

JAQUELINE RIBAS VERBINENN

**ESTUDO ANATÔMICO E ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE  
*MYRCEUGENIA SERIATORAMOSA* (KIAERSK.)  
D. LEGRAND & KAUSEL E *MYRCEUGENIA*  
*PILOTANTHA* (KIAERSK.) LANDRUM  
(MYRTACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
obrigatório para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima  
Co-orientador: Prof. Dr. Yedo Alquini  
Co-orientador: Prof. Aluizio de Abreu Marcondes

CURITIBA

2001



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Botânica  
Curso de Pós-Graduação em Botânica  
Centro Politécnico - Jardim das Américas – Caixa Postal 19031  
CEP: 81531-990 - CURITIBA - Paraná  
Tel. (41) 361-1625 - Fax. (41) 266-2042  
E-mail: [pgbotan@bio.ufpr.br](mailto:pgbotan@bio.ufpr.br) - home page: <http://www.ufpr.br>

**“Estudo Anatômico e Análise da composição química do Óleo Essencial de Folhas de *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel e *Myrceugenia pilotantha* (Kiaersk.) Landrum (Myrtaceae)”.**

por

**Jaqueline Ribas Verbinenn**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre no Curso de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão formada pelos Professores**

  
**Prof. Dr. Tomoe Nakashima (Orientador/Presidente)**

  
**Prof. Dr. Cleusa Bona (Titular/UFPR)**

  
**Prof. Dr. Márcia do Rocio Duarte (Titular/UFPR)**

**Curitiba, 21 de dezembro de 2001**

***DEDICO ESTE TRABALHO AO NILSON,  
POR TODO AMOR E APOIO. AGRADEÇO A  
DEUS POR ESSE MOMENTO TÃO  
ESPECIAL, QUE ME CONTEMPLA COM O  
TÍTULO DE MÃE.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora, Profª Drª Tomoe Nakashima, do Departamento de Farmácia, pela sua orientação e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr Yedo Alquini, do Departamento de Botânica pelo seu apoio e orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Aluizio de Abreu Marcondes, do LOEA (Laboratório de Óleos Essenciais e Aromas ), do Departamento de Química, por sua orientação e dedicação nas análises cromatográficas e espectrométricas.

A Profª Drª. Élide dos Santos Jimena , coordenadora do curso de Pós-Graduação em Botânica pela sua colaboração na coleta e identificação das espécies estudadas.

Ao Prof. William Rodrigues por sua colaboração na descrição da espécie.

À secretária do Curso de Pós Graduação em Botânica, Elisabeth França, por sua amizade, atenção.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela atenção prestada na correção das referências bibliográficas.

Aos meus colegas e amigos de Pós Graduação em Botânica especialmente ao Paulo Vitor Farago.

A colega Karol Sataki, acadêmica do Curso de Farmácia, pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

À Universidade Federal do Paraná e a toda equipe do Curso de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	3
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1 POSIÇÃO SISTEMÁTICAS DAS ESPÉCIES .....	4
3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS .....	4
3.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS .....	9
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
4.1 MATERIAL BOTÂNICO .....	13
4.1.1 ANATOMIA FOLIAR .....	13
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	14
4.2.1 Características Organolépticas e Resíduo Seco .....	14
4.2.2 Marcha Sistemática Fitoquímica .....	14
4.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL .....	15
4.3.1 Determinação Quantitativa de Óleos Essenciais .....	16
4.3.2.1 Determinação da densidade relativa .....	16
4.3.2.2 Determinação do índice de refração .....	16
4.3.2.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial .....	17
4.4.1 CCD .....	17
4.4.2 CG/MS .....	17
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>

5.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO .....	19
5.1.1 Descrição Morfológica de <i>M. seriatoramosa</i> .....	19
5.1.2 Descrição Morfológica de <i>M. pilotantha</i> .....	19
5.1.3 Anatomia Foliar de <i>M. seriatoramosa</i> e <i>M. pilotantha</i> .....	19
5.1.4 Estudo Anatômico do Pecíolo de <i>M. seriatoramosa</i> e <i>M. pilotantha</i> .....	30
<b>5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO.....</b>	<b>30</b>
5.2.1 Características Organolépticas, Resíduo Seco e Marcha sistemática fitoquímica .....	30
<b>5.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....</b>	<b>30</b>
5.3.1 Análise Quantitativa .....	30
5.3.2 Análise Físico-química .....	31
5.3.3 Resultado das análises Físico-química .....	31
5.3.4 Cromatografia em camada delgada .....	31
5.3.5 Cromatografia Capilar de Alta Resolução .....	34
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRÁFIA CONSULTADA.....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Vista frontal da epiderme da face adaxial de <i>M. seriatoramosa</i> .....	23
Figura 02- Vista frontal da epiderme da face adaxial de <i>M. pilotantha</i> .....	23
Figura 03- Epiderme da face abaxial de <i>M. seriatoramosa</i> .....	24
Figura 04- Epiderme da face abaxial de <i>M. pilotantha</i> .....	24
Figura 05- Epiderme da face abaxial de <i>M. pilotantha</i> .....	25
Figura 06- Lâmina foliar de <i>M. seriatoramosa</i> .....	25
Figura 07- Lâmina foliar de <i>M. pilotantha</i> .....	26
Figura 08- Lâmina foliar de <i>M. seriatoramosa</i> .....	26
Figura 09- Lâmina foliar de <i>M. pilotantha</i> - nervura principal .....	27
Figura 10- Pecíolo de <i>M. seriatoramosa</i> .....	27
Figura 11- Pecíolo de <i>M. pilotantha</i> .....	28
Figura 12- Detalhe da secção transversal do pecíolo de <i>M. seriatoramosa</i> .....	28
Figura 13- Detalhe da secção transversal do pecíolo de <i>M. seriatoramosa</i> .....	29
Figura 14- Detalhe da secção transversal do pecíolo de <i>M. pilotantha</i> .....	29
Figura 15- Perfil cromatográfico de <i>M. seriatoramosa</i> e <i>M. pilotantha</i> .....	33
Figura 16- Espectro de massa: $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno.....	37
Figura 17- Espectro de massa : canfeno e 1,8 cineol.....	38
Figura 18- Espectro de massa : isoterpinoleno e terpineol 4.....	39
Figura 19- Espectro de massa : $\alpha$ -copaeno e $\beta$ -cariofileno .....	40
Figura 20- Espectro de massa : aromadendreno e $\alpha$ -humuleno.....	41
Figura 21- Espectro de massa : aloaromadendreno e $\beta$ -selineno.....	42
Figura 22- Espectro de massa : $\alpha$ -selineno e cis-calameneno .....	43
Figura 23- Espectro de massa : cadina-1,4-dieno e espatulenol.....	44
Figura 24- Espectro de massa : oxido de cariofileno e globulol .....	45
Figura 25- Espectro de massa : viridiflorol e isobutil o-ftalato.....	46
Figura 26- Espectro de massa : ácido palmítico hexadecanóico e fitol .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Especificações das amostras.....	13
Tabela 02- Resultado da abordagem fitoquímica de metabólitos secundários..	30
Tabela 03- Rendimento da extração de óleo essencial.....	31
Tabela 04- Compostos identificados em <i>M. seriatoramosa</i> .....	34
Tabela 05- Compostos identificados em <i>M. pilotantha</i> .....	35

## RESUMO

Folhas de *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel e *M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum foram analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas na Serra de Araçatuba, Morro dos Perdidos, Município de Guaratuba, Paraná, Brasil. No estudo anatômico as espécies revelaram caracteres histológicos comuns a família Myrtaceae, como: presença de glândulas oleíferas, tricomas tectores, folhas dorsiventrais hipoestomáticas. Epiderme de ambas as faces em vista frontal, com intensa sinuosidade das paredes anticlinais. Tricomas tectores em ambas as faces das folhas com maior incidência sobre a nervura central de *M. pilotantha*. Em secção transversal constata-se um único estrato epidérmico em ambas as faces, com intensa cutícula na face adaxial, das duas espécies. O mesofilo é do tipo heterogêneo, com parênquima paliçádico provido de dois a três estratos celulares em ambas, enquanto o lacunoso é provido de sete a dez estratos em *M. pilotantha* e dose a quinze em *M. seriatoramosa*. A nervura principal de *M. seriatoramosa* é pouco saliente, com uma leve depressão na face adaxial. O tecido vascular da nervura principal é constituído por um único feixe vascular, envolto por uma bainha esclerenquimática. O floema circunda totalmente o xilema. Os estudos fitoquímicos demonstraram a presença de metabólicos secundários como os flavonóides, esteróides e/ou triterpenos, taninos e amino grupos. O óleo essencial de ambas as espécies foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e analisado por GC/MS em associações com índice de Kovats. Entre os principais compostos estão cariofileno (19,49%) e espatulenol (14,73%) em *M. pilotantha* e  $\beta$ -pineno (13,55%) e 1,8 cineol (9,46%) para *M. seriatoramosa*.

## ABSTRACT

Leaves of *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel and *M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum were collected in “Serra de Araçatuba”, “Morro dos Perdidos”, Guaratuba County, State of Paraná, Brazil. Anatomical analysis revealed histological features typical of Myrtaceae such as: presence of oil glands, trichomas and dorsio-ventral leaves with stomata present only on the lower epidermis. The epidermis’s frontal view showed highly sinuous anticlinal walls at both, lower and upper epidermis. Trichomas were found on both surfaces of the leaves, being more numerous on the central rib of *M. pilotantha*. Analysis of transverse sections showed a single epidermal layer, on both surfaces, for both species, with intense cuticle on the leaves’s upper surface. The mesophyll is heterogeneous, with 2-3 layers of palisade parenchyma for both plants, and spongy parenchyma consisted of 7-10 layers in *M. pilotantha* and 12-15 layers in *M. seriatoramosa*. The main rib of *M. seriatoramosa* is slightly salient, with a light depression on the upper surface. A single vascular bundle wrapped up by a sclerenchyma sheath make up the vascular system. The phloem totally surrounds the xylem. Phytochemical analysis demonstrated the presence of secondary metabolites such as flavonoids, steroids and/or triterpenoids, tannins and amino-groups. The essential oil of both species was obtained by hydro-distillation in Clevenger’s apparatus and analyzed by GC/MS in association with Kovats’s Index. Caryophyllene (19,49%) and spathulenol (14,73%) were the main constituents in *M. pilotantha* while in *M. seriatoramosa*  $\beta$ -pinene (13,55%) and 1,8 cineol (9,46%) were the main components.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pela população tem despertado o interesse da ciência na busca de novos fármacos destinado à cura ou melhoria de diversas enfermidades. A forma pouco conhecida como eram utilizadas, gerou a necessidade da pesquisa de princípios ativos que concorram com os quimioterápicos, valorizando essa prática já consagrada pela história humana. Atualmente, esses conhecimentos não são somente a experiência transmitida através de gerações ao longo de séculos. Hoje as substâncias ativas são detectadas, analisadas, isoladas e identificadas e posteriormente testadas para avaliar a sua eficácia terapêutica. Esse interesse decorre do fato que a biotecnologia ainda não superou a natureza na formulação de moléculas com atividades terapêuticas.

Várias espécies de plantas possuem em sua constituição, entre os inúmeros componentes, a presença de óleos essenciais que são substâncias aromáticas formadas por diferentes vias metabólicas, podendo possuir ações expectorantes, diuréticas, antiespasmódicas, anti-sépticas, antimicrobianas, entre outras.

O uso de óleos essenciais como agentes medicinais vem de épocas remotas. Os antigos egípcios já os utilizavam para cura de males e a busca do bem estar físico. No entanto, foi a partir da Idade Média, por processos de destilação introduzidos por cientistas muçulmanos que se iniciou a verdadeira comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

As espécies americanas das Myrtaceae são muito semelhantes morfologicamente, o que dificulta sobremaneira o trabalho de sua identificação (BARROSO, 1984).

Com o objetivo de ajudar a esclarecer dúvidas, a Sistemática vem utilizando outras áreas da ciência botânica onde os estudos anatômicos têm oferecido resultados de grande valia. A observação de características anatômicas, como o arranjo e a forma das células, aspectos das paredes anticlinais, escultura cuticular, tipos de estômatos e outras características, conduzem muitas vezes a resultados conclusivos em relação ao diagnóstico genérico e específico. Entre as demais Myrtaceae, o gênero *Myrceugenia*

Berg. é dividido basicamente em dois centros importantes: um no Chile e outro no Brasil austral, não passando o sul de Goiás (Legrand & Klein, 1978). A grande maioria encontra-se no Brasil, desde o Rio de Janeiro até Porto Alegre (Legrand, 1981). Descritos como arbustos ou pequenas árvores raramente altas, com folhas discolores geralmente apiculadas e freqüentemente mais ou menos opostas. Pilosidade muito característica composta em maior parte de pêlos estrigosos bifurcados, sésseis ou pedicelados, pequeníssimos ou maiores de 1 mm. Alabastos em sépalas valvadas, conivente no ápice ou eretos, raramente menores que o globo das pétalas. O reconhecimento do gênero pode efetuar-se na maioria das espécies com base na pilosidade, o ovário trilocular e sobretudo os pedúnculos sobrepostos. Caso contrário, somente o estudo do embrião, pois o gênero *Myrceugenia* pode ser qualificado como uma *Eugenia* ou um embrião de *Myrcia* ou uma *Myrcia* de flor tetrâmera. O tipo baseado nesta descrição foi a *Myrceugenia myrtoides* Berg. (LEGRAND & KLEIN, 1978). A espécie *Myrceugenia seriatoramosa* está descrita como presente, desde o Rio de Janeiro, até o Estado do Paraná. A fenologia ocorre de abril a maio. *Myrceugenia pilotantha* cresce em floresta úmida na costa do Atlântico. O período de florescência ocorre de fevereiro a maio, com prováveis frutos maduros em setembro.

A importância florestal e econômica das Myrtaceae motivou a elaboração do estudo botânico e fitoquímico das folhas de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha* demarcadas e identificadas na Serra de Araçatuba, Morro dos Perdidos, Município de Guaratuba, Paraná, Brasil.

O presente trabalho propõe subsídios para a diferenciação estrutural das folhas e química do óleo essencial das duas referidas espécies de *Myrceugenia*. Outro objetivo também é de avaliar seu perfil químico para eventual detecção de produtos com utilização medicinal na busca de substâncias bioativas ou outros metabólitos de importância comercial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Efetuar o estudo morfo-anatômico e análise do óleo essencial da espécie *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel comparativamente com *M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum, MYRTACEAE, a fim de estabelecer parâmetros e métodos de avaliação à análise das espécies sob o ponto de vista do controle de qualidade e metabólitos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a organização estrutural de folhas de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha*.

Selecionar caracteres morfo-anatômicos das folhas das duas espécies que possam subsidiar o controle de qualidade.

Promover uma análise preliminar dos metabólitos de folhas das referidas espécies.

Analisar os óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Posição Sistemática das Espécies:

Segundo CRONQUIST (1988)

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Myrtales

Família: Myrtaceae

Gênero: *Myrceugenia*

Espécie: *M. seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel e  
*M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum

#### 3.2 Características Botânicas

Poucos trabalhos descrevem as espécies *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel e *Myrceugenia pilotantha* (Kiaersk.) Landrum.

*Myrceugenia seriatoramosa* anteriormente foi classificada como *Eugenia seriatoramosa* Kiaersk, 1893 e *Luma seriato-ramosa* (Kiaersk.) Burret, 1941.

*Myrceugenia pilotantha* anteriormente conhecida como *Eugenia pilotantha* Kiaersk, 1893.

*Myrceugenia* refere-se à junção dos termos *Myrcia* com *Eugenia* (BARROSO, 1978). A família Myrtaceae está descrita na literatura como portadora de numerosos canais oleíferos, presentes na forma de pequenos pontos translúcidos que podem aparecer nas folhas, flores, frutos e sementes (BARROSO, 1991). Apresenta cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies entre árvores e arbustos, que se distribuem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais. Ocorrem em todos os continentes com exceção da Antártida. Em relação às folhas, são descritas como folhas

inteiras, opostas ou alternadas, com glândulas oleíferas translúcidas no limbo, nervura submarginal e estípulas muito pequenas, caducas. As flores apresentam-se geralmente hermafroditas, polistêmones, brancas e de simetria radial. Essas descrições morfológicas, segundo os autores, possuem numerosas exceções, como flores tetrâmeras em espécies de *Myrceugenia*, *Myrciaria*, *Eugenia* e *Myrciantes pungens*. Os frutos podem ser baciformes ou capsulares. As sementes possuem tegumento geralmente esclerificado, raramente aladas.

A madeira apresenta caracteres primitivos. Há predominância de numerosos vasos solitários e com pequeno diâmetro apresentando placas de perfuração simples e pontoações ornamentadas pequenas. Placas de perfuração escalariformes são relativamente raras na família porém são características em *Myrceugenia*, *Luma apiculata* e em *Myrtus communis*. Ainda aparecem raios geralmente estreitos e heterogêneos de parênquima apotraqueal difuso e de fibras com pontoações nitidamente areoladas. Entre as espécies americanas representantes como folhas simples e sempre opostas, de bordas peninérveas e geralmente com nervura central. Glabras ou pilosas, com indumento de pêlos simples, unicelulares ou raramente escamosas, possuem numerosos canais oleíferos. Flores andróginas, actinomorfas, diclamídias, dialipétalas, raramente com pétalas de tamanho reduzido ou abortadas, florescências reunidas (BARROSO, 1991).

BEHAR (1971) descreve no estudo anatômico das folhas de *E.uniflora*, entre outras características, a presença de epidermes glabras com aberturas glandulares, folhas hipoestomáticas, estômatos do tipo paracítico.

FERRI (1971) revela informações sobre anatomia foliar de algumas Myrtaceae. Folhas hipoestomáticas para todas as espécies estudadas, epiderme glabra em *Eugenia brasiliensis*, *E. uniflora* e *Jambosa vulgaris*. Estômatos anomocíticos para *Eugenia brasiliensis*, e paracíticos nas demais espécies. Presença de glândulas em *Eugenia brasiliensis*, *Psidium guayava* e *Psidium multiflorum*. Observada cutícula na face adaxial de *E. tomentosae* e *E. brasiliensis*.

MOURA (1971) relata aspectos da anatomia foliar de *Myrciaria cauliflora*, entre eles cita o contorno irregular e sinuosidades das paredes celulares presentes nas células da epiderme adaxial, hipoestomatismo, com estômatos do tipo paracítico.

BACKES (1971) cita em *Psidium multiflorum* a presença de uma epiderme adaxial glabra e abaxial com presença de tricomas e estômatos do tipo paracítico, presença de glândulas, feixe vascular do tipo biclateral, bainha esclerenquimática envolvendo totalmente o sistema vascular.

SOUSA (1971) descreveu em *Psidium guayava* folhas hipoestomáticas com estômatos do tipo paracítico, tricomas mais abundantemente distribuídos na epiderme adaxial e menos numerosos na abaxial, presença de idioblastos e glândulas.

VAN WYK *et al.* (1982) estudaram os estômatos de 11 espécies de *Eugenia* L. proveniente da África e ainda *Eugenia uniflora* e *E. incerta*. Citam para as espécies africanas a denominação de estômatos do tipo anomoestaurocíticos, para *E. uniflora* anomocítico e *E. incerta* do tipo paracítico.

MACHADO *et al.* (1988) analisaram a espécie *Eugenia sulcata* à luz de microscopia óptica, eletrônica de transmissão e varredura. Observaram que as paredes anticlinais apresentaram-se bastante sinuosas, tanto na face abaxial quanto na face adaxial e que as paredes periclinais externas possuem espessura não uniforme em decorrência de projeções internas dessas paredes. Os estômatos ocorrem isolados ou em grupo, distribuem-se ao acaso na epiderme abaxial, classificados como anomoestaurocíticos quanto ao número de arranjos das células subsidiárias e considerados graminóides em função de espessamento desigual das células estomáticas. A lâmina foliar com estrutura dorsiventral, ocorrendo no mesofilo glândulas secretoras em posição subepidérmica. Idioblastos cristalíferos contendo drusas e gotas lipídicas também são freqüentes.

NEVES *et al.* (1989) reforçam as características citadas para *E. uniflora* por BEHAR (1971) e JORGE *et al.* (1994).

KHATIJAH *et al.* (1992) estudaram sob ponto de vista anatômico, 25 espécies de *Eugenia* L. para facilitar a identificação de material não florido. Foram eleitas 11

características para a identificação das espécies como: tipo de estômatos, forma das folhas, forma dos feixes da nervura principal, bainha esclerenquimática, cutinização da epiderme, presença ou ausência de esclereídes, idioblastos, hipoderme, células epidérmicas colunares, cristais solitários, número de camadas do parênquima paliádico, forma dos feixes vasculares, bainha esclerenquimática e esclereídes no parênquima do pecíolo.

FONTENELLE *et al.* (1994) citaram como características importantes do estudo de 11 espécies de *Eugenia* da restinga de Maricáa: presença e os tipos de tricomas e arranjo celulares. Todas as espécies estudadas são hipoestomáticas, observadas cavidades secretoras no mesofilo, e a sinuosidades das paredes anticlinais.

JORGE *et al.* (1994) descreveram a espécie *Eugenia uniflora* possuindo a epiderme formada por uma única fileira de células de contorno variável na forma e no tamanho, predominando células alongadas no sentido periclinal e cutícula fina e uniforme. Colênquima pouco desenvolvido, sendo constituído por duas a quatro camadas celulares com espessamentos nos ângulos, podendo ser observada a presença de glândulas oleíferas. O parênquima fundamental é citado como bem desenvolvido, sendo constituído de células de contorno arredondado e de paredes delgadas, podendo ser observada a presença de drusas. A bainha esclerenquimática que envolve os feixes vasculares pode conter grãos de amido simples. O feixe vascular é do tipo biclateral e envolto por bainha fibrosa, constituída de duas a cinco camadas celulares, podendo ser contínua ou interrompida nas regiões laterais relacionadas com o floema voltado para a epiderme superior.

COSTA *et al.* (1995) realizaram um estudo complementar do trabalho citado anteriormente, com 11 espécies de *Eugenia* da restinga de Maricáa. Os autores descrevem o sistema vascular no pecíolo em secção transversal como sendo em forma de arco não dividido, podendo variar a sua configuração em três níveis. Em nível distal a forma não se altera podendo apresentar-se atenuado, ou extremidades eretas com variação de extensão, ou dirigidas para o centro, ou fletidas nesta direção. Um sistema vascular na forma de anel foi observado ao nível mediano em uma das espécies

estudadas. Todas apresentaram floema intraxilar no pecíolo e na nervura mediana da lâmina foliar. Podendo ainda ser observado em algumas espécies floema intraxilar acompanhando as nervuras secundárias o sistema vascular apresenta-se envolto por uma bainha perivascular podendo apresentar células parenquimáticas e ou fibras esclerenquimáticas. A nervação foliar das espécies é do tipo pinada.

JORGE *et al.* (1996) citaram como características gerais universais à família Myrtaceae em *Plinia glomerata* e *Eugenia pyriformis* no exame microscópico, presença de glândulas oleíferas subepidérmicas nas folhas e nos frutos. Feixes vasculares do tipo bicolateral ao nível da nervura central nas folhas, bem como a presença de bainha fibrosa em torno do feixe vascular, ao nível de nervura central. Presença de tricomas tectores simples, cônicos e unicelulares na folhas e nos frutos, as diferenças intra-específicas são quantitativas. As células epidérmicas dispõem-se radialmente em torno dos tricomas, em cuja base concentra-se o óleo essencial. O par de células que recobre as glândulas oleíferas tem parede comissural quase reta, com detalhe em forma de letra "s" na região mediana. Presença de cristais prismático e/ou drusas em idioblastos parenquimáticos das folhas ou dos frutos. Em ambas as espécies os autores citam a presença de estômatos do tipo anomocítico, na epiderme abaxial.

JORGE *et al.* (2000) estudaram sob o ponto de vista antômico *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis* e *Eugenia puniceifolia*. As folhas das três espécies apresentaram-se hipoestomáticas, com estômatos do tipo ranunculáceo. Não foi possível a caracterização da espécie de *Eugenia* estudada em relação ao gênero e concluíram que somente a complementação com estudos químicos e o auxílio da Taxonomia permitem a definição da espécie. Em relação as espécies de *Myrcia* os autores descrevem características significativas para a diferenciação entre *M. guianensis* e *M. sphaerocarpa* como: a diferenciação entre as células epidérmicas, número de camadas no parênquima paliádico, presença de cristais de oxalato de cálcio e apresentação da nervura central.

### 3.3 Características Químicas

Poucos são os trabalhos que relatam os constituintes químicos do gênero *Myrceugenia*, sobretudo mais facilmente encontram-se publicações sobre a família Myrtaceae.

ALENCAR *et al.* (1971) relatam em seu estudo sob o ponto de vista químico a obtenção de um rendimento de 2% de óleo essencial proveniente de folhas de *Myrcia polyantha*, conhecida popularmente pelo nome de “pau santo”, espécie apreciada pela medicina popular. Apresenta como principais constituintes em sua composição: limoneno 4,5%, neral 12,80%, geranial 50,2%, sesquiterpenos 14,6%.

JOLY (1979) cita entre as numerosas famílias existentes que possuem elementos voláteis presentes nas folhas, um destaque especial as Myrtaceae. Distribuídas por todo o mundo, preferencialmente nas zonas tropicais e subtropicais da América e Austrália.

SIQUEIRA *et al.* (1983) trabalharam com *Eugenia pugnans* e *Blepharocalix salicifolia*, espécies de Myrtaceae encontradas no Rio Grande do Sul. Na análise do óleo essencial extraído de folhas de *Eugenia pugnans* a presença de:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, linoleno, cineol e terpinol, visto o cineol como principal composto, com rendimento de 48,39%. Em *Blepharocalix salicifolia* na essência dos frutos, evidenciou-se:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, acetato de mirtenila e carvona. No óleo essencial presente nas folhas,  $\beta$ -pineno, acetato de mirtenila e mirtenol.

WEYERSTAHL *et al.* (1988) citam vários constituintes químicos encontrados nas folhas de *E. uniflora*. Os que se encontram em maior concentração são: furanodieno, selina-1,3,7(11)-trien-8-one e oxidoselina-1,3,7(11) trien-8-one. Encontrados também em menor percentual outros componentes tais como:  $\beta$ -elemeno,  $\gamma$ -cariofileno, humuleno, aloaromadendreno, espatulenol, globulol e viridiflorol. Os autores usaram como recurso para identificação GCL, NMR e espectrometria de massa.

ADEBAJO *et al.* (1989) relatam sobre atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *E. uniflora* testado em alguns fungos e bactérias, variando a ação desde resistente a sensíveis.

ZHENG *et al.* (1992) descrevem a atividade anticarcinogênica observada em ratos, de componentes encontrados no óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata*. Mencionam o potencial dos seguintes compostos:  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -humuleno epóxido e eugenol. O mecanismo de ação base está relacionado à atividade desses compostos sobre a enzima glutadiona-S-transferase, em intestino de ratos.

MIGUEL *et al.* (1992) obtiveram rendimento de 1,6% de óleo essencial no estudo realizado com *E. osoriana* conhecida popularmente por jaboticaba do campo, guaramirim, guamirim, gabioba de porco. Por meio de análise realizada por cromatografia gasosa os autores citam como principais constituintes do óleo essencial o limoneno com 56%,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno.

HENRIQUES *et al.* (1993) relatam a identificação de quarenta e quatro componentes presentes nos óleos essenciais das seguintes espécies de *Eugenia*: *E. involucrata*, *E. plicato-costata*, *E. rostrifolia*, *E. scluechiana*, *E. tinguayensis*, *E. uniflora*. Entre eles encontram-se o  $\alpha$ -pineno, viridifloreno,  $\beta$ -cariofileno e nerolidol.

JORGE *et al.* (1994) descrevem sobre *Eugenia uniflora*, conhecida popularmente pelo nome de pitanga. Utilizada freqüentemente na cultura popular como febrífugo, aromático, anti-reumático e hipoglicemiante. O infuso das folhas ingerido juntamente com mate na Argentina, é utilizado no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Tal atividade está correlacionada à presença de óleos essenciais.

RUIZ *et al.* (1994) relatam o estudo de flavonóides em duas espécies de *Myrceugenia* encontradas na ilha de Juan Fernandes em comparativo com outras cinco espécies presentes no Chile e mais duas do Brasil. As *Myrceugenia* provenientes do Brasil, *M. campestris* e *M. rufescens*, apresentaram perfil de compostos diferentes das outras setes espécies. Entre esses compostos os autores citam como provável identificação: o quercetin-3-O-monoglicosídeo, luteolin e 5-deoxi-luteolin.

BELLO *et al.* (1995) obtiveram óleo essencial a partir da extração de folhas de *Eugenia banderensis*. A análise revelou a presença de: 22,09% de T-muurolol, 8,635 % de  $\alpha$ -cadinol, 8,16 % de  $\gamma$ -carnol e 6,73% de óxido de cariofileno, entre outros.

MORAIS *et al.* (1996) citam presentes na constituição do óleo essencial de *E. uniflora* alguns compostos. Os que se destacam são: selina-1,3,5 (11) trien-8-one com 48,52%, oxido seline - 1,3,7(11)-trien-8-one (17,33%), germocreno b (8,53%),  $\eta$ -elemeno (3,64%),  $\beta$ -elemeno (3,63%) e  $\beta$ -cariofileno (2,62) entre 21 compostos identificados.

HENRIQUES *et al.* (1997) descrevem um estudo com cinco espécies de *Myrcia*. *M. acuminatissima*, *M. bombycina*, *M. fallax*, *M. glabra*, *M. multiflora*. Trabalho realizado com os óleos essenciais de espécies de *Myrcia*, apresentam setenta compostos representando de 87,5% a 97% dos componentes identificados. Destacam a presença de cinco principais substâncias que aparecem em maior concentração. São essas:  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bisabolol, valerianol, linalol e  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno.

MAIA *et al.* (1997) citam para o óleo essencial extraídos de folhas de *Eugenia puniceifolia* coletadas em diferentes localizações da Amazônia como principais compostos:  $\beta$ -cariofileno seguido por  $\eta$ -elemeno,  $\alpha$ -humuleno, escandineno e  $\beta$ -elemeno.

DELLACASSA *et al.* (1997) reportam no óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia uruguayensis*, 61 compostos. Entre esses se destacam por apresentar maior concentração, o limoneno, 1,8-cineole,  $\alpha$  pineno e óxido de cariofileno.

LIMBERGER *et al.* (1998) estudaram sob o ponto de vista farmacológico a atividade antimicrobiana do óleo volátil de várias espécies de Myrtaceae. Entre elas: *Myrceugenia cucullata*, *Myrceugenia myrcioides* e *Myrceugenia oxysepata*. De todas os exemplares testados, o que melhor apresentou resultado frente aos agentes testados foi *Marlierea eugeniopsoides*, com destaque frente ao *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteos* e *Saccharomyces cerevisiae*. *M. cucullata* apresentou bom potencial de atividade antimicrobiana, demonstrando inibição de crescimento para *S. aureus* e inibição total para *S. cerevisiae*. Os autores ainda citam a

presença de componentes químicos presentes no óleo volátil com ação inibitória, entre eles: terpinen-4-ol, terpinoleno, 1,8 cineol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, eugenol, timol e citral.

MARTINS *et al.* (1998) relatam no estudo do óleo essencial obtido de folhas de *Eugenia nitida* trinta componentes encontrados. Os que se apresentam em maior concentração são:  $\beta$ -cariofileno, D-4 ol,  $\gamma$ -elemeno,  $\beta$ -selineno,  $\gamma$ -muuroleno, valenceno, epi- $\alpha$  cadinol, selin-11-en-4 $\alpha$ -ol,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$  cadinol, selin-3,7(11)-diene e  $\beta$ -eudesmol.

GODOY *et al.* (1999) destacam no óleo essencial de *Eugenia ovalifolia* a presença de globulol (12,9%) e viridiforol (11,4%), presentes em maiores percentuais. Em um total de quarenta e quatro compostos representando 88% por cento da identificação do óleo.

LIMBERGER *et al.* (2001) descrevem no óleo essencial de quatro espécies de *Camponesia*, a presença de 62 componentes identificados, resultado no total de 94 -99% dos constituintes do óleo. Apresentam-se em maior concentração para *C. guazumifolia*, o espatulenol (27,7%) e óxido de cariofileno (29,0%), em *C. rhombe*, biciclogermacreno (13,6%), globulol (10,8%) e linalol (9,7%). Em *C. xanthocarpa* (e) nerolidol (28,8%) e linalol (17,7%). Em *C. aurea*  $\alpha$ -pineno (16,5%) e mirceno (11,5%).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Myrceugenia seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel e *M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum (Myrtaceae) foram analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas na Serra de Araçatuba, Morro dos Perdidos Município de Guaratuba, Paraná, Brasil. As coletas foram efetuadas no período de setembro de 2000 a maio de 2001. Os materiais foram identificados com as seguintes especificações:

Tabela 01 - Especificações das amostras

Coleta	<i>M. seriatoramosa</i>	<i>M. pilotantha</i>
Setembro de 2000	0920MS	0920MP
Março de 2001	0321MS	0321MP
Maior de 2001	0521MS	0521MP

#### 4.1.1 Anatomia Foliar

Para análise da anatomia foliar foram selecionadas amostras de folhas a partir do 4º nó de ambas as espécies, amostras 0321MS e 0321MP. As amostras foram coletadas e imediatamente fixadas em FAA 70 (JOHANSEN,1940) e armazenadas em álcool etílico 70%.

Parte das amostras foi utilizada na elaboração de lâminas semi-permanentes e parte para lâminas permanentes.

Para confecção de lâminas foram realizadas secções transversais da porção central mediana do limbo e do pecíolo, bem como secções paradérmicas de ambas as faces da folha.

As secções transversais e paradérmicas foram realizadas à mão livre e a clarificação foi efetuada com solução de hipoclorito de sódio a 20% (FOSTER,1949). As mesmas foram coradas com azul de toluidina 0,05% em solução aquosa e montadas

em glicerina a 40% (BERLYN & MIKSCHE, 1976). Para a lutagem das lâminas utilizou-se esmalte incolor.

As lâminas permanentes foram confeccionadas a partir de material emblocado em glicol metacrilato (GMA), de acordo com técnicas de FEDER & O'BRIEN, (1968) e especificações do fabricante.

A microtomização foi realizada em micrótomo rotatório Olympus CUT 4055.

Para técnica de inclusão em glicol metacrilato, obteve-se secções de 7 $\mu$ m. As secções foram distendidas em lâminas com água e secas em mesa térmica. Para coloração, utilizou-se azul de astra a 1% e fucsina básica a 0,0125% em solução aquosa (BRITO & ALQUINI, 1996).

Para os testes microquímicos, obteve-se secções à mão livre da região central mediana da folha e testadas com os seguintes corantes ou reagentes: cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para comprovação de compostos fenólicos; floroglucinol acidificado (FOSTER, 1949) para lignina; lugol (BERLYN & MIKSCHE, 1976) indicado para amido e Sudan III (SASS, 1951) para substâncias graxas (paredes cutinizadas e suberizadas).

Os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio ZEISS MC-80. As escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

## 4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Destinou-se as amostras 0920MS e 0920MP para a realização dos ensaios fitoquímicos relacionados abaixo.

### 4.2.1 Características Organolépticas, pH e Resíduo Seco.

Determinaram-se nos extratos aquoso e hidroalcoólico a 20% o pH, cor, odor e resíduo seco das amostras selecionadas.

#### 4.2.2 Marcha Sistemática Fitoquímica

A marcha sistemática fitoquímica foi realizada segundo MOREIRA (1979), modificado por NAKASHIMA (1993).

Os extratos aquoso e hidroalcoólico a 20% das folhas de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha* foram preparados pelo método de maceração, para determinação dos seguintes grupos químicos:

a) extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas e aminogrupos.

b) extrato aquoso: aminogrupos, glicosídeos antociânicos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos cianogenéticos, taninos (condensados e hidrolisáveis) e ácidos fixos.

As reações realizadas para a caracterização dos metabólitos secundários foram:

- a) testes da cianidina ou Shinoda e oxalo-bórica para a detecção de flavonóides;
- b) reação de Bornträger para a pesquisa de antraquinonas;
- c) reação de Liebermann-Burchard para a detecção de esteróides e triterpenos;
- d) método do ultravioleta (360nm) para caracterização das cumarinas, pelo fato da maioria possuir fluorescência azul-brilhante ou verde;
- e) reações gerais utilizando os reativos de Dragendorff, Mayer, Bouchardat e Bertrand para a pesquisa de alcalóides;
- f) reação de ninhidrina para detectar a presença de aminogrupos;
- g) reação de coloração em meio ácido, básico e neutro para caracterização das antocianinas, pois estas comportam-se como indicadores de ácido-base;
- h) reação com papel picro-sódico para a pesquisa de glicosídeos cianogenéticos;
- i) reação com reativo de Nessler para detectar os ácidos fixos;
- j) reação de Stanishy para a caracterização de taninos condensados e hidrolisáveis;
- k) teste de formação de espuma para detectar a presença de saponinas.

#### 4.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

#### 4.3.1 Determinação Quantitativa de Óleos Essenciais

Foi determinado quantitativamente o óleo essencial das seguintes amostras: 0301MS, 0301MP, 0501MS, 0501MP.

Para extração do óleo essencial das folhas, fez-se a secagem à temperatura ambiente. As folhas foram fragmentadas em pedaços pequenos com o auxílio de um liquidificador. A extração do óleo essencial foi realizada através de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXII, 1990). Manteve-se a extração por 5 horas, decorrido esse tempo determinou-se do valor o óleo essencial em ml %.

Procederam-se as análises físicas dos óleos essenciais das amostras. Determinaram-se índice de refração (F. BRAS. IV, 1988), densidade relativa (F. BRAS. IV, 1988), e a solubilidade em álcool (Ph. Helv. VII, 1993). As determinações foram feitas em triplicatas.

##### 4.3.2.1 Determinação da densidade relativa $_{20}d^{20}$ (F. BRAS. IV, 1988)

Utilizou-se o método do picnômetro, com o auxílio de um capilar previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e de sua massa preenchida com água, recentemente destilada e ajustada a 20° C.

Colocou-se a amostra no capilar. Ajustou-se a temperatura para 20°C e pesou-se. Obtendo-se a massa da amostra através da diferença da massa do picnômetro cheio e vazio.

O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20°C, é a densidade relativa.

##### 4.3.2.2 Determinação do índice de refração $_{20}n^{20}$ (F. BRAS. IV, 1988)

Determinou-se o índice de refração em refratômetro ABBÉ em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D) e à temperatura de 20°C.

A calibração do aparelho foi realizada com água destilada, cujo índice de refração é 1,3330 a 20°C e 1,3325 a 25°C.

#### 4.3.2.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool (Ph. Helv. VII, 1993).

Determinou-se a solubilidade do óleo essencial em álcool etílico 60%, 70%, 80%, 90% e álcool etílico absoluto. O álcool etílico foi colocado na bureta de 25ml e gotejou-se sobre a amostra de 0,1 ml de óleo essencial. Após a solubilização total da amostra, procedeu-se a leitura do volume gasto de álcool na bureta.

#### 4.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram realizadas cromatografias utilizando o sistema abaixo, das amostras 0301MS e 0501MS, 0301MP e 0501MP . As amostras proveniente das mesmas espécies foram reunidas, devido ao baixo rendimento do óleo essencial.

- a) placas - cromatofolhas de sílica gel G preparadas no laboratório (5x20; 10x20; 20x20);
- b) cuba: de vidro saturada;
- c) desenvolvimento: simples, ascendente;
- d) percurso: 12 cm;
- e) fase móvel: toluol + acetato de etila (93: 7);
- f) revelador: vanilina sulfúrica.
- g) amostra: óleo essencial a 10% em hexano;
- h) o da amostra: 1µl da amostra.

#### 4.3.4 Cromatografia Capilar de Alta Resolução Acoplada a um Detector de Massas

Para a separação e identificação dos componentes químicos do óleo essencial, utilizou-se GC/MS-MSD de Hewlett-Packard, cromatógrafo modelo HP 5890A e Detector Seletivo de Massas modelo HP 5970, com banco de dados Wiley -Windows para 250.000 espectros. Injetando-se 0,5µl das amostras de óleo essencial de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha* na razão de Split 1:100, com T. inicial: 80°C, com Tempo inicial: 6min., Rampa de Aquecimento: 12°C/min., T parcial: 145°C, Tempo parcial: 10 min, Rampa de Aquecimento: 2°C/min., T.parcia1: 160°C, Tempo parcial: 20 min, Rampa de Aquecimento: 3°C/min, T.final: 250°C, Tempo final: 10min., coluna capilar de metil silicona do tipo PONA, com 50m x 0,2mm x 0,5µm de filme líquido, vazão de 4ml/min He. Temperatura de injetor: 250°C, temperatura de detector: 280°C, energia de ionização: 70eV, scanning de 10 a 550 u.m.a.

Tempo total de análise foi de 93.92 minutos para *M. pilotantha* e *M. seriatoramosa*.

A confirmação dos compostos detectados por CG/MS-MSD foi feita através dos seguintes itens:

Cálculo do índice de Kovats com padrões de terpenos (DOOL & KRATZ, 1963).

Comparação do índice calculado com o presente na literatura (ADANS, 1993).

Via biblioteca Willey-Windows do Chemstation HP séries 4 5/133 Vectra XM.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

#### 5.1.1 Descrição Morfológica de *M. seriatoramosa* (Kiaersk.) D. Legrand & Kausel.

Árvores em torno de 6 m de altura. Folhas glabras em ambas as faces, medindo de 5,5 - 7 x 2,5 - 3,5 cm, ápice agudo ou acuminado, a ponta em geral obtusa, pecíolos canaliculados, 3 - 7 mm de comprimento; nervuras laterais até 16 pares, em geral quase indistintas ou promínulas; vênulas marginais e retículas quase indistintas em ambas as faces ou levemente promínulas, lâminas foliares coriáceas. Características condizentes com LANDRUM (1980).

#### 5.1.2 Descrição Morfológica de *M. pilotantha* (Kiaersk.) Landrum.

Árvores de aproximadamente 5 m de altura. Folhas elíptica-lanceoladas, com cerca de 3,5 - 5,0 x 1,4 - 2,3 cm, espessamente pubescentes quando jovens, nervuras medianas densamente pubescente em ambas as faces. Folhas agudas acuminadas ou arredondadas no ápice, agudas ou acuminadas na base, pecíolos subpubescentes ligeiramente caniculados na face abaxial, medindo aproximadamente 2 - 8 mm de comprimento, 0,5 - 1mm de diâmetro. Nervuras laterais pouco distintas, até cerca de 10 pares; vênulas marginais idênticas as laterais ou promínulas; lâminas foliares coriáceas a subcoriáceas. Características condizentes com LANDRUM (1980).

#### 5.1.3 Anatomia Foliar de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha*.

No estudo anatômico, as duas referidas espécies aqui analisadas revelaram epiderme de ambas as faces em vista frontal, com intensa sinuosidade das paredes

anticlinais, coincidindo com descrições constatadas em outras Myrtaceae, variando o grau de intensidade para as diferentes espécies, citadas por MOURA (1971), MACHADO *et al.* (1988) NEVES (1989) e KHATIJAH *et al.* (1992) ( Fig. 1 e 2).

As folhas são hipoestomáticas, com estômatos do tipo anomocítico, acordando com METCALFE & CHALK (1950) que citam os estômatos para a família sendo freqüentemente na maioria do tipo anomocítico. FERRI (1971) relata ter encontrado em seis espécies estudadas da família Myrtaceae, a presença de estômatos do tipo anomocítico somente para uma. Nas demais todas descrevem a presença de estômatos do tipo paracítico. As espécies analisadas no presente trabalho acordam com os relatos de JORGE *et al.* (2000), que também descrevem a presença de estômatos do tipo anomocítico em *Myrcia guaianensis* e *Eugenia puniceifolia* (Fig. 3 e 4).

METCALFE & CHALK (1950) citam os tricomas tectores na família Myrtaceae comumente simples e unicelulares e tricomas glandulares normalmente ausentes. As duas espécies analisadas apresentam tricomas tectores, com maior incidência na nervura central de *M. pilotantha*, na qual apresentam-se em forma de "T" e levemente espiralizados, unicelulares, vindo a coincidir com a observação de FONTANELLE (1994) (Fig 5).

Em secção transversal constata-se um único estrato epidérmico em ambas as faces, com intensa cutícula na face adaxial, das duas espécies (Figs. 6 e 7). As duas espécies aqui analisadas revelaram mesofilo do tipo heterogêneo, com parênquima paliçádico provido de 2 ou 3 estratos celulares em ambas, enquanto o lacunoso é provido de 7 a 10 estratos em *M. pilotantha* e 12 a 15 em *M. seriatoramosa* ( Fig. 6 e 7). As duas espécies aqui analisadas não revelam as mesmas características descritas por METCALFE e CHALK (1950), que citam o mesofilo isobilateral a central como o mais freqüente nesta família.

Idioblastos contendo drusas se fazem presentes no mesofilo de ambas, vindo ao encontro com o observado por MACHADO *et al.* (1988), NEVES (1989), FONTANELLE *et al.* (1994) e METCALFE e CHALK (1950).

A família Myrtaceae está descrita por BARROSO (1991) contendo numerosos canais oleíferos, apresentando-se na forma de pequenos pontos translúcidos freqüentemente presentes nas folhas, frutos e sementes. Tanto *M. seriatoramosa* quanto *M. pilotantha* apresentam glândulas oleíferas no mesofilo (Fig. 6 e 7). Estas estruturas também relatadas em trabalhos de MOURA (1971), NEVES (1989), JORGE *et al.* (2000).

A nervura principal de *M. seriatoramosa* é pouco saliente, com uma leve depressão na face adaxial (fig. 8). O sistema vascular é constituído por um único feixe, do tipo bicolateral envolto por uma bainha esclerenquimática acordando com JORGE *et al.* (2000). Discordando de NEVES (1989), que em seu trabalho observou a presença de um feixe colateral para Myrtaceae analisada. O floema aparece circundando totalmente o xilema em ambas as espécies aqui estudadas. Uma diferença significativa ocorre na nervura principal de *M. pilotantha*, onde há presença de uma acentuada proeminência na face abaxial bem como a presença de tricomas (Fig. 9). As duas espécies em estudo revelaram reações positivas perante a presença de cloreto férrico, floroglucinol acidificado e sudam III.

#### 5.1.4 Estudo Anatômico de Pecíolo de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha*.

Em secção transversal, o pecíolo revela-se côncavo convexo, com sinuosidades em torno de toda sua superfície, manifestando na parte superior, duas expansões laterais para *M. seriatoramosa*. Essas características são condizentes com as observadas por NEVES (1989). Em *M. pilothanta* o formato do pecíolo é levemente arredondado com intensa sinuosidade, bem como revela tricomas tectores (Fig. 10 e 11). Em ambas as espécies, a epiderme é uniestratificada com presença de compostos fenólicos, acordando com VARELLA (2001). Uma intensa cutícula com presença de estrias se faz presente na epiderme de ambas as espécies (Fig.12, 13 e 14). Conforme METCALFE & CHALK (1950), na família Myrtaceae encontram-se cavidades secretoras, freqüentemente glândulas oleíferas, ocorrendo próximas à epiderme ou em

camadas mais profundas da folha. Os mesmos autores relatam também a presença de cristais isolados ou agrupados muito comuns em tecidos não lignificados. Nas espécies estudadas, internamente à epiderme, o parênquima fundamental apresenta idioblastos com drusas bem como a presença de glândulas. Apresentam de 10 a 13 estratos celulares no parênquima lacunoso e 2 estratos no parênquima paliçádico em *M. seriatoramosa*, e 13 ou 14 estratos no parênquima lacunoso e 2 paliçádicos em *M. pilotantha* (Fig. 10 e 12). O sistema vascular é do tipo biclateral em forma de arco com convexidade voltada para a face abaxial, apresentando xilema envolto por floema e todo o conjunto envolto por uma bainha esclerenquimática em ambas as espécies, revelando lateralmente um feixe de menor calibre em *M. seriatoramosa*. Esse feixe apresenta xilema em direção à face adaxial e floema em direção a face abaxial sendo o conjunto todo circundado por uma bainha esclerenquimática espessa ( Fig. 10 e 11). Essa mesma configuração é descrita por COSTA(1995) e NEVES (1989) para outros exemplares da família.

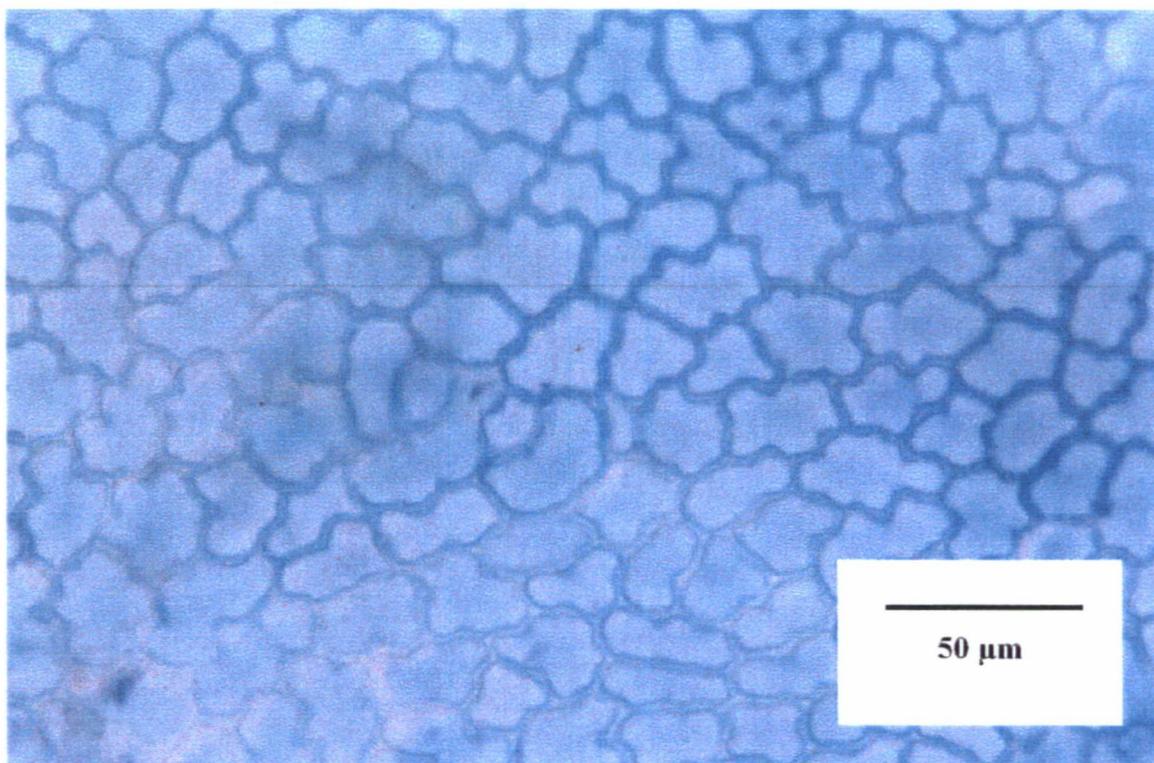


Fig. 01-Vista frontal da epiderme da face adaxial de *M. seriatoramosa*.

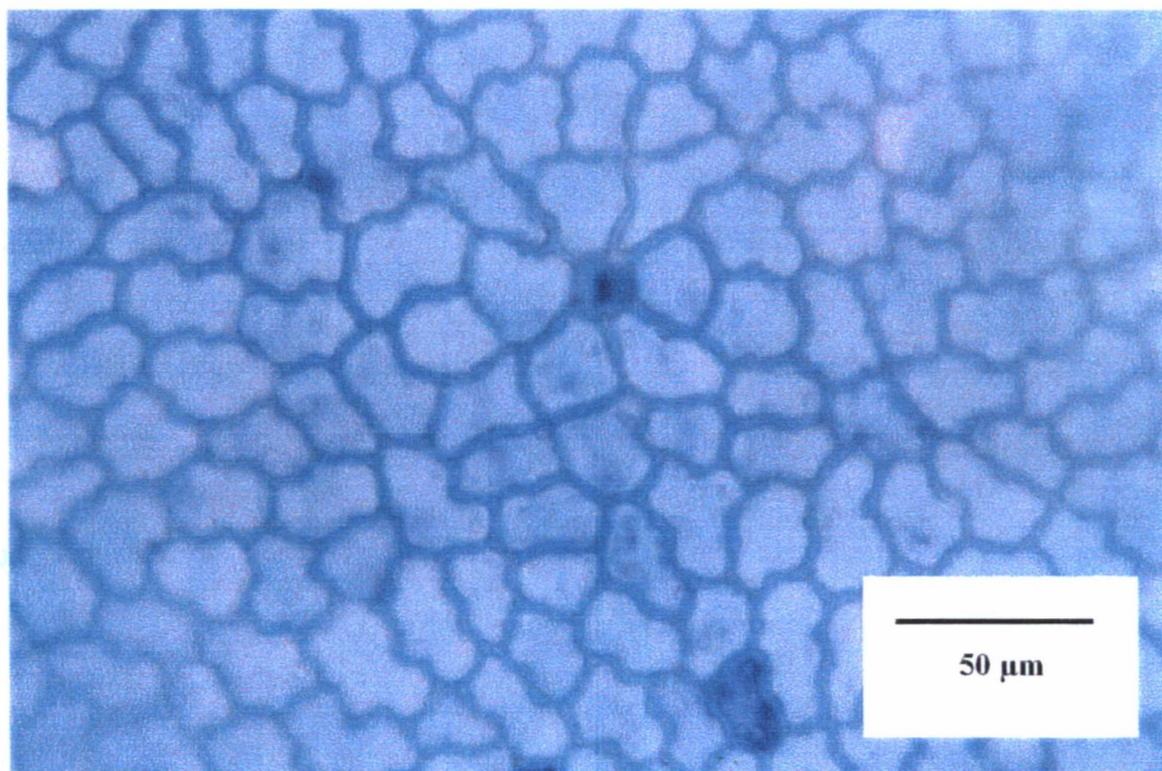


Fig. 02 - Vista frontal da epiderme da face adaxial de *M. pilotantha*.

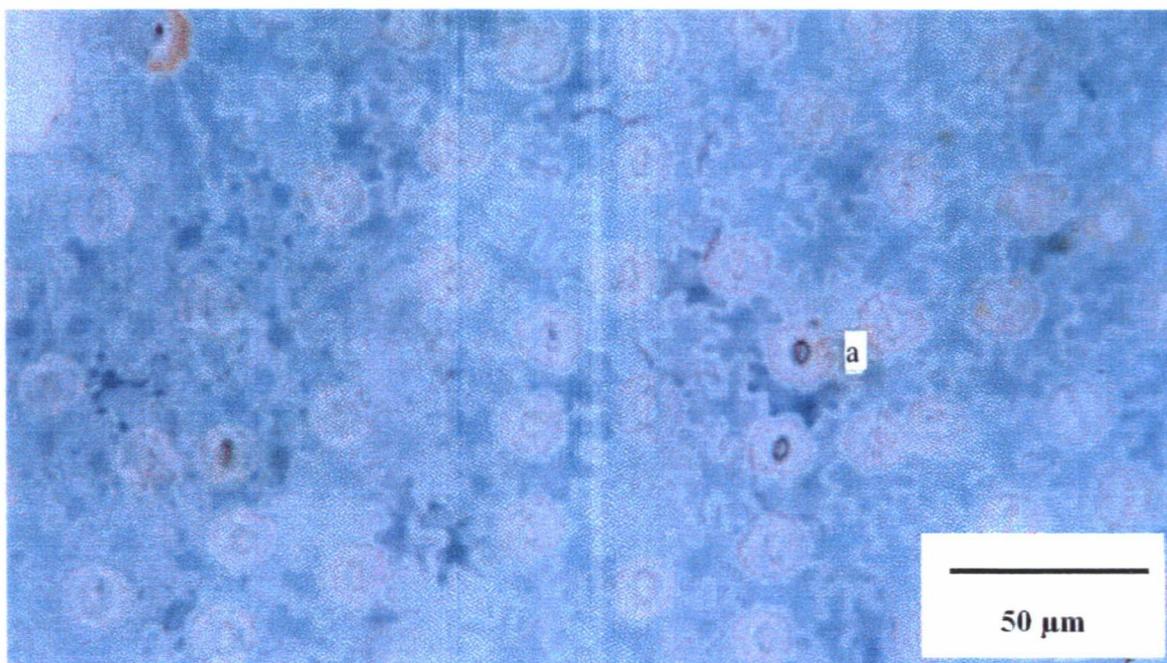


Fig. 03 Epiderme da face abaxial de *M. seriatoramosa* destacando estômatos do tipo anomocítico.

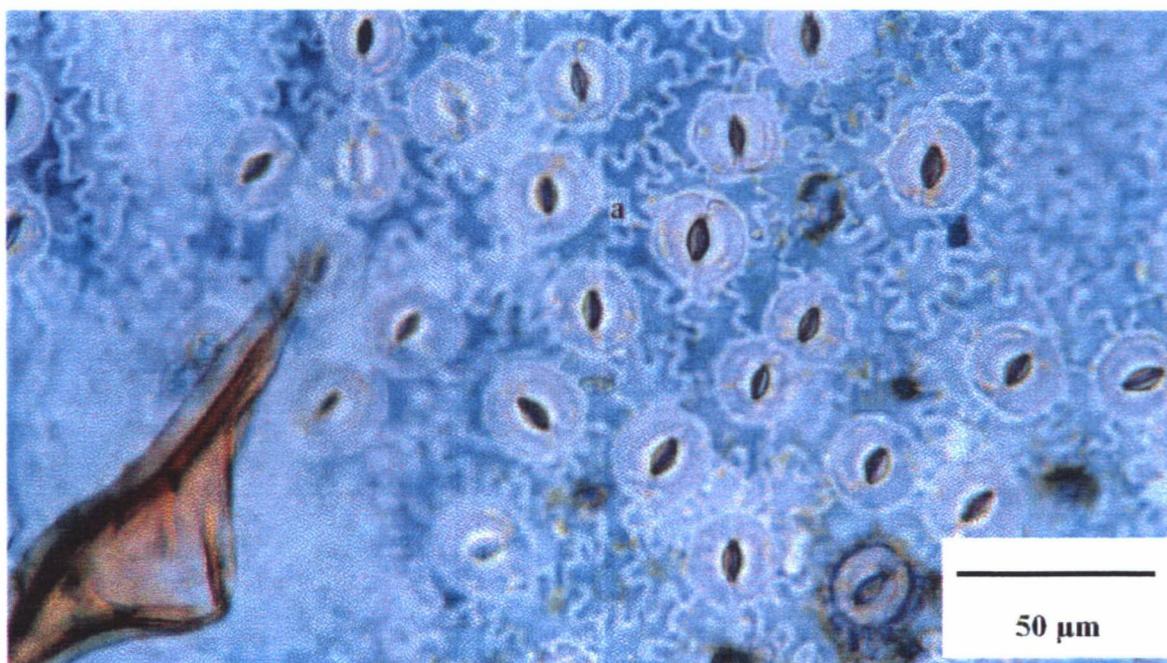


Fig. 04 - Epiderme da face abaxial de *M. pilotantha* destacando estômatos do tipo anomocítico.

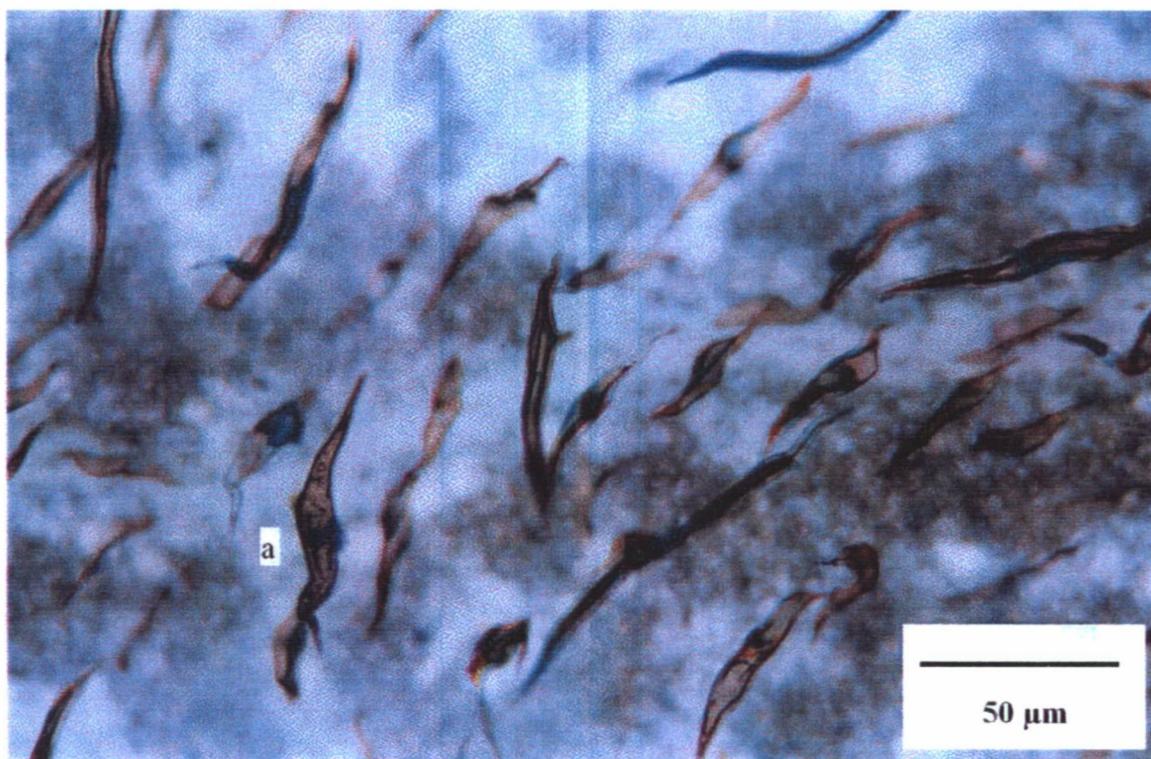


Fig.05 - Epiderme da face **abaxial** de *M. pilotantha*.  
a) Tricomas tectores

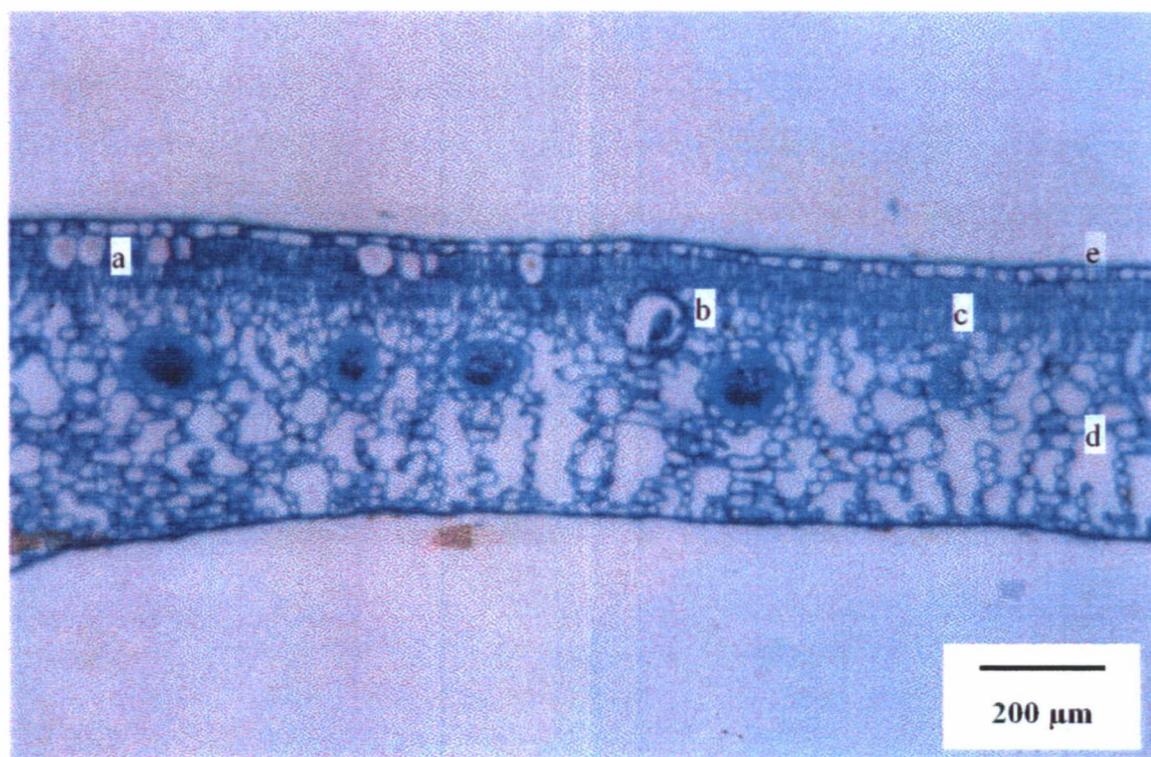


Fig. 06 - Lâmina foliar de *M. seriatoramosa* em secção transversal destacando-se: a) Idioblastos com cristais, b) Glândulas, c) Parênquima paliçádico, d) Parênquima lacunoso, e) Cutícula

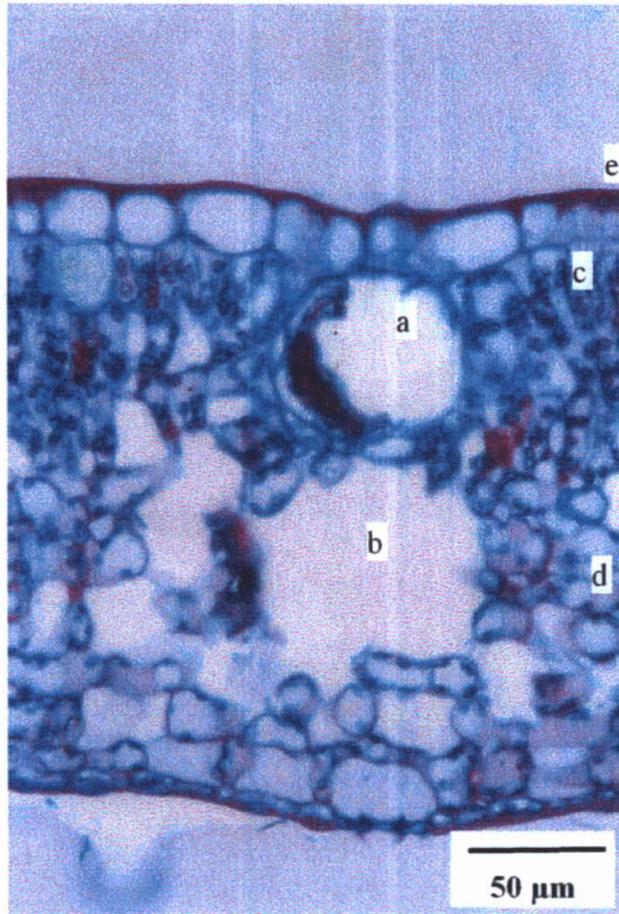


Fig. 07 - Detalhe da lâmina foliar de *M. pilotantha* em secção transversal destacando-se: a) Glândula, b) Lacuna, c) Parênquima paliçadico, d) Parênquima lacunoso, e) Cutícula.



Fig. 08 - Lâmina foliar de *M. seriatoramosa* em secção transversal, na porção mediana da nervura principal destacando-se: a) Cutícula, b) Bainha esclerenquimática, c) Glândulas.

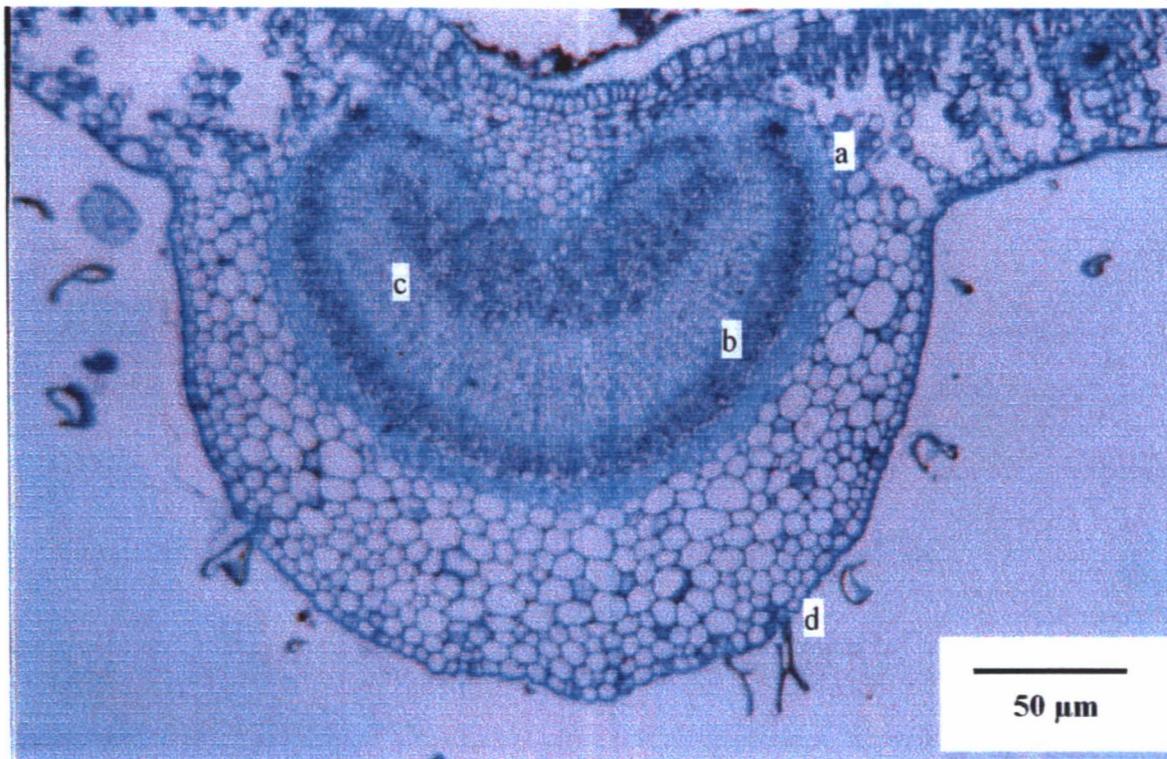


Fig. 09 - Lâmina foliar de *M. pilotantha* em secção transversal, na região da nervura principal destacando-se: a) Bainha esclerenquimática, b) Floema, c) Xilema d) Tricomas tectores.

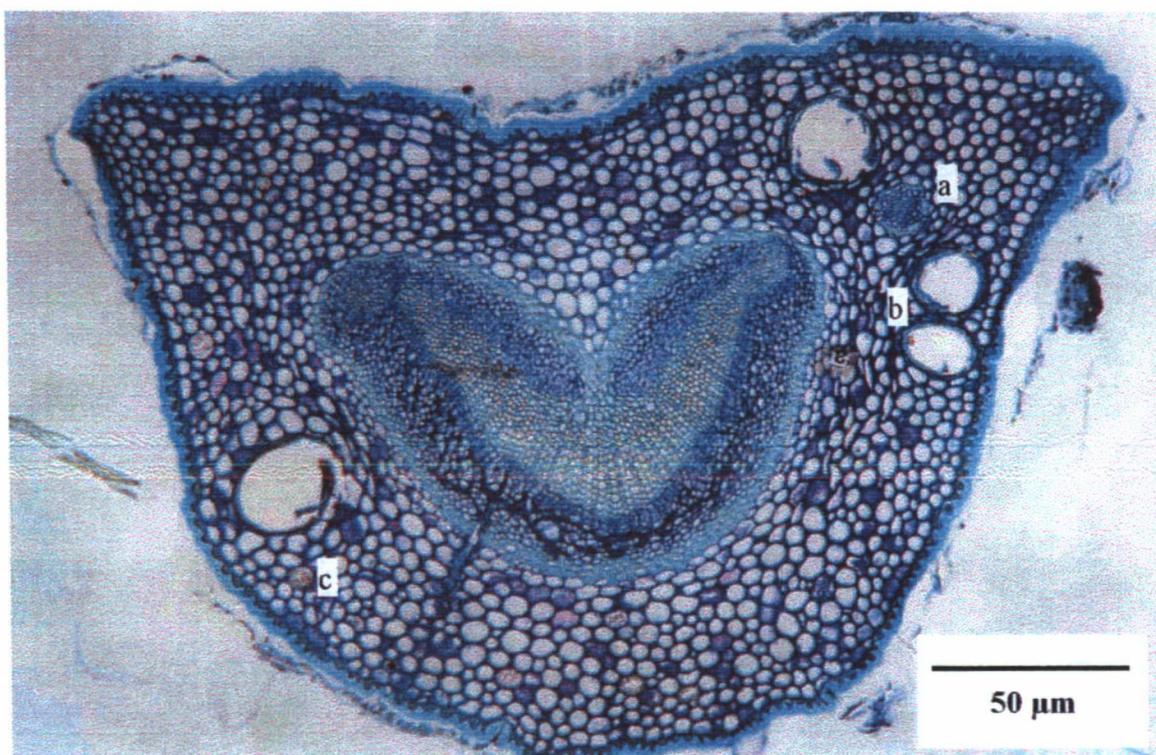


Fig. 10 - Secção transversal do pecíolo de *M. seriatoramosa* na porção mediana, estacando-se: a) Feixe lateral, b) Glândulas, c) Idioblastos contendo cristais.

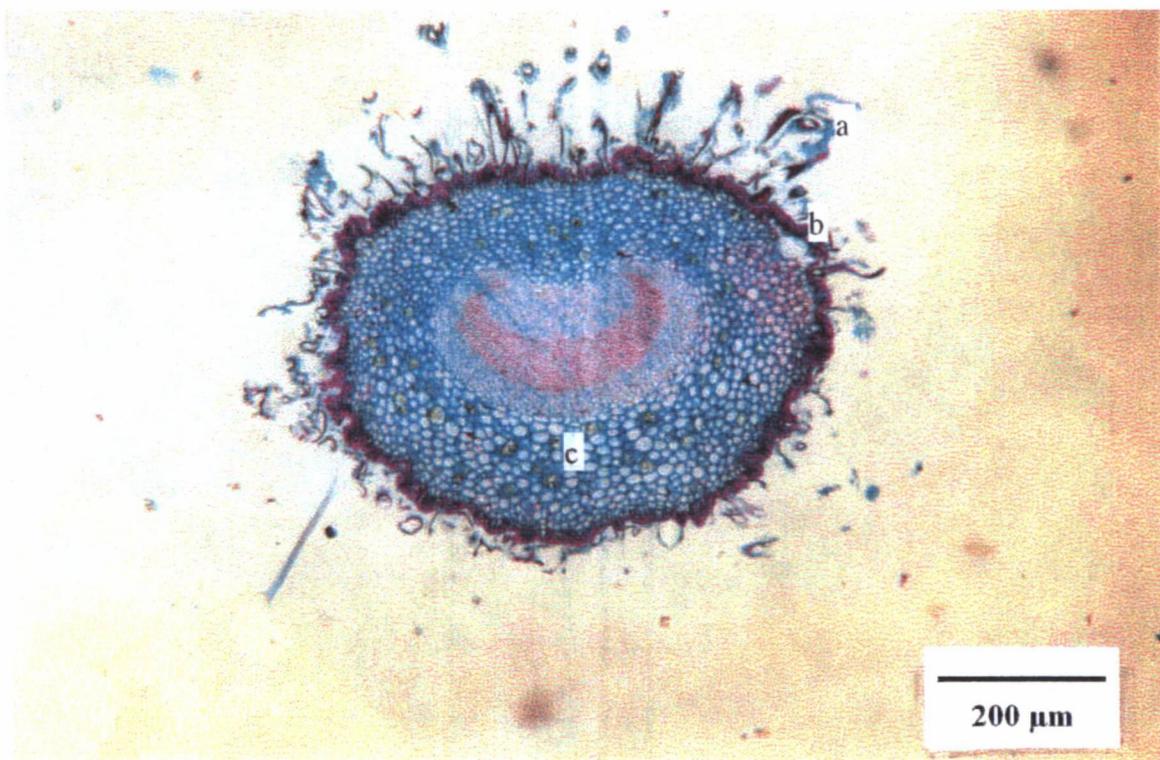


Fig. 11- Secção transversal do pecíolo de *M. pilotantha* na porção mediana, destacando-se: a) Tricomas tectores, b) Glândulas, c) Idioblastos contendo cristais.

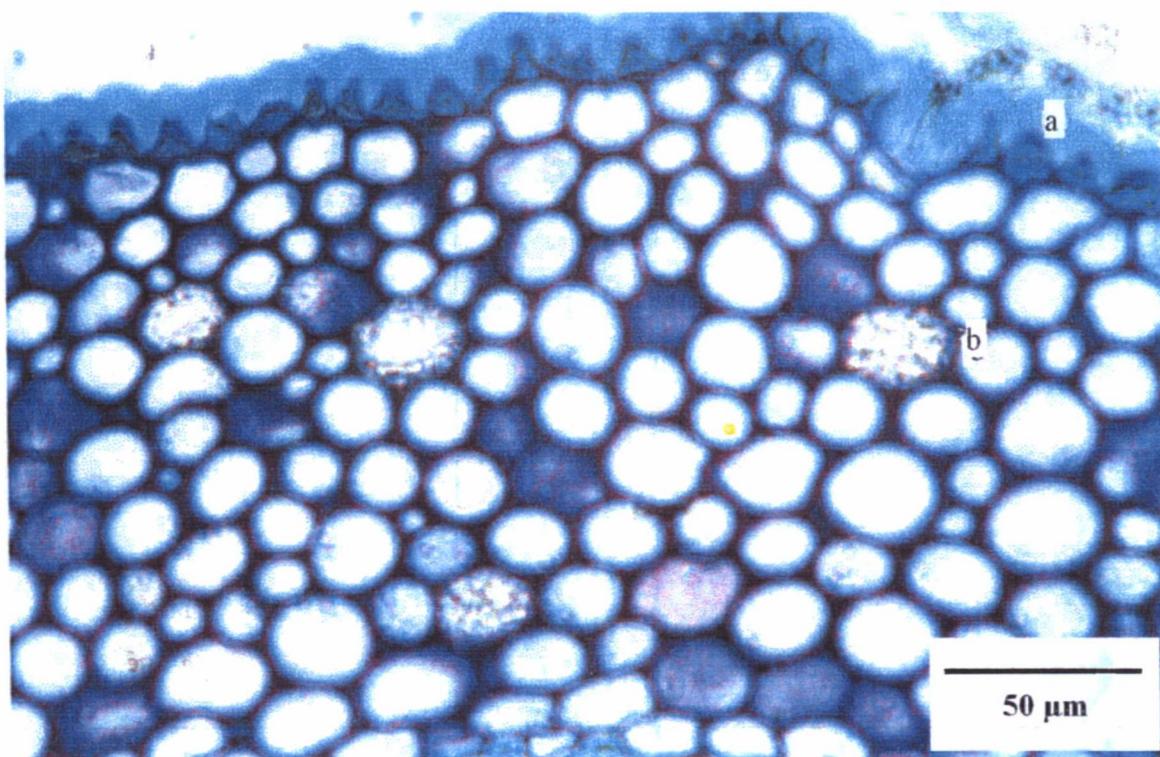


Fig. 12 - Detalhe da secção transversal do pecíolo de *M. seriatoramosa*, destacando-se: a) Flanges cuticulares, b) Idioblastos contendo cristais

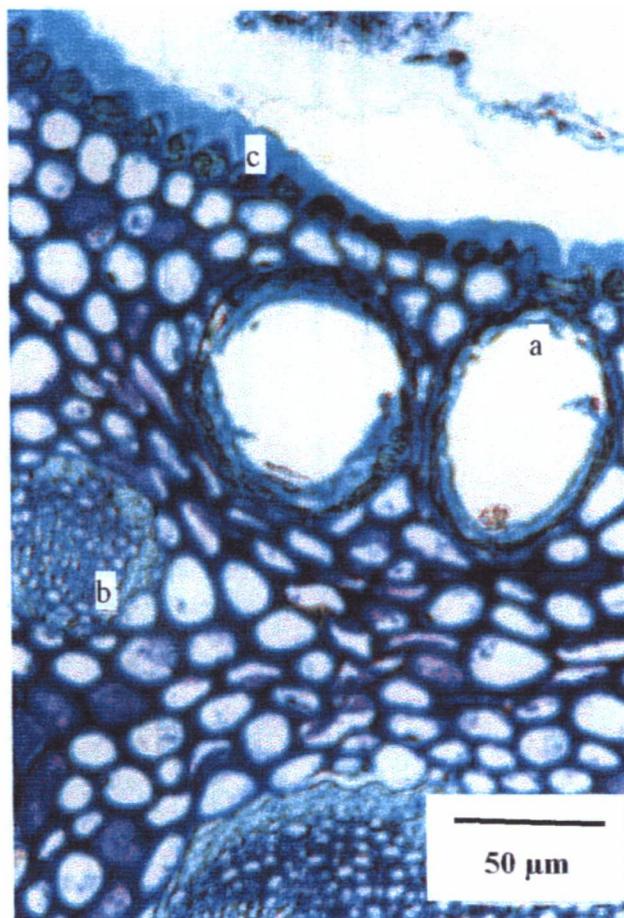


Fig. 13- Detalhe do peciolo de *M. seriatoramosa* em secção transversal , destacando-se: a) Glândulas, b) Feixe lateral, c) Epiderme uniestratificada.

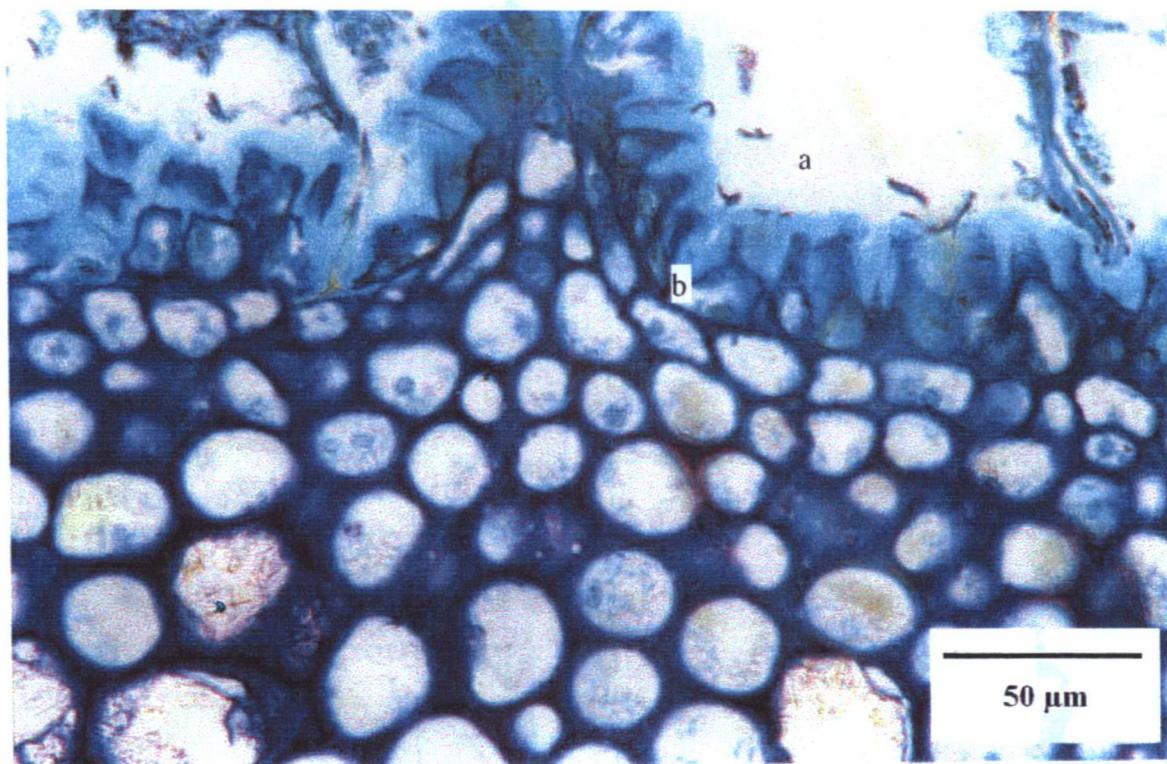


Fig. 14 - Detalhe do peciolo de *M. pilotantha* em secção transversal, destacando-se: a) Flanges cuticulares, b) Epiderme uniestratificada.

## 5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

### 5.2.1 Características Organolépticas, Resíduo Seco e Marcha Sistemática Fitoquímica

Tabela 02. Resultado da abordagem fitoquímica de metabólitos secundários.

Hidroalcoólico	<i>M. seriatoramosa</i>	<i>M. pilotantha</i>
cor	verde escuro	verde escuro
odor	característico	característico
sabor	fermentado	adocicado
pH	6.0	6.0
extrato seco	10,37g%	5,58g%
glicosídeos flavônicos	positivo	positivo
esteróides e/ ou triterpenóides	positivo	positivo
aminogrupos	positivo	positivo

Aquoso	<i>M. seriatoramosa</i>	<i>M. pilotantha</i>
cor	laranja claro	laranja claro
odor	característico	característico
sabor	amargo	amargo
pH	5.0	5.0
taninos	positivo	positivo
aminogrupos	positivo	positivo
extrato seco	3,38g%	1,21g%

Ambas espécies de *Myrceugenia* revelaram algumas diferenças na abordagem fitoquímica. No extrato hidroalcoólico diferenciaram-se no sabor e percentual do extrato seco onde *M. seriatoramosa* apresentou 10,37g% enquanto que *M. pilotantha* somente 5,58g%. No extrato aquoso ocorreu somente uma diferença significativa novamente na análise referente ao extrato seco, *M. seriatoramosa* apresentou maior percentual 3,38g% em relação a *M. pilotantha* 1,21g%.

## 5.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

### 5.3.1 Análise Quantitativa

Tabela 03: Rendimento da extração de óleo essencial pelo processo de hidrodestilação para cada 100g de material.

Espécie	Rendimento (ml %)
<i>M. seriatoramosa</i> coletada em março de 2001	0,5
<i>M. seriatoramosa</i> coletada em abril de 2001	0,3
<i>M. pilotantha</i> coletada em março de 2001	0,1-0,15
<i>M. pilotantha</i> coletada em abril de 2001	0,1-0,15

### 5.3.2 Análise Físico - química

### 5.3.3 Resultado das Análises Físico-químicas

Realizaram-se as análises para o óleo essencial extraído de *M. seriatoramosa* por apresentar um rendimento suficiente. Viabilizando a realização de todos os itens relacionados abaixo. A espécie *M. pilotantha* apresentou um percentual muito baixo limitando a sua determinação.

A análise do óleo essencial de *M. seriatoramosa* apresentou cor amarelo claro, odor fortemente desagradável lembrando piridina, índice de refração: 1,4835, densidade relativa 0,8799 g/cm<sup>3</sup>. Em relação a solubilidade em álcool etílico, total para álcool absoluto na proporção 1:1, diminuindo acentuadamente a solubilidade perante apresentações mais diluídas de etanol. Perante uma solução a 90%, foram necessários 50 gotas de álcool para uma gota de óleo chegando a insolúvel frente a uma solução a 60%.

Para *M. pilotantha* foi possível somente observar a visualização da cor amarela tendendo a um tom palha e odor característico de mata.

### 5.3.4 Cromatografia em Camada Delgada

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) apresentou um desempenho satisfatório na separação de alguns constituintes químicos do óleo

essencial de *M. seriatoramosa* e *M. pilotantha*. As amostras apresentaram manchas com diferentes intensidade e valores de Rf (Fig. 15A e 15B). Tanto para *M. seriatoramosa* quanto *M. pilotantha* houve coincidência para dois padrões testados, são esses: cineol Rf: 58,33 e  $\beta$ -cariofileno Rf: 83,33.

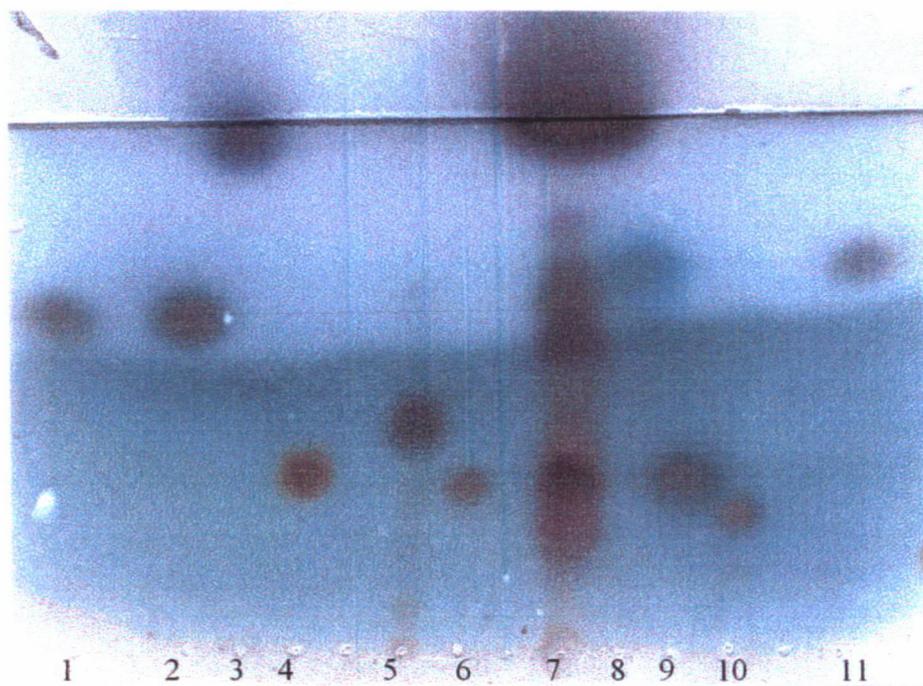


Fig.15A-Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. seriatoramosa*: 1-cineol, 2-acetato de isobornila, 3-  $\beta$  cariofileno, 4-eugenol, 5-citral, 6-linalol, 7-amostra, 8-mentona, 9-mentol, 10-terpineol, 11-terpenos de menta.

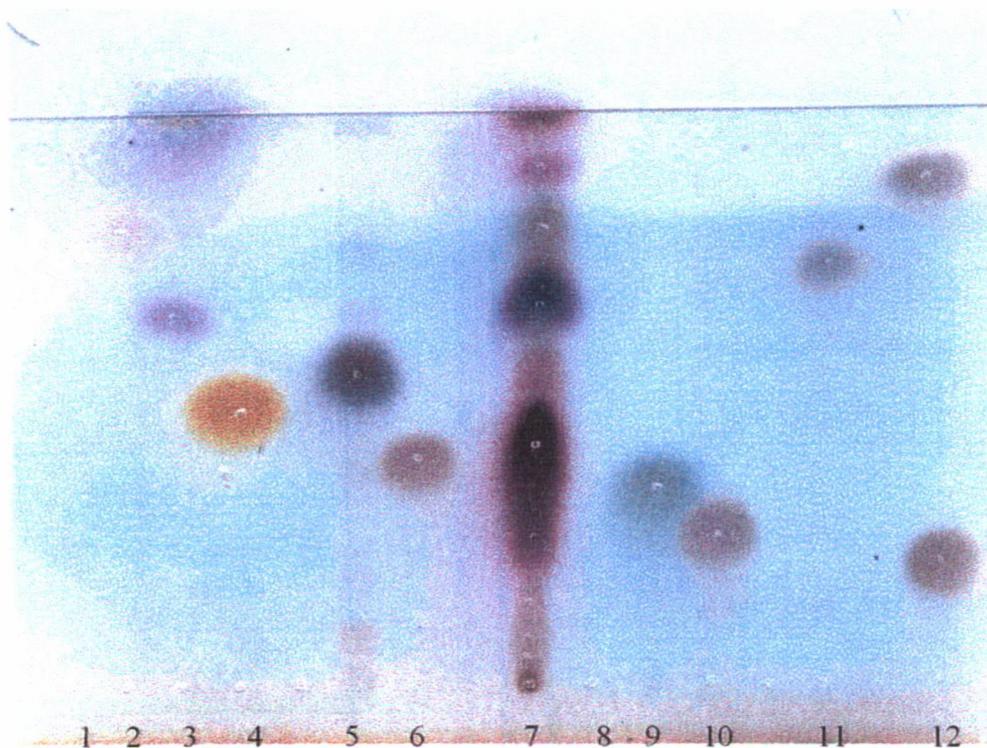


Fig.15B-Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. pilotantha*: 1-cineol, 2-acetato de isobornila, 3-  $\beta$  cariofileno, 4-eugenol, 5-citral, 6-linalol, 7-amostra, 8-mentona, 9-mentol, 10-terpineol, 11-cineol, 12-terpenos de menta.

### 5.3.5 Cromatografia Capilar de Alta Resolução Acoplada a um Detector de Massas

O rendimento máximo do óleo essencial para *M. seriatoramosa* foi de 0,5%.

Obtidos 47 picos cromatográficos principais em análise preliminar, desses, 18 foram identificados de acordo com as inferências citadas a baixo.

Tabela 04: compostos identificados em *M. seriatoramosa*

Picos	Provável Identificação	TR	Área % v/v	I. R (L)	I. R (C)	Qual	Inferência
1	$\alpha$ -pineno	13.87	3.27	939	Pd	94	MS, IR
2	canfeno	14.08	2.76	953	949	95	BD, MS, IR
3	$\beta$ -pineno	14.81	13.55	980	970	83	BD, MS, IR
4	1.8 cineol	16.20	9.46	1033	1012	96	MS
5	isoterpinoleno	18.13	1.48		1064	98	BD, MS
6	terpinenol	22.6	6.33	1177	1167	96	MS, BD, IR
7	$\alpha$ -copaene	35.31	1.38	1376	Pd	99	MS, BD, IR
8	$\beta$ -cariofileno	39.27	2.67	1418	1424	99	MS, BD, IR
9	aromadendreno	41.18	1.74	1439	1445	99	MS, BD, IR
10	$\alpha$ -humuleno	42.48	0.71	1454	1459	97	MS, BD, IR
11	aloaromadendreno	43.30	1.10	14390	1467	99	BD, MS, IR
12	$\beta$ -selineno	46.08	2.36	1485	1495	99	MS, BD, IR
13	$\alpha$ -selineno	47.15	2.05	1494	1505	97	MS, BD, IR
14	cis-calameneno	49.42	3.43	1521	1526	96	MS, BD, IR
15	cadina-1,4-dieno	51.28	1.20	1532	1543	99	MS, BD, IR
16	espatulenol	57.18	2.79	1576	pd	94	MS, BD, IR
17	óxido de cariofileno	58.01	2.85	1581		91	MS, BD
18	globulol	58.39	0.87	1587		93	MS, BD

TR-tempo de retenção

IR (L)-índice de retenção da literatura

IR (C)-índice de retenção calculado

BD-banco de dados

MS-espectro de massa

IR-índice de retenção

O rendimento para óleo essencial, de *M. pilotantha* foi de 0,15%. Obtidos a partir de uma análise preliminar, 19 picos cromatográficos principais, desses 16 foram identificados.

Tabela 05: compostos identificados em *M. pilotantha*

Picos	Provável Identificação	TR	Área % v/v	I. R (L)	I. R (C)	Qual	Inferência
1	$\alpha$ -pineno	13.37	0.66	939		97	BD, MS
2	$\alpha$ -copaeno	35.42	2.99	1376	Pd	99	BD, MS, IR
3	$\beta$ -cariofileno	39.88	19.49	1418	1424	99	BD, MS, IR
4	aromadendreno	41.52	5.76	1439	1440	99	BD, MS, IR
5	$\alpha$ -humuleno	42.81	4.26	1454	1453	90	BD, MS, IR
6	aloaromadendreno	43.55	2.68	1461	1460	99	BD, MS, IR
7	germacreno d	47.65	6.98	1480	1469	97	BD, MS, IR
8	cis- calameneno	50.07	8.4	1521	1517	99	BD, MS, IR
9	$\delta$ -cadineno	50.30	1.72	1524	1517	95	BD, MS, IR
10	espatulenol	58.06	14.73	1576	Pd	96	BD, MS, IR
11	óxido de cariofileno	58.50	5.94	1581	1581	70	BD, MS, IR
12	globulol	59.03	5.48	1583	1587	99	BD, MS, IR
13	viridiflorol	59.80	4.96	1590	1601	99	BD, MS, IR
14	isobutil o-fetalato	77.27	1.43		1821	74	BD, MS, IR
15	ác. palmídico hexadecanóico	82.87	2.62	1879	1880	99	BD, MS, IR
16	Fitol	89.77	1.06	1949	Pd	95	MS

TR-tempo de retenção

IR (L)-índice de retenção da literatura

IR (C)-índice de retenção calculado

BD-banco de dados

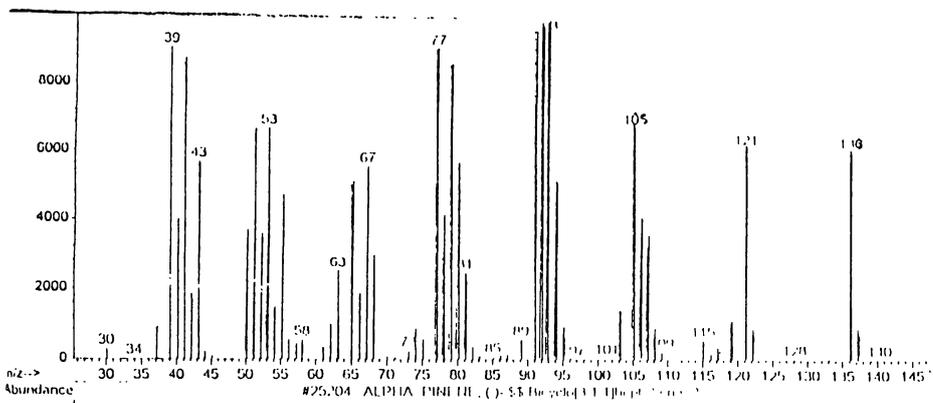
MS-espectro de massa

IR-índice de retenção

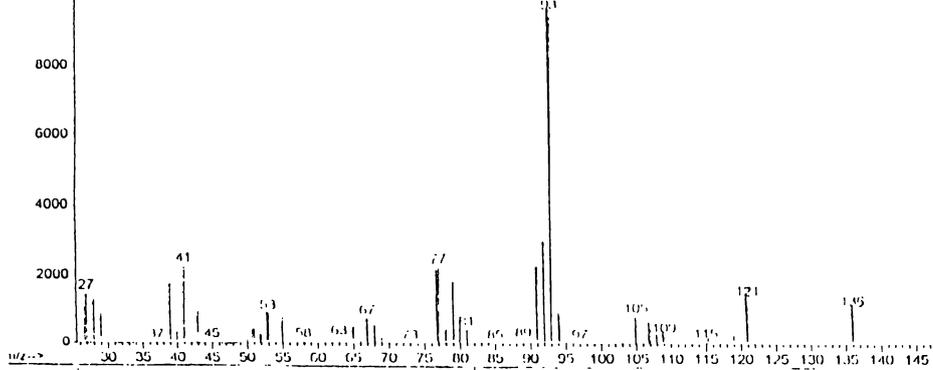
As duas espécies aqui analisadas revelaram a presença de  $\alpha$  e  $\beta$  - pineno. Enquanto que o cineol aparece neste estudo preliminar, somente para *M. pilotantha*, apesar de ter sido constatado na análise realizada em CCD. A presença destes compostos, é também relatada por outros autores, SIQUEIRA *et al.* (1983), MIGUEL *et al.*(1992) e HENRIQUES *et al.* (1993). Diferenciando o percentual para cada espécie analisada. Para as espécies em estudo, o maior percentual observado foi  $\beta$ -pineno (13,55 %) e 1.8 cineol (9,33 %) em *M. seriatoramosa*. Para *M. pilotantha* destacam-se:  $\beta$ -cariofileno (19,49%) e o espatulenol (14,73%)

Entre outros, são comuns as duas espécies de *Myrceugenia* em estudo, a presença de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, espatulenol, globulol. Aparecem citados por outros autores, a detecção de vários componentes presentes nas espécies aqui analisadas. Diferem em percentual caracterizando uma peculiaridade para cada representante da família. Em relação a presença desses componentes identificados, os dados acordam com WEYERSTAHL *et al.*(1988), ZHENG *et al.*(1992).

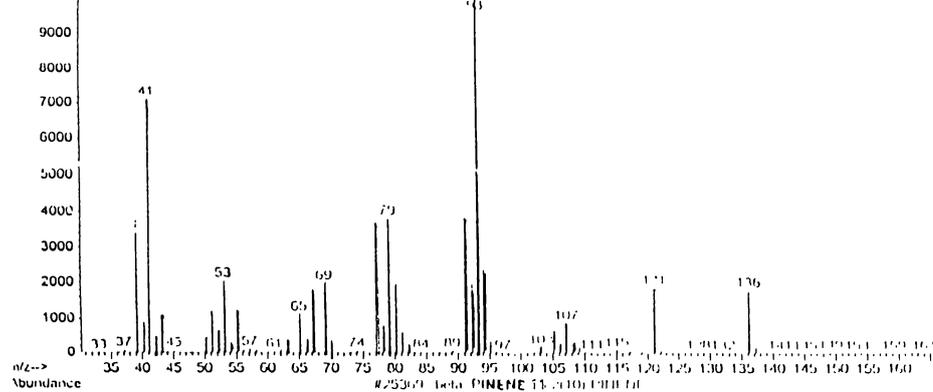
LIMBERGER *et al.*(1998) estudou sob o ponto de vista farmacológico algumas espécies de Myrtaceae. Os autores citam entre alguns componentes, com ação inibitória frente a antimicrobianos, o terpinen- 4 ol, 1,8 cineol, também presentes no óleo essencial de *M. seriatoramosa*.



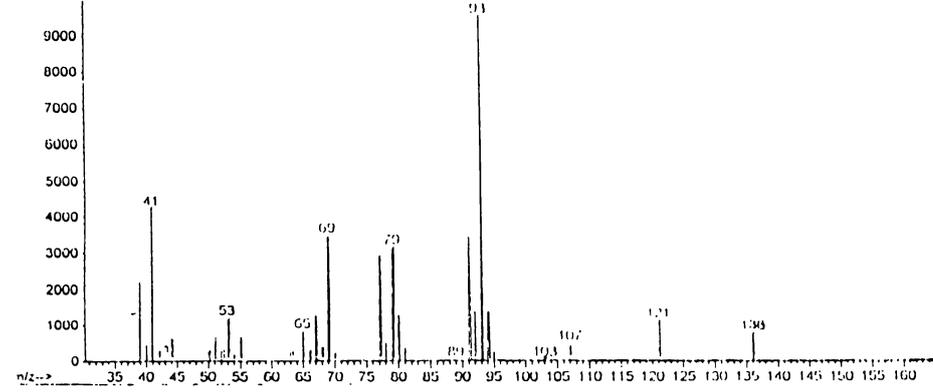
1A



1B



2A



2B

Figura 16 - Espectros de massas:  $\alpha$ -pineno (1) e  $\beta$ -pineno(2).

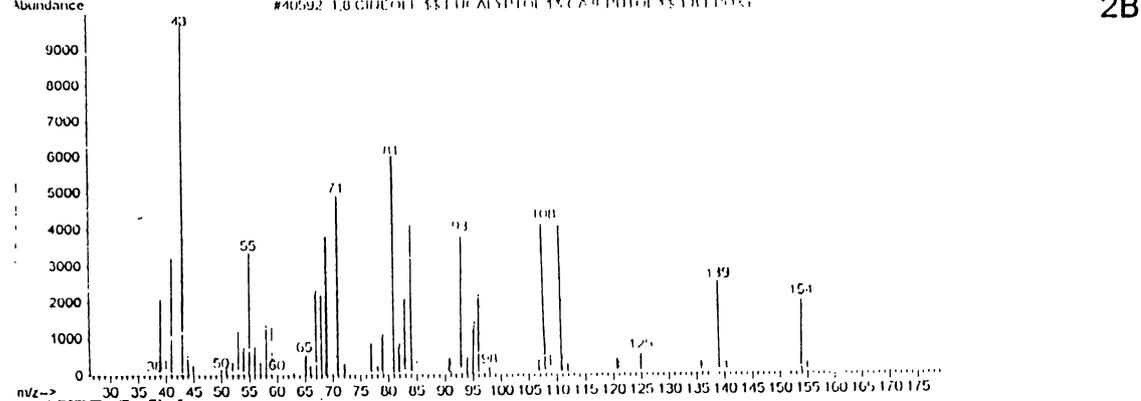
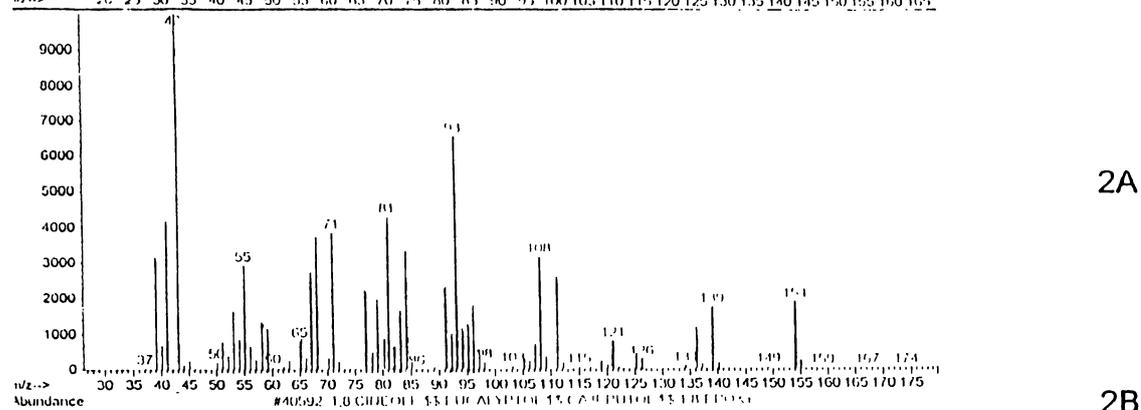
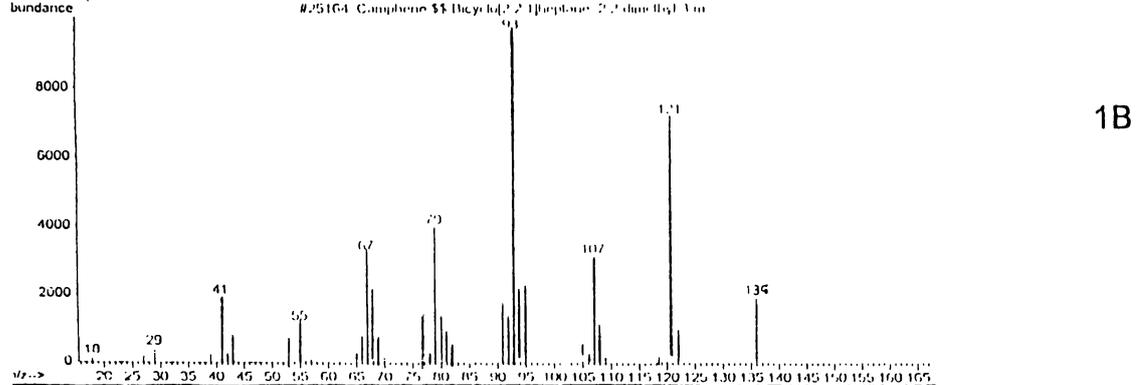
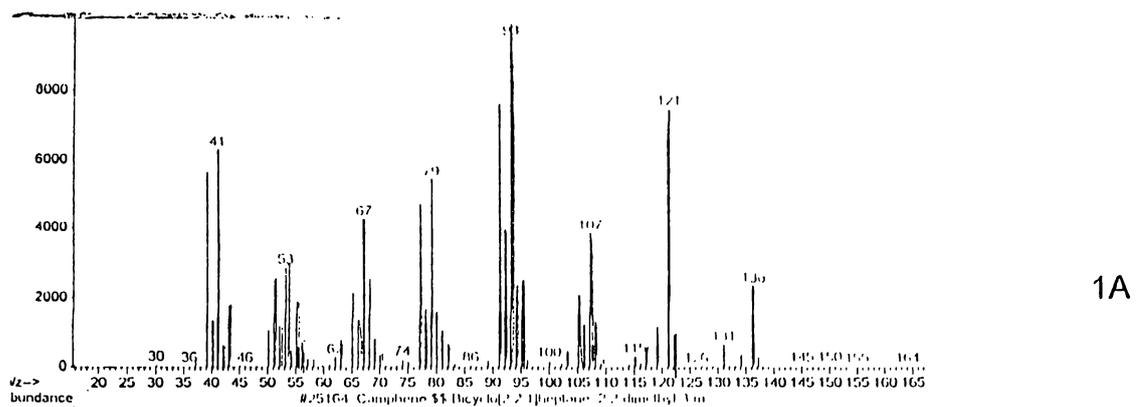


Figura 17 - Espectros de massas: canfeno (1), 1.8 cineol (2).

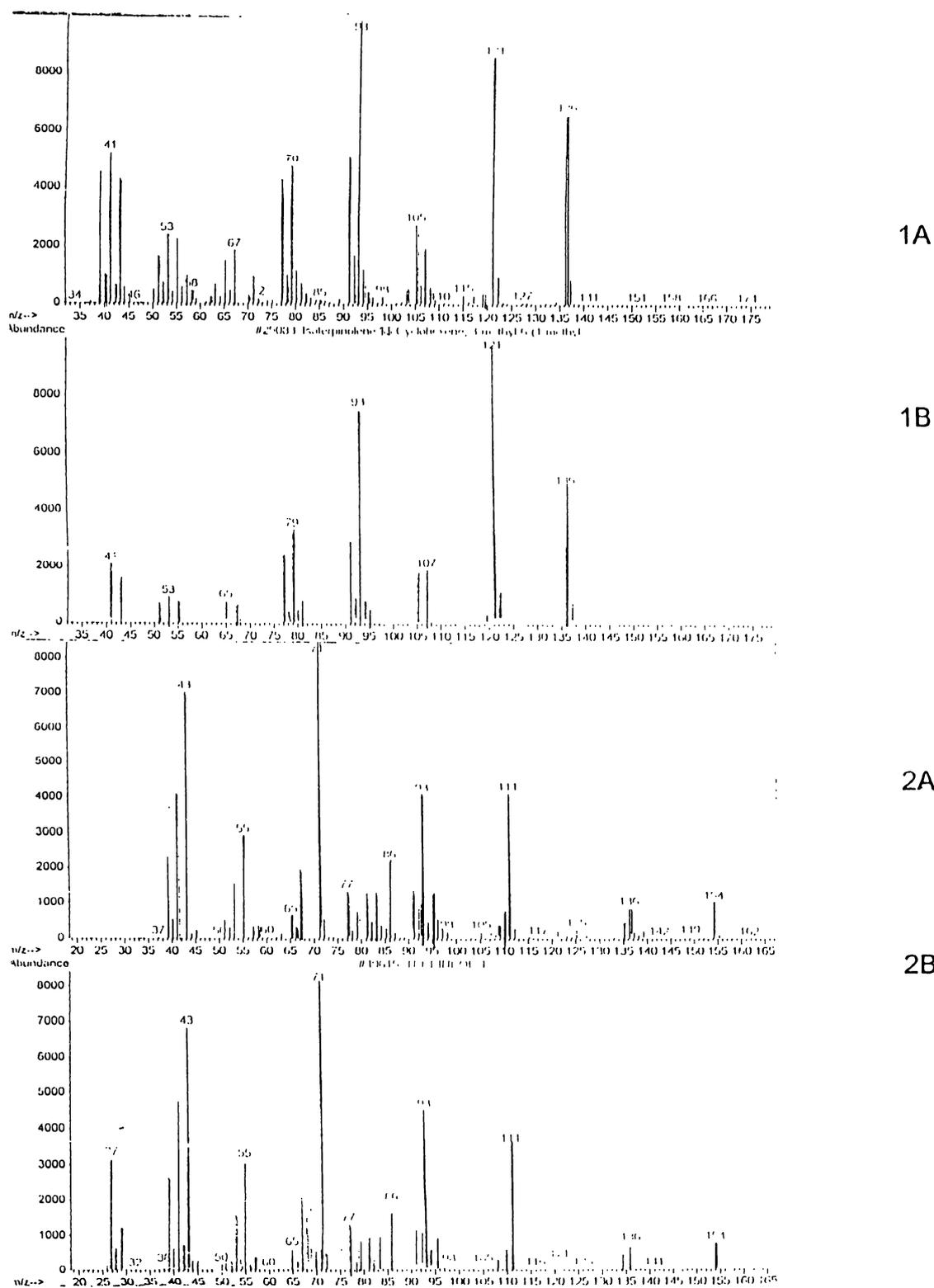
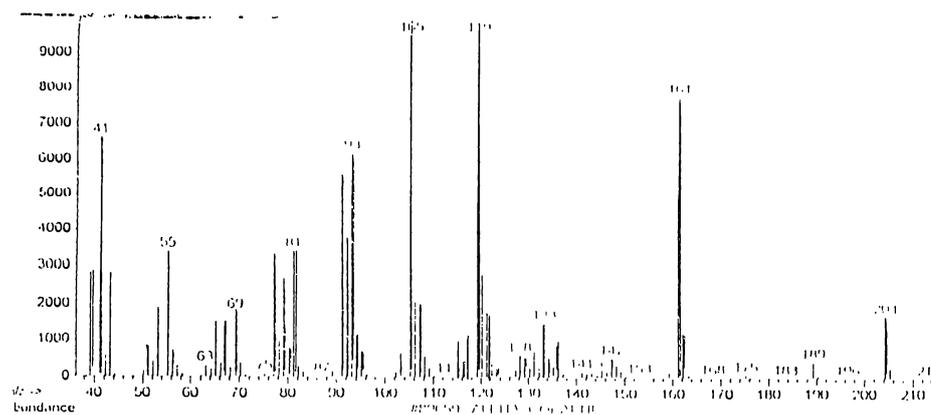
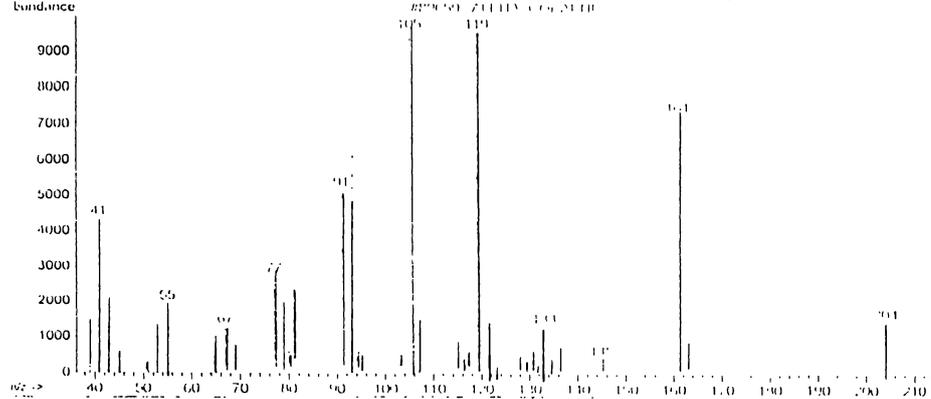


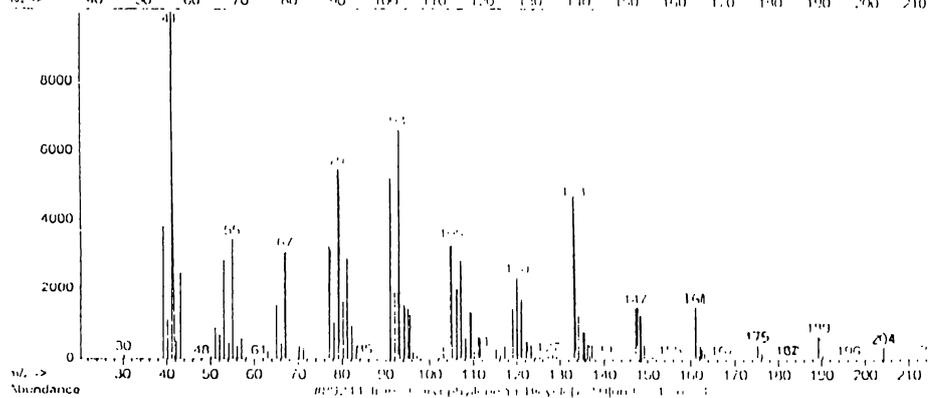
Figura 18 - Espectros de massas: isoterpinolene (1), terpineol 4 (2).



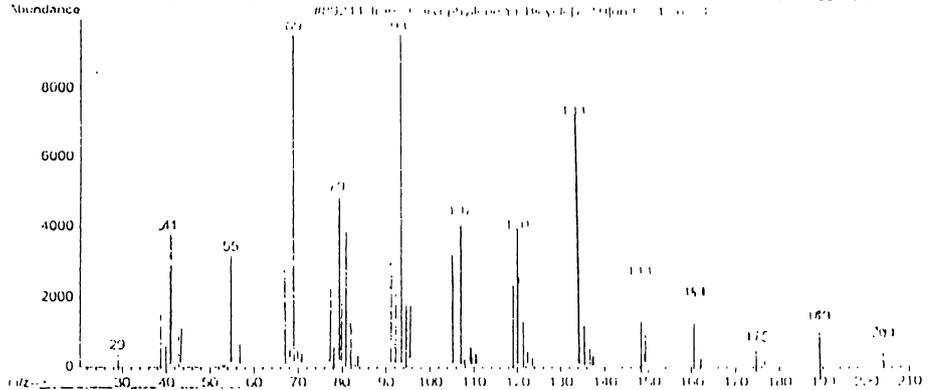
1A



1B

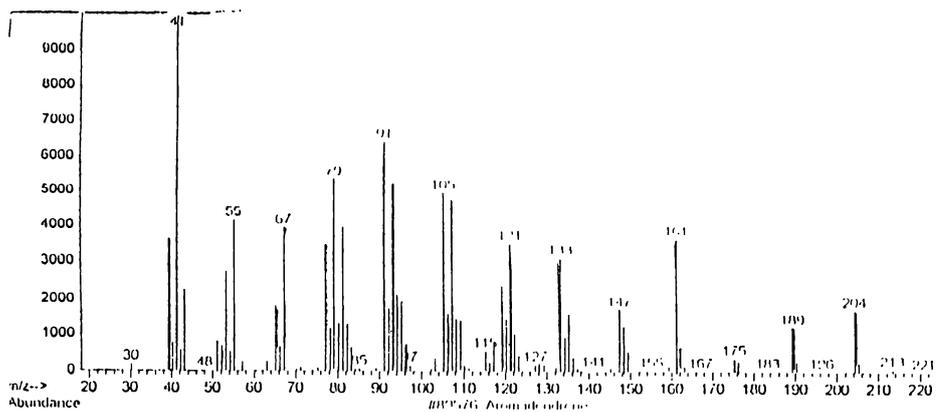


2A

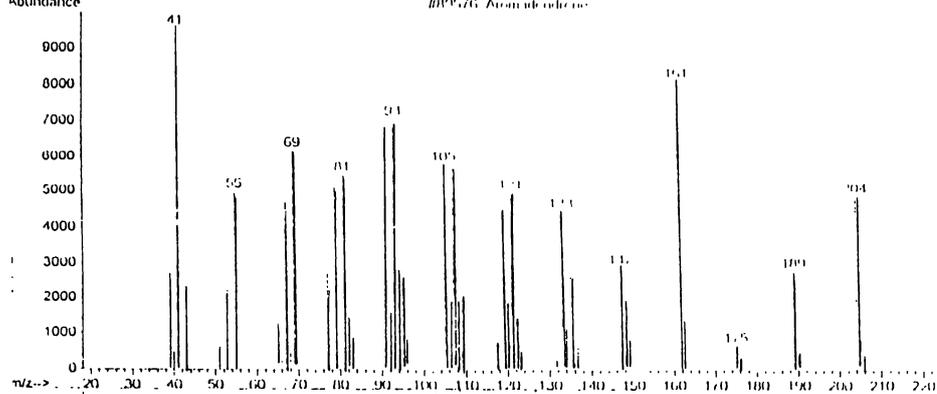


2B

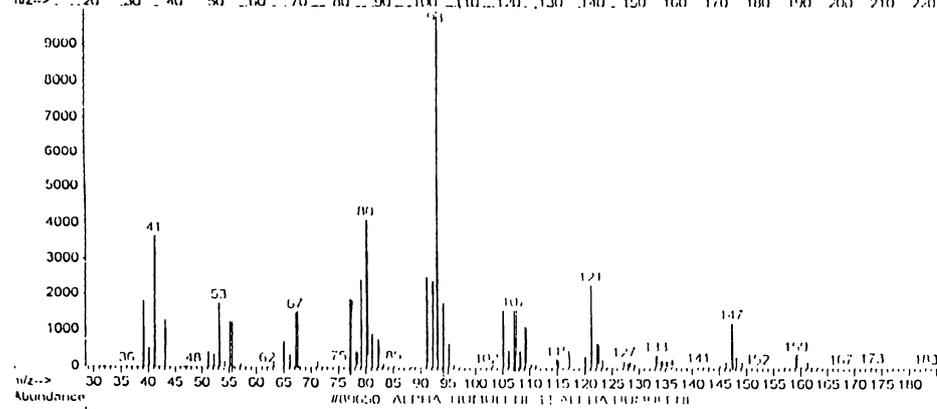
Figura 19 - Espectros de massas:  $\alpha$ -copaeno (1),  $\beta$ -cariofileno (2).



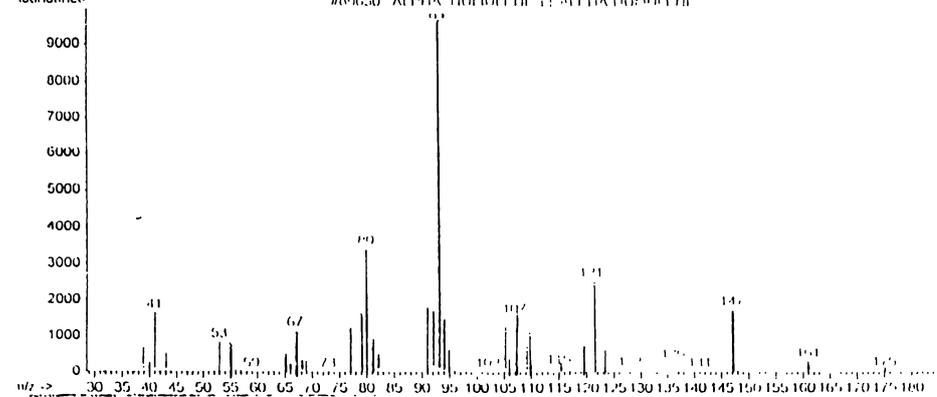
1A



1B

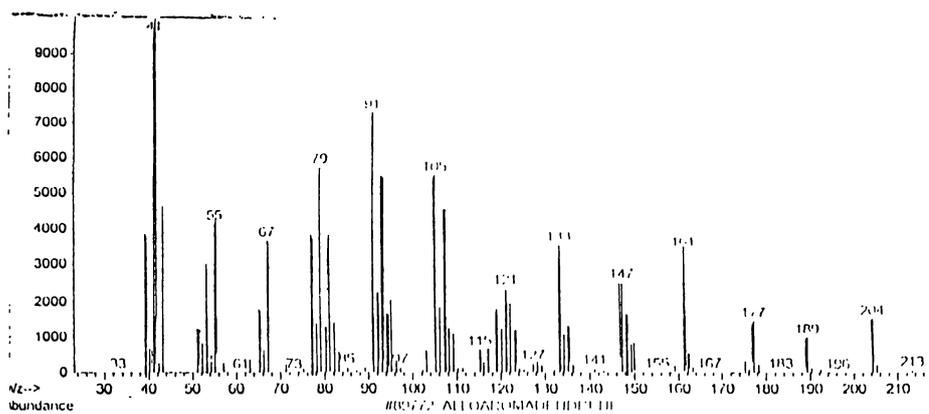


2A

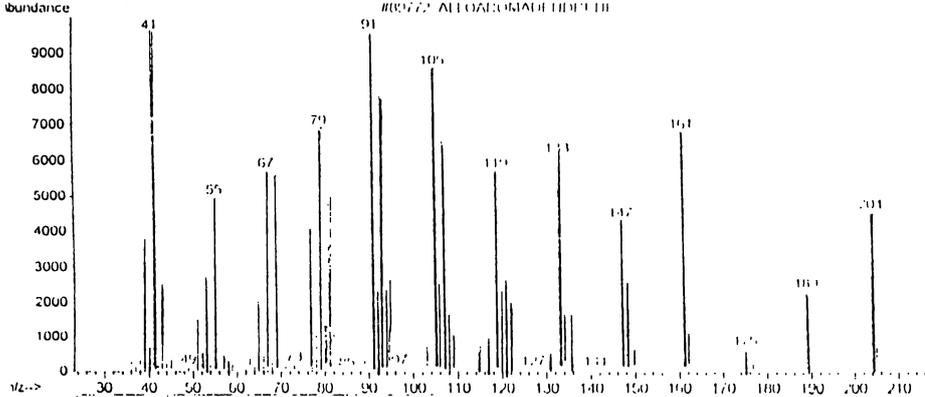


2B

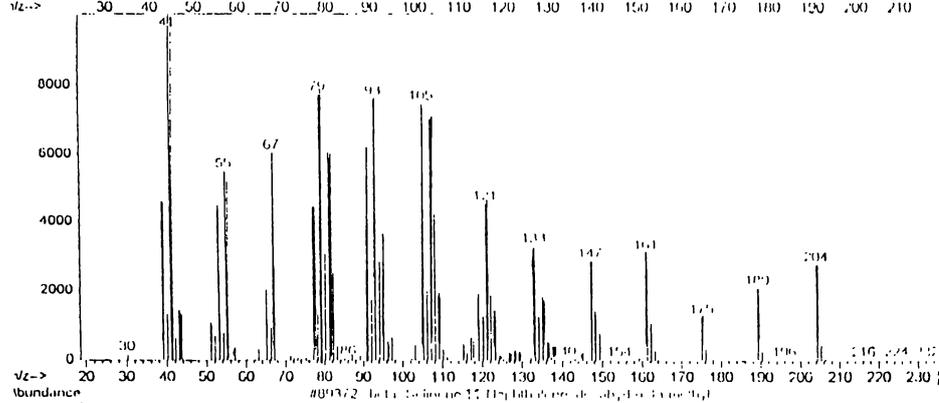
Figura 20 - Espectros de massas: aromadendreno (1),  $\alpha$ -humuleno (2).



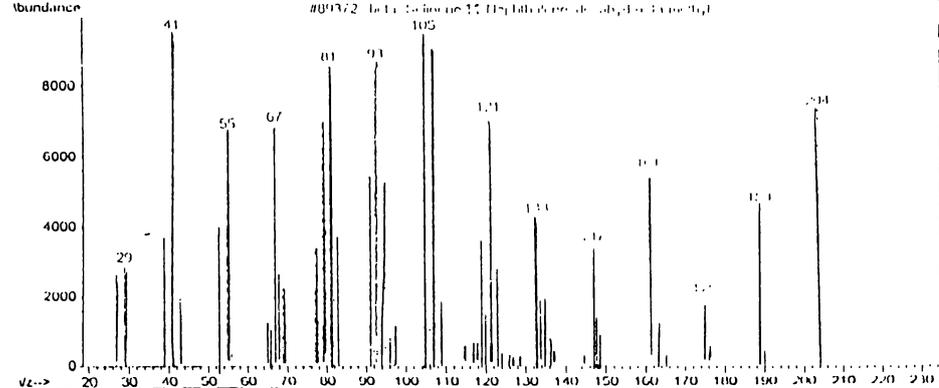
1A



1B



2A



2B

Figura 21 - Espectros de massas: aloaromadendreno (1),  $\beta$ -selineno (2).

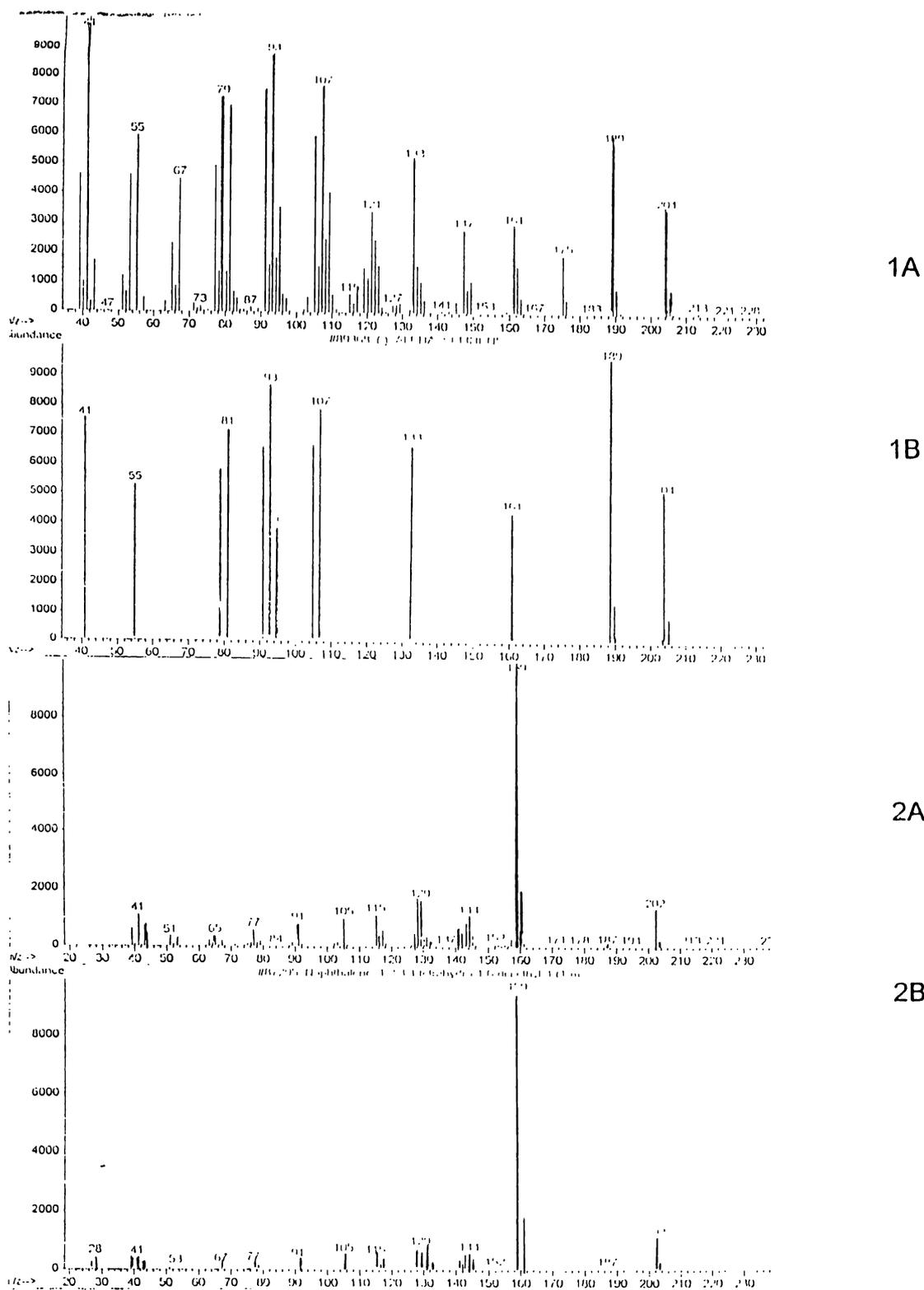


Figura 22 - Espectros de massas:  $\alpha$ -selineno (1), cis-calameneno (2).

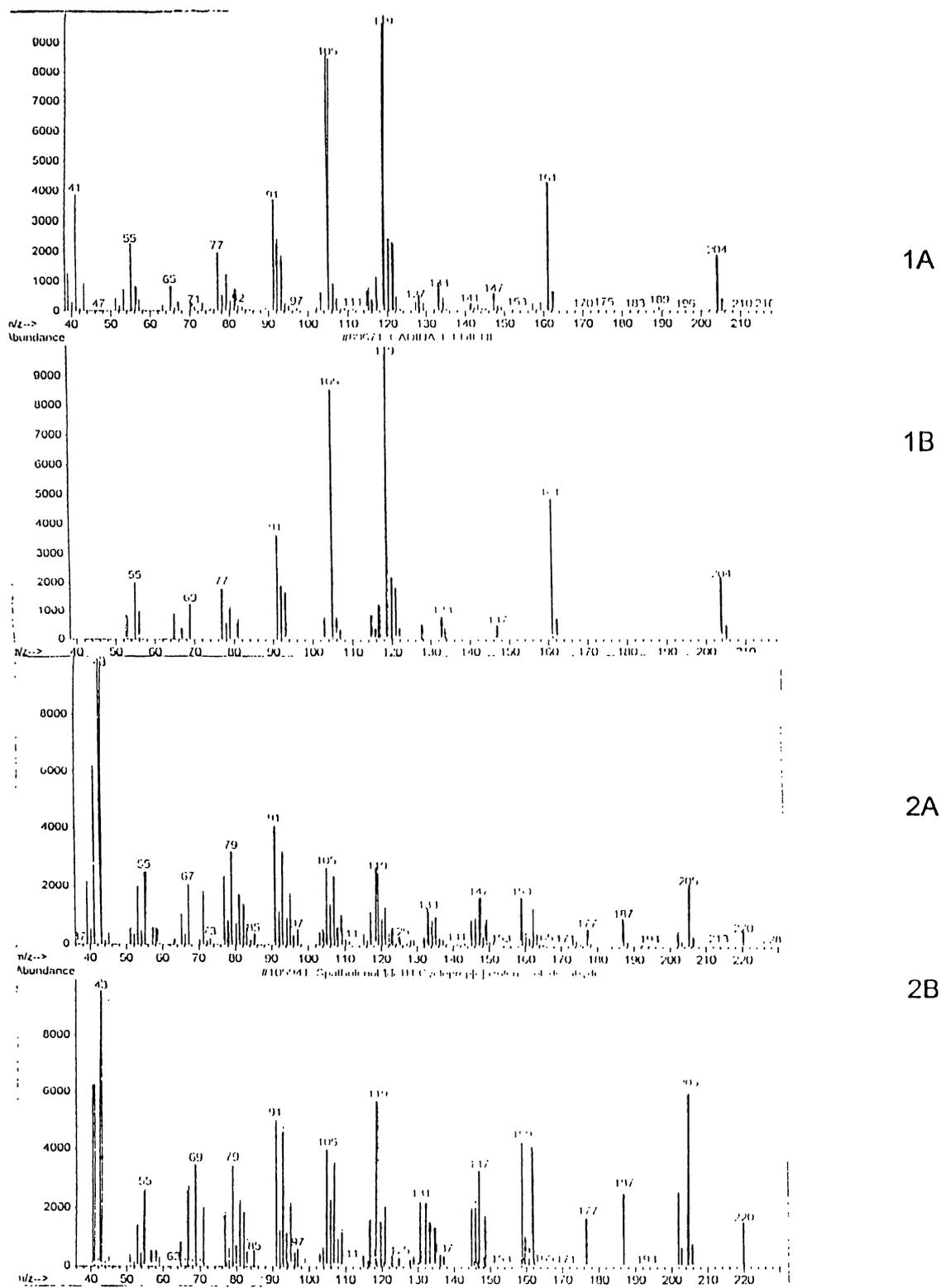
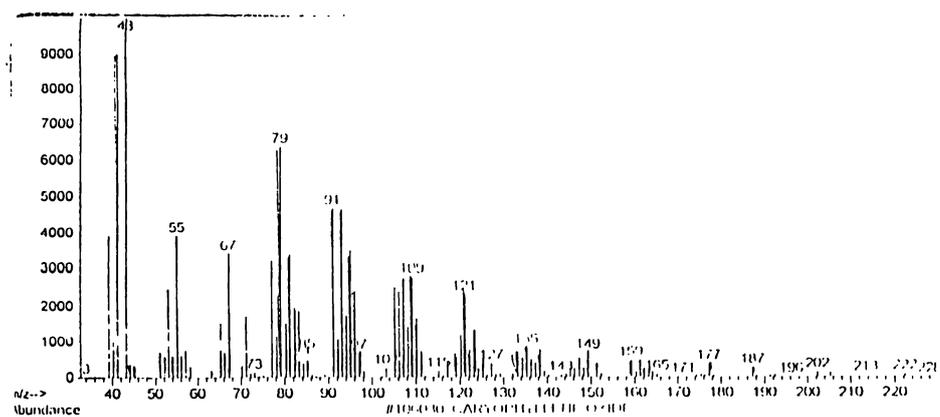
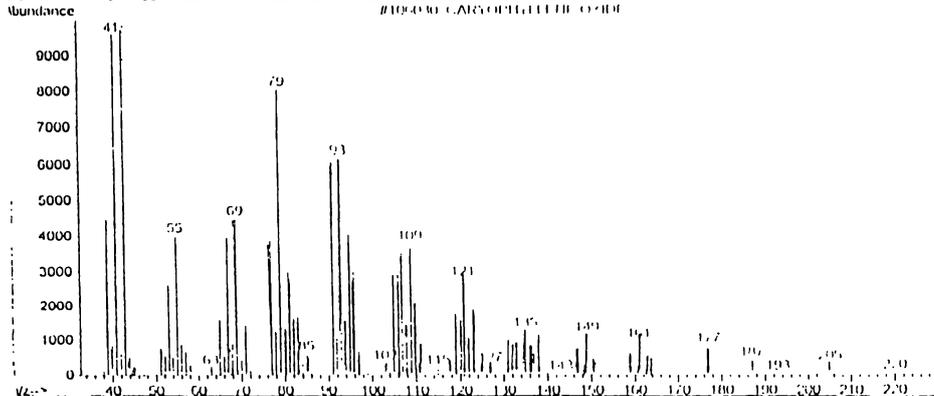


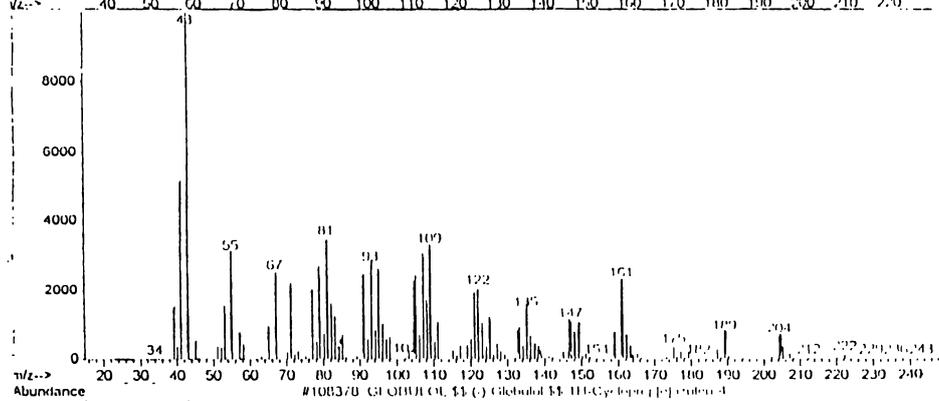
Figura 23 - Espectros de massas: cadina-1,4-diene (1), espatulenol (2).



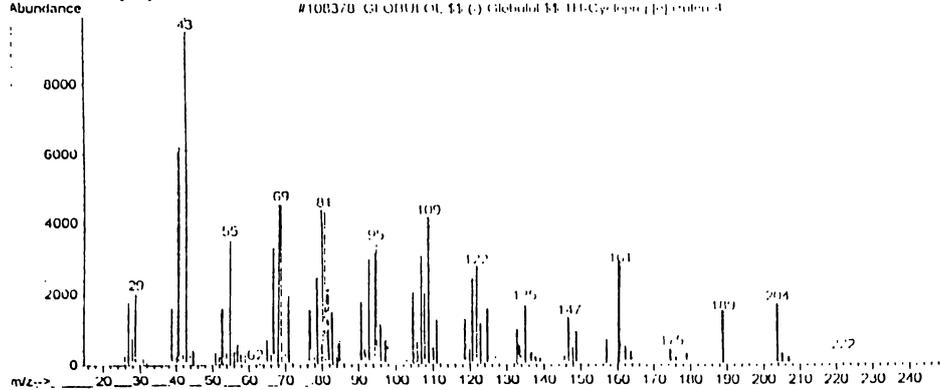
1A



1B

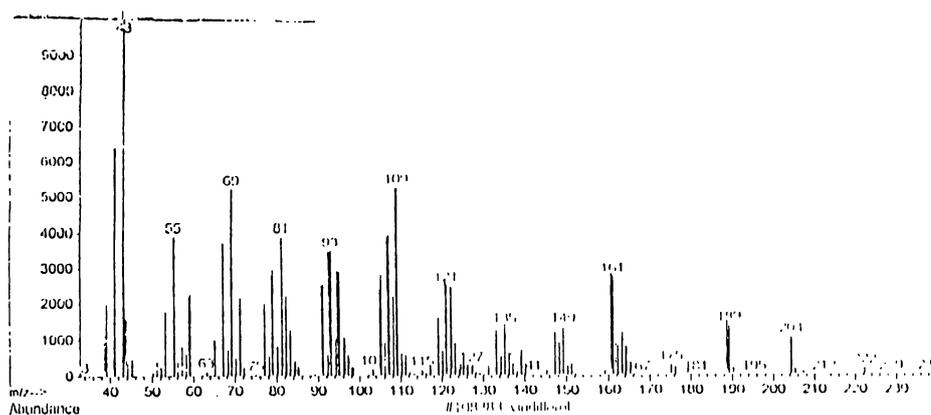


2A

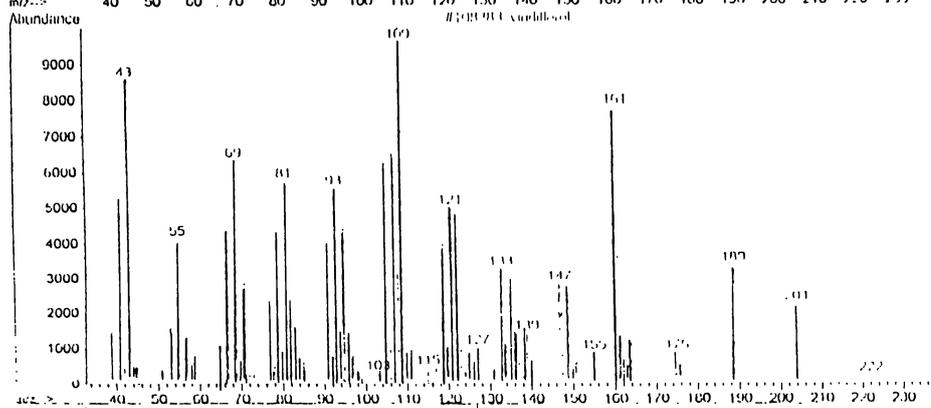


2B

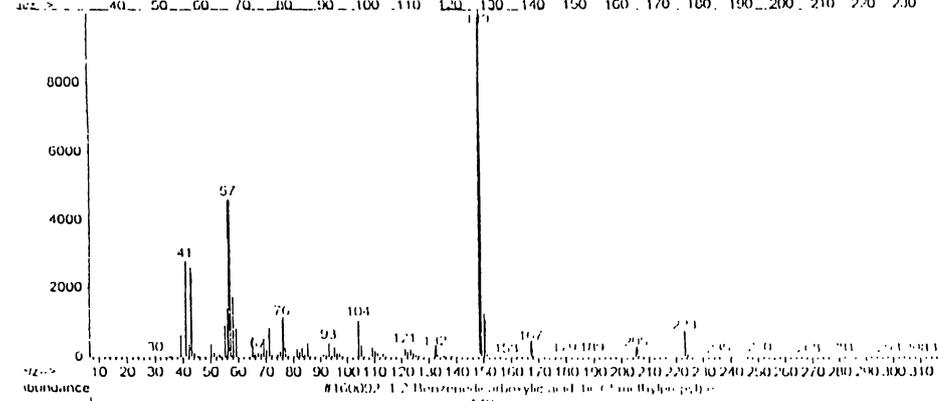
Figura 24 - Espectros de massas: oxido de cariofileno (1), globulol (2).



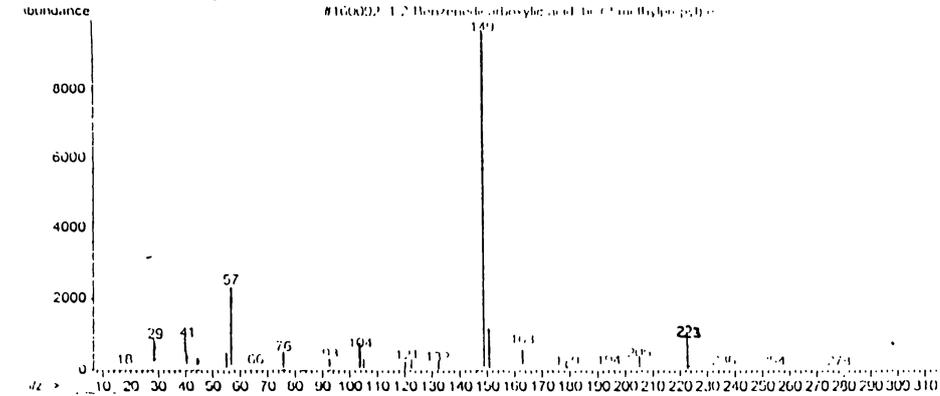
1A



1B

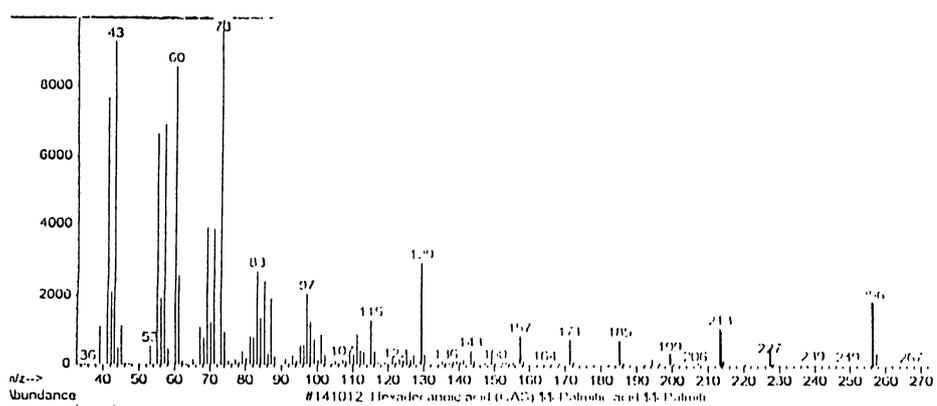


2A

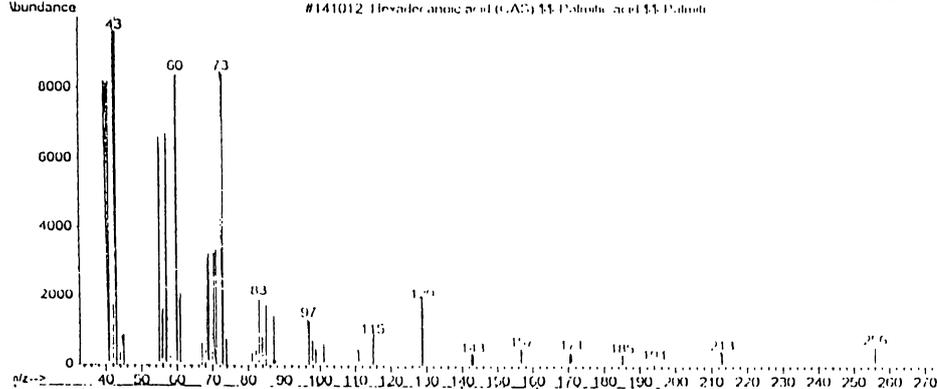


2B

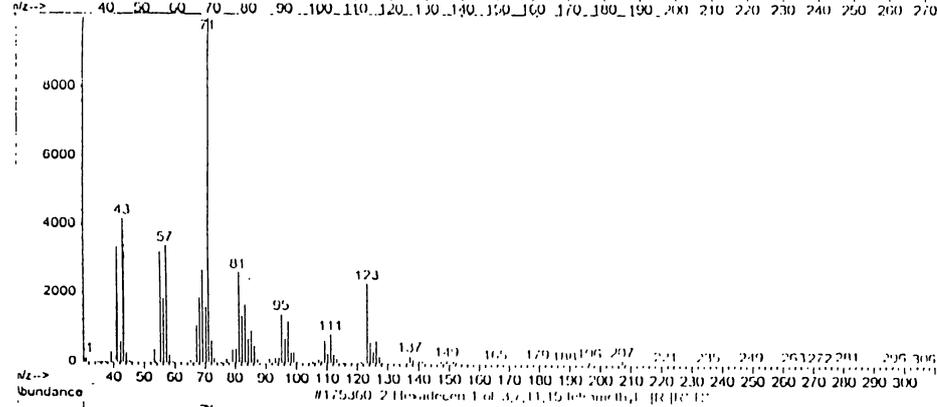
Figura 25 - Espectros de massas: viridiflorol (1), isobutil o-ftalato (2).



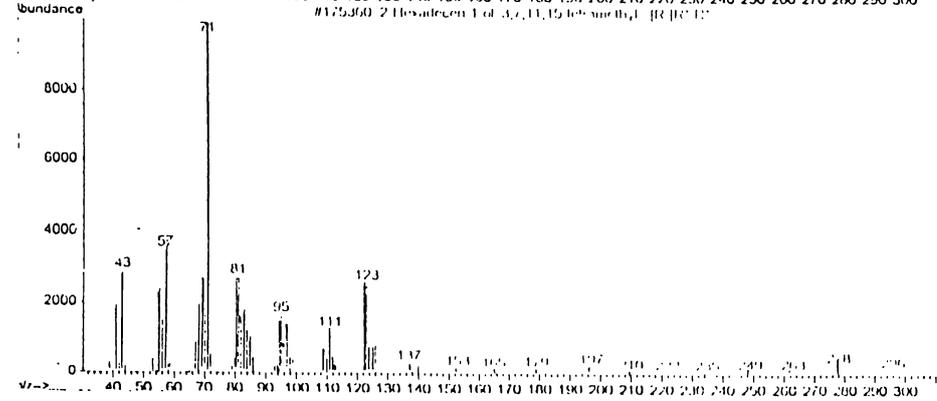
1A



1B



2A



2B

Figura 26 - Espectros de massas: ácido palmítico hexadecanóico (1), fitol (2).

## 6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados com as folhas de *Myrceugenia seriatoramosa* e *M. pilotantha* permitiram a visualização de aspectos morfológicos distintos que permitem concluir que as espécies estudadas são distintas entre si avaliando as seguintes características:

Intensa pilosidade apresentada em *M. pilotantha*.

Pecíolo canelado em *M. seriatoramosa*, e forma arredondada recoberta por tricomas em *M. pilotantha*.

Mesofilo do tipo heterogêneo, com parênquima lacunoso provido de 7 a 10 estratos em *M. pilotantha*, 12 a 15 em *M. seriatoramosa*.

Presença abundante de tricomas tectores principalmente na nervura principal de *M. pilotantha* e raros em *M. seriatoramosa*.

Na nervura principal, ocorre uma grande proeminência na face abaxial de *M. pilotantha* em relação a *M. seriatoramosa*.

Presença de características comuns a família Myrtaceae, como: tricomas tectores, glândulas oleíferas, dorsiventralidade foliar, hipoestomatismo e bainha esclerenquimática em torno dos feixes vasculares.

Os estudos fitoquímicos revelam que as espécies de *Myrceugenia* estudadas são constituídas de metabólitos secundários relevantes como os flavonóides, esteróide e/ou triterpenos, aminogrupos, taninos e óleos essenciais.

As espécies estudadas revelam um percentual muito baixo de óleo essencial dificultando sua extração.

Para *M. seriatoramosa* os constituintes de maior concentração foram o  $\alpha$ -pineno (13,55%) e 1,8 cineol(9,46%), em *M. pilotantha*,  $\beta$ -cariofileno (19,55%) e espatulenol (14,49%).

## REFERÊNCIAS

- ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 60, p.451-455, 1989.
- ALENCAR, R.; LIMA, R. A.; CORRÊA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; MAGALHÃES, M. T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Óleos essenciais de plantas brasileiras. **Acta Amazônica**, Manaus, n.3, p.41-43, 1971.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Viçosa: Ed. Universitária, 1978. v. 2.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Viçosa: Ed. Universitária, 1984. v.2.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Viçosa: Ed. Universitária, 1991. v.2.
- BACKES, A. Contribuição ao estudo da anatomia foliar e da fisiologia de *Psidium multiflorum* Camb. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 23, p.297-303, 1971.
- BEHAR, L. Dados sobre transpiração e anatomia foliar de *Eugenia uniflora* L. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 23, p.273-284, 1971.
- BELLO, A.; RODRIGUES, M. L.; CASTÑEIRAS, N.; URQUILA, A.; ROSADO, A.; PINO, J. A. Major components of the leaf oil of *Eugenia banderensis* Urb. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, p.697-698, 1995.
- BERLING, G.P.; MIKSCH, J.P. **Botanical microtechnique and citochemistry**, Iowa State University Press, 1976.
- COSTA, C. G.; MACHADO, R. D.; FONTANELLE, J. B. Sistema vascular em folhas de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Bradea**, Rio de Janeiro, v. 6, p.345-356, 1995.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden, 1988.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D. Uruguayan essential oils. Part VII. Composition of leaf oil of *Eugenia uruguayensis* Camb. Var. *uruguayensis* (Myrtaceae). **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 9, p.295-297, 1997.

FONTANELLE, G.; COSTA, C. G.; MACHADO R. D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (MYRTACEAE). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 115, p. 111-133, 1994.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São paulo: Atheneu, 1988.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**: Columbus, v. 5, p. 123-142, 1968.

FERRI, M. G. Informações sobre transpiração e anatomia foliar de diversas mirtáceas. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 23, p.313-316, 1971.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

GODOY, R. L. O.; ALEGRIO, L. V.; DUARTE, A. A. Compositional analysis of the leaf oil of *Eugenia ovalifolia* Camb. (Myrtaceae). **Journal Essential Oil Research**, London, v. 11, p. 570-572, 1999

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIÈRE, J. M. Essential from five southern brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). **Journal Essential Oil Research**, v. 9, p. 13-18, 1997.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, Mc Graw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1979.

JORGE, L.I.F.; OLIVEIRA, I.; OLIVEIRA, F.; KATO, E.T.M. Caracterização farmacognóstica das folhas e frutos de *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae. **Lecta**, Bragança Paulista., v. 12, p.103-120, 1994.

JORGE, L.I.F.; FERRO V. O.; OLIVEIRA, I. Exame diagnóstico das folhas e frutos de *Plinia aglomerata* (Berg.) Amsl. (cabeludinha) e de *Eugenia pyriformis* Camb. (uvali). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77 p. 7-10, 1996.

JORGE, L.I.F.; AGUIAR J. P. L.; SILVA M. L. P. Anatomia foliar de Pedra-Hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia Punicifolia* - MYRTACEAE). **Acta Amazonica**, Manaus, v.30, p. 49-57, 2000.

LANDRUM, L. R. A monograph of the genus *Myrcegeunia* (Myrtaceae), *Flora Neotropica*, n.29, p.70-75, 1980.

LEGRAND, D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas. *Flora Ilustrada Catarinense: Itajai*, p. 733-876, 1978.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M.P.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, T. A. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v.79, p. 49-52, 1998.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M.P.; SOBRAL, M.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, T. A.; MENUT, C. Chemical Composition of essential oil from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 13, p. 113-115, 2001.

MACHADO, R. D.; COSTA, C. G.; FONTENELLE, G. B. Anatomia foliar de *Eugenia Spring* ex Mart. (MYRTACEAE). *Acta Botânica Brasilica*, Porto Alegre, v. 1, p.275-285, 1988.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential oil *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. *Journal Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 9, p.337-338, 1997.

MARCHIORI J. N. C.; MARCOS SOBRAL. *Dendrologia das angiospermas: Myrtales*. Santa Maria, ed. da UFSM, 1997.

MARTINS, R. C. C.; ALEGRIO, L. V.; CASTRO, R. N.; GODOY, R. L. O. Constituents of the essential oil of *Eugenia nitida* Camb. (Myrtaceae). *Journal Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 11, p.724-726, 1998.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1950.

MORAIS, S. M.; CRAVEIRO, A. C.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W.; MATOS, J. A. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. *Journal Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 8, p.449-451, 1996.

MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A.; WEISS, A.; MIGUEL, M. D.; MOREIRA, E. A. Óleo essencial de *Eugenia osoriana*. XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, p. 153, 1992.

MOREIRA E. A. *Marcha Sistemática de Análise em Fitoquímica. Tribuna Farmacêutica*, Curitiba, v. 47, n. 1, 1979.

MOURA, C. A. F. Contribuição ao conhecimento da anatomia foliar e da fisiologia da jabuticaba. *Ciência e Cultura* (São Paulo), v. 23, p.363-372, 1971.

NAKASHIMA, T. **Fitoquímica experimental**. Curitiba: UFPR, 1993. Apostila.

NEVES, L. J. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE). *Bradea*, Rio de Janeiro, v. 5, p. 275-284, 1989.

PHARMACOPOEA Helvica. Berne: Dèartement Fédéral de l' Intérieur, 1993.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

RUIZ, E.; BECERRA, J.; SILVA, M.; CRAWFORD, D. J.; STUESSY, T. F. Flavonoid chemistry of the endemic species of *Myrceugenia* (Myrtaceae) of the Juan Fernandez Islands and relatives in continental South America. *Britonia*. New York, v.46, p.187-293, 1994.

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

SIQUEIRA, N. C. S. de; SILVA, G. A. A. B. E; BAUER, L.; ALICE, C. B.; SANT'ANA, B. M. S.; FALKENBERG, M. E.; PRADO A. *Eugenia pungens* e *Blepharocalix sacifolia* - Composição química dos óleos essenciais de Myrtaceae do Rio Grande do Sul (Parte I). *Revista Brasileira de Farmácia*, rio de Janeiro, out. - dez., p.149-151, 1983.

SOUSA, A. V. G. V. Contribuição ao estudo anatomico foliar e da fisiologia de *Psidium guayava* RADDI. *Ciência e Cultura* (São Paulo), v. 23, p.373-382, 1971.

KHATIJAH, H. H.; CUTLER, D. F.; MOORE, D. M. Leaf anatomical studies of *Eugenia* L. (Myrtaceae) species from de Malay Peninsula. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 110, p. 137-156, 1992.

TYRREL, M. H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Fd Tech*. January, 1990.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Drogenanalyse: dünnsschichtchromatographische analyse von arzneidrogen**. Berlin: Springer -

Verlag, 1983.

WEYERSTAHL, H.; WEYERSTAHL, H. M.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTMEIN, B.O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. **Planta Médica**, New-York, p.546-549, 1988.

VAN WYK, A.E.; ROBBERTESE, P. J.; KOK, P. D. F. The genus *Eugenia* L. (Myrtaceae) in southern Africa: the structure and taxonomic value of stomata. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.84, p.41-56, 1982.

VARELLA, M. X. DA S. **Estudo comparativo morfo-anatômico e dos constituintes químicos das folhas de araçá - *Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae - espécimes de fruto vermelho e amarelo.** Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products, (Lloydia)** v. 55, P.999-1003, 1992.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANGELY, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: Phytton, 1965.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**, Zaragoza: Ed. Acribia, 1991.

BUVAT, R. **Ontogeny cell differentiation and structure of vascular plants**. New York: Springer-Verlag, 1989.

CLAUS, E. P.; TYLER, V. E. **Farmacognosia**. Buenos Aires: El Ateneo, 1968.

CLOWES, F. A.A L.; JUNIPER, B.E. **Plant cells**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1968. v.8.

CORRÊA, M. PIO. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa nacional, 1984.

CORRÊA P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa nacional, 1988.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1968.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: células e tecidos**. São Paulo: Roca, 1986.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: órgão - experimentos e interpretação**, São Paulo: Roca, 1987.

ESAU, K. **Plant anatomy**. 2. ed. New York: John Wiley , 1974.

DARWINIANA, **Revista do Instituto de Botânica Darwinion**, Buenos Aires, v. 11, 1955/59.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Barcelona: Labor, 1962.

INDEX kewensis on compact disc: Version 2.0 for Windows. Oxford: Oxford University press, 1997. 1cd-room.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Ed. UFC, 1988.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1988.

RIZZINI C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press, 1997.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 22 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.

TOLEDO, M. DA G. T. de. **Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.