendo grãos de amido (FIGURA 12C) e cristais prismáticos (FIGURA 12D, E, F), limita o córtex internamente. O cilindro vascular apresenta o floema para fora e o xilema para dentro. As capas de fibras perivasculares e os braquiesclereídes são unidos ao floema.

A medula é composta de células parenquimatosas com paredes finas (FIGURA 12A) e grãos de amido isolados e arredondados estão presentes (FIGURA 12C).

FIGURA 13 – HISTOQUÍMICA DE *M. clavigera*



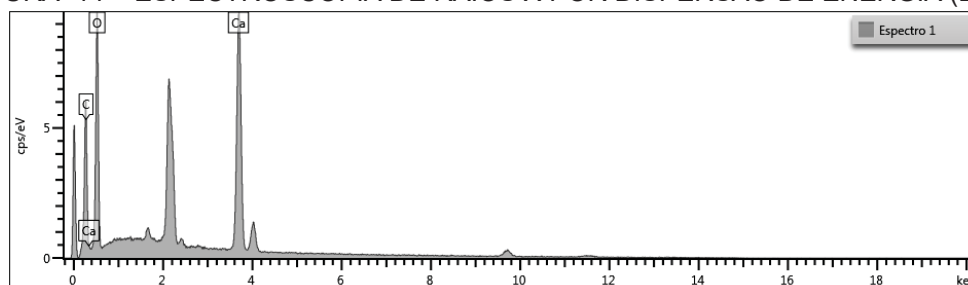
NOTA: [a, b, i: floroglucina clorídrica; c, e, j: Sudam III; c, d: solução de iodo a 1%; f, g: cloreto férrico; h: solução de dicromato de potássio (10%)]. Seções transversais a – c: nervura central; d, e: pecíolo; f-j: caule [bs: braquiesclereídes; ca, cambium; co, colênquima; ct, cutícula; cx, córtex; e, endoderme; ep, epiderme; fi, fibra; gp, parênquima de preenchimento; pc, compostos fenólicos; ph, floema; pi, medula; pc: composto fenólico; sc, célula secretora; sg, grãos de amido; xy, xilema]. Barra de escala: a = 200 μm, b-j = 50 μm.

FONTE: A autora (2019).

A lignificação foi detectada em braquiesclereídes, capas de fibra perivascular e xilema, utilizando o teste de floroglucina clorídrica na nervura central (FIGURA 13A, B), pecíolo e caule (FIGURA 13I). Idioblastos preenchidos com compostos fenólicos foram encontrados em poucas células do parênquima esponjoso e nos feixes vasculares. Estes componentes reagiram com soluções de cloreto férrico (FIGURA 13F, G) e dicromato de potássio (FIGURA 13H). Espécies de Monimiaceae geralmente apresentam alcaloides e flavonoides em folhas e raízes (MOREIRA; LEITÃO, 2001). *M. gilgiana* e *M. marliae* também apresentaram compostos fenólicos (BARROS et al. 1997). Substâncias fenólicas têm sido extensivamente estudadas por suas propriedades: antimicrobiana, antiherbívora, alelopática (LARCHER, 2000) e antioxidante (GARG et al., 2012). Os grãos de amido reagem positivamente com a solução de iodo, mostraram-se pequenos e arredondados, agregados em dois ou mais grânulos, sendo encontrados no parênquima do pecíolo (FIGURA 13D) e na endoderme e medula (FIGURA 12C) do caule.

Cristais de oxalato de cálcio com forma prismática e estilóides com extremidades pontiagudas, como descrito acima para mesofilo, nervura central e pecíolo, também são encontrados no caule. Os espectros da espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) mostraram que a composição química dos cristais é o oxalato de cálcio. A FIGURA 14 mostra picos proeminentes de carbono (23,14%), oxigênio (54,2%) e cálcio (22,66%) dos cristais prismáticos. Os principais picos não rotulados representam o elemento ouro, usado no revestimento das amostras.

FIGURA 14 – ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS).



FONTE: A autora (2019).

A presença ou ausência de cristais e seu tipo e composição química são úteis na taxonomia das espécies vegetais. Os cristais têm formas diferentes e estão localizados em tecidos ou órgãos específicos e em plantas definidas (MERIÇ, 2009).

Gotículas de óleo foram encontradas em células secretoras na nervura central e no parênquima moído do pecíolo e no córtex do caule. Células secretoras são freqüentemente encontradas na epiderme e no mesofilo em espécies de Monimiaceae (METCALFE; CHALK, 1987), como *Macropheplus dentatus* e *M. ligustrinus* (COSTA et al., 2010). Marques e colaboradores (2009) afirmaram que o óleo essencial é armazenado em idioblastos oleosos no mesofilo de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson e que este recurso pode auxiliar no diagnóstico das espécies.

5.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E CETÔNICOS DAS FOLHAS E CAULES

Para a realização de ensaios biológicos foram obtidos extratos brutos etanólicos das folhas e caules, enquanto para a realização do estudo fitoquímico, obtiveram-se extratos brutos cetônicos das folhas e caules. Os rendimentos dos extratos brutos etanólicos e cetônicos das folhas e caules de *M. clavigera* encontram-se descritos na TABELA 3:

TABELA 3 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

MATERIAL VEGETAL	RENDIMENTO (%)
EBEF	13,5
EBEC	4,0
EBCF	11,0
EBCC	3,0

FONTE: A autora (2019)

Legenda: EBEF: extrato bruto etanólico das folhas

EBEC: extrato bruto etanólico dos caules

EBCF: extrato bruto cetônico das folhas

EBCC: extrato bruto cetônico dos caules

5.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

Os rendimentos das frações orgânicas obtidas a partir dos extratos brutos cetônicos das folhas e caules de *M. clavigera* encontram-se descritos na TABELA 4:

TABELA 4 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

ELUENTE	NOME	PARTE VEGETAL	RENDIMENTO (%)
Éter de petróleo	IM18A	FOLHA	33,0
Acetato de etila	IM18B		40,0
THF	IM18C		24,0
Metanol	IM46A	CAULE	80,0

FONTE: A autora (2019)

5.6 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

5.6.1 Purificação e isolamento de compostos

Através de técnicas cromatográficas, realizou-se a purificação e isolamento de compostos químicos a partir de frações orgânicas dos extratos brutos cetônicos das folhas e caules de *M. clavigera*.

5.6.1.1 Fração éter de petróleo das folhas (IM18A)

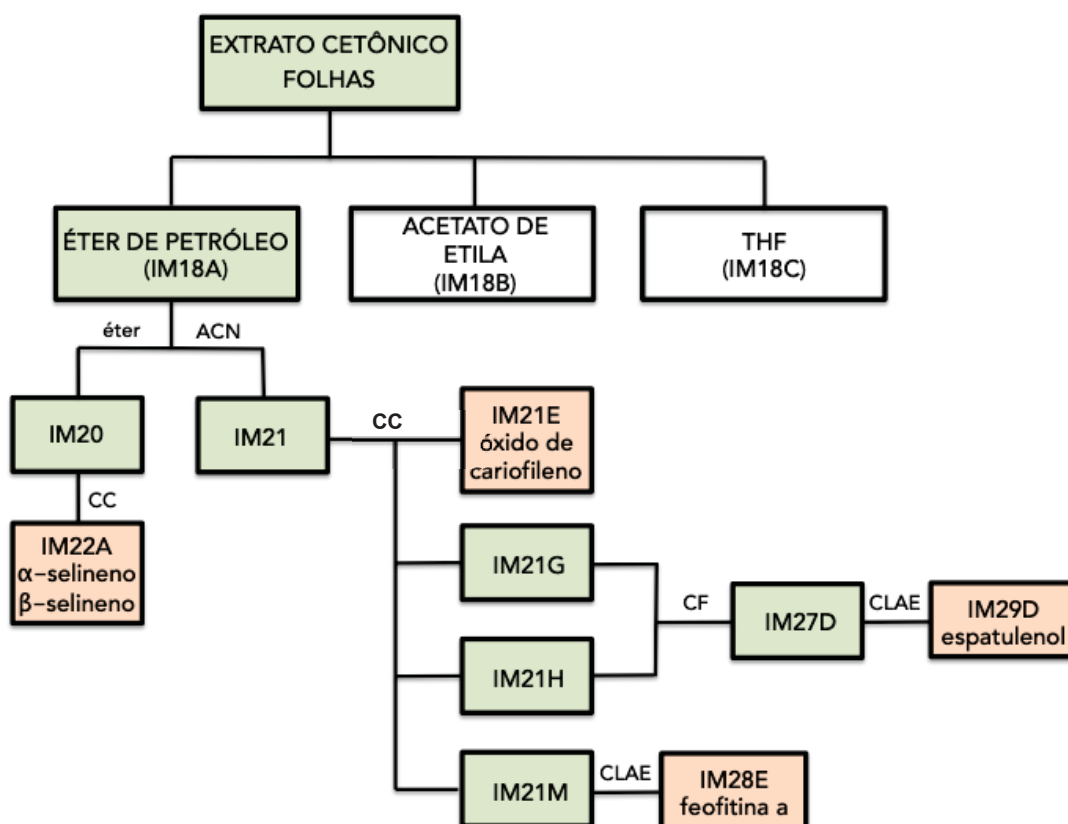
A fração éter de petróleo das folhas (IM18A) foi submetida ao particionamento em funil de separação, com éter de petróleo e acetonitrila com o intuito de separar substâncias em relação à polaridade. Substâncias mais apolares permaneceram na fração éter de petróleo (IM20) e substâncias ligeiramente menos apolares mantiveram-se na fração acetonitrila (IM21). Estas subfrações foram então empregadas no processo de isolamento e identificação de compostos químicos.

Com auxílio de técnicas cromatográficas, foram isolados quatro compostos das folhas de *M. clavigera*, nomeadas então IM22A, IM21E, IM29D e IM28E.

5.6.2 Identificação dos compostos IM22A, IM21E, IM29D e IM28E.

O fluxograma (FIGURA 15) expõe resumidamente as etapas de isolamento e identificação dos compostos da fração éter de petróleo das folhas de *M. clavigera* (IM18A).

FIGURA 15 – FLUXOGRAMA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO DAS FOLHAS DE *M. clavigera*.



Legenda:

THF – tetrahidrofurano

CC – cromatografia em coluna

ACN – acetonitrila

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CF – cromatografia flash

FONTE: A autora (2019).

5.6.2.1 Composto IM21E

A subfração IM21 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica eluída com éter de petróleo e acetato de etila (98:2). Desta coluna purificou-se o composto nomeado IM21E. A amostra (153,7 mg) apresentou-se como uma substância oleosa de coloração amarelo pálida. Esta foi submetida à análise espectrométrica (RMN ^1H e RMN ^{13}C) para elucidação da sua estrutura. O composto foi identificado como o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno (FIGURA 16). Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C podem ser observados na TABELA 5.

TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C (300 MHz, 50 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO IM21E (ÓXIDO DE CARIOFILENO)

POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)			
	^{13}C		^1H	
	MOREIRA et al., 2007	IM21E	MOREIRA et al., 2007	IM21E
1 (CH)	64,0	64,4	2,90 (dd) (J=10,6 Hz, 4,3 Hz)	2,86 (dd) (J= 10,4 Hz, 4,4 Hz)
2 (CH_2)	30,4	31,1		
3 (CH_2)	30,0	29,9		
4 (C)	152,1	152,5		
5 (CH_2)	49,0	49,2		
6 (CH_2)	39,4	40,6		
7 (CH)	50,9	51,8		
8 (CH_2)	27,4	28,1		
9 (CH_2)	40,0	40,1		
10 (C)	60,0	60,3		
11 (C)	34,2	34,7		
12 (CH_3)	21,8	22,2	1,01 (s)	1,02 (s)
13 (CH_3)	30,1	30,2	1,0 (s)	0,98 (s)
14 (CH_2)	113,0	113,6	4,86 (s) 4,97 (s)	4,83 (s) 4,95 (s)
15 (CH_3)	17,2	18,4	1,20	1,19 (s)

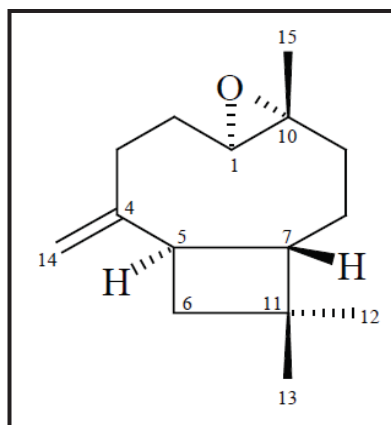
FONTE: A autora (2019)

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 17) observaram-se três singletos em 1,02, 0,98 e 1,19 ppm, atribuídos às metilas C-12, C-13 e C-15, respectivamente. Dois singletos largos em 4,87 e 4,98 ppm atribuídos aos hidrogênios H-14 da dupla exocíclica e duplo dubleto em 2,86 ppm compatível ao grupo epóxido.

O espectro de RMN de ^{13}C de IM21E (FIGURA 18) apresentou quinze sinais, sendo dois relativos a carbonos de ligação dupla exocíclica (152,5 e 113,6) e dois referentes a carbonos carbonílicos (64,4 e 60,3), característicos de grupos epóxido.

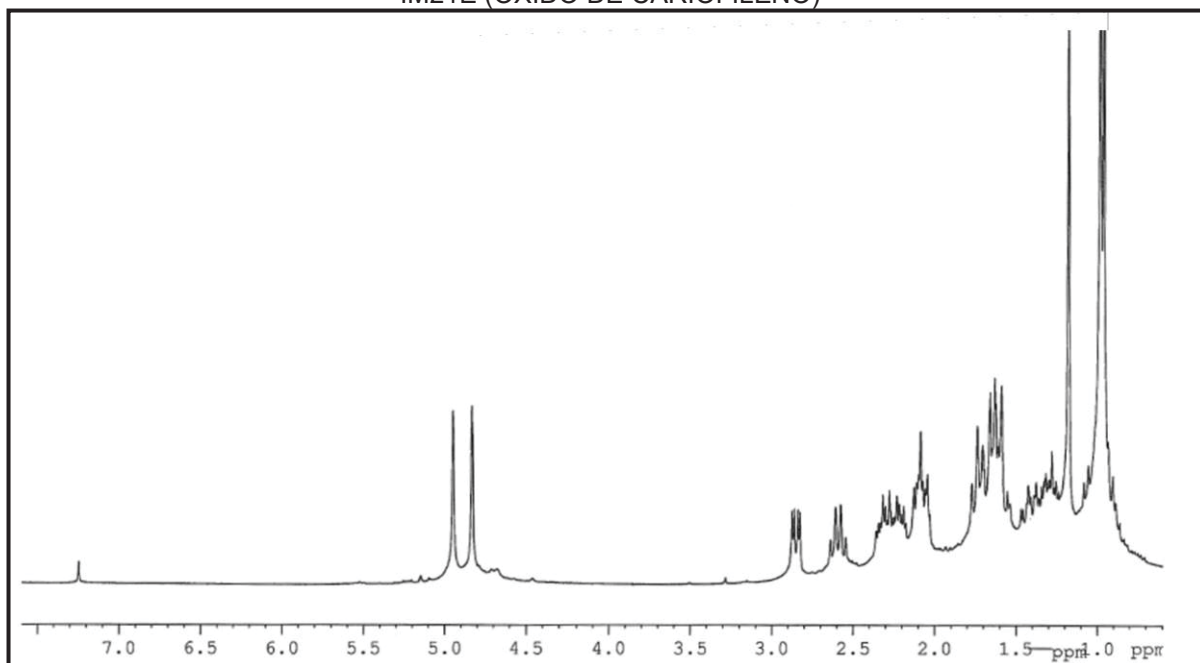
Os dados referentes às análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C da amostra IM21E são concordantes aos encontrados em literatura que descreve o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno.

FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÓXIDO DE CARIOFILENO



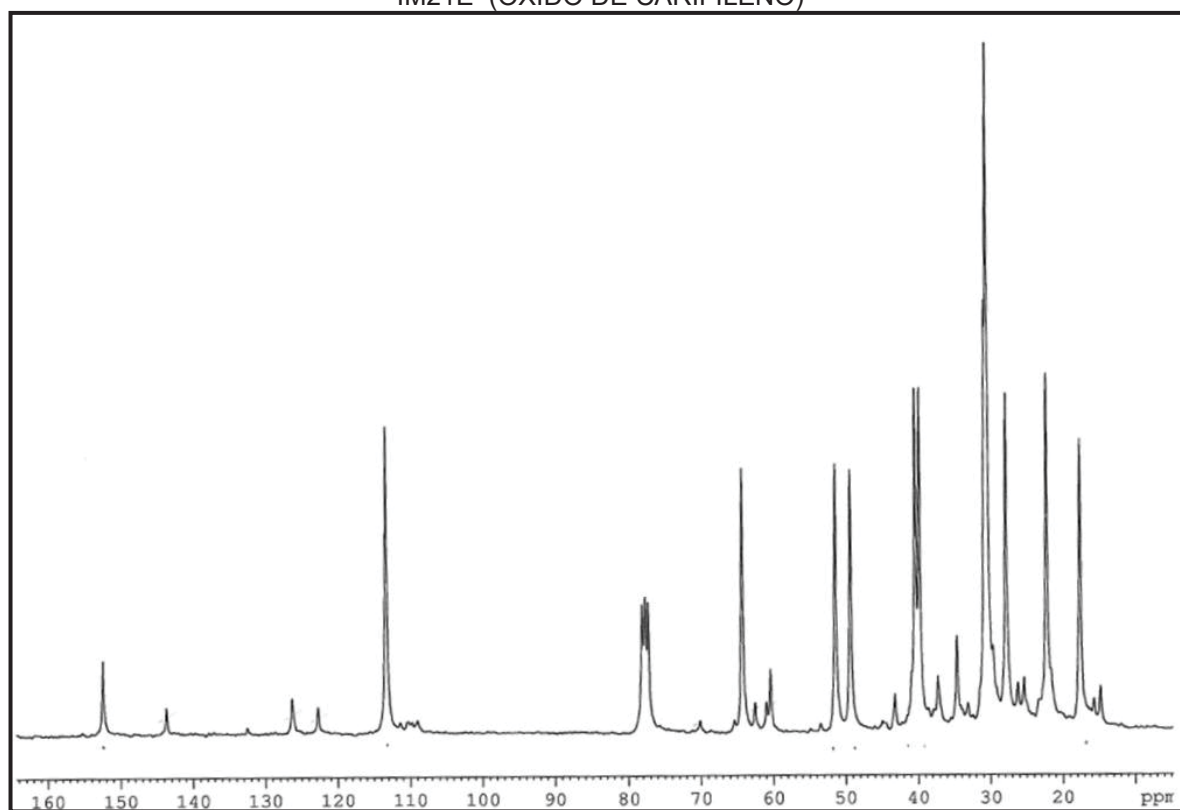
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE IM21E (ÓXIDO DE CARIOFILENO)



FONTE: A autora (2019)

FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DE IM21E (ÓXIDO DE CARIFILENO)



FONTE: A autora (2019).

5.6.2.2 Composto IM22A

A subfração IM20 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica eluída com éter de petróleo e acetato de etila (98:2). Desta coluna purificou-se o composto nomeado IM22A (189,5 mg), uma substância oleosa de coloração amarelo pálido. Esta foi submetida à análise espectrométrica RMN ^1H para elucidação da sua estrutura. O composto foi identificado como uma mistura dos sesquiterpenos α -selineno e β -selineno. Os deslocamentos químicos de ^1H podem ser observados na TABELA 6.

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H (300 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO IM22A (α -SELINENO e β -SELINENO)

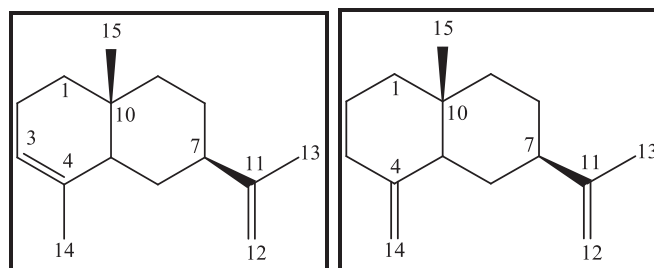
POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)				
	^1H				
	WILLIAMS et al., 1995 α -selineno	IM22A α -selineno	POSIÇÃO	WILLIAMS et al., 1995 β -selineno	IM22B β -selineno
1 (CH_2)	1,31	1,32	1 (CH)	1,43	1,45
				1,26	1,25
2 (CH_2)	2,07	2,05	2 (CH_2)	1,60	1,62
	1,94	1,92			
3 (CH)	5,29	5,31	3 (CH_2)	2,31	2,30
				2,01	2,00
4 (C)	---		4 (CH)	---	
5 (CH)	1,89	1,88	5 (CH)	1,81	1,82
6 (CH_2)	1,74	1,72	6 (CH)	1,55	1,52
	1,13	1,13		1,29	1,29
7 (CH)	1,95	1,95	7 (CH)	1,96	1,97
8 (CH_2)	1,55	1,52	8 (CH_2)	1,55	1,52
9 (CH_2)	1,41	1,41	9 (CH_2)	1,49	1,50
	1,16	1,17		1,27	1,26
10 C	----		10 C	----	
11 C	----		11 C	----	
12 (CH_2)	4,71	4,70	12 (CH_2)	4,71	4,70
13 (CH_3)	1,75 s	1,75	13 (CH_3)	1,75	1,75
14 (CH_3)	1,58 s	1,57	14 (CH_2)	4,69	4,71
				4,42	4,42
15 (CH_3)	0,77 s	0,79	15 (CH_3)	0,71 s	0,71

FONTE: A autora (2019)

Os dados obtidos em RMN ^1H e RMN ^{13}C são concordantes com a mistura dos sesquiterpenos α -selineno e β -selineno (FIGURA 19), de acordo com Williams et al. (1995). No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 20) os sinais referentes à α -selineno foram três singletos em 1,75, 1,75 e 0,79 ppm, atribuídos às metilas C-13, C-14 e C-15, respectivamente. Além de singlete em 4,70 ppm relacionado aos hidrogênios da dupla ligação em C-12 e outro em 5,29 atribuídos a dupla ligação em C-3. Já os

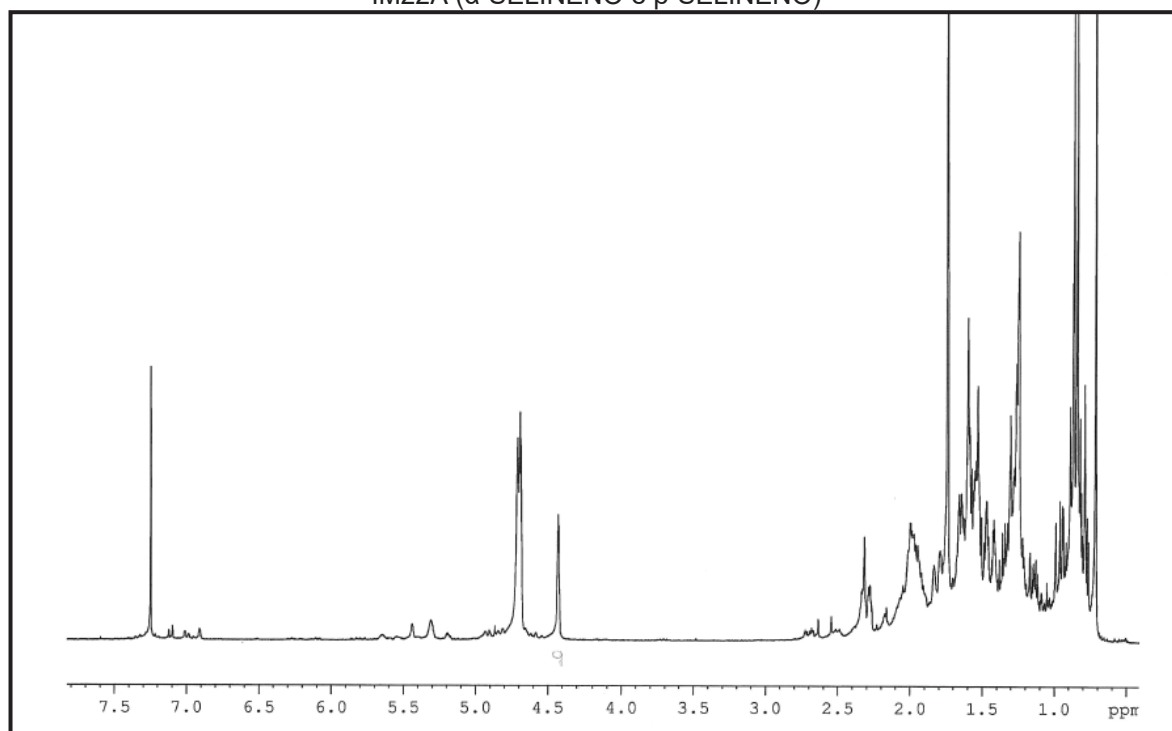
sinais atribuídos a β -selineno foram singletos em 0,71 e 1,75 ppm, referentes às metilas C-13 e C-15, além de singletos em 4,70 ppm atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação em C-12 e singletos em 4,71 e 4,42 ppm relacionados com a dupla ligação em C-14.

FIGURA 19 – ESTRUTURA QUÍMICA DE α -SELINENO E β -SELINENO



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE IM22A (α -SELINENO e β -SELINENO)



FONTE: A autora (2019).

5.6.2.3 Composto IM29D

A subfração IM21 da fração éter de petróleo das folhas (IM18A) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica eluída com éter de petróleo e acetato de etila (98:2). Desta coluna reuniram-se as subfrações IM21G e IM21H, por apresentarem

perfis cromatográficos similares. Estas subfrações foram então purificadas através cromatografia flash (Reveleris) e cromatografia líquida de alta eficiência. Obteve-se assim o composto nomeado IM29D (21,2 mg), uma substância oleosa incolor. Esta foi submetida à análise espectrométrica RMN ^1H e RMN ^{13}C para elucidação da sua estrutura. O composto foi identificado como o sesquiterpeno hidrocarboneto espatulenol. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C podem ser observados na TABELA 7.

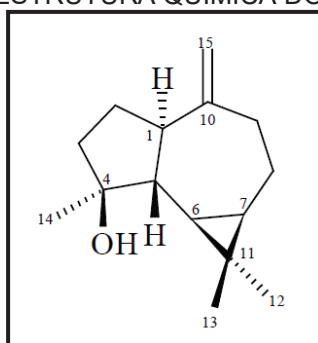
No espectro de RMN de ^1H de IM29D (FIGURA 22) foram observados dois sinais em 0,69 e 0,46 ppm atribuídos a H-6 e H-7 de sesquiterpenos de esqueleto aromadendrano. Adicionalmente, a presença de dois singletos em 4,64 e 4,67 ppm, característicos de hidrogênio de dupla exocíclica além de três singletos em 1,05, 1,06 e 1,29 ppm, referentes a três grupos metílicos, sendo o último ligado a carbono oxigenado, sugeriu a estrutura do espatulenol (FIGURA 21), sendo confirmada após análise dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 23).

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C (300 MHz, 50 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO IM29D (ESPATULENOL)

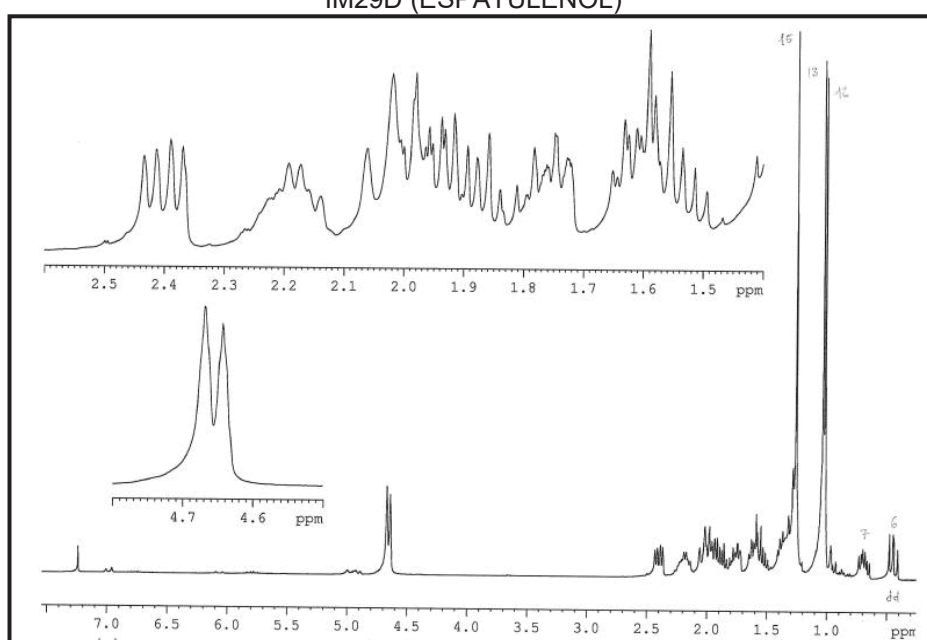
POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)			
	^{13}C		^1H	
	MOREIRA et al., 2007	IM29D	MOREIRA et al., 2007	IM29D
1 (CH)	54,3	55,5	2,39 (dd) (J=14,1 Hz, 6,3 Hz)	2,41 (dd) (J=14,3 Hz, 6,1Hz)
2 (CH ₂)	26,7	27,8		
3 (CH ₂)	41,7	42,9		
4 (C)	80,9	81,7		
5 (CH)	53,3	54,4		
6 (CH)	29,9	30,9	0,72 (ddd) (J=11,2 Hz, 9,6 Hz, 6,1 Hz)	0,69 (ddd) (J=11,0 Hz, 9,6 Hz, 6,0 Hz)
7 (CH)	27,4	28,4	0,46 (dd) (J=11,2 Hz, 9,5 Hz)	0,46 (dd) (J=11,0 Hz, 9,6 Hz)
8 (CH ₂)	24,8	25,9		
9 (CH ₂)	38,8	39,8		
10 (C)	153,4	154,1		
11 (C)	20,2	21,3		
12 (CH ₃)	28,6	29,7	1,06 (s)	1,06 (s)
13 (CH ₃)	16,2	17,2	1,05 (s)	1,05 (s)
14 (CH ₃)	26,0	27,0	1,28 (s)	1,29 (s)
15 (CH ₂)	106,2	106,9	4,66 (s) 4,69 (s)	4,64 (s) 4,67 (s)

FONTE: A autora (2019)

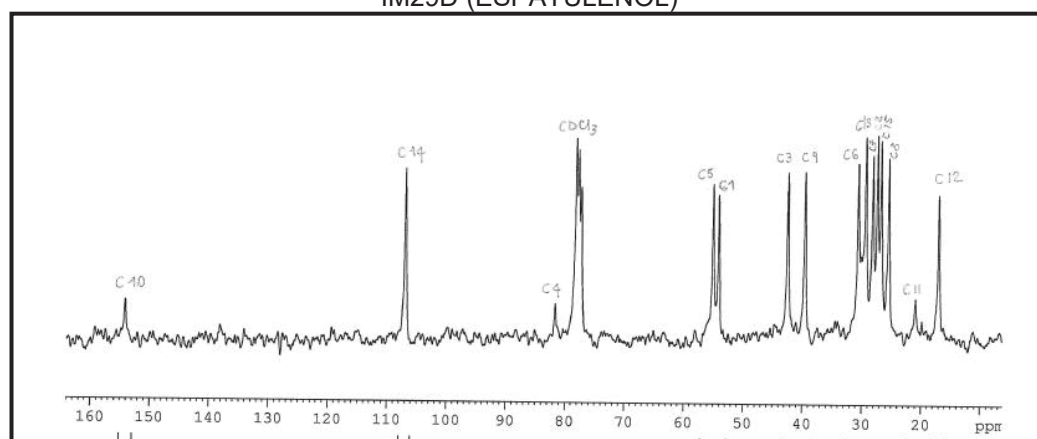
FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESPATULENOL



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE IM29D (ESPATULENOL)

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DE IM29D (ESPATULENOL)

FONTE: A autora (2019).

5.6.2.4 Composto IM28E

A subfração IM21 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica eluída com éter de petróleo e acetato de etila (98:2). Desta coluna originou-se o composto nomeado IM21M que foi submetido à CLAE, isolando assim o composto IM28E. A amostra (22,9 mg) apresentou-se como uma substância oleosa de coloração verde. Esta foi submetida à análise espectrométrica (RMN ^1H) para elucidação da sua estrutura. O composto foi identificado como o derivado porfirínico feofitina *a*. Os deslocamentos químicos de ^1H podem ser observados na TABELA 8.

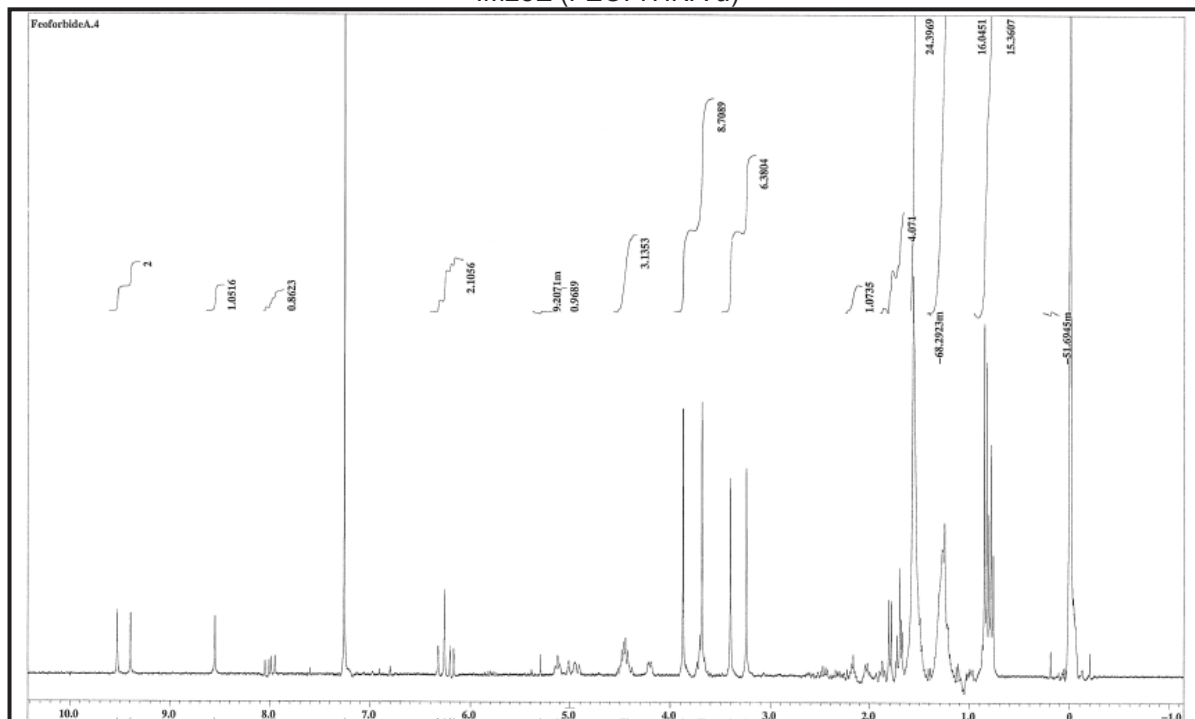
TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H (300 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO IM28E (FEOFITINA *a*)

H	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)	
	^1H	
	SCHWIKKARD et al., 1998	IM28E
H-10	9,50 (s)	9,53
H-5	9,36 (s)	9,39
H-20	8,55 (s)	8,55
H-3 ¹	7,98 (dd) (J=15,19 Hz, 11,39 Hz)	7,99 (dd) (J=17,7 Hz, 11,7 Hz)
H-3 ²	6,28 (dd) (J=15,19 Hz, 2,29 Hz)	6,25 (dd) (J=14,2 Hz, 1,8 Hz)
H-13 ²	6,26 (s)	
H-3 ²	6,17 (dd) (J=11,39 Hz, 2,28 Hz)	6,18 (dd) (J=10,5 Hz, 1,5 Hz)
F2	5,10	5,12
F1	4,00	
H-18	4,45 (m)	4,46 (m)
H-17	4,20 (m)	4,21 (m)
H-13 ⁴	3,88 (s)	3,88 (s)
H-12 ¹	3,66 (s)	3,68 (s)
H-2 ¹	3,39	3,40
H-7 ¹	3,21 (s)	3,24 (s)
H-18 ¹	1,80 (d) (J=7,59 Hz)	1,80 (d) (J=7,0 Hz)
H-8 ²	1,68 (t)	1,69 (t)

FONTE: A autora (2019)

Os espectros de RMN ^1H (FIGURA 24) apresentam singletos em 9,53 ppm, 9,39 ppm e 8,55 ppm, que correspondem aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-20, características atribuídas a compostos que contêm cadeias porfirínicas. A presença de singletos em 3,68, 3,40 e 3,24 ppm, refere-se aos hidrogênios de metilas olefínicas. Outro sinal característico de cadeias porfirínicas é a presença de duplo dubleto em 7,99 ppm, 6,25 ppm e 6,18 ppm, correspondentes aos hidrogênios vinílicos do grupo vinila, inseridos na posição 3 (H-31 e H-32), respectivamente (SCHWIKKARD et al. 1998, HUANG et al., 2007).

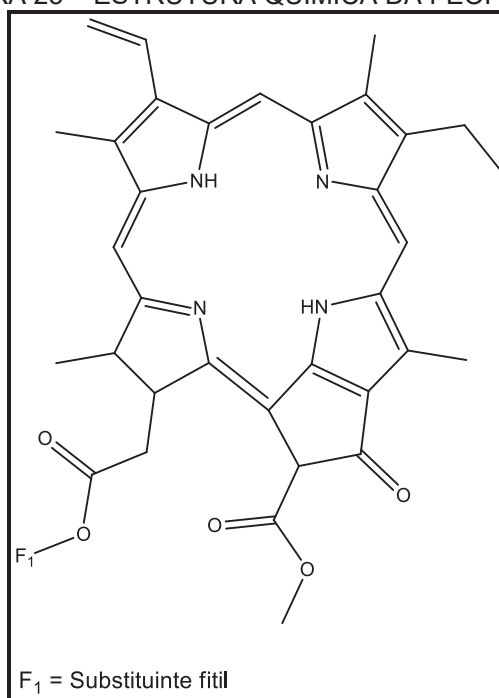
FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) DE IM28E (FEOFITINA *a*)



FONTE: A autora (2019)

As clorofilas, amplamente encontradas em algas e folhas de plantas, são compostos porfirínicos, formados por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, apresentando como átomo central o magnésio. Cerca de 10 clorofilas foram isoladas e identificadas, sendo as mais abundantes em ordem crescente: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c* (*c1* e *c2*), clorofila *d* (DOLPHIN, 1978; SCHWARTZ, LORENZO, 1990).

Sempre que as folhas mudam de cor ocorre à degradação das clorofilas por reações químicas, através da inativação parcial ou total de enzimas. A formação das feofitinas ocorre através da feofitinização da molécula de clorofila, onde o magnésio central é substituído por hidrogênio através da Mg-dequelatase (SHIOI et al., 2005; STREIT et al., 2005). A feofitina *a* (FIGURA 25) origina-se quando o íon metálico Mg^{2+} da clorofila *a* é substituído por dois átomos de hidrogênio. Há estudos relatando o uso de feofitina *a* como agente ativo em terapia fotodinâmica (MIRANDA et al., 2014).

FIGURA 25 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FEOFITINA *a*

FONTE: A autora (2019).

5.7 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E CAULES

5.7.1 Folhas

5.7.1.1 Rendimento do óleo essencial das folhas

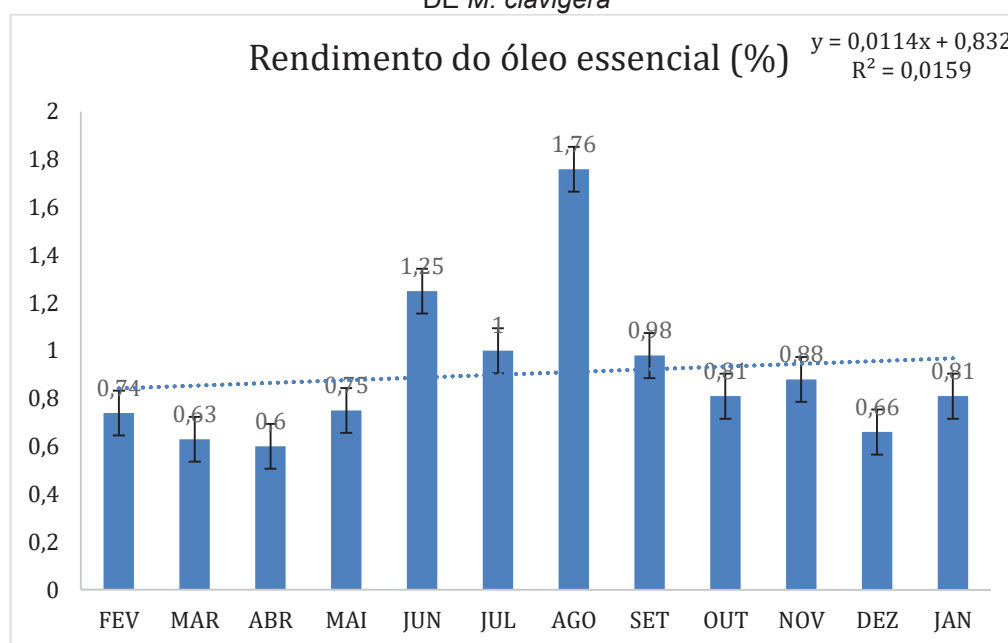
Os rendimentos das amostras de óleo essencial das folhas foram calculados em mililitros de óleo essencial por 100 g de vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2019), descritos na TABELA 9 e demonstrados graficamente no GRÁFICO 1.

TABELA 9 – RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*

MÊS	RENDIMENTO (%)
Fevereiro/15	0,74
Março/15	0,63
Abril/15	0,6
Mai/15	0,75
Junho/15	1,25
Julho/15	1,00
Agosto/15	1,76
Setembro/15	0,98
Outubro/15	0,81
Novembro/15	0,88
Dezembro/15	0,66
Janeiro/16	0,81

FONTE: A autora (2019).

GRAFICO 1 – RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



FONTE: A autora (2019).

Percebe-se maior rendimento do óleo essencial durante os meses de inverno, apresentando relação direta com a variação de temperatura. A média desta variante foi solicitada ao Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR), para o período de cinco dias que antecederam o dia da coleta (TABELA 10).

TABELA 10 – TEMPERATURA MÉDIA DURANTE O PERÍODO DE COLETA (SIMEPAR)

Mês	Período (dias)	Temp. Média (°C)
Fev./2105	23-28	21,590
Mar./2015	21-26	18,878
Abr./2015	22-27	16,849
Mai./2015	15-20	15,582
Jun./2015	18-23	13,650
Jul./2015	15-20	16,500
Ago./2015	15-20	16,784
Set./2015	16-21	23,145
Out./2015	15-20	18,500
Nov./2015	21-26	17,860
Dez./2015	13-18	22,323
Jan./2016	18-22	19,15

FONTE: A autora (2019).

5.7.1.2 Caracterização físico-química do óleo essencial das folhas

Analísaram-se características organolépticas (coloração e odor) e todas as amostras mostraram-se translúcidas, com coloração em tons que variam entre amarelo claro e escuro, odor forte e não agradável. As características físico-químicas das amostras de óleo essencial estão descritas na TABELA 11:

TABELA 11 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QÍMICA DAS AMOSTRAS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*

MÊS	DENSIDADE (mg/mL)	ÍNDICE DE REFRAÇÃO
Fev./2015	0,90	1,503
Mar./2015	0,84	1,502
Abr./2015	0,93	1,503
Mai./2015	0,95	1,503
Jun./2015	0,90	1,506
Jul./2015	0,93	1,505
Ago./2015	0,90	1,506
Set./2015	0,91	1,505
Out./2015	0,88	1,504
Nov./2015	0,93	1,504
Dez./2015	0,94	1,501
Jan./2016	0,93	1,504

FONTE: A autora (2019).

De acordo com Simões e Spitzer (2010), os valores para a densidade dos óleos essenciais geralmente encontram-se entre 0,69 e 1,118 mg/mL e os valores para o índice de refração de óleos essenciais variam entre 1,450 e 1,590. Todos os resultados encontrados nas amostras avaliadas enquadram-se entre os valores citados. Estes resultados podem ser utilizados como parâmetros característicos para

a espécie vegetal em questão e encontram-se de acordo com os valores citados por Homem (2015): densidade 0,967 mg/mL e índice de refração 1,5039.

5.7.1.3 Análise da composição química sazonal do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM)

Os resultados obtidos nos cromatogramas (FIGURAS 31 a 42, ANEXO) estão descritos na TABELA 12. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2008 – banco de dados do sistema.

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA SAZONAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*

	IRL*	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN
α -cubeneno	1345	0	0	0	0	0	0,23	0,19	0	0	0,13	0	0
ylangeno	1373	0	0	0	0	0	0	0,11	3,67	0	0	0	0
copaeno	1374	4,59	5,58	2,96	4,12	8,04	7,74	6,51	0	2,2	4,7	2,07	2,82
β -elemeno	1389	9,52	6,38	6,31	8,86	10,43	15,04	11,81	6,81	1,83	6,35	4,25	6,37
panasinsen	1381	0	0	0	0	0	0,59	0,88	0,58	0,32	0,63	0,29	0,82
sativeno	1390	0	0	0	0	0	0	0	0,71	0	0	0	0
α -cariofileno	1415	0,96	0,82	0,62	0,38	1,98	1,33	2,05	0,86	0	0,68	0	1,46
β -cariofileno	1423	5,28	2,89	2,44	1,38	10,69	5,02	10,06	4,04	0,49	2,44	0,74	3,9
α -gurjuneno	1431	0	0	0	0	0	0,9	0,77	0,55	0,64	0	0	0,45
γ -elemeno	1434	2,42	2,1	0,21	1,01	3,44	1,39	6,62	0,63	0	0,43	0,28	1,77
α -gualeno	1437	0	0	0	0	0	0,48	2,37	0	1,82	5,29	2,03	7,42
allooromadendreno	1458	1,88	2,37	1,6	1,56	2,71	2,8	2,68	1,27	0,94	0,82	0,78	0,69
β -chamigreno	1476	0	0	0	0	0	0	8,92	0	0	0	0	0
germacreno D	1484	0	0	0	0	0	2,58	5,1	2,36	0,18	0,9	0	0,95
β -selineno	1489	15,06	19,13	19,37	23,26	13,04	13,26	12,15	16,24	18,32	15,97	19,41	20,28
δ -gualeno	1509	5,75	5,34	4,49	3,45	9,73	7,37	0,4	5,67	2,11	0,21	0	0,19
δ -cadineno	1522	4,24	5,03	3,05	2,1	6,97	5,33	4,22	3,64	0,48	1,96	0,63	1,88
calameneno	1528	0	0	0	0	0	0,27	0,24	0,17	0,12	0,15	0,11	0,09
α -calacoreno	1544	1,27	1,74	0	0	0	0	0,12	0,19	1,13	1,01	1,07	0
germacrenoB	1559	0	0	0	0	0	3,17	0,14	1,79	0	1,68	0	0
espatulenol	1577	8,51	10,7	10,96	8,38	6,5	7,29	3,86	5,13	7,16	7,53	6,44	5,18
óx. Cariofileno	1582	15,77	14,31	17,12	15,01	7,69	5,22	2,43	16,67	19,97	15,54	17,44	13,69
ac. de nerolidol	1676	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,19
Sesquiterpenos hidrocarbonados		67,73	63,3	59,96	66,35	82,53	84,36	92,35	68,29	52,99	65,27	57,9	72,03
Sesquiterpenos oxigenados		32,27	32,7	42,04	83,35	17,47	15,64	7,65	30,71	47,01	34,73	42,1	27,97
Total identificado		75,25	76,49	70,13	69,51	81,22	80,01	82,22	70,98	57,71	66,42	55,54	68,15
Rendimento		0,74	0,63	0,6	0,75	1,25	1	1,76	0,98	0,81	0,88	0,66	0,81

*IRL: Índice de Retenção Linear

Fonte A autora(2019).

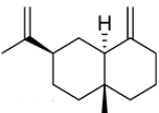
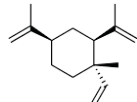
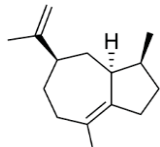
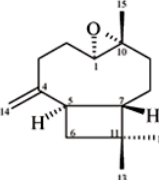
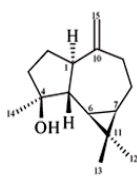
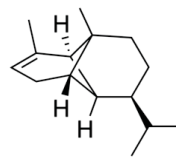
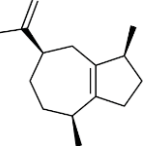
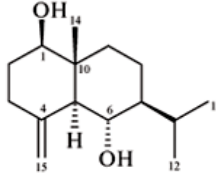
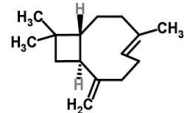
A presença majoritária de sesquiterpenos na composição de óleo essencial pode ser observada em várias espécies do gênero *Mollinedia*, bem como em famílias próximas como Siparunaceae e Lauraceae (MARQUES et al., 2009). Os terpenos, em especial monoterpenos e sesquiterpenos, apresentam diversas funções nos vegetais. As mais conhecidas dizem respeito aos efeitos de proteção contra herbívoros e agentes microbianos, bem como atração de polinizadores. Outras funções, ainda pouco estabelecidas para a maioria dos derivados isoprênicos, envolvem efeitos de termo proteção, proteção a danos oxidativos, fotorrespiração a altas temperaturas e baixas concentrações de O₂, alelopatia e foto-proteção (BARROS, 2009).

Analisando a composição mensal do óleo essencial das folhas de *M. clavigera* podemos concluir que tanto a composição dos compostos majoritários como a quantidade dos mesmos não são constantes durante o ano, sofrendo influência direta da temperatura, assim como verificado na variação do rendimento mensal do óleo. Outro ponto observado foi à variação da composição entre sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonados. Constatou-se o decréscimo da produção de sesquiterpenos oxigenados durante os meses com temperaturas mais baixas, meses onde prevaleceram a maioritariamente de sesquiterpenos hidrocarbonados. Gardin (2017), também descreve sobre a predominância da produção de sesquiterpenos hidrocarbonados durante o período de inverno na cidade de Curitiba, em estudo sazonal realizado com a espécie *Curitiba prismática* (Myrtaceae).

Os compostos majoritários do óleo essencial de *M. clavigera* estão representados na TABELA 13. O sesquiterpeno β -elemeno faz parte da composição do óleo essencial de diversas espécies vegetais. Estudos evidenciam atividade antineoplásica *in vivo* deste composto em diferentes tipos celulares (pulmão, cólon, estômago, cérebro) por induzir a apoptose, limitar a diferenciação celular e promover a inibição de metástases (WANG et al., 2005). Outros compostos majoritários apresentaram estudos quanto suas atividades biológicas, como propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica do álcool sesquiterpênico espatulenol (SANTOS et al., 2012) e atividade antimalárica e antiplasmodial do sesquiterpeno β -selineno (ARANGO et al., 2009). Derivados de cariofileno demonstraram propriedades fagorrepelentes, antiedêmica, anti-inflamatória, bactericida e espasmolítica. A literatura relata atividade anticarcinogênica *in vitro* do

óxido de cariofileno e ação anestésica para o β -cariofileno. Em espécies do gênero (*M. gilgiana*, *M. schottiana*, *M. glaziovii* e *M. salicifolia*) relatou-se a presença do sesquiterpeno oxigenado - óxido de cariofileno - na composição do óleo essencial, sendo este o constituinte majoritário nas espécies *M. glaziovii*, e *M. salicifolia* (MACIEL et al., 2002; MARQUES et al., 2009; SANTOS et al., 2012, SOUZA et al., 2007).

TABELA 13 – COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NA COMPOSIÇÃO SAZONAL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*.

COMPOSTO	ESTRUTURA	COMPOSTO	ESTRUTURA	COMPOSTO	ESTRUTURA
β -selineno		β -elemeno		δ -guaieno	
Óxido de cariofileno		Espatulanol		Copaeno	
α -guaieno		β -eudesmeno		β -cariofileno	

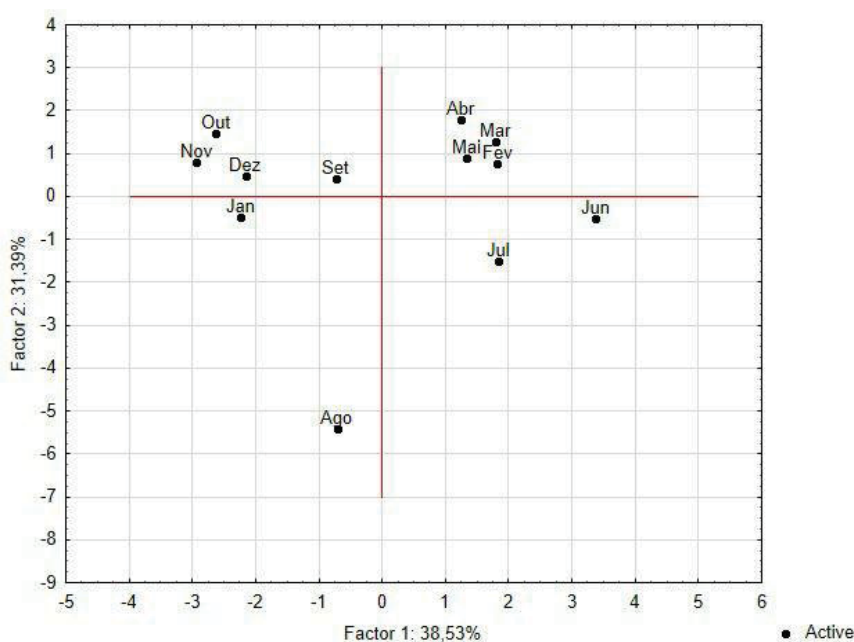
FONTE: A autora (2019).

5.7.1.4 Análise estatística

5.7.1.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma análise estatística multivariada que possibilita investigações com um grande número de dados disponíveis, correlacionando os resultados, sendo muito eficaz para visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados. Diversos estudos utilizam este tipo de análise estatística para diferenciar e correlacionar as diferentes amostras estudadas. A análise de PCA da sazonalidade do óleo essencial das folhas de *M. clavigera* encontra-se representada na FIGURA 26.

FIGURA 26 – ANÁLISE DE PCA DA SAZONALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



FONTE: A autora (2019).

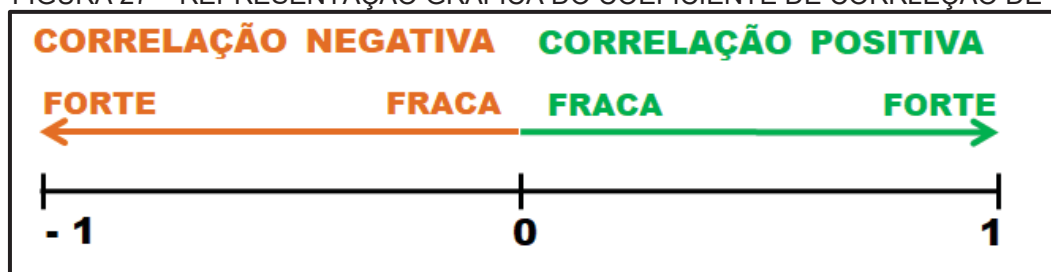
Para a análise de PCA utilizou-se como variáveis principais as substâncias majoritárias da composição do óleo essencial e como variáveis complementares o rendimento mensal, além da temperatura dos cinco dias anteriores a coleta do material. A composição e a quantidade dos compostos químicos dos óleos essenciais, assim como o seu rendimento não são constantes durante o ano e sofre influência direta de parâmetros climáticos como a variação da temperatura.

É possível verificar que o gráfico ficou dividido em três grupos principais, que coincidem com as estações do ano. Sendo um grupo formado pelas amostras que compreendem o período entre fevereiro e maio de 2015, correspondendo principalmente à fase de outono; e outro grupo referente amostras do período entre setembro de 2015 e janeiro de 2016, correspondendo à fase de primavera. O terceiro grupo é formado pelas amostras do período entre junho a agosto de 2015, correspondendo à fase de inverno. O mês de agosto apresentou características diferentes dos meses de junho e julho devido à presença do composto β - chamigreno (como um dos compostos majoritários), sendo este o único mês onde este composto foi identificado. Esta correlação foi explicada, estatisticamente pelo Coeficiente de correlação de Pearson (item 5.7.1.4.2).

5.7.1.4.2 Coeficiente de correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson (r) indica o grau de relação entre duas variáveis quantitativas, sendo expresso em valores situados entre -1 e 1. Valores próximos a zero exprimem relações nulas entre variáveis. Quanto mais este coeficiente se aproxima de -1 ou 1, mais forte é esta relação. Quando próximo de 1, indica uma relação positiva diretamente proporcional entre as variáveis, enquanto próximo a -1 a relação se dá de maneira negativa e inversamente proporcional, conforme FIGURA 27 (MUKAKA, 2012).

FIGURA 27 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

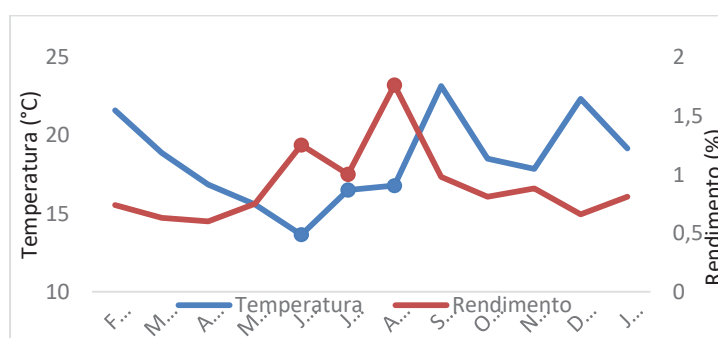


FONTE: A

autora (2019).

Correlacionando o rendimento do óleo essencial e a temperatura média ao longo dos meses, obteve-se o valor de -0,35776, exprimindo relação negativa (inversamente proporcional) entre estas variáveis. O coeficiente de Pearson corrobora a influência da temperatura na produção de óleo essencial observada em *M. clavigera*, uma vez que os maiores rendimentos foram em meses de inverno, conforme mostra o GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO RENDIMENTO DAS AMOSTRAS SAZONAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



FONTE: A autora (2019).

A análise de PCA evidenciou disparidade nas variáveis da amostra obtida no mês de agosto, sendo possível expor estatisticamente esta variação a partir da aplicação do Coeficiente de correlação de Pearson. Exclusivamente em agosto verificou-se a presença do sesquiterpeno β -chamigreno (8,92%) como um dos compostos majoritários, observando uma forte ligação entre este composto e outros constituintes do óleo essencial.

A correlação entre β -chamigreno e germacreno D foi de 0,81, indicando uma forte relação positiva entre estes compostos. A produção do β -chamigreno (8,92%) acompanhou o aumento na produção do germacreno D (5,1%), momento em que este também obteve sua maior expressão sazonal no referido mês. Esta situação também pode ser observada com γ elemeno (6,62%), onde foi evidenciada uma forte relação positiva (0,83) com β -chamigreno. Verificou-se fortes relações negativas de β -chamigreno com outros compostos. Pode-se destacar a relação de -0,50 com o composto espatulenol (3,86%) e a relação de -0,64 com óxido de cariofileno (2,43%), que apresentaram a menor expressão sazonal durante o mês de agosto.

A presença de β -chamigreno apenas no mês de agosto, associado a forte relação com demais compostos e o aumento do rendimento (1,76%) do óleo essencial neste mês, explicam a discrepância do mês de agosto quando comparado aos meses de junho e julho (período de inverno).

5.7.2 Caules

Devido ao baixo rendimento do óleo essencial dos caules (0,1 mL), não foi possível realizar a caracterização físico-químicas da amostra. A alíquota foi destinada apenas a caracterização da composição química realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS). Os compostos químicos identificados estão descritos na TABELA 14.

TABELA 14 – COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DOS CAULES DE *M. clavigera*

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO QUÍMICO	ÁREA (%)
25,288	ácido palmítico	18,11
18,040	espatulenol	3,95
18,174	óxido de cariofileno	1,25
16,113	germacreno D	0,68
17,223	α -calacoreno	0,32
16,797	L calameneno	0,30
16,921	δ -cadineno	0,24
16,348	β -selineno	0,24
13,868	β -elemeno	0,19
14,576	β -cariofileno	0,12
16,850	α -panasinsen	0,11
13,568	α -copaeno	0,10
12,907	α -cubebeno	0,08
15,364	α -cariofileno	0,03

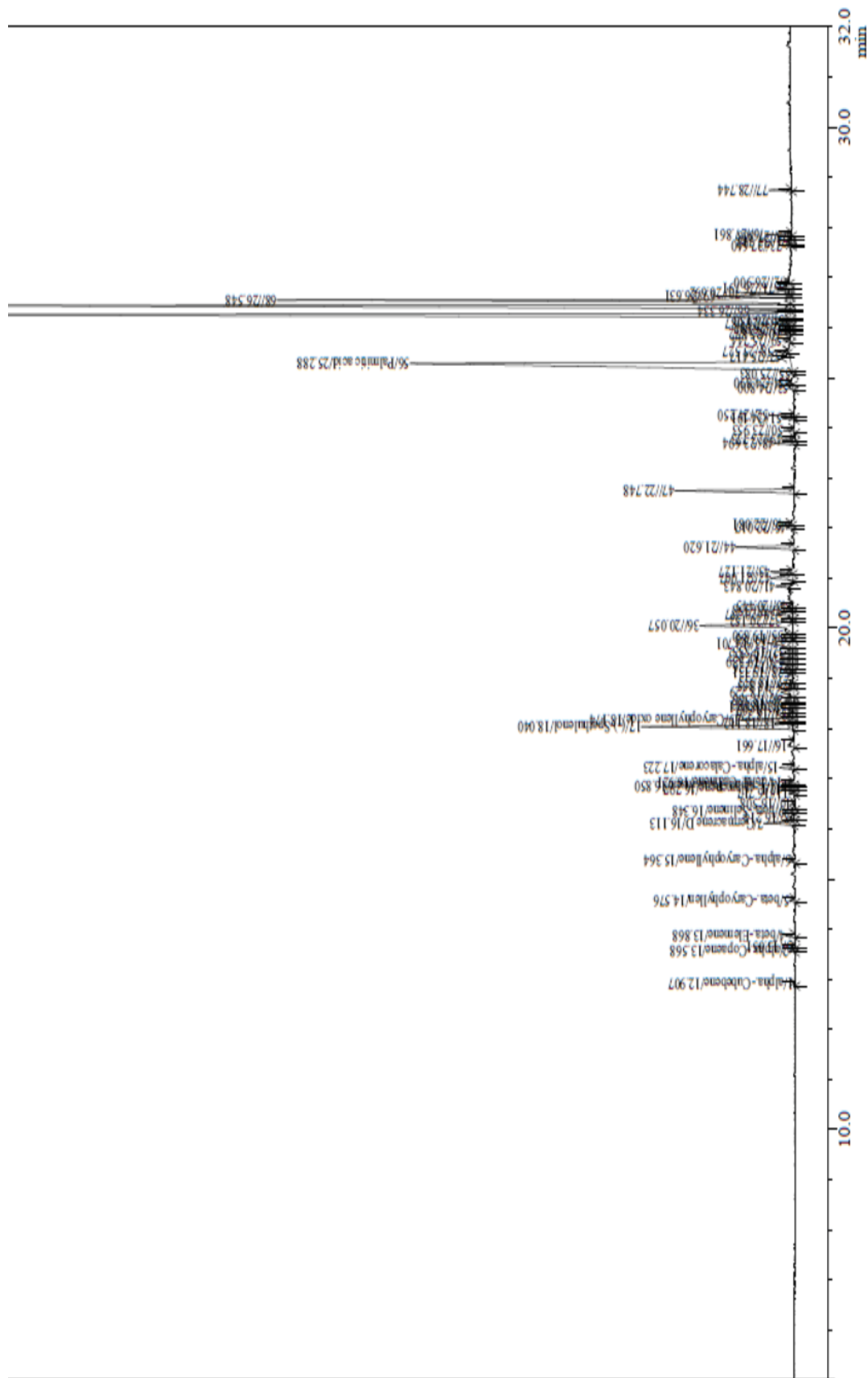
FONTE: A autora (2019).

Foram encontrados 77 compostos químicos, dos quais 14 foram identificados, entre eles o ácido palmítico (18,11%) ou ácido hexadecanóico. Trata-se de um ácido graxo saturado que, juntamente com os ácidos dodecanóico, tetradecanóico e oleico são constituintes comuns de óleos fixos (KASSUYA et al., 2009). Durante a extração do óleo essencial dos caules de *M. clavigera*, em aparato de Clevenger, o ácido palmítico, possivelmente, foi carregado juntamente com os demais componentes voláteis.

Assim como descrito para as folhas, a composição do óleo essencial dos caules de *M. clavigera* foi exclusivamente de sesquiterpenos, sendo os compostos majoritários o espatulenol (3,95%) e óxido de cariofileno (1,25%).

O cromatograma obtido a partir da análise de CG/EM do óleo essencial dos caules de *M. clavigera* está representado na FIGURA 28. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2008 – banco de dados do sistema.

FIGURA 28 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DOS CAULES DE *M. clavigera*



FONTE: A autora (2019).

5.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.8.1 Avaliação da atividade alelopática

Alelopatia está relacionada à capacidade de uma espécie vegetal exercer efeito benéfico ou maléfico no crescimento e desenvolvimento de outras espécies, através da produção de compostos químicos (aleloquímicos) liberados no ambiente (SILVA et al., 2018).

5.8.1.1 Teste de germinação

Diversas maneiras de mensurar a germinação foram desenvolvidas, dentre elas, a porcentagem de germinação (%G). Representando a porcentagem de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas a germinar sob determinadas condições experimentais, é uma forma simples de avaliar o processo germinativo. Entretanto, não reflete quanto tempo foi necessário para que as sementes determinado grau de germinação (LABOURIAU, 1983; BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Uma abordagem cinética envolve o tempo médio de germinação (TMG), que corresponde à média de tempo necessário para um conjunto de sementes germinar. Outra forma utilizada é o cálculo da velocidade média de germinação (VMG), de relação inversa ao TMG. O índice de velocidade de germinação (IVG) contabiliza o número de sementes ou plântulas normais diariamente, trazendo estimativa cinética (MAGUIRE, 1962; BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

O teste de germinação avaliou as influências do óleo essencial das folhas e extratos brutos etanólicos de folhas (EBF) e caules (EBC) em sementes de alface e cebola em relação à VMG, TMG, IVG e %G. As atividades das amostras foram comparadas e as significâncias avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey (95% de confiança).

5.8.1.1.1 Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas de *M. clavigera* na germinação de *L. sativa*.

Como observa-se no GRÁFICO 3, VMG de sementes de alface é similar entre as amostras, exceto para DMSO 1% que é cerca de 50% inferior quando comparada à água. Apesar disso, TMG de DMSO 1% é próximo ao observado nas sementes expostas à água. O TMG de sementes expostas aos extratos brutos etanólicos foi superior às expostas à água e DMSO 1%, indicando um possível atraso na germinação em sementes de alface. O IVG foi o coeficiente que mais variou, sendo que todos os extratos atingiram valores inferiores à água.

GRÁFICO 3 – INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CAULES EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE *L. sativa*.



FONTE: A autora (2019).

A variação de IVG significativamente dispare foram separadas em grupos distintos, como observa-se na TABELA 15. Diferem significativamente da água as amostras EBF250, EBF500, EBF750, EBC250 e EBC500, apresentando IVG inferiores. As porcentagens de germinação consideradas estatisticamente diferentes da água são EBF500 e EBC1000. DMSO 1% ocasionou germinação 55% inferior à observada em água e em grande parte dos extratos.

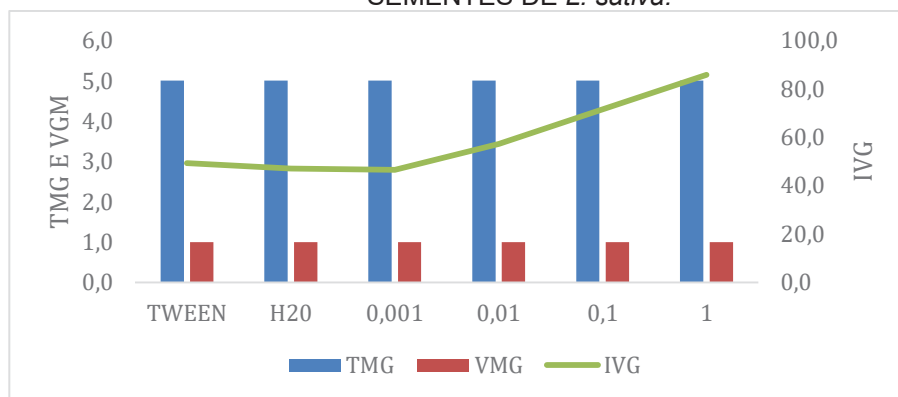
TABELA 15 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE *M. clavigera* NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa*.

Amostra	% germinação	IVG	TMG	VMG
DMSO 1%	45 ^D	121,1 ^A	4,2	0,5
H ₂ O	100 ^A	101,2 ^{AB}	4,3	1,2
EBF100	100 ^A	89,7 ^{AB}	4,4	1,1
EBF250	100 ^A	83,7 ^B	4,5	1,1
EBF500	90 ^{ABC}	79,9 ^B	4,4	1,0
EBF750	100 ^A	80,0 ^B	4,5	1,1
EBF1000	100 ^A	90,7 ^{AB}	4,5	1,1
EBC100	100 ^A	98,6 ^{AB}	4,9	1,0
EBC250	100 ^A	83,7 ^B	4,5	1,1
EBC500	100 ^A	81,3 ^B	4,5	1,1
EBC750	100 ^A	98,6 ^{AB}	4,9	1,0
EBC1000	95 ^{AB}	99,3 ^{AB}	5,0	1,0

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

Em relação ao óleo essencial das folhas, como pode ser observado no GRÁFICO 4, não houve variação em VMG assim como em TMG entre as amostras avaliadas. O IVG das concentrações menores de óleo essencial é próximo ao observado em água, ao passo que as concentrações 0,1% e 1% são superiores, caracterizando a influência das amostras como dose dependentes. A TABELA 16 apresenta a significância da variação de IVG, sendo as referidas concentrações de óleo essencial estatisticamente superiores ao IVG observado em água, indicando influência positiva na velocidade de germinação. Não houve diferença na taxa de germinação das sementes de alface entre as amostras avaliadas.

GRAFICO 4 – INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE *L. sativa*.

FONTE: A autora (2019).

TABELA 16 - ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera* NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa*.

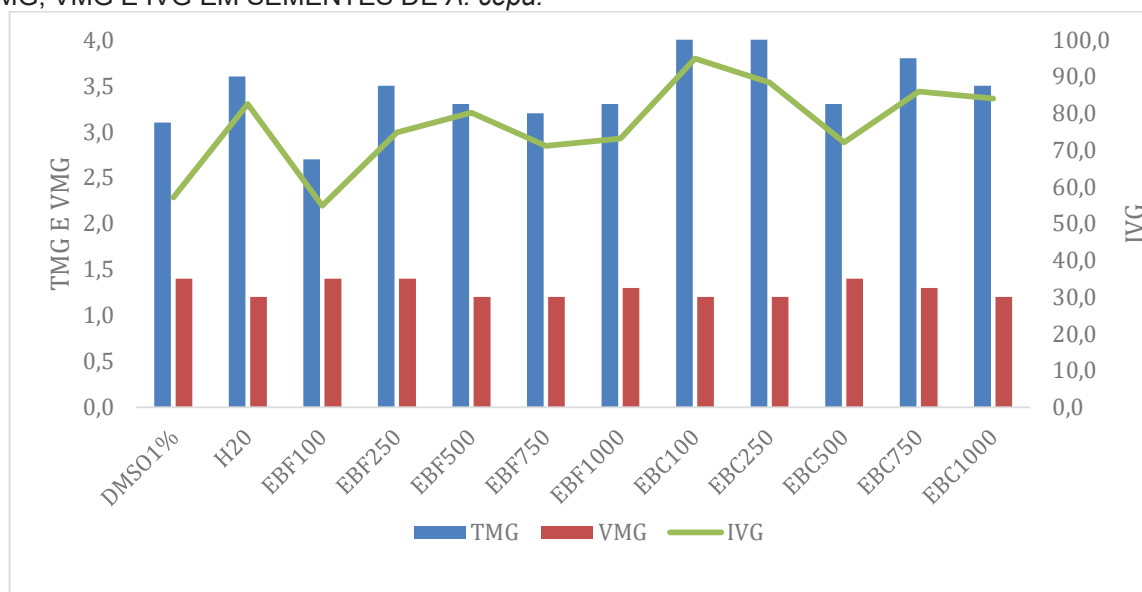
Amostra	% germinação	IVG	TMG	VMG
TWEEN	100 ^A	49,2 ^C	5,0	1,0
H ₂ O	100 ^A	47,0 ^C	5,0	1,0
0,001%	100 ^A	46,4 ^C	5,0	1,0
0,01%	100 ^A	57,1 ^C	5,0	1,0
0,1%	100 ^A	71,4 ^B	5,0	1,0
1%	100 ^A	85,7 ^A	5,0	1,0

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise

FONTE: A autora (2019).

5.8.1.1.2 Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas de *M. clavigera* na germinação de *A. cepa*.

Observando o GRÁFICO 5, verifica-se que VMG das sementes de cebola expostas às amostras é similar às expostas à água. O TMG apresentou maior variação quando comparado à água, sendo superado apenas em EBC100, EBC250 e EBC750, indicando atraso na germinação.

GRÁFICO 5 – INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CAULES EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE *A. cepa*.

FONTE: A autora (2019).

As variações observadas no IVG das sementes expostas às amostras não foram consideradas significantes, como pode ser observado na TABELA 17. A

porcentagem de germinação em água é considerada semelhante apenas à EBF250, EBC100, EBC 250 e EBC750 (TABELA 17). DMSO 1%, EBF500, EBF1000, EBC500 e EBC1000 foram agrupados em grupo intermediário, que não é considerado diferente de maneira significativa a ponto de pertencer a um grupo distinto, como ocorre com EBF100 e EBF750. Estes indicam influência negativa na taxa de germinação das sementes de cebola de maneira estatisticamente significativa.

TABELA 17 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE *M. clavigera* NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *A. cepa*.

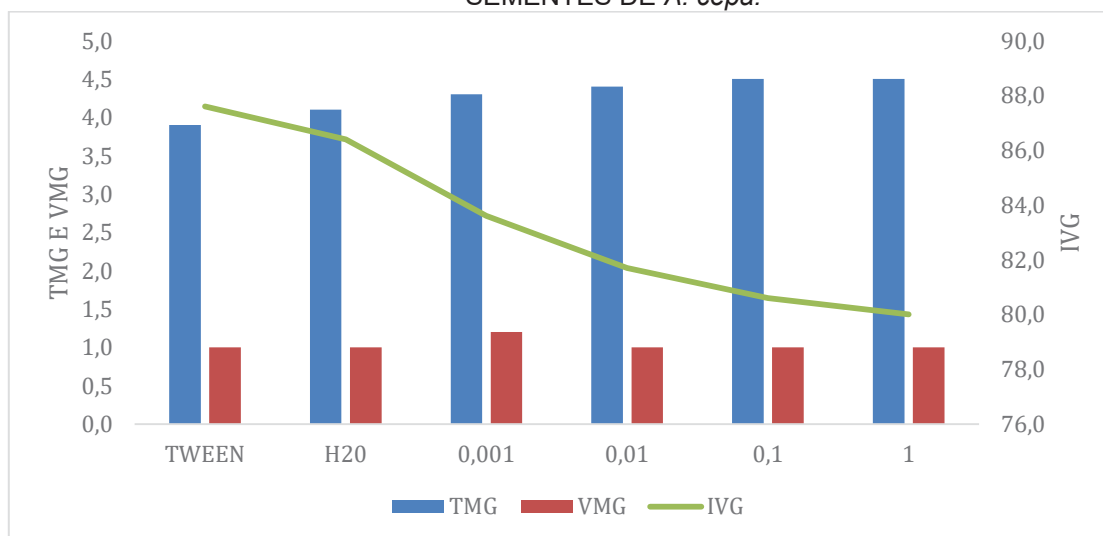
Amostra	% germinação	IVG	TMG	VMG
DMSO 1%	80 ^{AB}	57,1 ^A	3,1	1,4
H ₂ O	100 ^A	82,5 ^A	3,6	1,2
EBF100	75 ^B	54,8 ^A	2,7	1,4
EBF250	95 ^A	74,8 ^A	3,5	1,4
EBF500	80 ^{AB}	80,2 ^A	3,3	1,2
EBF750	75 ^B	71,1 ^A	3,2	1,2
EBF1000	85 ^{AB}	73,1 ^A	3,3	1,3
EBC100	95 ^A	94,9 ^A	4,0	1,2
EBC250	95 ^A	88,4 ^A	4,0	1,2
EBC500	85 ^{AB}	72,1 ^A	3,3	1,4
EBC750	100 ^A	85,9 ^A	3,8	1,3
EBC1000	85 ^{AB}	84,0 ^A	3,5	1,2

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

No GRÁFICO 6, pode-se observar que VMG é similar em todas as amostras avaliadas em sementes de cebola. O TMG foi superior nas concentrações de óleo essencial em comparação à água. A TABELA 18 expõe que, apesar das variações no IVG as amostras são agrupadas juntamente, indicando que não há diferença estatística entre elas. A %G observada nas sementes de cebola expostas à água assemelha-se estatisticamente às concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% de óleo essencial. A menor concentração de óleo essencial empregada (0,001%) provocou influência positiva na porcentagem de germinação, atingindo 100% de sementes germinadas, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo da água e Tween (que influenciou negativamente a germinação das sementes).

GRÁFICO 6 – INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS EM TMG, VMG E IVG EM SEMENTES DE *A. cepa*.



FONTE: A autora (2019).

TABELA 18 - ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera* NO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *A. cepa*.

Amostra	% germinação	IVG	TMG	VMG
TWEEN	80 ^B	87,6 ^A	3,9	1
H ₂ O	85 ^{AB}	86,4 ^A	4,1	1
0,001%	100 ^A	83,6 ^A	4,3	1,2
0,01%	90 ^{AB}	81,7 ^A	4,4	1
0,1%	90 ^{AB}	80,6 ^A	4,5	1
1%	90 ^{AB}	80 ^A	4,5	1

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise

FONTE: A autora (2019).

5.8.1.2 Teste de crescimento

O teste de crescimento avaliou a atividade do óleo essencial, extrato bruto etanólico das folhas e caules no desenvolvimento da radícula e hipocótilo de alface e cebola. As médias dos tamanhos de cada estrutura foram comparadas às médias observadas em água, observando as influências em seu crescimento (FIGURA 29 e 30). Aplicando o teste de Tukey (95% de confiança), pode-se verificar estatisticamente as significâncias das influências indicadas pela análise comparativa de médias (TABELA 19 e 21).

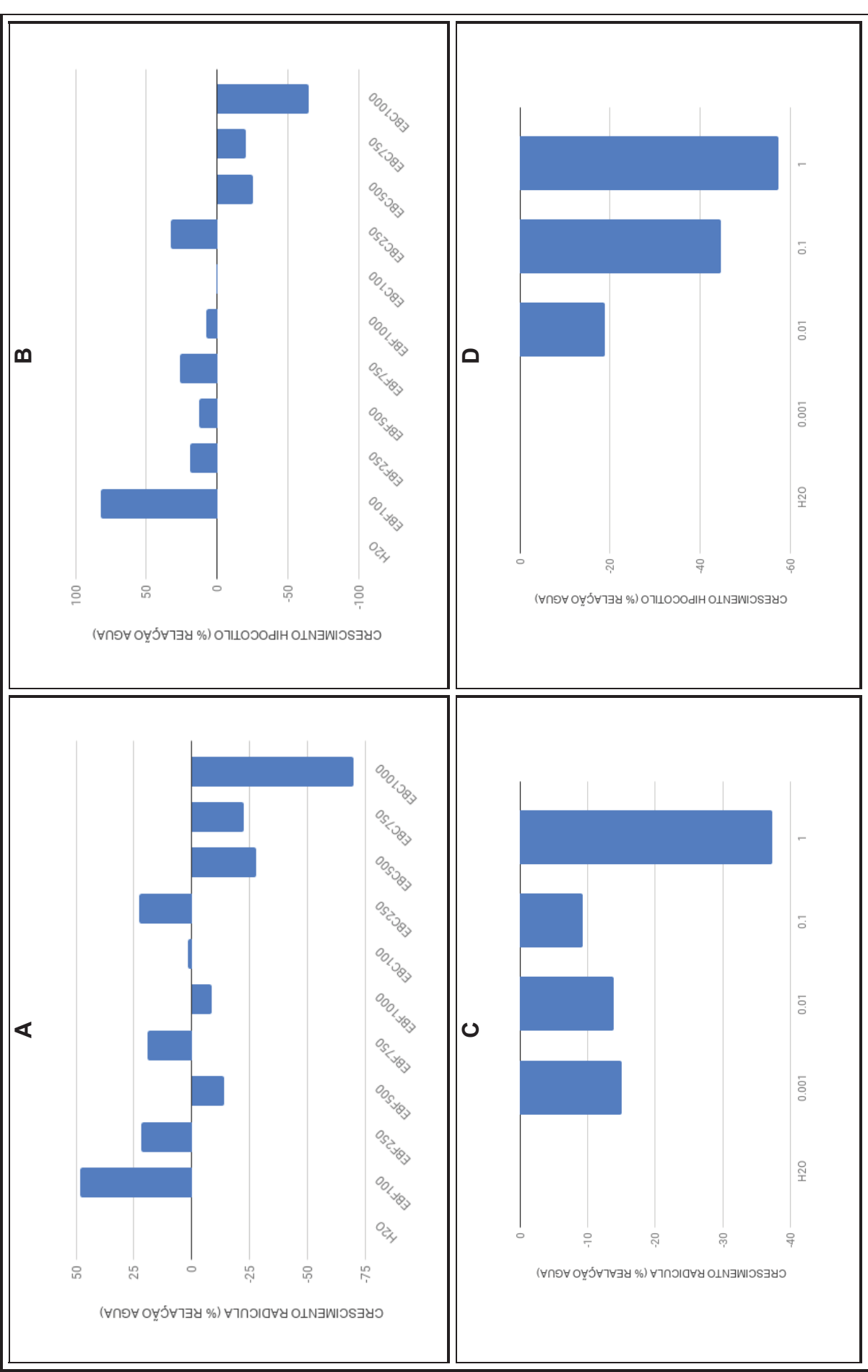
5.8.1.2.1 Influência dos extratos brutos etanólicos de folhas e caules e óleo essencial de folhas no crescimento de *L. sativa*

Em relação ao crescimento da radícula de alface, a FIGURA 29A indica influência positiva de EBF100, EBF250, EBF750 e EBC250 quando comparadas à atividade da água, enquanto EBF500, EBF1000, EBC500, EBC750 e EBC1000 demonstraram influência negativa. A significância estatística destas aparentes influências (TABELA 19) evidencia que EBF100 exerce influência positiva no crescimento da radícula, apesar de compartilhar similaridades com a água, enquanto EBC1000 diferencia-se significativamente da atividade da água, exercendo influência negativa sobre o crescimento da radícula de alface.

Em relação ao crescimento do hipocótilo de alface (FIGURA 29B), todas as concentrações de extrato bruto etanólico das folhas indicaram influência positiva em relação à água, enquanto o extrato bruto etanólico dos caules apontou influência negativa (exceto EBC250, que exerceu aparente influência positiva, e EBC100, que apresentou atividade similar à água). A TABELA 19 expõe que água e DMSO 1% são considerados similares à EBF500, EBF1000 e EBC100, portanto suas aparentes influências não são consideradas significantes. EBF100 e EBC1000 diferenciaram-se significativamente da água, EBF100 estimulando o crescimento do hipocótilo de alface enquanto EBC1000 influenciou negativamente.

Em ambas as características avaliadas no ensaio de crescimento em alface, EBF100 apresentou influência positiva enquanto EBC1000 interferiu negativamente no desenvolvimento das estruturas, quando comparados à água.

FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera* EM SEMENTES DE *L. sativa*



Fonte: A autora (2019).

TABELA 19 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* EM EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*.

Amostras ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Radícula (mm)				Hipocótilo (mm)			
	EBF	EBC	ÁGUA	DMSO	EBF	EBC	AGUA	DMSO
100	12,3 ^A	8,4 ^{A,B,C}	8,3 ^{A,B,C}	4,2 ^{C,D}	28,4 ^A	15,8 ^B	15,6 ^B	16,0 ^B
250	10,1 ^{A,B}	10,2 ^{A,B}	8,3 ^{A,B,C}	4,2 ^{C,D}	18,7 ^{A,B}	20,7 ^{A,B}	15,6 ^B	16,0 ^B
500	7,2 ^{A,B,C,D}	6,0 ^{B,C,D}	8,3 ^{A,B,C}	4,2 ^{C,D}	17,7 ^B	11,7 ^{B,C}	15,6 ^B	16,0 ^B
750	9,9 ^{A,B}	6,4 ^{B,C,D}	8,3 ^{A,B,C}	4,2 ^{C,D}	19,7 ^{A,B}	12,5 ^{B,C}	15,6 ^B	16,0 ^B
1000	7,6 ^{A,B,C,D}	2,5 ^D	8,3 ^{A,B,C}	4,2 ^{C,D}	16,9 ^B	5,5 ^C	15,6 ^B	16,0 ^B

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

Observando a FIGURA 29C e 29D, verifica-se a influência negativa do óleo essencial no crescimento do hipocótilo e radícula de alface em relação à água. Porém, a TABELA 20 evidencia que não há diferença significativa entre as concentrações de óleo essencial, água e Tween no crescimento de radícula. Em relação ao hipocótilo, 1% de óleo essencial ocasiona influência negativa estatisticamente significativa quando comparado à água, ao passo que 0,001% de óleo essencial inferiu influência positiva significativa, apesar de compartilhar semelhanças com o grupo da água. Portanto, a radícula não sofreu influência significativa em contato com óleo essencial, porém o hipocótilo sofreu influência negativa na presença das maiores concentrações (0,1% e 1%) e moderado estímulo na menor concentração (0,001%).

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *L. sativa* EM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*.

Amostras	Radícula (mm)			Hipocótilo (mm)		
	Óleo	Água	Tween	Óleo	Água	Tween
0,001%	7,1 ^A	8,3 ^A	7,1 ^A	17,1 ^A	15,6 ^{A,B}	12,4 ^{A,B,C}
0,01%	7,2 ^A	8,3 ^A	7,1 ^A	12,7 ^{A,B,C}	15,6 ^{A,B}	12,4 ^{A,B,C}
0,1%	7,5 ^A	8,3 ^A	7,1 ^A	8,7 ^{B,C}	15,6 ^{A,B}	12,4 ^{A,B,C}
1%	5,2 ^A	8,3 ^A	7,1 ^A	6,7 ^C	15,6 ^{A,B}	12,4 ^{A,B,C}

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

5.8.1.2.2 Influência dos extratos brutos etanólicos das folhas e caules e óleo essencial das folhas no crescimento de *A. cepa*

Em relação ao crescimento da radícula de cebola, pode-se observar na FIGURA 30A aparente influência positiva do extrato bruto das folhas (exceto EBF1000) e influência negativa do extrato bruto dos caules (exceto EBC100 e EBC500) em comparação à água. Avaliando a significância das influências na TABELA 21, verifica-se que EBF100 exerce estímulo, enquanto EBF1000 exerce influência negativa, assim como EBC250. Quando comparados à água, EBC750 e EBC1000 influenciaram negativamente o desenvolvimento da radícula, sendo considerados mais inibidores que EBF1000 e EBC250.

O crescimento do hipocótilo (FIGURA 30B) foi aparentemente inibido pelos extratos brutos de folhas e caules de maneira dose dependente e diretamente proporcional quando comparados à água. A TABELA 21 diferencia estatisticamente todas as amostras da atividade da água (exceto EBF100), trazendo destaque ao poder inibitório de EBF250, EBF500, EBF750 e EBC750, seguido de EBC1000 e, especialmente, EBF1000.

Evidenciando o poder inibitório dos extratos brutos em cebola, traz-se destaque à EBF1000 e EBC1000, que ocasionaram maior poder inibitório no crescimento de hipocótilo e radícula, respectivamente.

A atividade do óleo essencial das folhas observada na FIGURA 30C e 30D indica influência negativa no crescimento de cebola quando comparado água (exceto 0,01% em radícula). Como pode-se observar na TABELA 22, não houve influência com significância estatística no crescimento de radícula. A aparente influência negativa do óleo essencial no hipocótilo em foi significativa apenas na maior concentração (1%), sendo considerado distinto da água.

TABELA 21 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *A. cepa* EM EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*.

Amostras ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Radícula (mm)				Hipocótilo (mm)			
	EBF	EBC	AGUA	DMSO	EBF	EBC	AGUA	DMSO
100	12,9 ^A	10,2 ^{A,B}	7,4 ^{A,B,C}	10,0 ^{A,B}	29,0 ^A	26,0 ^{A,B}	29,4 ^A	27,6 ^{A,B}
250	8,8 ^{A,B,C}	4,1 ^{B,C}	7,4 ^{A,B,C}	10,0 ^{A,B}	21,5 ^{A,B,C}	26,0 ^{A,B}	29,4 ^A	27,6 ^{A,B}
500	9,2 ^{A,B,C}	10,3 ^{A,B}	7,4 ^{A,B,C}	10,0 ^{A,B}	18,7 ^{A,B,C}	24,8 ^{A,B}	29,4 ^A	27,6 ^{A,B}
750	8,3 ^{A,B,C}	3,1 ^C	7,4 ^{A,B,C}	10,0 ^{A,B}	15,3 ^{A,B,C}	18,9 ^{A,B,C}	29,4 ^A	27,6 ^{A,B}
1000	5,2 ^{B,C}	3,5 ^C	7,4 ^{A,B,C}	10,0 ^{A,B}	10,0 ^C	13,9 ^{B,C}	29,4 ^A	27,6 ^{A,B}

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

TABELA 22 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *A. cepa* EM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*.

Radícula (mm)				Hipocótilo (mm)		
Amostras	Óleo	Água	Tween	Óleo	Água	Tween
0,001%	6,4 ^A	7,4 ^A	8,9 ^A	27,4 ^A	29,4 ^A	17,9 ^{A,B}
0,01%	7,8 ^A	7,4 ^A	8,9 ^A	21,5 ^A	29,4 ^A	17,9 ^{A,B}
0,1%	5,5 ^A	7,4 ^A	8,9 ^A	14,6 ^{A,B}	29,4 ^A	17,9 ^{A,B}
1%	4,3 ^A	7,4 ^A	8,9 ^A	6,6 ^B	29,4 ^A	17,9 ^{A,B}

Nota: Para cada coluna as letras sobrescritas iguais são estatisticamente equivalentes para o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, ao fim do sétimo dia de análise.

FONTE: A autora (2019).

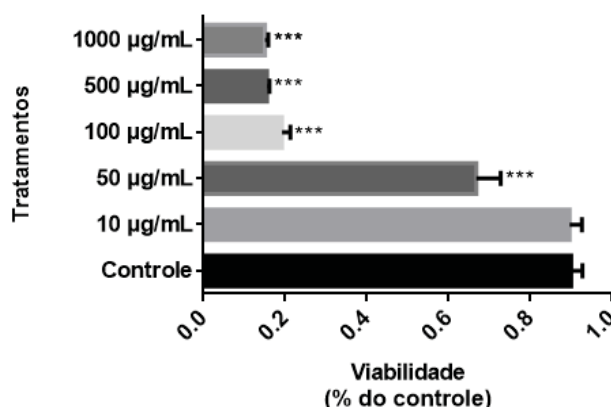
5.8.2 Avaliação da atividade citotóxica

5.8.2.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, baseado na capacidade de células viáveis reduzirem o sal de MTT, por meio de uma enzima mitocondrial (desidrogenase succínica), em cristais de formazan de cor azul púrpura que se acumulam no citoplasma celular. Este ensaio é empregado especificamente para a funcionalidade mitocondrial, avaliando a toxicidade das amostras.

A inibição da viabilidade celular ocorreu de forma dose dependente, ou seja, o aumento da concentração das amostras acarretou em redução da viabilidade celular.

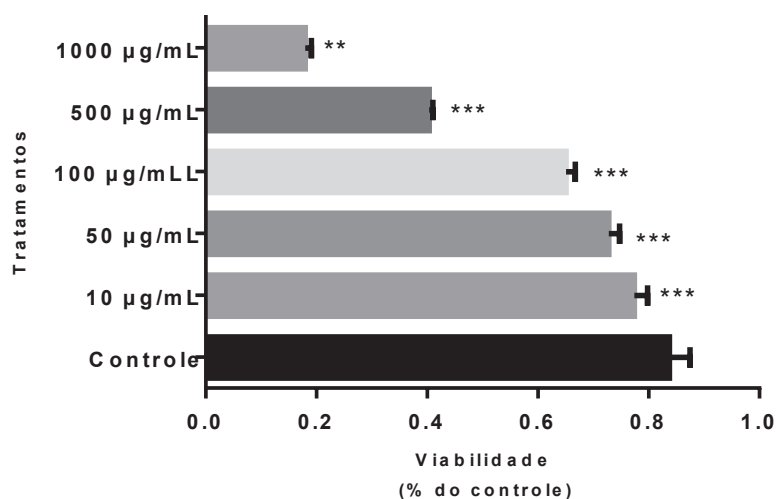
GRAFICO 7 – VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS NIH 3T3 TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



Nota: As células NIH 3T3 foram tratadas com o óleo essencial das folhas de *M. clavigera* nas concentrações 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL a 37°C por 24 horas e tratadas com MTT por 4 horas. O controle (células não tratadas) foi considerado 100%. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM de oito repetições. ***P<0,01 Controle x óleo essencial *M. clavigera* 50 µg/mL; ***P<0,01 Controle x óleo essencial *M. clavigera* 100 µg/mL; ***P<0,01 Controle x óleo essencial *M. clavigera* 500 µg/mL; ***P<0,01 Controle x óleo essencial *M. clavigera* 1000 µg/mL. FONTE: A autora (2019).

Em relação ao óleo essencial (GRÁFICO 7) percebe-se que na concentração de 50 µg/mL a viabilidade reduziu significativamente, evidenciando que a dose viável não deve ultrapassar a concentração de 10 µg/mL. Já para o extrato bruto etanólico das folhas (GRÁFICO 8) a redução da viabilidade celular é mais pronunciada em concentrações superiores. Isto reflete uma maior toxicidade do óleo essencial das folhas quando comparado ao extrato bruto etanólico das folhas.

GRAFICO 8 – VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS NIH 3T3 TRATADAS COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. clavigera*



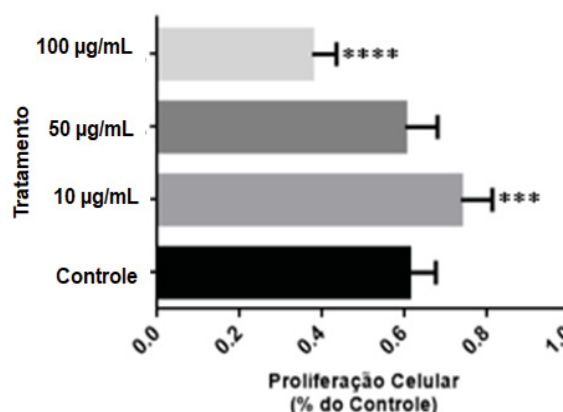
Nota: As células NIH 3T3 foram tratadas com o extrato das folhas de *M. clavigera* nas concentrações 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL a 37°C por 24 horas e tratadas com MTT por 4 horas. O controle (células não tratadas) foi considerado 100%. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM de oito repetições. ***P<0,0002 Controle x Extrato das folhas de *M. clavigera* 10 µg/mL; ***P<0,0002 Controle x extrato das folhas de *M. clavigera* 50 µg/mL; ***P<0,0002 Controle x Extrato das folhas de *M. clavigera* 100 µg/mL; ****P<0,001 Controle x Extrato das folhas *M. clavigera* 500 µg/mL; **P<0,0012 Controle x Extrato das folhas de *M. clavigera* 1000 µg/mL.
 FONTE: A autora (2019).

5.8.2.2 Ensaio de Proliferação Celular

Realizou-se o ensaio de proliferação celular através do emprego do corante cristal violeta, originalmente descrito como uma forma de obter dados quantitativos em relação à densidade celular presente em monocamadas de células cultivadas (GILLIES et al, 1986). O ensaio foi realizado apenas com amostra do extrato bruto etanólico das folhas de *M. clavigera*, devido à baixa viabilidade celular (10 µg/mL) na presença do óleo essencial.

O GRÁFICO 9 apresenta o resultado da exposição da linhagem celular NIH 3T3 ao extrato bruto etanólico das folhas de *M. clavigera* nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL.

GRÁFICO 9: PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS FIBROBLASTOS NIH 3T3 DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. clavigera*.



Nota: As células NIH 3T3 foram tratadas com o extrato das folhas de *M. clavigera* nas concentrações 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL por tempo de exposição de 48 horas. Estes dados representam o resultado de triplicata experimental e quadruplicata biológica. O controle (células não tratadas) foi considerado 100%. *** $P < 0,01$ Controle x Extrato das folhas de *M. clavigera* 10 µg/mL; **** $P < 0,001$ Controle x Extrato das folhas de *M. clavigera* 100 µg/mL.

FONTE: A autora (2019)

Em 48 horas de exposição verificou-se aumento estatisticamente significativo da proliferação celular na concentração de 10 µg/mL e uma diminuição significativa na concentração de 100 µg/mL.

O ensaio de proliferação celular tem como objetivo avaliar a capacidade de um determinado composto inibir ou estimular o crescimento celular (ALBERTS et al., 2004). Com base nos resultados encontrados, atesta-se a importância da realização ensaios mais aprofundados com o extrato bruto das folhas de *M. clavigera* em fibroblastos NIH 3T3, já que estas são células diretamente envolvidas no processo de reparação tecidual, como também em células de carcinoma.

6 CONCLUSÃO

Os resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos da espécie, perda por dessecação e cinzas totais, foram condizentes com o estabelecido pela Farmacopeia Brasileira. Resultados corroborados pela análise do perfil de degradação térmica das folhas e caules da espécie.

No estudo morfoanatômico caracterizou-se as folhas como hipoestomáticas, apresentando estômatos do tipo paracítico. Foram observados dois tipos de tricomas não glandulares unicelulares: simples e longos; curtos e ramificados. A nervura central plano-convexa apresentou feixes vasculares abertos em forma de arco, o pecíolo ligeiramente plano-convexo e os caules em formato circular, regiões onde encontrou-se cristais de oxalato. Ensaio histoquímico detectaram compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido e elementos lignificados.

No estudo fitoquímico, realizado na Università del Piemonte Orientale, foi possível isolar e identificar substâncias inéditas para a espécie na fração éter de petróleo das folhas: sesquiterpenos (α -selineno, β -selineno, óxido de cariofileno e espatulenol) e derivado porfirínico (feofitina *a*).

A sazonalidade influenciou no rendimento e composição química do óleo essencial das folhas de *M. clavigera*, demonstrando a importância da determinação da época de coleta mais adequada para obtenção de compostos químicos de interesse. Em análise cromatográfica (CG/EM) do óleo essencial dos caules de *M. clavigera* verificou-se a presença exclusiva de sesquiterpenos e identificou-se a presença majoritária de espatulenol (3,95%) e óxido de cariofileno (1,25%).

Na avaliação da atividade alelopática não foi observada influência de nenhuma amostra de *M. clavigera* no teste de germinação em sementes de alface. Entretanto, houve inibição da porcentagem de germinação em sementes de cebola expostas à EBF100 e EBF750, ao passo que foram favorecidas quando expostas à concentração de 0,001% de óleo essencial. Em relação ao teste de crescimento, pode-se observar estímulo às radículas de alface em EBF100, assim como para o hipocótilo, acompanhada de óleo essencial 0,001%. Em contrapartida EBC1000 provocou inibição em radículas, assim como no hipocótilo, juntamente a 0,1% e 1% de óleo essencial. As radículas de cebola foram estimuladas por EBF100 e inibidas por EBC750 e EBC1000, enquanto os hipocótilos foram inibidos por EBF1000, EBC1000 e óleo essencial 1%.

A avaliação da atividade citotóxica, através da viabilidade celular, mostrou maior toxicidade do óleo essencial das folhas quando comparado ao extrato bruto etanólico das folhas. Foi observado estímulo do extrato bruto etanólico das folhas na concentração de 10 µg/mL, enquanto a concentração de 100 µg/mL apresentou uma diminuição na proliferação celular.

Este trabalho consistiu em aprofundamento e complementação do estudo desenvolvido na dissertação de mestrado de Homem (2015), que embasou dados iniciais em relação à composição química e atividades biológicas de *M. clavigera* Tul. Anteriormente, o acervo bibliográfico da espécie limitava-se às caracterizações botânicas e geográficas. Desta forma, à luz dos resultados inéditos obtidos, a busca pelo isolamento e identificação de prováveis substâncias responsáveis pelas atividades biológicas, desenvolveu detalhada caracterização química dos extratos brutos e óleo essencial de folhas e caules desta espécie.

REFERÊNCIAS

- AHARONI, A. et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 49-58, 2006.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 235-331, 2004.
- ALONSO, J. In: **Tratado de fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas**. ISIS Ediciones SRL, 1038p. Buenos Aires, 1998.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** p.105 – 121, 2009.
- ARAGÃO, C. F. S. et al. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 60-61, 2002.
- ARANGO, O. et al. Study of extraction conditions of “laurel de cera” (*Morella pubescens*) essential oil by means of steam distillation. **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, v.7, p. 40-48, 2009.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p. 269-276, 2006.
- ARAÚJO, E. J. F. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas básicas e Aplicadas**, v.35, p. 355-361, 2014.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Edufes, 624p. Vitória, 2008.
- BARNES, J. P. et al. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.
- BARROS, C. F. et al. Anatomia ecológica e micromorfologia foliar de espécies de floresta montana na reserva ecológica de Macaé de Cima, p.275-296. In: LIMA, H. C.; GUEDES, B. R. R. **Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica**. 345p. Rio de Janeiro, 1997.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: Systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, v.1, p. 345-355, 2008.
- BASILA, D.; YUAN C. S. Effects of dietary supplements on coagulation and platelet function. **Thrombosis Research Journal**, v.117, p. 49-53, 2005.

BATALHA, A. P. **Anatomia e perfil lignoídico do lenho e das folhas de *Mollinedia schottiana* (Spreng.) Perkins**. 96f. Dissertação de mestrado em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

BEÇAK, W. ; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v. 1, p. 33-37, 1976.

BENÍCIO, D. A. et al. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos - Paraíba. **Anais eletrônicos do VI congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande**. Paraíba, 2009.

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

BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.209-222, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. 399 p. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

CALLADO, C. H. et al. Anatomia do lenho de espécies da Mata Atlântica: Interpretação ecológica e indicações para aproveitamento, 251-273. In: LIMA, H. C.; GUEDES-BRUNI, R. R. **Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica**. 345p. Rio de Janeiro, 1997.

CARR, G. et al. Hortonones A to C, Hydroazulenones from the Genus *Hortonia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1189-1191, 2012.

CLAROS, B. M. G. et al; Chemical constituents of two *Mollinedia* species. **Phytochemistry**, v. 55, p. 859-862, 2000.

COSTA, F. F. et al. Leaf Anatomy and histochemistry of *Macropeplus dentatus* (Perkins) I. Santos & Peixoto and *Macropeplus ligustrinus* (Tul.) Perkins (Monimiaceae). **Acta botanica Brasilica**, v. 24, p. 852-861, 2010.

DOLPHIN, D. **The porphyrins - Physical Chemistry**. Part C (vol. V). New York: Academic press, 1978.

DUQUE, J. F. S. et al. Valoración del potencial antioxidante de *Mollinedia racemosa* (romadizo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, p. 151-163, 2011.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 293p., 1976.

FAHN, A. **Plant anatomy**. New York: Pergamon Press, 544 p., 1982.

FARIAS, M. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Fundação Oswaldo Cruz. 6. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2019.

FERNANDEZ, J. et al. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. **Phytotherapy Research**, v. 23, p.1024 -1027, 2009.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2 ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

GALLORI, S. et al. Identification of Volatile Constituents of *Tambourissa leptophylla*. **Planta Medica**, v. 67, p. 290-292, 2001.

GARG, D. et al. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v.2, p.41-46, 2012.

GEORGE, S. et al. Cytotoxicity screening of Bangladesh medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.10, p. 1-11, 2010.

GILLIES, R. J. et al. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, Colorado, v. 1, n. 159, p.109-113, 1986.

GOBBO-NETO L.; LOPES N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GUERREIRO, K. K. et al. Análise farmacobotânica de folha e caule de *Tanacetum vulgare* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, p.89-95, 2015.

HOMEM, I. C. M. **Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae)** 106 f. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HUANG, X. et al. Proteasome and NF-κB Inhibiting Phaeophytins from the Green Alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. 12, p. 587-92, 2007.

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

JUSSIEU, A. I. Mémoire sur les Monimiées, nouvel orde de plantes. **Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v.14, p.116-135, 1809.

KASSUYA, C. A. L. et al. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.06, p.919-921, 2009.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, p. 170, 1983.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima. 531p. 2000.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Record, 1997.

LEITÃO, G. G. et al. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 87-102, 1999.

LHULLIER, A. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes Malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 2007.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 197-201, 2006.

LIRIO, E. J. et al. Monimiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10077>>. Acesso em: 11/2018.

LOPEZ, J. A. et al. Mollinedine, a new alkaloid from *Mollinedia costaricensis*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 754-759, 1988.

MACIAS, F. A. et al. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlig emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n.1, p.176-177,1962.

MARQUES, C. A. et al. Anatomia e análise de óleo essencial das folhas de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 95-105, 2009.

MAZUTTI, M. et al. Chemical profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* Molina) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.25, n.2, p. 427-434, 2008.

MERIÇ C., Calcium oxalate crystals in some species of the Tribe Inuleae (Asteraceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.51, p.105-110, 2009.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: systematic anatomy of the leaf and stem. 2 ed. Oxford: Clarendon, v. 1, p. 276, 1987.

MIRANDA, M. L. D. et al. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v.37, n.3, p. 473-476, 2014.

MONEY, L. L. et al. The morphology and relationships of the Monimiaceae. **Journal of the Arnold Arboretum**, v.31, p.371- 403, 1950.

MONTANARI C. A.; BOLZANI V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, D. L.; LEITÃO, G. G. Quantitative Determination of Liriodenine and Moupinamide in Five Species of *Mollinedia* by High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 4, p. 223-225, 2001.

MOREIRA, I. C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.55-58, 2007.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUKAKA, M. M. **A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research**. **Malawi Medical Journal**, v.24, p. 69-71, 2012.

MURILLO, E. et al. Química y Funcionalidad Biológica de *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae). **Información Tecnológica**, v. 22, p. 3-14, 2011.

O'BRIEN, T.P, et al. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

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

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4. p. 162-174, 2013.

OWEN, S. M.; PEÑUELAS, J. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 9, p. 420-426, 2005.

PEREIRA, B. L. C. et al. Estudo da degradação térmica da madeira de *Eucalyptus* através de termogravimetria e calorimetria. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.567-576, 2013.

PHILIPSON, W. R. A classification of the Monimiaceae - an additional note. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 8, n. 1, 1988.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45 -61, 2002.

QUEZADA, N. et al, Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. **Journal Food Science**, v. 69, p. C371-C376, 2004.

RATNAYAKE, R. et al. Bioactivity and chemistry of the genus *Hortonia*. **Natural products Research**, v. 22, n.16, p.1393-1402, 2008.

REFLORA. Flora do Brasil 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em 11/2018.

RENNER, S. S. et al. Biogeography of the Monimiaceae (Laurales): a role for East Gondwana and long-distance dispersal, but not West Gondwana. **Journal of Biogeography**, v. 37, p.1227-1238, 2010.

RUIZ, A. L. T. G. et al. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.18, p. 295-300, 2008.

SANCHEZ-PERALTA, W. E. et al. Caracterización química preliminar y evaluación de la actividad antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo de los extractos y fracciones de diferente polaridad de *Mollinedia racemosa* (Romadizo). **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacêutica**, v. 21, 2014.

SANDES, A. R. R.; DI BIASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 13, p. 28-32, 2000.

SANTOS, C. Z. A. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Peumus boldus* (Monimiaceae) frente à levedura da espécie *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, v.15, n.2, p. 43-50, 2014.

SANTOS, I. S.; PEIXOTO, A. L. Taxonomia do gênero *Macropeplus* Perkins (Monimiaceae, Monimioideae). **Rodriguesia**, v. 52, p. 65-105, 2001.

SANTOS, R. F. et al. Chemical composition and productivity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. as affected by organic compound. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, p. 224-234, 2012.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

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

SCHENKEL E. P. et al. Plantas tóxicas. In: Simões C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC e UFRGS, 6 ed. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SHIOI, Y. et al. Breakdown of chlorophylls by soluble proteins extracted from leaves of *Chenopodium album*. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 416-421, 1995.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophyll in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SCHWIKKARD, S. L. Phaeophytins from *Tapura fischeri*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2391- 2394, 1998.

SILVA, E. S. et al. Scenario of research on allelopathy in Brazil and its potential as a strategy to reduce the use of pesticides that cause environmental pollution: an integrative review. **Diversitas Journal**, v.3, n.2 p. 442-454, 2018.

SIMÕES, C. M. O. ; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 18, Óleos voláteis. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SOLEREDER, H. **Systematic Anatomy of The Dicotyledons**. London, Oxford: Clarendon Press, v.2, p. 699-702, 1908.

SOUZA, A. S. L. **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos**. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SOUZA, T. J. T. et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

STAEDLER, Y. M.; ENDRESS, P. K. Diversity and lability of floral phyllotaxis in the pluricarpellate families of core Laulares (Gormotegaceae, Atherospertaceae, Siparunaceae e Monimiaceae). **International Journal of Plant Science**, p. 522-550, 2009.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 888p., 2017.

TRÓPICOS. Disponível em: www.tropicos.org/Name/100351648?projectid=3, Acesso em: 05/ 2018.

VALLE, J. M. et al. Extraction of Boldo (*Peumus boldus* M.) Leaves with Supercritical CO₂ and Hot Pressurized Water. **Food Research International**, v.38, p. 203-213, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILA, R. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Médica**, v. 65, p. 178-179, 1999.

VOGEL, H. et al. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus*). **Planta Médica**, v.65, p. 90-91, 1999.

WANG, G. et al. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 62, p. 881-893, 2005.

WILLIAMS, H. J. et al. Diversity in cyclic sesquiterpene production by *Gossypium hirsutum*. **Phytochemistry**, v.40, p. 1633-1636, 1995.

YODER, B. J. et al. Tambouranolide, a new cytotoxic hydroxybutanolide from a *Tambourissa* sp. (Monimiaceae). **Natural Product Research**, v. 21, p. 37-41, 2007.

YOUN, Y. C. et al. Protective effect of boldine on dopamine induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 495-505, 2002.

ANEXOS

FIGURA 31 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM FEVEREIRO DE 2015

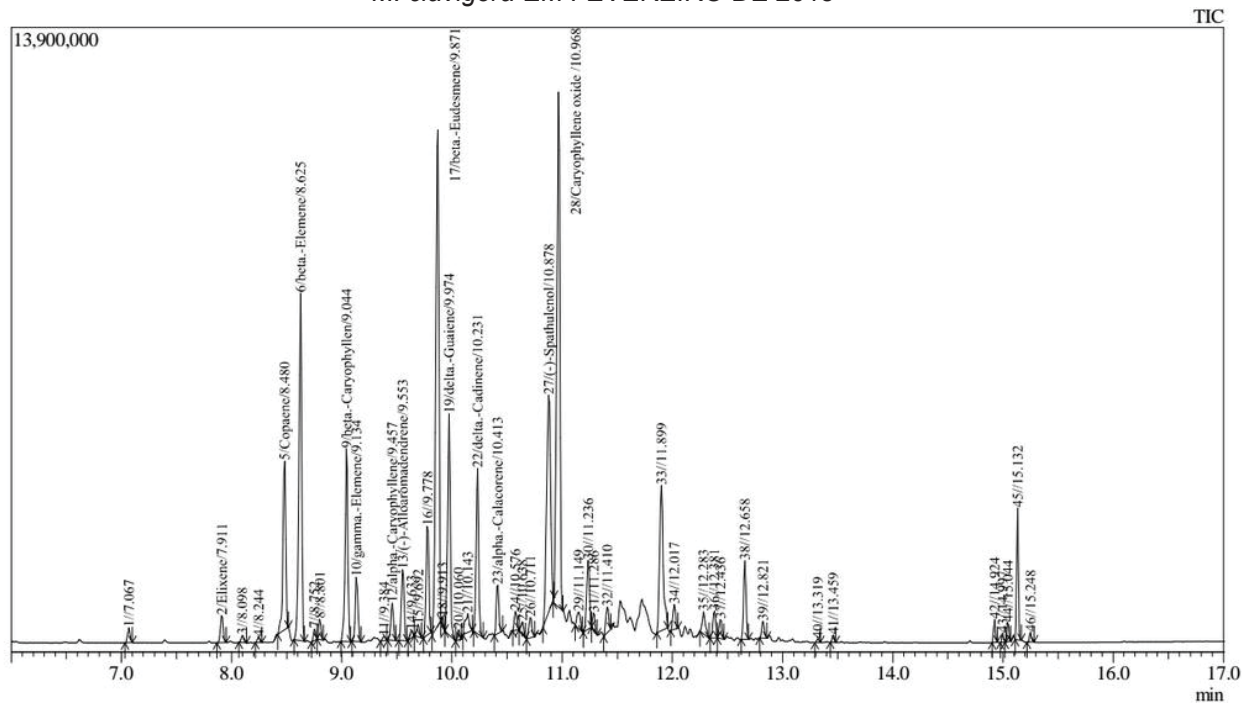


FIGURA 32 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM MARÇO DE 2015

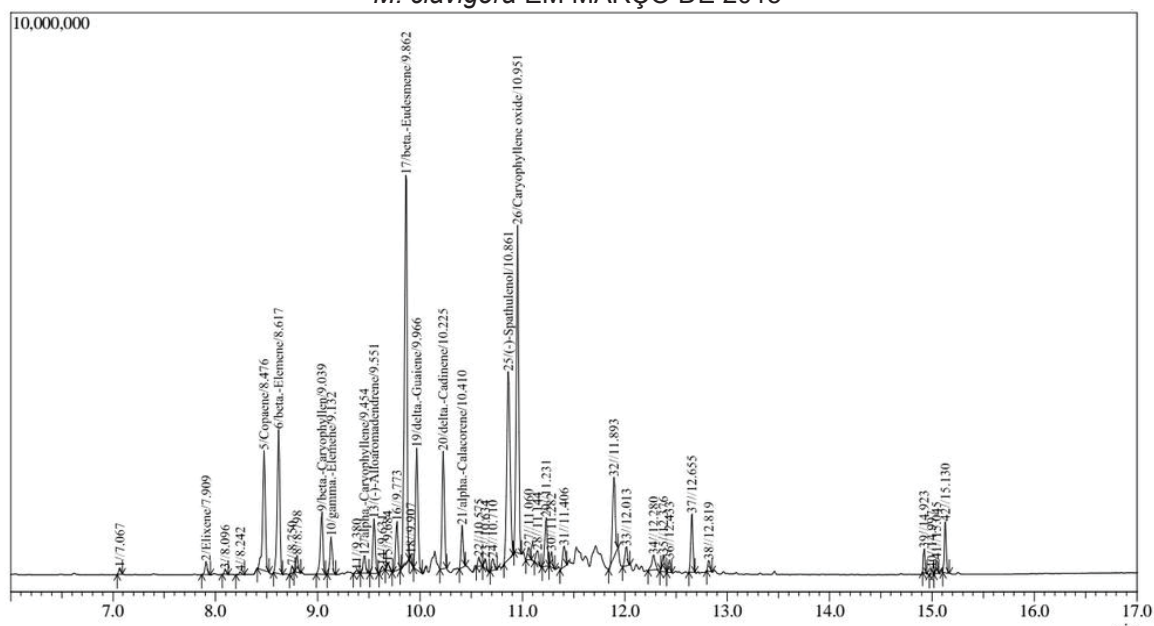


FIGURA 33 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM ABRIL DE 2015

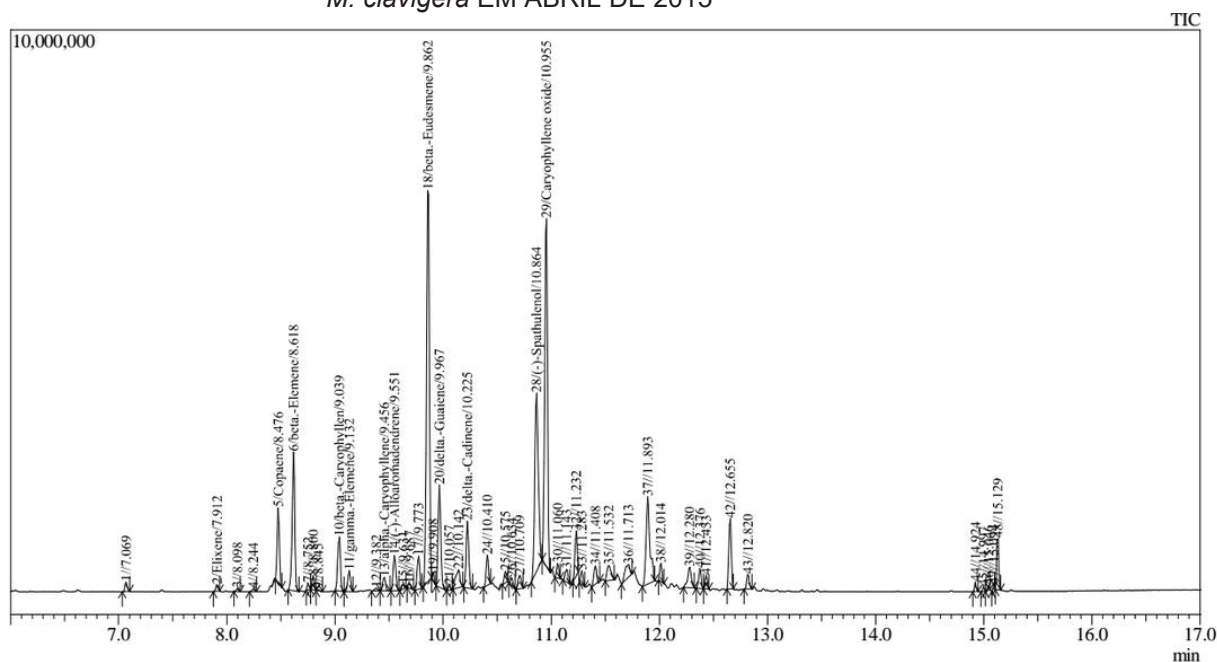


FIGURA 34 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM MAIO DE 2015

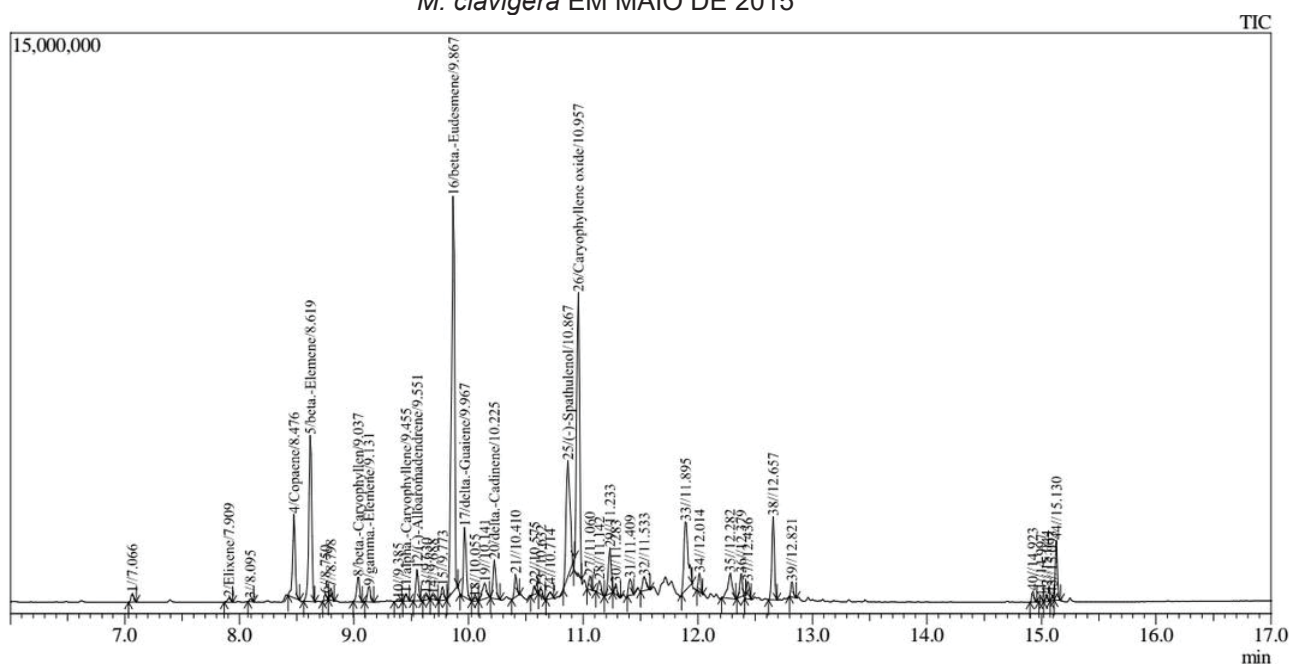


FIGURA 35 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM JUNHO DE 2015

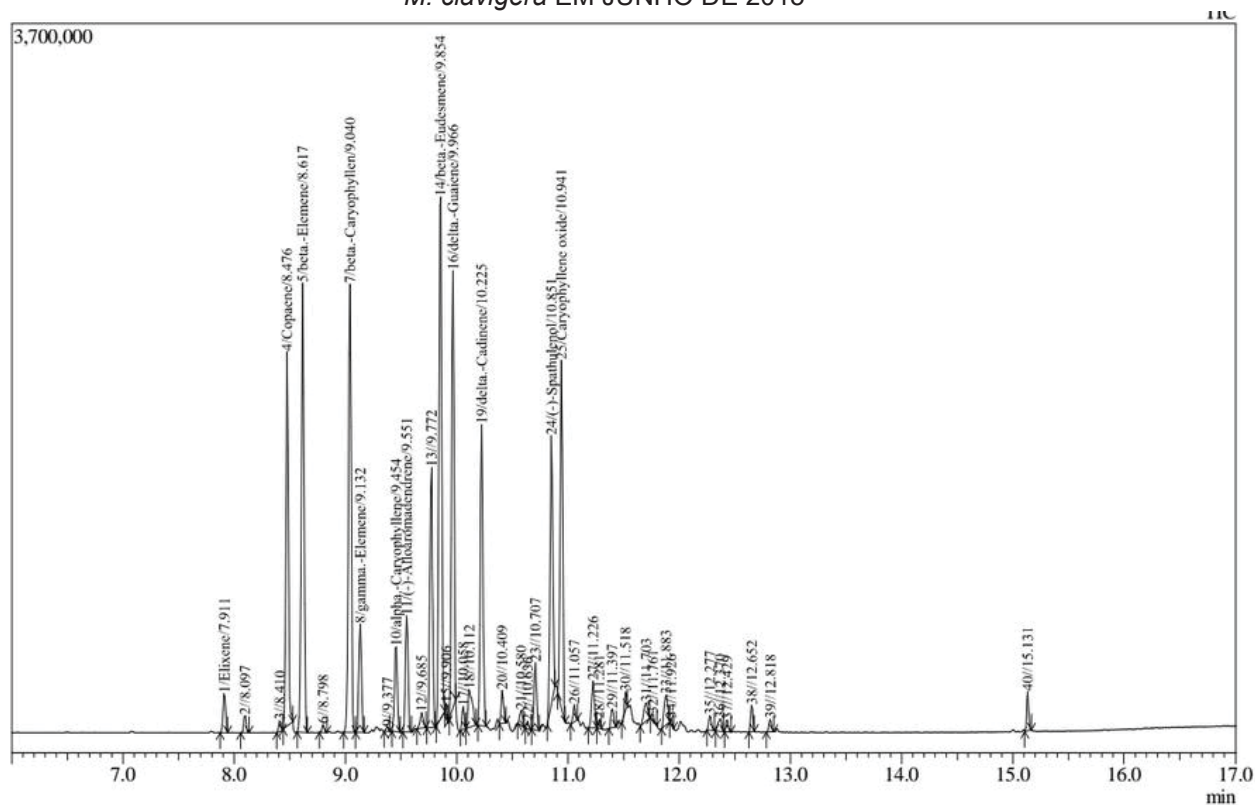


FIGURA 36 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM JULHO DE 2015

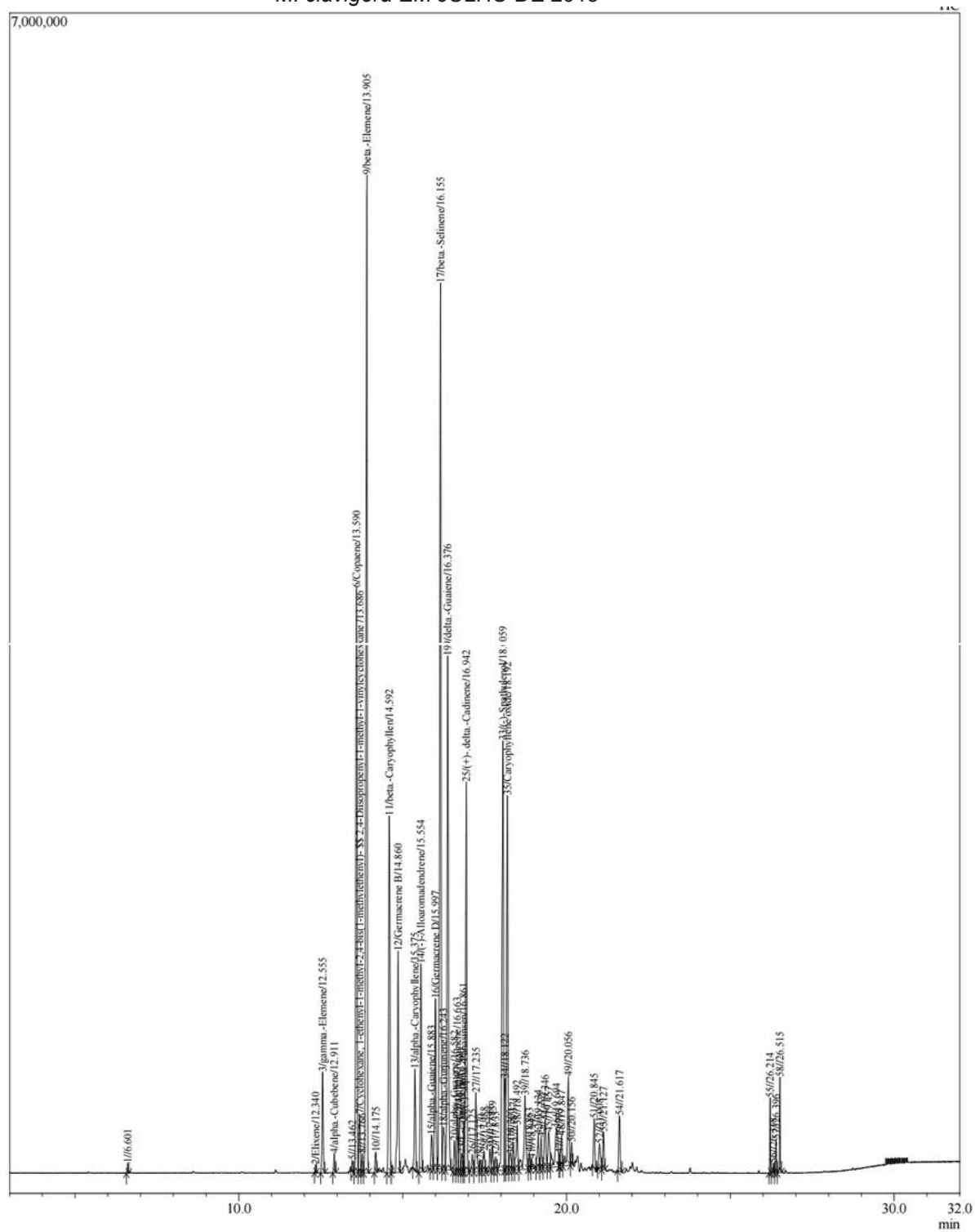


FIGURA 37 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM AGOSTO DE 2015

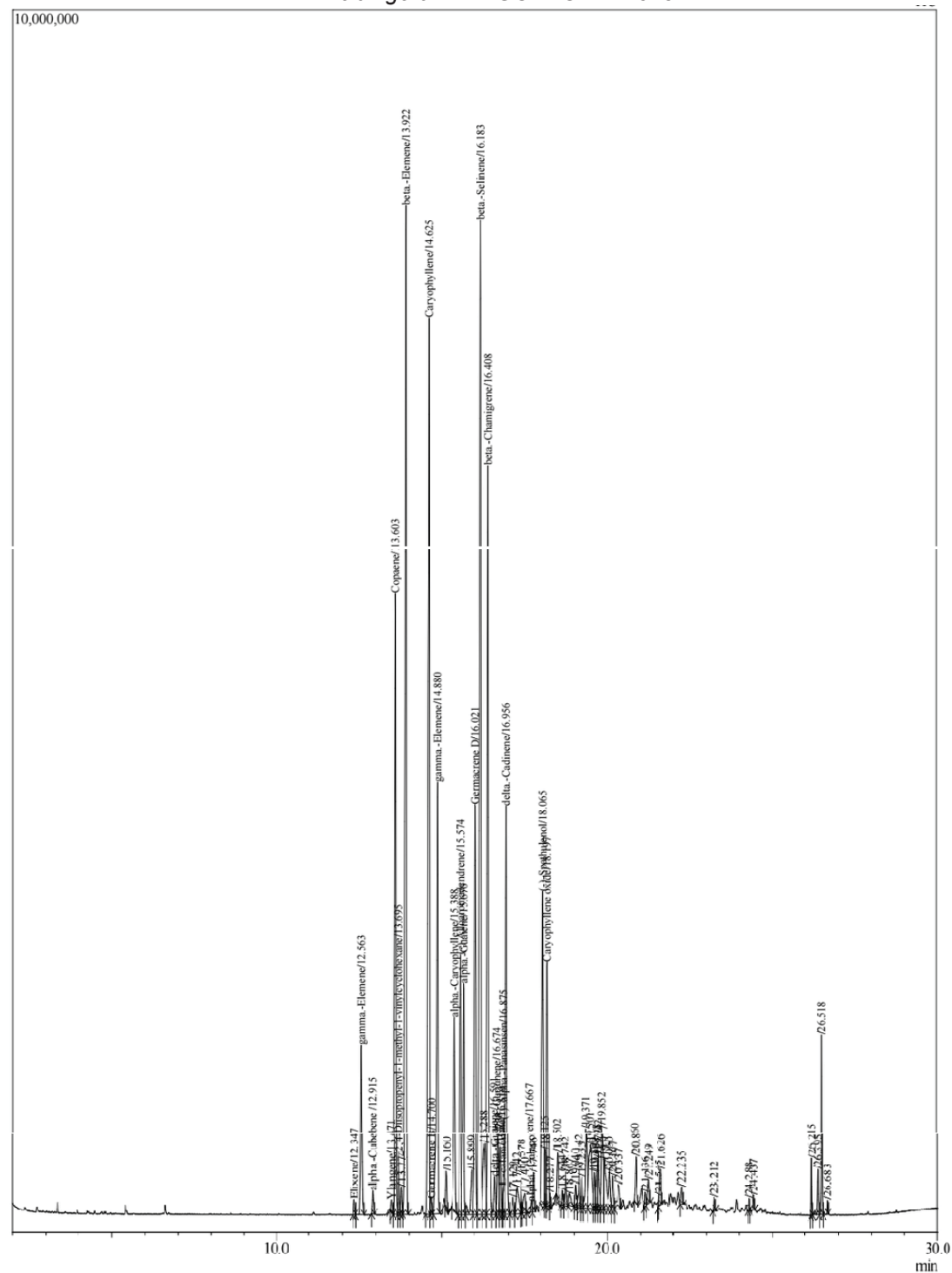
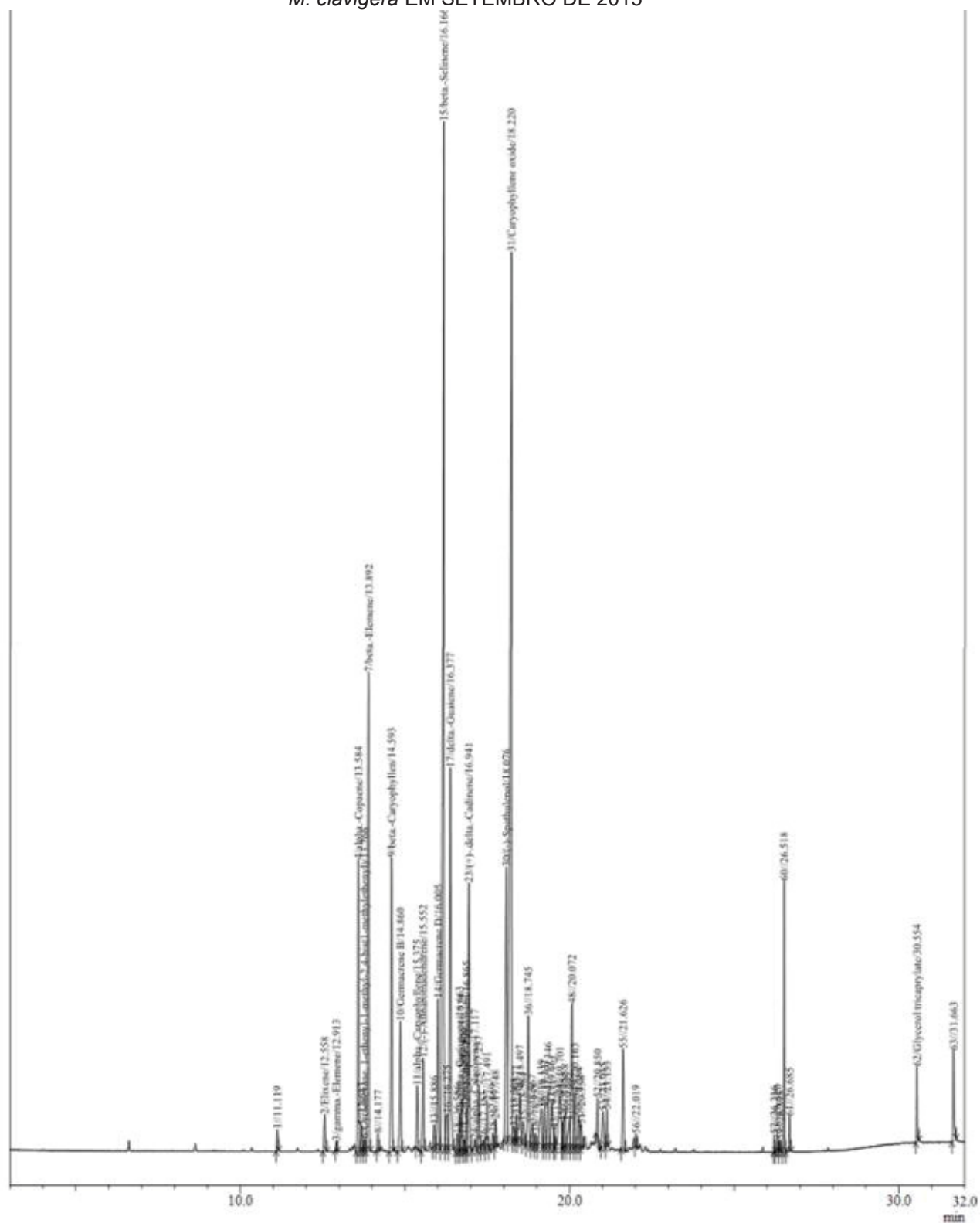
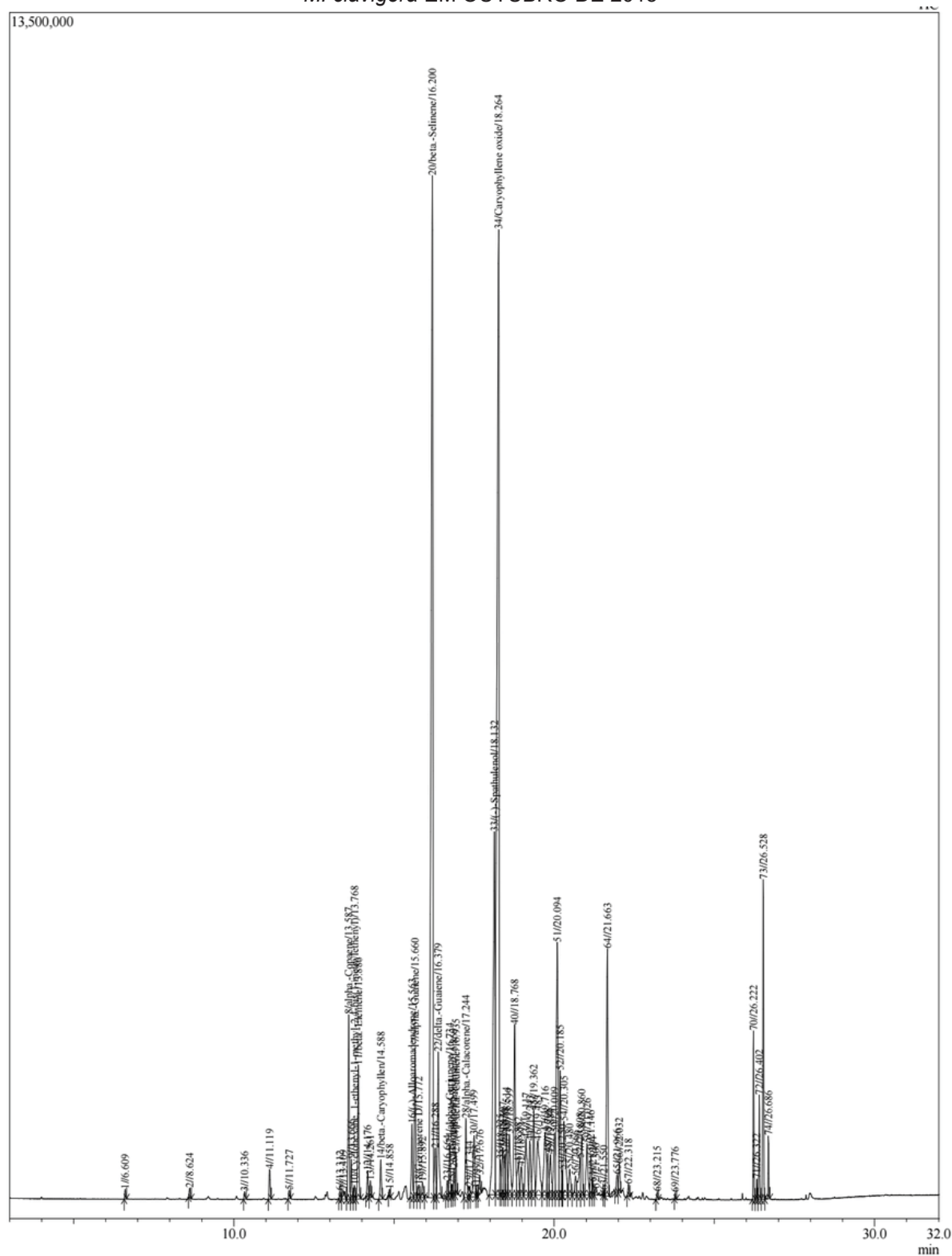


FIGURA 38 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM SETEMBRO DE 2015





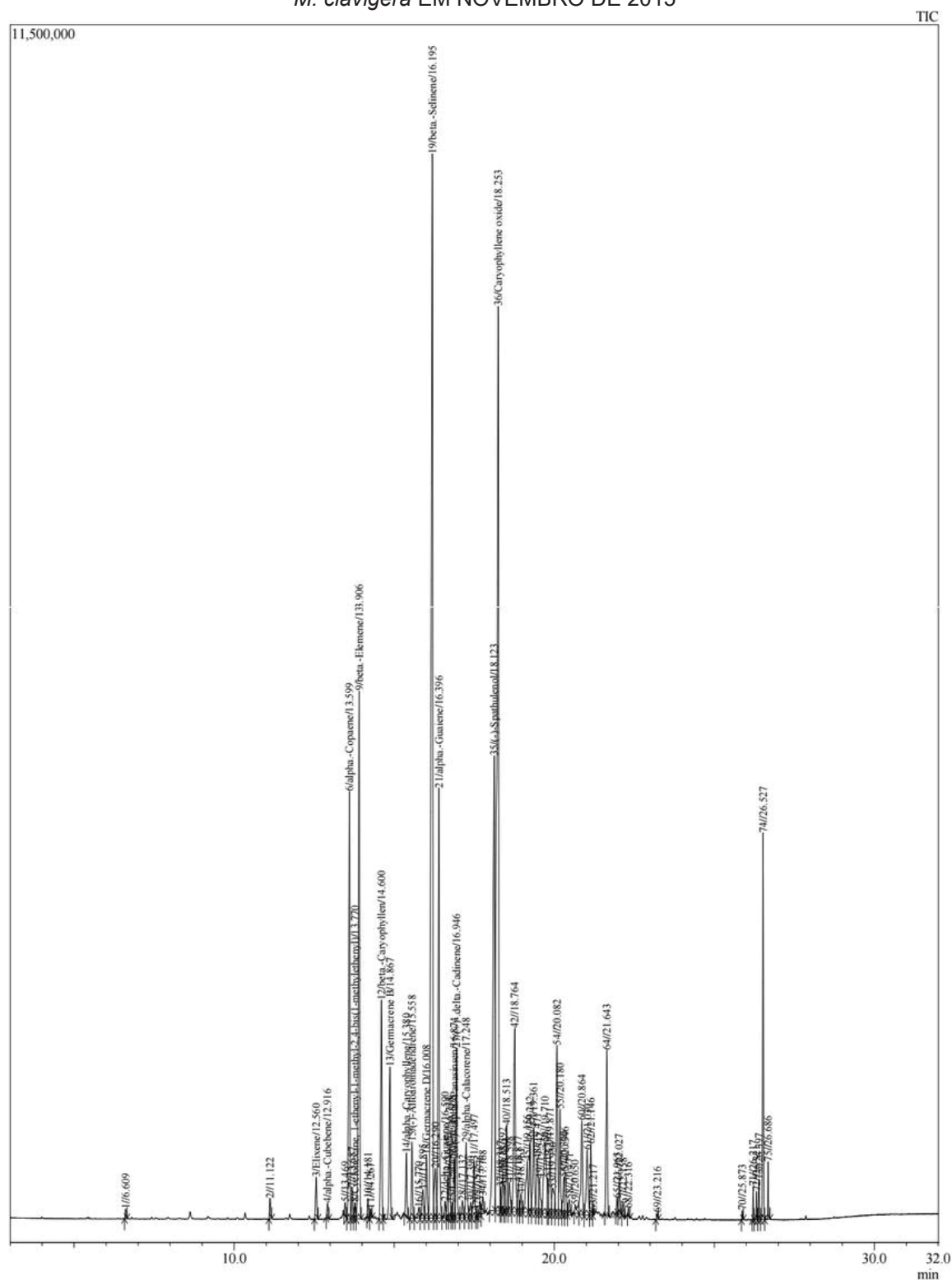


FIGURA 41 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM DEZEMBRO DE 2015

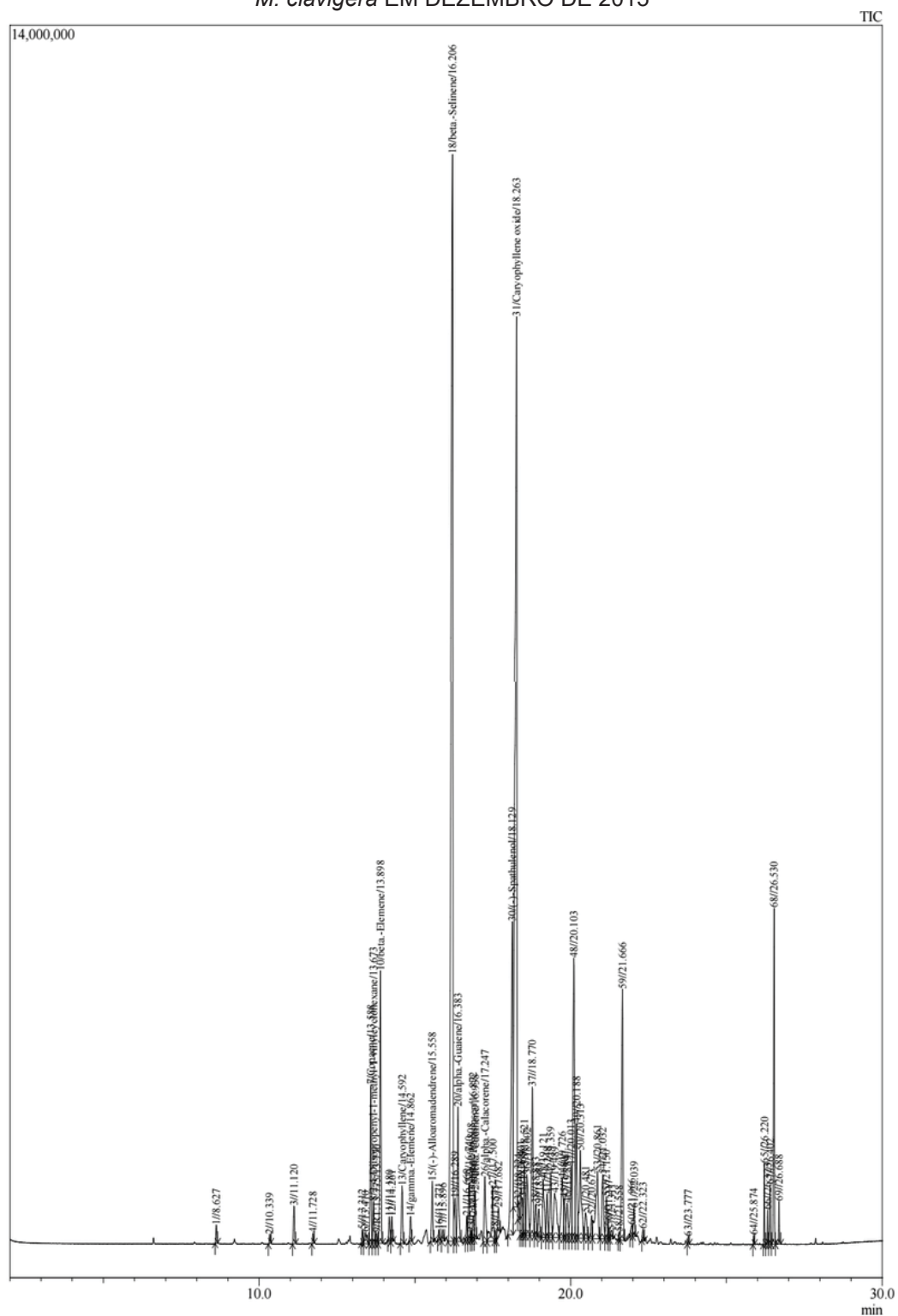


FIGURA 42 – ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS
M. clavigera EM JANEIRO DE 2016

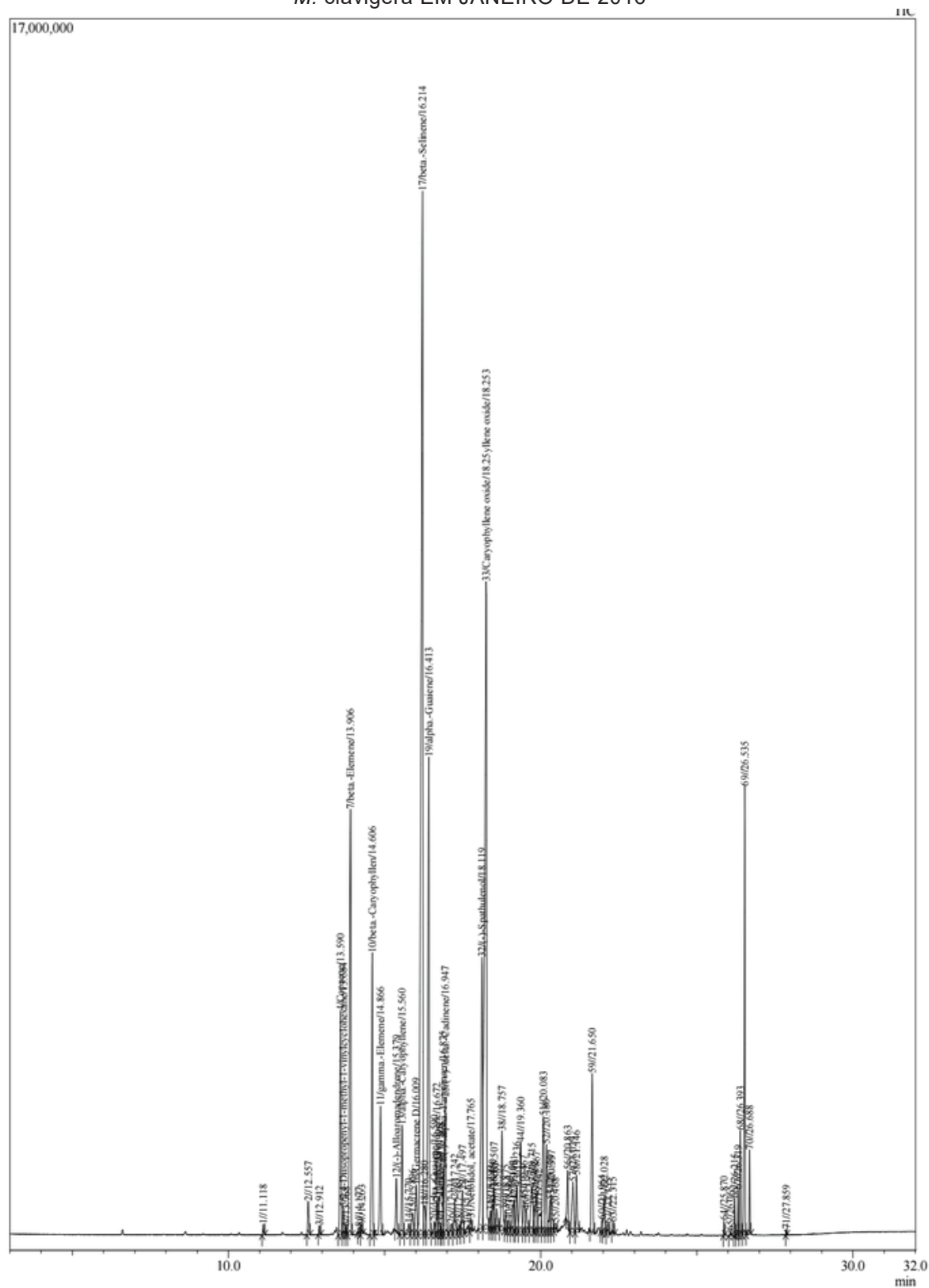


FIGURA 43 – AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO CONCEDIDA PELO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A0EB51A

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A0EB51A
Usuário:	Universidade Federal do Paraná
CPF/CNPJ:	75.095.679/0001-49
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	☒ Pesquisa Científica ☒ Bioprospecção ☒ Desenvolvimento Tecnológico