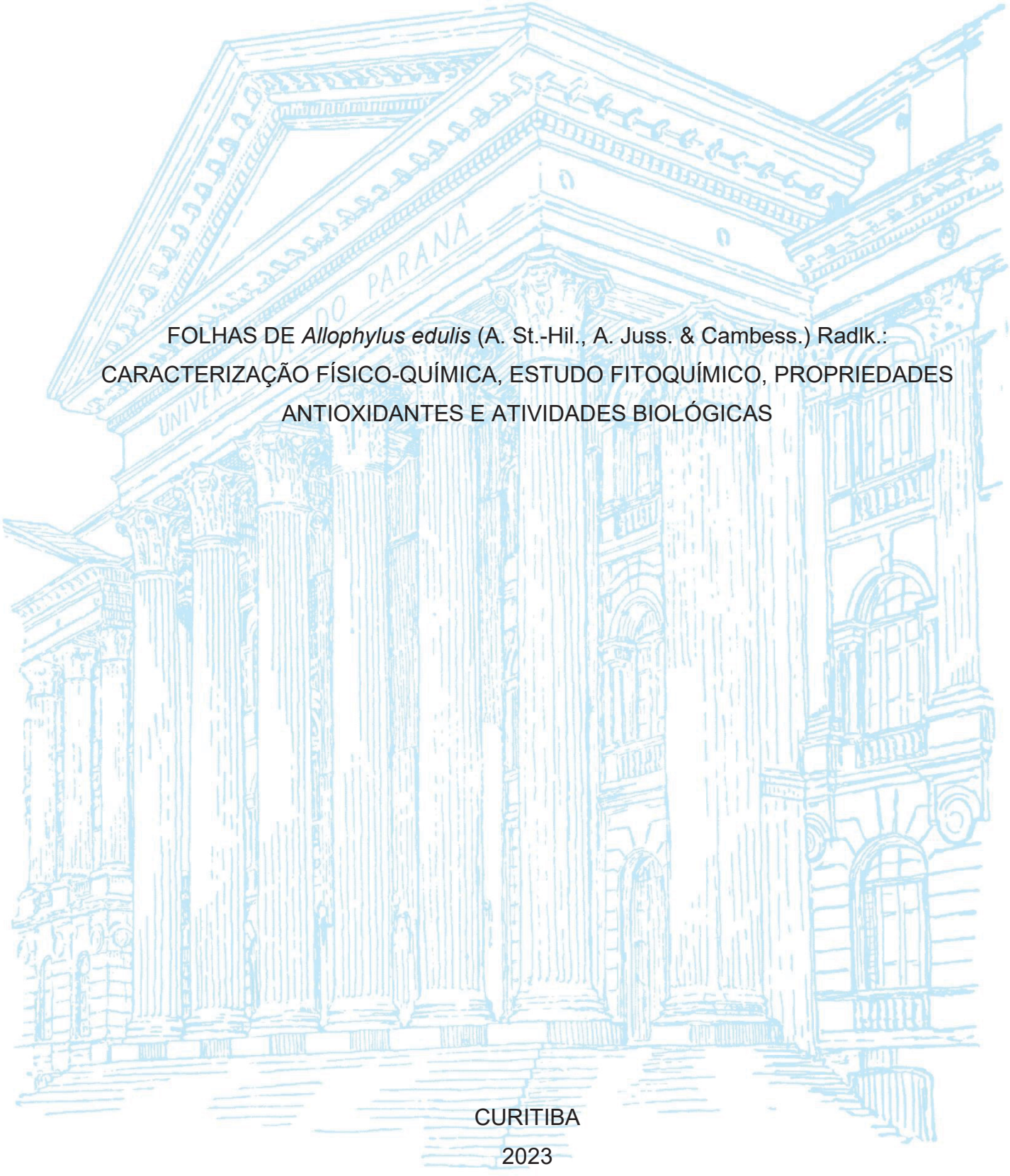
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA PIEKARSKI BARCHIK



# FOLHAS DE *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

CURITIBA

2023

PAULA PIEKARSKI BARCHIK

# FOLHAS DE *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no Setor de Ciências da Saúde, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2023

Barchik, Paula Piekarski
Folhas de *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. [recurso eletrônico]: caracterização físico-química, estudo fitoquímico, propriedades antioxidantes e atividades biológicas / Paula Piekarski Barchik – Curitiba, 2023.
1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

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

1. Sapindaceae. 2. Óleos voláteis. 3. Sesquiterpenos. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.75

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

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 CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PAULA PIEKARSKI BARCHIK** intitulada: **FOLHAS DE *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.**, 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 doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2023.

OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora

SUELEN ÁVILA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO)

BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO FARMACOLOGIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CAROLINA SETTE BARBOSA
Avaliador Externo (SECRETARIA MUNICIPAL DA EDUCAÇÃO-CURITIBA)

Esse trabalho é dedicado a Anastácia Sizanoski Piekarski (*in memoriam*), a minha amada avó que me ensinou o amor pelas plantas.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por ter colocado em meu caminho tantas oportunidades que me conduziram até aqui.

Ao meu filho, Miguel Piekarski Barchik, que chegou no último ano do doutorado e foi a energia extra necessária para conclusão desse trabalho. Obrigada por, em tão pouco tempo, me ensinar tanto e me tornar uma pessoa mais forte.

Ao meu marido, Guilherme Barchik, por todo o amor, por ser meu parceiro de vida e meu incentivador e por sempre deixar a vida mais leve.

Aos meus pais, Jorge e Marcia Piekarski, meus primeiros mestres, por todo amor, carinho, apoio, educação e incentivo para que mais esse objetivo de vida fosse alcançado.

À minha irmã, Bruna Piekarski, por estar sempre presente, me incentivando a cada etapa.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes ao longo dessa trajetória e auxiliaram-me com ações ou palavras de incentivo.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de poder concluir mais uma etapa da minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pelo acolhimento e oportunidade.

Ao Departamento de Nutrição e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição da Universidade Federal do Paraná pela abertura para realização de análises nos laboratórios.

Ao professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, meu orientador, pelo incentivo, pela paciência e por todos os ensinamentos que vão muito além dos temas presentes nesse trabalho.

À professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel pela coorientação, pelo incentivo e por todos os ensinamentos.

À professora Dra. Sila Mary Rodrigues Ferreira do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio para redação do artigo publicado e por todos os ensinamentos desde a minha graduação.

À professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná pelo registro no SisGen, pelo auxílio com os resultados das atividades biológicas e por todos os ensinamentos.

À doutora Suelen Ávila pelo auxílio com a avaliação de compostos fenólicos, flavonoides e propriedades antioxidantes, pelo auxílio com a redação e revisão do artigo e, principalmente, por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada. Aprendi muito com essa pesquisadora e professora que admiro tanto.

Aos mestres Eloyse Weeny Ramos Bieberbach Cheschim, Lilian Mitsuko Tanikawa, Andressa Kudiess e Alisson David Silva pela amizade e companhia dentro e fora do laboratório.

À doutoranda Letícia Mazepa pelo incentivo com o início do doutorado, pela amizade e por todas as conversas e trocas ao longo dessa jornada.

À doutoranda Cíntia Anjos pela amizade e parceria na condução de ensaios fitoquímicos e de atividade biológica.

À doutoranda Elisiane de Bona Sartor pelo apoio, pelo auxílio com as metodologias e por conversas tão ricas.

Ao técnico Jair José de Lima do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com as análises físico-químicas, pela paciência e pela prontidão em ajudar.

Aos técnicos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná Gracinha, Paulo, Gustavo e Edneia por toda a ajuda.

Ao Engenheiro Florestal do Museu Botânico Municipal, Marcelo Leandro Brotto pela identificação do material botânico.

Ao doutorando Renan R. Schorr, à doutora Nayana Cristina da Silva Santos e ao professor Dr. Francisco de Assis Marques do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com a caracterização química do óleo essencial.

À doutoranda Mayara Padovan dos Santos e ao professor Dr. Marco Tadeu Grassi do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com a análise de minerais presentes em folhas de *A. edulis*.

À mestre Mariana Mengarda e ao professor Dr. Fabio Seigi Murakami do Departamento de Farmácia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com as análises de atividade antimicrobiana.

À doutoranda Inaiara Casapula e ao professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com as análises de atividade antifúngica.

Ao doutor Fernando Cesar Martins Betim pelo auxílio com as análises de atividade larvicida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

"*A ciência é um meio de desmascarar aqueles que apenas fingem conhecer.*"

(Carl Sagan, 2006, p. 59)

## RESUMO

*Allophylus edulis*, popularmente conhecida como vacum ou chalchal, é uma planta da biodiversidade da América do Sul utilizada para fins medicinais e alimentícios. É uma espécie fonte de compostos bioativos, da qual pode ser extraído óleo essencial. O objetivo do presente estudo foi realizar caracterização físico-química, mineral e fitoquímica de folhas de *A. edulis*; isolar e identificar compostos bioativos e avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas do óleo essencial e extrato bruto obtidos de folhas de *A. edulis*. A partir do material vegetal coletado na região metropolitana de Curitiba, Brasil, foi conduzida a caracterização físico-química, incluindo análise de cor, pH, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, fibras e minerais. Foi obtido extrato bruto etanólico (EBF) em aparelho de Soxhlet, o qual foi particionado com solventes de polaridade crescente. Foi conduzida a extração de óleo essencial (OEF) em aparelho de Clevenger modificado em dois momentos: logo após o processo de secagem das folhas e após 12 meses de armazenamento do material vegetal, com posterior caracterização química por CG/MS. Foram conduzidas cromatografias em coluna a fim de isolar substâncias bioativas e a avaliação de compostos fenólicos se deu via HPLC. Foram determinados os compostos fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC), propriedades antioxidantes e potencial tóxico frente à *Artemia salina* do EBF, OEF e frações. O EBF e o OEF foram submetidos a avaliação de atividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica contra *Botrytis cinerea*, alelopática, larvicida contra *Aedes aegypti* e hemolítica. O processo de secagem reduziu a umidade das folhas de 68,7% para 11,3%. As folhas secas apresentam elevado teor de fibras insolúveis (52,4%) e proteínas (18,4%). Cálcio, potássio e fósforo foram os minerais detectados em maior concentração. O EBF apresentou rendimento de 21% e, a partir de seu particionamento foram obtidas 4 frações semipurificadas (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente). Da fração hexano foi isolado um hidrocarboneto de cadeia longa. O OEF apresentou rendimento de 1,3% e *E*-nerolidol, α-pineno e 10-epi-γ-eudesmol como compostos majoritários, contudo, o armazenamento das folhas pelo período de 12 meses levou a redução de 67% do rendimento e alteração da composição química do óleo essencial. A coluna cromatográfica realizada com o OEF foi eficaz em aumentar o percentual de *E*-nerolidol e de eliminar compostos não oxigenados. Ácido gálico, ácido cafeico e quercetina foram quantificados no EBF por HPLC. A fração acetato de etila demonstrou os maiores teores de TPC, TFC, além de maior potencial antioxidante. Verificou-se redução do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* na análise de atividade antimicrobiana. O EBF e o OEF não apresentaram atividade antifúngica contra *B. cinerea*, nem atividade hemolítica. O EBF demonstrou atividade alelopática por afetar o índice de velocidade de germinação de sementes de *L. sativa* e *A. cepa* e o OEF teve ação restritiva no crescimento de ambas as espécies. O EBF e o OEF foram altamente ativos no ensaio de atividade larvicida contra *A. aegypti*, com melhor atividade do OEF ($CL_{50}$ de 1,18 µg/mL). Foi verificada toxicidade do OEF no ensaio preliminar frente à *A. salina*.



Palavras-chave: Sapindaceae; óleos voláteis; sesquiterpenos; *E*-nerolidol; *Aedes aegypti.*

## ABSTRACT

*Allophylus edulis*, popularly known as vacum or chalchal, is a South American biodiversity plant used for medicinal and food purposes. It is a source species of bioactive compounds, from which essential oil can be extracted. The objective of the present study was to carry out physical-chemical, mineral and phytochemical characterization of *A. edulis* leaves; isolate and identify bioactive compounds and; to evaluate the antioxidant properties and biological activities of essential oil and crude extract obtained from leaves of *A. edulis*. From the plant material collected in the metropolitan region of Curitiba, Brazil, a physical-chemical characterization was carried out, including analysis of color, pH, moisture, ash, proteins, lipids, fibers and minerals. Crude ethanolic extract (EBF) was obtained in a Soxhlet apparatus, which was partitioned with solvents of increasing polarity. The essential oil extraction (OEF) was carried out in a modified Clevenger apparatus in two moments: immediately after the drying process of the leaves and after 12 months of storage of the plant material, with subsequent chemical characterization by GC/MS. Column chromatography was conducted in order to isolate bioactive substances, and the evaluation of phenolic compounds was performed via HPLC. Total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TFC), antioxidant properties and toxic potential against Artemia salina of EBF, OEF and fractions were determined. EBF and OEF were evaluated for biological activities: antimicrobial, antifungal against *Botrytis cinerea*, allelopathic, larvicidal against *Aedes aegypti* and hemolytic. The drying process reduced the leaf moisture from 68.7% to 11.3%. The dried leaves have a high content of insoluble fibers (52.4%) and proteins (18.4%). Calcium, potassium and phosphorus were the minerals detected in the highest concentration. The EBF yielded 21% and, from its partitioning, 4 semipurified fractions were obtained (hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder). From the hexane fraction, a long chain hydrocarbon was isolated. The OEF showed a yield of 1.3% and *E*-nerolidol, α-pinene and 10-epi-γ-eudesmol as major compounds, however, the storage of the leaves for a period of 12 months led to a reduction of 67% in the yield and alteration of the chemical composition of the essential oil. The chromatographic column performed with OEF was effective in increasing the percentage of *E*-nerolidol and eliminating non-oxygenated compounds. Gallic acid, caffeic acid and quercetin were quantified in EBF by HPLC. The ethyl acetate fraction showed the highest levels of TPC, TFC, in addition to greater antioxidant potential. There was a reduction in the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* in the analysis of antimicrobial activity. EBF and OEF did not show antifungal activity against *B. cinerea*, nor hemolytic activity. The EBF showed allelopathic activity by affecting the germination speed index of *L. sativa* and *A. cepa* seeds, and the OEF had a restrictive action on the growth of both species. EBF and OEF were highly active in the larvicidal activity assay against *A. aegypti*, with better activity than OEF (LC50 of 1.18 µg/mL). OEF toxicity was verified in the preliminary test against *A. salina*.



Keywords: Sapindaceae; volatile oils; sesquiterpenes; *E*-nerolidol; *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *A. edulis*..... 31
FIGURA 2 - *Allophylus edulis*..... 32
FIGURA 3 - FOLHAS DE *A. edulis*..... 33
FIGURA 4 - FRUTOS DE *A. edulis*..... 35
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DA PESQUISA..... 48
FIGURA 6 - PREPARO DE EXSICATAS DE A. edulis..... 56
FIGURA 7 - OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 55
FIGURA 8 - COLUNA CROMATOFRÁFICA DA FRAÇÃO HEXANO..... 57
FIGURA 9 - EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 59
FIGURA 10 - METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS..... 60
FIGURA 11 - METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS..... 61
FIGURA 12 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO SERIADA EM MICROPLACA..... 65
FIGURA 13 - METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Botrytis cinerea*..... 67
FIGURA 14 - METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA..... 68
FIGURA 15 - DISPOSIÇÃO DAS CAIXAS GERBOX EM FLUXO LAMINAR PARA O ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA 69
FIGURA 16 - FORMA DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTULAS DE *L. sativa* e *A. cepa* NO ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA..... 70
FIGURA 17 - METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA *A. aegypti*..... 71
FIGURA 18 - METODOLODIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA..... 73
FIGURA 19 - ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA..... 73

FIGURA 20 - METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE A *Artemia salina* Lech..... 75
FIGURA 21 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS DE FOLHAS DE *A. edulis*.. 85
FIGURA 22 - PRECIPITADOS DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA HEXANO 86
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN 1H DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO (200,13MHz, CDCl3) ..... 87
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN 13C DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO (50,62MHz, CDCl3) ..... 88
FIGURA 25 - ESTRUTURA DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA..... 88
FIGURA 26 - CROMATOGRAMA CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 92
FIGURA 27 - CROMATOGRAMA CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* APÓS 12 MESES DE ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL..... 95
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* ISOLADO POR COLUNA CROMATOGRÁFICA..... 99
FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 102
FIGURA 30 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *E. coli* ATCC 8738..... 107
FIGURA 31 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *P. aeruginosa* ATCC 9027..... 108
FIGURA 32 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *S. aureus* ATTC 6538..... 109
FIGURA 33 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *C. albicans* ATCC 10231..... 111
FIGURA 34 - TAXA DE INIBIÇÃO DO FUNGO *Botrytis cinerea* PROVOCADA PELO EXTRATO BRUTO, ÓLEO ESSENCIAL E CONTROLE POSITIVO..... 112

## LISTA DE GRÁFICOS


GRÁFICO 1 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *L. sativa*..... 115

GRÁFICO 2 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *L. sativa*..... 115

GRÁFICO 3 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *A. cepa*..... 116

GRÁFICO 4 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *A. cepa*..... 117

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESPÉCIES E RESPECTIVO USO TRADICIONAL DA FAMÍLIA SAPIDACEAE..... 27
QUADRO 2 - ENQUADRAMENTO TAXONOMICO DA ESPÉCIE *A. edulis*..... 32
QUADRO 3 - CONDIÇÕES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA..... 56
QUADRO 4 - FASES MÓVEIS UTILIZADAS NAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS..... 57
QUADRO 5 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL..... 62

## LISTA DE TABELAS


TABELA 1 - VALORES DE LOD E LOQ PARA MINERAIS ANALISADOS..... 53

TABELA 2 - PARÂMETROS PARA ANÁLISE DE COR DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 77

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FOLHAS DE *A. edulis* 78

TABELA 4 - TEOR DE MINERAIS E METAIS TÓXICOSEM FOLHAS DE *A. edulis*..... 79

TABELA 5 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS PELO SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR EM FOLHAS DE *A. edulis*..... 81

TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 83

TABELA 7 - PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS EM FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS DE FOLHA DE *A. edulis*..... 83

TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 90

TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* APÓS 12 MESES DE ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL..... 95

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS E CLASSES DE COMPOSTOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. edulis* APÓS ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS PELO PERÍODO DE 12 MESES..... 97

TABELA 11 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PRODUTO OBTIDO APÓS COLUNA CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. edulis*..... 98

TABELA 12 - TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS EM FOLHAS DE *A. edulis*..... 100

TABELA 13 - COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 101

TABELA 14 - PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE FOLHAS DE *A. edulis*..... 104
TABELA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE (ABTS, DPPH E FRAP), FENÓLICOS TOTAIS (TPC) E FLAVONOIDES TOTAIS (TFC) ..... 106
TABELA 16 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *B. cinerea*..... 113
TABELA 17 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O CRESCIMENTO DE *L. sativa*..... 118
TABELA 18 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O CRESCIMENTO DE *A. cepa*..... 119
TABELA 19 - ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE *Aedes aegypti* DE EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL *A. edulis*..... 121
TABELA 20 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA IN VITRO DE EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *A. edulis*.. 123
TABELA 21 - ATIVIDADE TÓXICA DE *A. edulis* FRENTTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina* Lech..... 125

## LISTA DE SIGLAS

| | |
|---|---|
| ABTS | - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| ANOVA | - Análise de variância unidirecional |
| CCD | - Cromatografia em camada delgada |
| CE | - Equivalentes de catequina |
| CG-MS | - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas |
| CIM | - Concentração inibitória mínima |
| $CL_{50}$ | - Concentração letal 50% |
| $CL_{90}$ | - Concentração letal 90% |
| COX-2 | - Ciclo-oxigenase-2 |
| DMAPP | - Dimetialil difosfato |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| DPP-IV | - Dipeptidil peptidase IV |
| DPPH | - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| EBF | - Extrato bruto de folhas |
| ECA | - Enzima conversora de angiotensina |
| ET | - Equivalentes de trolox |
| FAEF | - Fração acetato de etila das folhas |
| FAO | - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação |
| FCF | - Fração clorofórmio das folhas |
| FHF | - Fração hexano das folhas |
| FRAP | - Poder antioxidante de redução do ferro |
| FRF | - Fração remanescente das folhas |
| GAE | - Equivalentes de ácido gálico |
| HPLC | - Cromatografia líquida de alta eficiência |
| ICP OES | - Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente |
| IL-6 | - Interleucina 6 |
| IPP | - Isopentenil difosfato |
| IR | - Índice de retenção |
| IVG | - Índice de velocidade de germinação |
| LOD | - Limite de detecção |
| LOQ | - Limite de quantificação |
| MEP | - Metileritritol fosfato |

MVA - Mevalonato
OEF - Óleo essencial das folhas
PANC - Planta alimentícia não convencional
PBS - Tampão fosfato salino
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
TFC - Flavonoides totais
TMS - Tetrametilsilano – $(CH_3)4Si$
TPC - Compostos fenólicos totais
TPTZ - 2,4,6- tripidil-s-tri-azine
TTC - 2, 3, 5 – trifeniltetrazólio cloreto

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| **1** | **INTRODUÇÃO** | **22** |
| 1.1 | OBJETIVOS | 24 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 24 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 24 |
| **2** | **REVISÃO DE LITERATURA** | **25** |
| 2.1 | PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS | 25 |
| 2.2 | A FAMÍLIA SAPINDACEAE | 26 |
| 2.3 | O GÊNERO *Allophylus* | 28 |
| 2.4 | *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk | 31 |
| 2.4.1 | Descrição Botânica | 32 |
| 2.4.2 | Usos | 34 |
| 2.4.2.1 | Medicina Tradicional | 34 |
| 2.4.2.2 | Alimento | 34 |
| 2.4.2.3 | Outros | 35 |
| 2.4.3 | Valor Nutricional | 36 |
| 2.4.4 | Fitoquímica | 36 |
| 2.4.5 | Atividades Biológicas e Farmacológicas | 37 |
| 2.4.6 | Toxicidade | 40 |
| 2.5 | ÓLEO ESSENCIAL | 40 |
| 2.6 | COMPOSTOS BIOATIVOS | 41 |
| 2.6.1 | Terpenos | 42 |
| 2.6.2 | Compostos Fenólicos | 44 |
| **3** | **MATERIAL E MÉTODOS** | **46** |
| 3.1 | MATERIAL VEGETAL | 46 |
| 3.2 | CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA | 48 |
| 3.2.1 | Análise de Cor | 48 |
| 3.2.2 | Determinação Potenciométrica do pH | 49 |
| 3.2.3 | Umidade | 49 |
| 3.2.4 | Cinzas Totais | 49 |
| 3.2.5 | Proteínas | 49 |
| 3.2.6 | Fibra Solúvel e Insolúvel | 50 |

3.2.7 Lipídeos..... 51
3.2.8 Carboidratos..... 51
3.2.9 Valor Energético..... 51
3.2.10 Minerais..... 51
3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA..... 53
3.3.1 *Screening* Fitoquímico Preliminar..... 54
3.3.2 Obtenção de Extrato Bruto e Frações Semipurificadas..... 54
3.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... 56
3.3.4 Isolamento e Identificação de Compostos das Frações Semipurificadas 56
3.3.5 Extração e Caracterização Química de Óleo Essencial..... 58
3.3.6 Isolamento e Identificação de Compostos do Óleo Essencial..... 59
3.3.7 Doseamento de Compostos Fenólicos Totais (TPC)..... 60
3.3.8 Doseamento de Flavonoides Totais (TFC)..... 60
3.3.9 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos..... 61
3.4 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*..... 62
3.4.1 Redução do Radical DPPH..... 63
3.4.2 Redução do Radical ABTS..... 63
3.4.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)..... 63
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 64
3.5.1 Atividade Antimicrobiana..... 64
3.5.2 Atividade Anti-*Botrytis cinerea*..... 66
3.5.3 Atividade Alelopática..... 68
3.5.4 Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*..... 71
3.5.5 Atividade Hemolítica *in vitro*..... 72
3.5.6 Atividade Tóxica em *Artemia salina*..... 74
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 76
**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 77**
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA..... 77
4.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA..... 81
4.2.1 *Screening* Fitoquímico Preliminar..... 81
4.2.2 Obtenção de Extrato Bruto e Frações Semipurificadas..... 82
4.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... 83
4.2.4 Isolamento e Identificação de Compostos..... 85

4.2.5 Extração e Caracterização Química de Óleo Essencial..... 89
4.2.6 Isolamento e Identificação de Substâncias do Óleo Essencial..... 98
4.2.7 Doseamento de Compostos Fenólicos Totais (TPC) e Flavonoides Totais (TFC)..... 100
4.2.8 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos..... 101
4.3 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*..... 103
4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 106
4.4.1 Atividade Antimicrobiana..... 106
4.4.2 Atividade Anti-*Botrytis cinerea*..... 111
4.4.3 Atividade Alelopática..... 114
4.4.3.1 Germinação..... 114
4.4.3.2 Crescimento..... 117
4.4.4 Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*..... 120
4.4.5 Atividade Hemolítica *in vitro*..... 123
4.4.6 Atividade Tóxica em *Artemia salina*..... 124
**5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 128**
**REFERÊNCIAS..... 130**
**APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS DOS MINERAIS ANALISADOS POR ICP OES..... 155**
**APÊNDICE 2 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS..... 158**
**APÊNDICE 3 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS VIA HPLC..... 159**
**APÊNDICE 4 – CURVAS ANALÍTICAS DO TROLOX PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE..... 160**
**ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO – SISGEN..... 161**
**ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DE TOMBAMENTO DE AMOSTRA DE *A. edulis*..... 162**
**ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO..... 163**

# 1 INTRODUÇÃO

As plantas contribuem para a saúde do ser humano desde tempos remotos, seja para fins alimentícios ou medicinais (BARREIRA *et al.*, 2015). Essa influência tem relação com a presença de uma gama de compostos que podem apresentar atividades biológicas e farmacológicas – os compostos bioativos (CHAN *et al.*, 2016). Esses compostos são, em sua maior parte, metabólitos secundários sintetizados por plantas e participam dos sistemas de defesa e de atração de polinizadores dos vegetais (GUERRIERO *et al.*, 2018; MEHMOOD *et al.*, 2022). De acordo com a estrutura química, podem ser divididos em três principais grupos: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (VÁSQUEZ-REYES *et al.*, 2021), os quais apresentam atividades biológicas relacionadas à saúde como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (DIMA *et al.*, 2020). Também podem apresentar aplicações na agricultura e na indústria alimentícia, atuando como pesticidas, agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais, em detrimento dos sintéticos (DAS, 2016; SHIRAHIGUE; CECCATO-ANTONINI, 2020). Com o avanço da ciência e tecnologia, observa-se intensificação das pesquisas com produtos naturais a fim de identificar seus compostos bioativos (NTUNGWE N *et al.*, 2020).

O Brasil é um país com rica biodiversidade, possuindo cerca de 33.200 espécies vegetais, as quais são fonte de compostos bioativos (TEIXEIRA *et al.*, 2019). A biodiversidade local pode ser utilizada para fins alimentícios, ampliando a variabilidade da dieta da população (BALDERMANN *et al.*, 2016) e para fins medicinais, sendo que para muitas comunidades tradicionais, o uso das plantas está associado à preservação do meio ambiente e a aspectos econômicos e culturais, garantido o uso sustentável das espécies (BRAGA, 2021; MAGALHÃES *et al.*, 2022).

A *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk., pertencente à família Sapindaceae e popularmente conhecida como vacum ou chal-chal, representa um exemplo de espécie que pode ser importante tanto para alimentação quanto para uso medicinal (CHAVAN; GAIKWAD, 2016; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005). Trata-se de uma planta alimentícia não convencional (PANC), pois os frutos podem ser consumidos *in natura* ou utilizados para produção de licor e outros subprodutos (KUJAWSKA; ŁUCZAJ, 2015) e as folhas são utilizadas em conjunto

com a erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para produção de tererê. Em relação ao uso medicinal, a infusão das folhas de *A. edulis* é utilizada para o tratamento de desordens intestinais, diabetes, hepatite e hipertensão (BALSALOBRE *et al.*, 2023; KUJAWSKA, 2018; SANTOS *et al.*, 2021). É uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada em países como Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (SOBOTTKA *et al.*, 2021) e estudos prévios já demonstraram que suas folhas são fonte de óleo essencial, com predominância de sesquiterpenos, compostos bioativos da classe dos terpenos (SANTOS, *et al.*, 2021; SANTOS, *et al.* 2023; TREVIZAN *et al.*, 2016).

O estudo de *A. edulis* é relevante para ampliar o conhecimento sobre espécies da biodiversidade brasileira e promover o melhor uso do vegetal, além de auxiliar na preservação ambiental com manutenção da espécie. Ainda, *A. edulis* apresenta-se promissora em relação às propriedades antioxidantes e atividades biológicas, dada a identificação de compostos bioativos realizada em estudos prévios com o vegetal. Soma-se ao fato de que estudos sobre composição físico-química e mineral das folhas, assim como a composição do óleo essencial de folhas de *A. edulis* cultivadas no sul do Brasil são contribuições inéditas ao estudo da espécie.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar caracterização físico-química, mineral e fitoquímica de folhas de *A. edulis*; isolar e identificar compostos bioativos, avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas do óleo essencial e extrato bruto obtidos de folhas de *A. edulis*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição físico-química e mineral de folhas de *A. edulis.*
- Realizar *screening* fitoquímico preliminar de folhas secas de *A. edulis.*
- Obter extrato bruto e frações semipurificadas de folhas de *A. edulis.*
- Extrair óleo essencial das folhas de *A. edulis* e avaliar sua composição química antes e após 12 meses de armazenamento do material vegetal.
- Isolar e identificar constituintes químicos presentes nas frações semipurificadas e óleo essencial obtidos das folhas de *A. edulis.*
- Quantificar compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato bruto e frações semipurificadas de folhas de *A. edulis.*
- Determinar os compostos fenólicos individuais presentes no extrato bruto de folhas de *A. edulis*.
- Avaliar as propriedades antioxidantes do extrato bruto, frações semipurificadas e óleo essencial de *A. edulis.*
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans* e *Botrytis cinerea, a* atividade alelopática frente à *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e a atividade hemolítica *in vitro* do extrato bruto e óleo essencial de folhas de *A. edulis.*
- Avaliar a toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* do extrato bruto, frações semipurificadas e óleo essencial de folhas de *A. edulis*.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS

Pouco mais de 90 espécies de plantas são responsáveis por 90% do suprimento de alimentos no mundo. Esse baixo número de espécies utilizadas colabora para uma alimentação com menor diversidade e menor valor nutritivo (SCHUNKO *et al.*, 2022). Além disso, o número escasso de espécies vegetais empregadas na dieta base de diversos povos se correlaciona a formas de produção de alimentos não ambientalmente sustentáveis e, até mesmo, a extinção de algumas espécies que, em algum momento da história, serviram como alimento (LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018).

Nesse cenário, a inclusão das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) na rotina alimentar, poderia estar relacionada a preservação do conhecimento tradicional acerca de espécies vegetais, preservação de espécies nativas e melhora da composição nutricional da dieta da população (PINELA; CARVALHO; FERREIRA, 2017; SCHUNKO *et al.*, 2022). Por definição, Plantas Alimentícias Não Convencionais são aquelas que apresentam uma ou mais partes com potencial alimentício e não são comumente utilizadas para esse fim, podendo estar contempladas nesse grupo plantas nativas ou exóticas (KINUPP, 2007).

Frutas silvestres ou não convencionais são fontes de nutrientes e compostos bioativos e contribuem para a diversidade alimentar, podendo ser cultivadas como fonte de alimento para uma população em constante crescimento. Além do uso como alimento, muitas dessas frutas apresentam propriedades medicinais, sendo utilizadas por comunidades locais para o tratamento de doenças (MISRA; MISRA, 2016). Segundo Kinupp (2007), *Allophylus edulis* (A. St-Hil.) Radlk. ex Warm. (vacum ou chalchal) é considerada uma PANC, já que seus frutos são comestíveis e podem ser empregados para a elaboração de sucos, licores e polpa congelada. Outras espécies da família Sapindaceae também são consideradas PANC pelo mesmo autor como *Cardiospermum halicacabum* L. (coração da índia), *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (vassoura vermelha) e *Allophylus guaraniticus* (A. St-Hil.) Radlk. (vacum).

Em geral, as PANC não apresentam ou apresentam baixo valor comercial, sendo destinadas apenas para consumo local (MUTIE *et al.*, 2020). Os estudos sobre diferentes espécies de PANC incluindo composição química, partes utilizadas

(folhas, frutos, sementes, etc), usos potenciais e toxicidade são escassos (TULER; PEIXOTO; SILVA, 2019). Promover estudos sobre plantas não convencionais é uma forma de ampliar o conhecimento sobre o tema e auxiliar na conservação dessas espécies para futuras gerações (MUTIE *et al.*, 2020).

## 2.2 A FAMÍLIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae se originou na Eurásia durante o período Cretáceo Superior (100,5 a 65 milhões de anos), havendo dispersão para o hemisfério sul durante o período Paleoceno (65 a 55 milhões de anos) (BUERKI *et al.*, 2021). Possui aproximadamente 140 gêneros e 1900 espécies ao redor do mundo, principalmente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais. A maior parte das espécies são nativas da Ásia, havendo também espécies nativas da África, América do Sul e Austrália. No Brasil, contamos com 28 gêneros e 418 espécies, sendo a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica os principais centros de diversidade. No estado do Paraná, podem ser encontrados 12 gêneros e 65 espécies (ADEYEMI; OGUNDIPE, 2012; COELHO *et al.*, 2017; KAISER *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016).

A família é formada por espécies encontradas na forma de árvores, arbustos ou trepadeiras, normalmente com folhas de filotaxia alternada. Os frutos podem variar de bagas a esquizocárpicos, sendo algumas espécies conhecidas pela frutificação (PEREIRA *et al.*, 2016). Dentre as espécies que apresentam potencial econômico pelos frutos produzidos, destacam-se o guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.), a lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) e a pitomba (*Talisia esculenta* Radlk.) (BUERKI *et al.*, 2021). No Brasil, outras espécies são citadas por apresentar frutos comestíveis ou utilizados para elaboração de subprodutos como *Allophylus edulis* (chalchal, vacum, fruta de parão), *Paullinia cururu* L. (caruru), *Paullinia pinnata* L. (caruru-apê), *Talisia acutifolia* Radlk. (Pitombeira), *Talisia cerasina* (Benth.) Radlk. (Pitombeira) e *Talisia cupularis* Radlk. (Pitombeira) (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Além da importância na indústria alimentícia, devido aos frutos produzidos, a família Sapindaceae também apresenta importância econômica por ser fonte de materiais para a construção civil, indústria madeireira e indústria farmacêutica (PEREIRA *et al.*, 2016).

Em relação ao uso medicinal e possível aplicação na indústria farmacêutica, estudos etnobotânicos mostram que plantas da família Sapindaceae são popularmente utilizadas para o tratamento de queimaduras, úlceras, problemas dermatológicos, diarreia e desinteria (SOFIDIYA *et al.*, 2012). O QUADRO 1 a seguir apresenta algumas espécies dessa família, assim como suas aplicações na medicina tradicional.

QUADRO 1 - ESPÉCIES E RESPECTIVO USO TRADICIONAL DA FAMÍLIA SAPINDACEAE

(continua)

| Nome | Nome Popular no Brasil | Parte utilizada | Uso popular reportado |
|---|---|---|---|
| *Allophylus africanus* Beauv.[1] | - | Folhas e raízes | Folhas: tratamento de hérnia e dores cardíacas<br>Raízes: tratamento da epilepsia, para indução do parto e como sedativo. |
| *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk[2] | Vacum, chal-chal, fruta de pombo | Folhas | Anti-inflamatório, tratamento de dores de dente, desordens intestinais e hepatite. |
| *Allophylus rubifolius* (Hochst. ex A. Rich.) Engl.) [1] | - | Raízes | Contra inchaço, dor de dente e diarreia. |
| *Blighia unijugata* Baker[1] | Akee | Raízes | Contra vertigem, febre e amenorreia. |
| *Cardiospermum grandiflorum* SW. [3] | Ensacadinha | Folhas e raízes | Contra tosse. |
| *Deinbollia borbonica* Scheff. [1] | - | Folhas e raízes | Folhas: contra nervosismo<br>Raízes: contra dor de cabeça, gonorreia, desordens mentais, taquicardia, dores abdominais e no tratamento de ferimentos. |
| *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. [1] | Faxinha-vermelha | Folhas e raízes | Folhas: tratamento de hemorroidas e como agente antipruriginoso em erupções cutâneas.<br>Raízes: contra indigestão, no tratamento de úlcera péptica e ciclos menstruais irregulares. |
| *Lecaniodiscus fraxinifolius* Baker[1] | - | Raízes | Agente galactagogo |
| *Paullinia cupana* HBK. [3] | Guaraná | Frutos e sementes | Efeito diurético. Usados para o tratamento de diarreia com sangue e de dores de cabeça. |
| *Paullinia pinnata* L[1] | Carurrú-apê | Folhas e raízes | Folhas: contra picadas de cobra, raiva, problemas mentais e visuais.<br>Raízes: contra eczemas. |
| *Serjania erecta* Radlk. [3] | Cinco-folhas | Folhas e raízes | Folhas: tratamento de úlceras<br>Raízes: tratamento de hipertensão |
| *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk.[3] | Pitomba | Sementes e folhas | Sementes: chá usado na desidratação e cozidas usadas contra diarreia<br>Folhas: contra dores nos quadris e rins |

(conclusão)

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Zanha golungensis* Hiern[1] | - | Casca do caule | Tratamento de chiado no peito, malária e dores de cabeça. Usado contra catarro e para efeito galactagogo. |
| *Zunha africana* (Radlk.) Exel[1] | - | Raízes | Contra constipação, inflamação da próstata e dores nas pernas. Também é usada para facilitar o trabalho de parto. |

FONTE: Chhabra; Mahunnah; Mshiu (1991) [1]; Santos *et al*. (2021) [2] ;Guarim Neto; Santana; Silva (2000) [3]

Algumas plantas da família também são conhecidas por sua toxicidade. A casca do Timbó (*Magonia pubescens* St. Hil), folhas do timbó-amarelo (*Serjania ovalifolia* Radlk), carurú-apé (*Paullinia pinnata* L.), caule do tingui-da-mata (*Serjania caracasana* (Jacq.) Willd) e frutos de cipó timbó (*Paullinia elegans* Camb) são ictiotóxicas, ou seja, são tóxicas para peixes. As sementes de saboneteira (*Sapindus saponária* L.) são inseticidas (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000).

Em relação ao isolamento de metabólitos secundários, já foi relatada na literatura a presença de cianolipídios (SPITZER, 1996) diterpenos (CAVALCANTI *et al.*, 2001), triterpenos, fitosteróis (SANTOS *et al.*, 2010), flavonoides, ácidos orgânicos (FRAGA *et al.*, 2021) e saponinas (TSUZUKI *et al.*, 2007) em espécies da família Sapindaceae.

A presença de saponinas, em específico, é largamente relatada, sobretudo em plantas do gênero Sapindus, um dos representantes da família Sapindaceae. A ingestão de saponinas pode ser tóxica, mas diversas atividades biológicas já foram atribuídas a espécies deste gênero como antiedema, broncolítica, citotóxica frente a neoplasias, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica, indutora de parto, entre outras (GUIRADO, 2005). Espécies como o saboeiro (*Sapindus divaricatus* Willd.) e saboneteira (*Sapindus saponaria* L.) podem ser empregadas para a confecção de sabão (GUARIM NETO; SANTANA; SILVA, 2000).

## 2.3 O GÊNERO *Allophylus*

O gênero *Allophylus* é o maior da família Sapindaceae, incluindo cerca de 250 espécies, muitas com valor medicinal e nutricional (BUERKI *et al.*, 2021). Trata-se de um gênero distribuído mundialmente, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais, sendo que 31 espécies são encontradas no Brasil. É composto por

plantas monoicas e dioicas, sob a forma de árvores e arbustos, em sua maioria, com folhas trifoliadas (CHAVAN; GAIKWAD, 2016; SOMNER; FRAZÃO; FERRUCCI, 2013).

Em relação ao valor nutricional, folhas e frutos de algumas espécies do gênero *Alloplhylus* são comestíveis, como frutos de *A. cobbe*, *A. serratus, A. edulis* e frutos e folhas de *A. rubifolius*. Também há aplicação do gênero na alimentação animal (*A. africanus, A. abyssinicus* e *A. macrobotrys*) e potencial na indústria madeireira (*A. timorenses, A. rubifolius* e *A. puberulus*) (CHAVAN; GAIKWAD, 2016).

Várias espécies deste gênero têm sido estudadas em relação às atividades biológicas que apresentam, sendo que dentre as já estudadas, destacam-se: anti-osteoporose, anti-inflamatória, anti-ulcerogênica, antidiabética, antibacteriana, antimalária e inseticida (CHAVAN; GAIKWAD, 2016, CHAVAN; GAIKWAD, 2017).

A *A. africanus* tem relevância na medicina tradicional africana, sendo suas folhas utilizadas como antipiréticas e aplicadas no tratamento de enxaqueca, conjuntivite e cólicas. Suas raízes apresentam efeitos desverminantes e são utilizadas para o tratamento de artrite. Quanto a sua composição, já foram identificados diterpenoides, esteroides, triterpenos e flavonas (FERRERES *et al.*, 2018; OLADOSU; BALOGUN; LIU, 2015). Estudos relacionados a atividades biológicas demonstraram que a espécie apresentou atividade antibacteriana contra *Bacilus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens* e *Salmonella pooni* (SOFIDIYA *et al.*, 2012), antioxidante (BALOGUN; OLADOSU; LIU, 2014) e anti-inflamatória (FERRERES *et al.*, 2018).

A *A. cobbe* L. é tradicionalmente utilizada para tratamento de erupções cutâneas, dor de estômago e fraturas ósseas (BHARAT; KRISHNA, 2017). Prospecções fitoquímicas conduzidas com *A. cobbe* L. demonstraram a presença de alcaloides, flavonoides, esteróis, taninos, lignina e saponinas (GHAGANE *et al.*, 2017). Quanto às atividades biológicas associadas à espécie, pode-se citar atividade antioxidante (ANKAD *et al.*, 2016), nematicida e pesticida (JAYASINGHE *et al.*, 2003), antinociceptiva e anti-inflamatória (JAIN *et al.*, 2014). Extratos obtidos a partir de folhas de *A. cobbe* L. também apresentaram resultado promissor em relação a atividade anticâncer em linhagens de células de câncer de próstata (DU-145 e PC-3) (GHAGANE *et al.*, 2017).

A *A. cominia*, nativa de Cuba, é utilizada na medicina popular para tratamento de desordens intestinais, tuberculose, dores de dente, doenças venéreas

e, principalmente, para o tratamento do diabetes (OLIVA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Uma análise química preliminar demonstrou a presença de taninos, leucoantocianidinas, saponinas, triterpenos e esteroides na espécie (RODRIGUEZ *et al.*, 2005). Desta espécie, também já foram isolados dois flavonoides (quercetina e mearnsitrina) e as feofitinas A e B, sendo que, sobretudo a mistura dos flavonoides, apresentou importante efeito inibitório das enzimas dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), proteína tirosina fosfatase 1B, α-glucosidase e α-amilase, consideradas enzimas alvo no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Em relação a DPP-IV e a α-glucosidase, as frações com misturas de flavonoides apresentaram maior potencial de inibição que os inibidores comerciais. Interessante pontuar que, quando os flavonoides foram testados isoladamente, não foi observado o mesmo efeito inibitório que com a mistura, indicando uma ação sinérgica entre a quercetina e mearnsitrina (SEMAAN *et al.*, 2017; SEMAAN *et al.*, 2018). A espécie também demonstrou atividade anti-inflamatória, avaliada pela inibição da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (OLIVA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

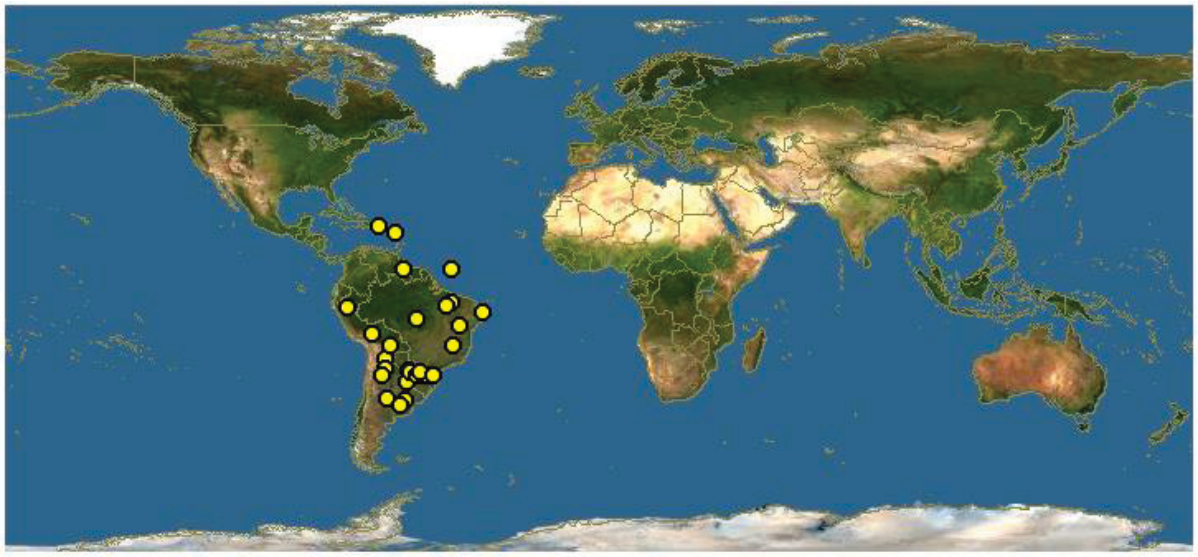
A *A. longipes* é conhecido pelo seu uso popular na China para o tratamento de gripes e inflamações. Os estudos com essa espécie são escassos, havendo destaque para a avaliação da composição fitoquímica. Vinte e cinco compostos foram isolados, dentre eles terpenos, sesquiterpenos, triterpenos, cumarinas e fitosteróis (ZHANG; CAI; LUO, 2012).

A *A. serratus* é utilizada como anti-inflamatória e carminativa na medicina Ayurveda, sendo também aplicada na medicina popular no tratamento de elefantíase, diarreia, anorexia, dispepsia e fraturas ósseas, além de ser considerada um agente capaz de induzir a lactação (DHARMANI *et al.*, 2005). Segundo Priya, Selvan e Tamilselvan (2012), a espécie é rica em fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e ácidos graxos. A rutina, um flavonoide isolado de *A. serratus* demonstrou atividade osteogênica (KUMAR *et al.*, 2010) e o extrato etanólico de folhas da espécie demonstrou propriedade antiulcerogênica em modelo animal, sendo capaz de reduzir a intensidade do dano na mucosa gástrica (DHARMANI *et al.*, 2005).

## 2.4 *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.

A *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk., conhecida popularmente como vacum, vacunzinho, chal-chal, cocu, fruta de pombo ou fruta de parão é uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada em países como Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Guiana (DÍAZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2012; TIRLONI *et al.*, 2015) (FIGURA 1). No Brasil, está presente nos 3 estados da região sul, além de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Ceará e Amazonas (ABREU *et al.*, 2005).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *A. edulis*



FONTE: discoverlife.org (2019)

Trata-se de uma espécie pertencente à família Sapindaceae (QUADRO 2) comum em áreas de Floresta Ombrófila Mista Aluvial, ocorrendo tanto em solos úmidos, no interior de florestas primárias, quanto em solos mais rochosos em florestas abertas (KNAPIK *et al.*, 2005). É encontrada também na Floresta Estacional Decidual (KAISER *et al.*, 2016).

O termo *edulis* presente no nome da espécie vegetal deriva do latim e significa comestível, característica associada aos frutos que são consumidos por humanos e outros animais (BIONDI; LEAL; COBALCHINI, 2007). Além do consumo *in natura* dos frutos, esses também podem ser utilizados para produção de bebida vinosa. Há relatos ainda do uso das folhas na medicina tradicional e dos caules para marcenaria e lenha. A árvore pode ser utilizada para arborização urbana e apresenta

importância na manutenção da fauna, pois frutos e folhas são apreciados por diferentes espécies animais (ABREU *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012; TOMAZI *et al.*, 2014).

QUADRO 2 - ENQUADRAMENTO TAXONOMICO DA ESPÉCIE *A. edulis*

| | |
|---|---|
| Reino | Plantae |
| Filo | Tracheophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordem | Sapindales |
| Família | Sapindaceae |
| Gênero | *Allophylus* L. |
| Espécie | *Allophylus edulis* |

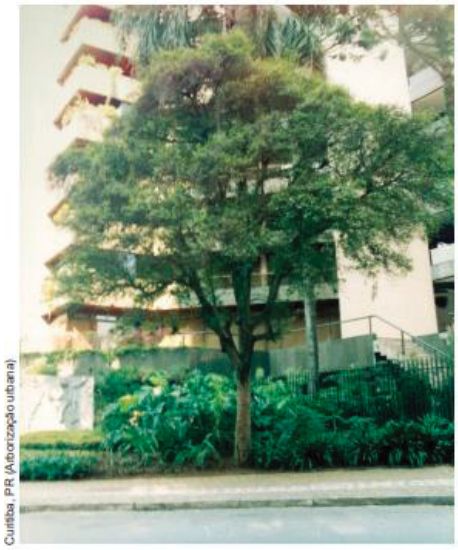
FONTE: Gbif (2019).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a espécie vegetal *A. edulis* é fonte de taninos (córtex do caule) e óleos essenciais (caules foliáceos e floríferos) (FAO, 2001). Nesta revisão de literatura, se procura descrever os achados da espécie vegetal até o momento.

### 2.4.1 Descrição Botânica

Trata-se de uma árvore de porte médio que pode atingir de 6 a 20 metros de altura e 15 a 30 centímetros de diâmetro (FIGURA 2) (SOBOTTKA *et al.*, 2021; YAJÍA *et al.*, 1999).

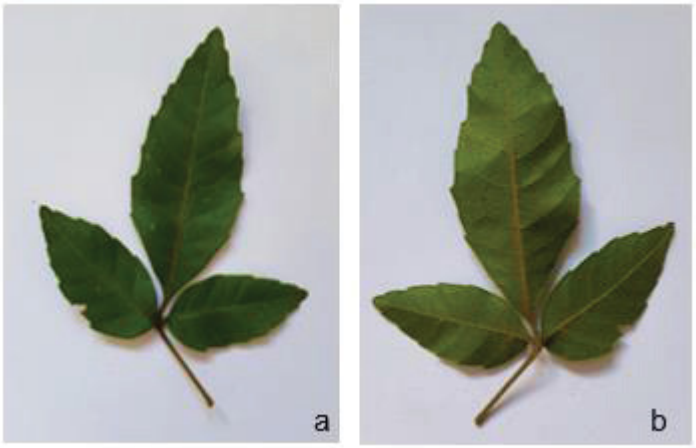
FIGURA 2 - *Allophylus edulis*




FONTE: Carvalho (2006).

As folhas são alternadas e trifolioladas (FIGURA 3), apresentando as bordas serrilhadas (YAJÍA *et al.*, 1999). As flores são branco-amareladas, dispostas em racemos auxiliares curtos e a floração ocorre de setembro a novembro (BIONDI; LEAL; COBALCHINI, 2007; SOBOTTKA *et al.*, 2021).

FIGURA 3 - FOLHAS DE *A. edulis*




FONTE: A autora (2023).
Nota: a – face adaxial; b – face abaxial

Os frutos são pequenos, globosos, pouco carnosos, de superfície lisa e brilhante. A coloração varia de verde à vermelho vivo de acordo com o grau de maturação. Quando maduros, apresentam sabor adocicado, sendo o epicarpo e mesocarpo as partes comestíveis do fruto (ABREU *et al.*, 2005; YAJÍA *et al.*, 1999). A frutificação ocorre de outubro a novembro ou dezembro a março (GASPARIN *et al.*, 2012; SOBOTTKA *et al.*, 2021).

As sementes são ovoides e pequenas, apresentando cerca de 4 mm de diâmetro, recobertas por tegumento fino de cor laranja. O início da germinação das sementes ocorre a partir de oito dias após o plantio, sendo as sementes provenientes de frutos com epicarpo na coloração predominantemente vermelha, as com adequada maturidade fisiológica (ABREU *et al.*, 2005; KAISER *et al.*, 2016). As sementes de *A. edulis* são consideradas recalcitrantes, ou seja, não toleram temperatura de secagem, perdendo seu poder germinativo rapidamente (GASPARIN *et al.*, 2012).

### 2.4.2 Usos

#### 2.4.2.1 Medicina Tradicional

As folhas de *A. edulis* são conhecidas por apresentar efeitos contra problemas digestivos como desinteria, pirose e colecistite, além de ação anti-inflamatória e diurética. O suco das folhas é usado para tratamento da icterícia e a infusão para tratamento da hepatite e hipertensão (ARISAWA *et al.*, 1989; KUJAWSKA, 2018; SANTOS *et al.*, 2021; YAJÍA *et al.*, 1999). A infusão de folhas de *A. edulis* também pode ser utilizada como adstringente e com ação terapêutica no diabetes (TOMAZI *et al.*, 2014).

No Paraguai e na Argentina, as folhas de *A. edulis* são utilizadas em conjunto com a erva mate para confecção de tererê. A mistura é considerada um remédio pelos paraguaios para tratamento de doenças do trato digestivo, hepatite e hipertensão (KUJAWSKA, 2018; YAJÍA *et al.*, 1999).

#### 2.4.2.2 Alimento

Os frutos são tradicionalmente utilizados como alimento. Apesar de produzir frutos pequenos (FIGURA 4), a produção ocorre com abundância. Os frutos com sabor doce são aproveitados como fruta de mesa, contudo, apresentam alta perecibilidade, sendo também utilizados para produção de sucos, licores e polpa congelada (KINUPP, 2007). O consumo também pode se dar sob a forma de uma bebida fermentada similar ao vinho. Além disso, no Peru há relatos de adição dos frutos a uma bebida tradicional conhecida como chicha (ABREU *et al.*, 2005; AICHHOLZ; SPITZER; LORBEER, 1997). O consumo dos frutos in natura ou como licor também é citado por Kujawska e Łuczaj (2015) ao avaliar a significância cultural de plantas alimentícias não convencionais para uma comunidade de descendência polonesa na Argentina. Acredita-se que o consumo excessivo dos frutos pode provocar cistite (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005).

FIGURA 4 – FRUTOS DE *A. edulis*

Fonte: Carvalho (2006)

As sementes também podem ser consumidas, havendo relato de uso sob a forma torrada para fins alimentícios em regiões do Rio Grande do Sul. Segundo Kinupp (2007) sementes torradas em forno e salgadas são saborosas, crocantes e bem aceitas.

2.4.2.3 Outros

A madeira de *A. edulis* pode ser aplicada na marcenaria por apresentar boa qualidade (ABREU *et al.*, 2005; GASPARIN *et al.*, 2012). A árvore também pode ser utilizada para arborização urbana, visto que é bastante ornamental, apresenta crescimento rápido, fácil adaptação à diferentes tipos de solo e condições de luminosidade e boa capacidade de regeneração natural (ABREU *et al.*, 2005; BIONDI; LEAL; COBALCHINI, 2007). Além disso, é uma espécie pouco exigente no que diz respeito à adubação do solo para produção de mudas (KNAPIK *et al.*, 2005). O *A. edulis* pode ser ainda uma boa alternativa para recuperação de ecossistemas degradados, sobretudo em estágios iniciais e médios, de Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual (UMEO *et al.*, 2011). Uma das características que favorece o uso de *A. edulis* para recuperação de ecossistemas é a sua capacidade de tolerar maiores níveis de radiação e apresentar adequada assimilação de $CO_2$ (BALLESTRERI *et al.*, 2021).

### 2.4.3 Valor Nutricional

Os estudos já publicados de composição nutricional de *A. edulis* são direcionados aos frutos. A polpa *in natura* de frutos apresenta baixo teor proteico (0,27%) e os minerais predominantes são potássio (0,1289 g/100g), fósforo (0,0185 g/100g), cálcio (0,0134 g/100g), magnésio (0,0133 g/100g) e enxofre (0,0133 g/100g) (KINUPP; BARROS, 2008). Ao avaliar a composição de frutos frescos cultivados na Argentina, Schmeda-hirschmann *et al.* (2005) identificaram 11,5% de umidade, 2,8% de cinzas, 12,04% de proteína, 21,6% de lipídios e 18% de fibras. Verificaram ainda a presença de fosfato (206,7mg/100g), cálcio (0,016g/100g), ferro (0,010mg/100g), potássio (318,2g/100g) e sódio (0,049g/100g). Considerando resultados como baixa umidade e elevado teor de lipídios, podemos considerar que os autores não separaram a polpa da semente, visto que essa informação não fica clara na publicação. Um único estudo conduzido com folhas de *A. edulis* demonstrou a presença de minerais como sódio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, manganês e zinco, sendo os teores desses minerais influenciados pelo uso de adubo a base de esterco de galinha (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

### 2.4.4 Fitoquímica

Diferentes partes da espécie vegetal foram submetidas à extração e posterior isolamento de substâncias. A partir de extratos de folhas de *A. edulis* cultivadas no Paraguai foram isolados seis flavonoides (quercetina 3-O-(2”-O-galoil)-glicosideo, vitexina 2”Oα-L-raminosidio, isovitexina, vicenina, vitexina e quercetina 3-O-glucoronídio) e uma isocumarina (bergenina) (ARISAWA *et al.*, 1989). A bergenina também foi identificada em extrato de folhas de *A. edulis* cultivadas no sul do Brasil, assim como 11-O-galoilbergenina, ácido gálico e nove c-glicosil flavonas (escaftosídeo, vicenina 2, lucenina-2, isovitexina 2”-O-raminosídeo, cerarvensina 2”-O-raminosídeo, vitexina 2”-O-raminosídeo, isorrientina 2”-O-raminosídeo, orientina 2”-O-raminosídeo e saponarina) (HOFFMANN-BOHM *et al.*, 1992).

A condução de prospecção fitoquímica indicou resultado positivo para saponinas, taninos e flavonoides em folhas de *A. edulis* (ARRUDA *et al.*, 2018; SOBOTTKA *et al.*, 2021).

Sesquiterpenos como viridiflorol, óxido de cariofileno e α-zingibereno são descritos como compostos majoritários de óleos essenciais obtidos de folhas de *A. edulis*. Verifica-se que, a depender da região e condições ambientais de cultivo, há mudanças na composição química do óleo essencial. Além disso, o rendimento do óleo essencial também é influenciado por questões climáticas, sendo observado maior rendimento em óleos obtidos de coletas de folhas de *A. edulis* realizadas na primavera e verão (SANTOS *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2023; TREVIZAN *et al.*, 2016).

Dos galhos de *A. edulis* (extrato etanólico) foi isolado um ciclitol, o L-quebrachitol (DÍAZ *et al.*, 2008). Outros seis compostos também já foram identificados no caule de *A. edulis* (extrato etanólico e fração hexânica), sendo eles: 6,7-epoxicariofileno (sesquiterpeno), espatulenol (sesquiterpeno), sitosterona (esteroide), lupeol (triterpenoide), sitosterol (esteroide) e 2-oxo-13-hidroxy-neo-cleroda-3,14-dieno (diterpenoide) (DÍAZ *et al.*, 2014).

A partir de sementes de *A. edulis* é possível a obtenção de óleo, no qual já foram identificados triglicerídeos e cianolipídios (AICHHOLZ; SPITZER; LORBEER, 1997).

### 2.4.5 Atividades Biológicas e Farmacológicas

Alguns estudos já foram conduzidos no que diz respeito a atividades biológicas de diferentes partes da espécie *A. edulis,* como potencial hepatoprotetor (HOFFMANN-BOHM *et al.*, 1992), potencial anti-inflamatório (BALSALOBRE *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2021; TREVIZAN *et al.*, 2016), potencial anti-artrite (BALSALOBRE *et al.*, 2023), potencial antioxidante (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005; SOBOTTKA *et al.*, 2021; TIRLONI *et al.*, 2015; TREVIZAN *et al.*, 2016; UMEO *et al.*, 2011), atividade antimicrobiana (ARRUDA *et al.*, 2018; TIRLONI *et al.*, 2015; TREVIZAN *et al.*, 2016), efeito inotrópico negativo (MATSUNAGA; SASAKI; OHIZUMI, 1997), atividade anticolinesterásica (UMEO *et al.*, 2011), ação inibitória da enzima conversora de angiotensina (ARISAWA *et al.*, 1989), genotoxicidade (PASQUALLI; TEDESCO; TEDESCO, 2015; YAJÍA *et al.*, 1999) e potencial inseticida (CASTILLO *et al.*, 2009; DÍAZ *et al.*, 2014).

Devido a descrição de uso popular das folhas para melhora da icterícia, o potencial hepatoprotetor de folhas de *A. edulis* foi avaliado. O extrato metanólico de

folhas provenientes de Porto Alegre (RS, Brasil) apresentou fraco potencial, contudo, compostos isolados das folhas como c-glicosil flavonas demonstraram resultados promissores (HOFFMANN-BOHM *et al.*, 1992).

Outro uso popular da planta, o potencial anti-inflamatório, foi avaliado por Trevisan *et al.* (2016) em relação a formação de edema e migração leucocitária em animais. Os autores observaram efeito anti edematogênico e inibitório da migração de leucócitos do óleo essencial obtido das folhas, sugerindo a existência da atividade anti-inflamatória na espécie vegetal. Esses resultados foram corroborados por Santos *et al.* (2021), quando observaram que o edema, a hiperalgesia e a alodinia ao frio foram inibidas em ratos após administração de óleo essencial obtido de folhas de *A. edulis.* O óleo essencial de folhas também foi capaz de reduzir a dor e o edema em modelo animal após administração oral, sugerindo o potencial anti artrite e analgésico do óleo essencial e do componente majoritário, o viridiflorol (BALSALOBRE *et al.*, 2023).

O potencial antioxidante foi explorado em frutos e folhas de *A. edulis*. Frutos cultivados no estado do Paraná (Brasil) apresentaram atividade antioxidante *in vitro* expressiva pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com concentração inibitória de 50% do radical ($IC_{50}$) de 46,4µg/mL (UMEO *et al.*, 2011), já frutos cultivados na província de Salta (Argentina), apresentaram 33% de descoloração do radical DPPH na dose de 100 µg de extrato etanólico (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005). Em relação às folhas, pelo método de redução do radical DPPH, o extrato bruto hidroalcóolico obtido por maceração de folhas cultivadas em Casca (RS, Brasil) apresentou concentração efetiva para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH ($EC_{50}$) de 134,4 µg/mL (SOBOTTKA *et al.*, 2021), enquanto que o extrato etanólico de folhas cultivadas em Dourados (MS, Brasil) demonstrou $IC_{50}$ de 17,7 µg/mL (TIRLONI *et al.*, 2015). O extrato etanólico de folhas também demonstrou potencial de inibição da peroxidação em eritrócitos humanos similar ao padrão ácido ascórbico (TIRLONI *et al.*, 2015). O óleo essencial, também obtido de folhas de *A. edulis* cultivadas em Mato Grosso do Sul (Brasil), apresentou atividade antioxidante moderada pelos métodos de redução dos radicais DPPH ($IC_{50}$ 82,9 µg/mL) e ABTS (44,33% de inibição) (TREVIZAN *et al.*, 2016).

Tanto o óleo essencial obtido de folhas de *A. edulis*, como o viridiflorol, composto majoritário isolado do óleo, apresentaram atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* promissora com doses de concentração inibitória mínima (CIM) de

157,5 µg/mL e 190 µg/mL para óleo e viridiflorol, respectivamente (TREVIZAN *et al.*, 2016). O extrato etanólico de folhas de *A. edulis* demonstrou atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (CIM de 150mg/ml), mas não para *Escherichia coli* ou *Candida albicans* (TIRLONI *et al.*, 2015). Já o extrato aquoso de folhas de *A. edulis* não demonstrou ação antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (ARRUDA *et al.*, 2018).

Sobre o efeito inotrópico negativo, a fração acetato de etila de *A. edulis* cultivados no Paraguai demonstraram forte efeito negativo na resposta contrátil de átrio esquerdo de porquinhos-da-Índia, ou seja, levaram a redução da força de contração do músculo cardíaco (MATSUNAGA; SASAKI; OHIZUMI, 1997).

Os frutos de *A. edulis* cultivados no estado do Paraná, Brasil, apresentaram atividade anticolinesterásica moderada por método bioautográfico quantitativo preliminar. O extrato etanólico dos frutos demonstrou potencial em inibir a enzima acetilcolinesterase, o que é útil no tratamento da doença de Alzheimer (UMEO *et al.*, 2011). Compostos fenólicos isolados de folhas e galhos de *A. edulis* demonstraram efeito inibitório da enzima conversora de angiotensina (ECA), envolvida na conversão de angiotensina I para angiotensina II, sendo a angiotensina II responsável pela contração de vasos sanguíneos e elevação da pressão arterial (ARISAWA *et al.*, 1989).

Em relação à genotoxicidade, o extrato aquoso de folhas e galhos de *A. edulis* cultivadas na Argentina demonstrou redução do crescimento da raiz, presença de tumores e necrose e redução do índice mitótico de cebola (*Allium cepa*) (YAJÍA *et al.*, 1999). A atividade genotóxica também foi observada por Pasqualli; Tedesdo; Tedesco (2015), ao analisar extratos aquosos de folhas de *A. edulis* cultivadas no Rio Grande do Sul, Brasil. As autoras também identificaram que houve redução do índice mitótico, demonstrando atividade antiproliferativa dos extratos aquosos de *A. edulis*.

O potencial inseticida de extratos etanólicos de folhas e caule foi avaliado. O extrato das folhas não apresentou resultados satisfatórios frente a insetos testados como *M*yzus *persicae* (pulgão-do-pessegueiro), *Rhopalosiphum padi* (piolho-da-cerejeira-brava) e *Spodoptera littoralis* (verme do algodão), já o extrato etanólico e frações do caule de *A. edulis* apresentaram efeito inseticida contra *M*yzus *persicae* (pulgão-do-pessegueiro) (CASTILLO *et al.*, 2009). Compostos isolados de galhos de

*A. edulis* também apresentaram ação contra *M*yzus *persicae* e *Epilachna paenulata* (praga das cucurbitáceas) (DÍAZ et al., 2014).

### 2.4.6 Toxicidade

Há descrição na literatura sobre a avaliação da toxicidade dos galhos e folhas de *A. edulis* frente à *Apis melífera* (CASTILLO *et al.*, 2009) e dos frutos e das folhas frente à *Artemia salina* (ARRUDA *et al.*, 2018; UMEO *et al.*, 2011), todos com resultados negativos. Os resultados também foram negativos para extrato etanólico de folhas de *A. edulis* em ratos W*istar.* Até a dose de 2g/kg não foram observadas alterações de peso corporal, de órgãos ou morte dos animais, contudo, na dose de 5g/kg, foi observado aumento do peso do fígado em relação aos grupos controle (TIRLONI *et al.*, 2015).

## 2.5 ÓLEO ESSENCIAL

Óleos essenciais são líquidos voláteis que apresentam odor característico e são sintetizados pelas plantas em resposta a agentes estressores como patógenos, pragas, alta exposição a raios ultravioleta, exposição a altas temperaturas e escassez hídrica (CHAUDHARI *et al.*, 2019; DAJIĆ-STEVANOVIĆ *et al.*, 2018). São formados por uma diversidade de compostos bioativos como álcoois, aldeídos, fenilpropanoides, terpenos, compostos fenólicos e cetonas (PATEIRO *et al.*, 2018). A composição química de um óleo essencial pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles, aqueles relacionados a planta (espécie, idade, grau de maturação, parte estudada), ao ambiente (localização, tipo de solo, incidência de luz, irrigação, estação do ano, clima) e ao método de extração (CHAN *et al.*, 2016). A mistura complexa de compostos presentes em um óleo essencial é que irá se relacionar com as atividades biológicas que os óleos apresentam como antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida, antiparasitária, antioxidante, dentre outras (DAJIĆ-STEVANOVIĆ *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2022).

O método tradicional empregado para extração de óleos essenciais de produtos naturais é a hidrodestilação, contudo, existem outras técnicas inovadoras como extração assistida por micro-ondas, hidrodestilação ôhmica e extração com fluidos supercríticos que também podem ser aplicadas (PATEIRO *et al.*, 2018).

Quanto a caracterização química de óleos essenciais, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) é o método analítico mais empregado (CHAN *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais são conhecidamente utilizados na aromaterapia, mas também são aplicados na indústria alimentícia, farmacêutica e na agroindústria (CHAN *et al.*, 2016). Na indústria alimentícia, por exemplo, são aplicados para melhora de atributos sensoriais como sabor e aroma e, além disso, como fonte de compostos bioativos que apresentam impacto positivo da saúde de consumidores (YANG *et al.*, 2023). Na saúde humana podem apresentar potencial hepatoprotetor, anti-inflamatório, anticarcinogênico, antiobesogênico e antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2018). Ainda a respeito da aplicação industrial, podem ser aplicados como conservantes devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano e antifúngico que apresentam, sendo considerados alternativas naturais, seguras e sustentáveis quando comparados aos conservantes sintéticos (CHAUDHARI *et al.*, 2019). A dificuldade da aplicação dos óleos em grande escala se dá pelas suas características de volatilidade, sensibilidade ao calor e a luz e a sua hidrofobicidade. Além disso, quando utilizados na indústria alimentícia, podem conferir alteração de sabor e aroma dos produtos. Entretanto, o uso de tecnologia, como métodos inovadores de extração e o emprego da nano encapsulação, podem proteger o óleo essencial, o tornando mais estável (PATEIRO *et al.*, 2018).

## 2.6 COMPOSTOS BIOATIVOS

Metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pelas plantas com o objetivo de desempenharem funções ecológicas importantes, seja por meio da ação como defensores contra patógenos e insetos ou como agentes atrativos para animais polinizadores ou responsáveis por dispersar sementes (CHAN *et al.*, 2016; TAIZ; ZEIGER, 2009). Esses compostos, ao contrário dos metabólitos primários, que derivam da fotossíntese e tem como função a manutenção da vida do vegetal, são sintetizados em pequena quantidade pelas plantas a partir da via glicolítica e da rota do ácido chiquímico e atuam em resposta a exposição dos vegetais a estressores bióticos e abióticos (DAJIĆ-TEVANOVIĆ *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2021). Diversos desses metabólitos secundários apresentam atividades biológicas relacionadas efeitos benéficos à saúde humana e, por isso, são também

chamados de compostos bioativos. Dentre as atividades biológicas relacionadas a esses compostos podemos citar atividade antioxidante, modulação de resposta imune, modulação do processo de destoxificação, redução da pressão arterial, atividade antibacteriana e antiviral e atuação na prevenção de tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento como doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer (HORST, 2013; SULTANA *et al.*, 2023). É importante destacar que compostos bioativos não são considerados compostos essenciais e que a utilização deles pelo organismo humano depende de sua biodisponibilidade e bioacessibilidade, ou seja, a fração do composto que, após o processo de digestão, atinge a circulação sanguínea para cumprimento da função biológica em determinado órgão ou tecido alvo (DIMA *et al.*, 2020). Além dos efeitos na saúde, os compostos bioativos também apresentam aplicabilidade na indústria, como a alimentícia e farmacêutica, atuando como aditivos ou ingredientes com potencial antioxidante e antimicrobiano (BONDAM *et al.*, 2022).

A atividade biológica de um metabólito secundário tem relação com sua estrutura química (HORST, 2013) e, de acordo com esse parâmetro, os compostos bioativos podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (VÁSQUEZ-REYES *et al.*, 2021), sendo os dois primeiros grupos já identificados em folhas de *A. edulis* (ARISAWA *et al.*, 1989; HOFFMANN-BOHM *et al.*, 1992; TREVIZAN *et al.*, 2016).

A análise desses compostos em produtos naturais inclui alguns estágios. Inicialmente é preciso conhecer as classes de metabólitos secundários presentes no vegetal, para então poder eleger a melhor forma de extração desses compostos. Após a extração, torna-se necessário purificar a substância alvo extrato, para então, isolá-la e identificá-la. Fatores como tamanho e complexidade da molécula e características físicas e químicas influenciam todo processo de extração, purificação e identificação (PROSHKINA *et al.*, 2020).

### 2.6.1 Terpenos

Os terpenos são o maior grupo de metabólitos secundários, compreendendo mais de oitenta mil compostos com diversidade estrutural e de atividades biológicas e farmacológicas associadas. Essa diversidade faz com que tais compostos possam apresentar aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e

agropecuária (PROSHKINA *et al.*, 2020; ZHOU; PICHERSKY, 2020). Todas as plantas sintetizam terpenos e alguns são comuns a maior parte das plantas. Contudo, alguns terpenos são sintetizados apenas em algumas famílias ou espécies, servindo como marcadores químicos (BEHR; JOHNEN, 2009; ZHOU; PICHERSKY, 2020).

Compostos pertencentes a essa classe são sintetizados em diferentes tecidos glandulares nos vegetais, sobretudo nos tricomas glandulares, e em diferentes órgãos vegetais como raízes, folhas, flores e sementes (DAJIĆ-STEVANOVIĆ *et al.*, 2018). Apresentam funções diversas como participação nos processos de respiração, fotossíntese, crescimento, desenvolvimento e no sistema de defesa contra insetos e patógenos (CHAN *et al.*, 2016).

Os terpenos derivam do isopentenil difosfato (IPP) e do isômero dimetialil difosfato (DMAPP), ambos com 5 carbonos em sua estrutura, gerados nas rotas biosintéticas do mevalonato (MVA) e do metileritritol fosfato (MEP) (SU *et al.*, 2016). Podem ser classificados em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (>C40) (PROSHKINA *et al.*, 2020). Podem ainda ocorrer na forma acíclica ou conter de 1 a 5 anéis associados a grupos éster, aldeído, cetona ou álcoois (BEHR; JOHNEN, 2009). Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais terpenos voláteis liberados pelas plantas e os principais componentes de óleos essenciais (CHAN *et al.*, 2016).

Os hemiterpenos são gerados pela degradação de terpenos de cadeia maior (ZHOU; PICHERSKY, 2020). Os monoterpenos são dímeros de isopreno e costumam ser voláteis, devido ao baixo peso molecular que apresentam. Por apresentar aroma agradável, possuem aplicação na indústria cosmética e alimentícia (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Nas plantas, o teor de monoterpenos parece aumentar de acordo com o grau de stress sofrido pela espécie, sobretudo em relação a aumento de temperatura pela exposição solar (JOFFARD *et al.*, 2017). De acordo com a estrutura, os monoterpenos podem ser acíclicos, ou seja, apresentam uma cadeia carbônica aberta ou cíclicos, com uma cadeia fechada. Pineno, limoneno, camfeno, eucaliptol e geraniol são exemplos de monoterpenos encontrados na natureza (PROSHKINA *et al.*, 2020). Assim como os monoterpenos, os sesquiterpenos também são compostos voláteis (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). São compostos constituídos de 3 unidades de isopreno e

compreendem um grupo com mais de cinco mil compostos. Os sesquiterpenos atuam nas espécies vegetais sobretudo como protetores da defesa de herbívoros (JOFFARD *et al.*, 2017). Farnesol, nerolidol, cariofileno e elemeno são exemplos de sesquiterpenos. As saponinas são uma classe de triterpenos e os carotenos e xantofilas pertencem ao grupo dos tetraterpenos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

### 2.6.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos contemplam um grande grupo de substâncias presentes em plantas que tem como característica principal a presença de um anel aromático com pelo menos um grupamento hidroxila em sua estrutura (VÁSQUEZ-REYES *et al.*, 2021). Podem ser divididos em dois principais subgrupos, os flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides compreendem antocianinas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas, enquanto que os não flavonoides dizem respeito aos ácidos fenólicos (que compreendem os ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), cumarinas, taninos, ligninas, estilbenos, chalconas e xantonas (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; VÁSQUEZ-REYES *et al.*, 2021).

São sintetizados pelas plantas em resposta a condições de stress como exposição UV, infecções, ataques de animais, dentre outros. Além disso, são compostos importantes para o crescimento e reprodução das espécies vegetais (PEREIRA *et al.*, 2018). O teor desses compostos nas plantas pode variar de acordo com fatores como qualidade do solo, irrigação, modo de produção e estagio de maturação (THAKUR *et al.*, 2020).

A síntese desse grupo de substâncias ocorre pelas rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico (TAIZ; ZEIGER, 2009) e, nas espécies vegetais, os compostos fenólicos estão geralmente em sua forma glicosilada, ou seja, ligados a uma ou mais moléculas de carboidrato, as quais podem ser liberadas durante o processo de digestão, melhorando a bioacessibilidade do composto fenólico (THAKUR *et al.*, 2020).

Atividades biológicas como antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa, antitumoral, anti-hipertensiva, antilipidemica, antiobesidade, neuro protetora e cardioprotetora são associadas à compostos

fenólicos (GIL-MARTÍN *et al.*, 2022). Dentre os compostos bioativos são o grupo com maior capacidade antioxidante, a qual é exercida pela neutralização de radicais livres com a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio (SULTANA *et al.*, 2023). Por apresentarem essa capacidade de proteger os sistemas biológicos contra os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, podem contribuir para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, dentre outras (MEHMOOD *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2018).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

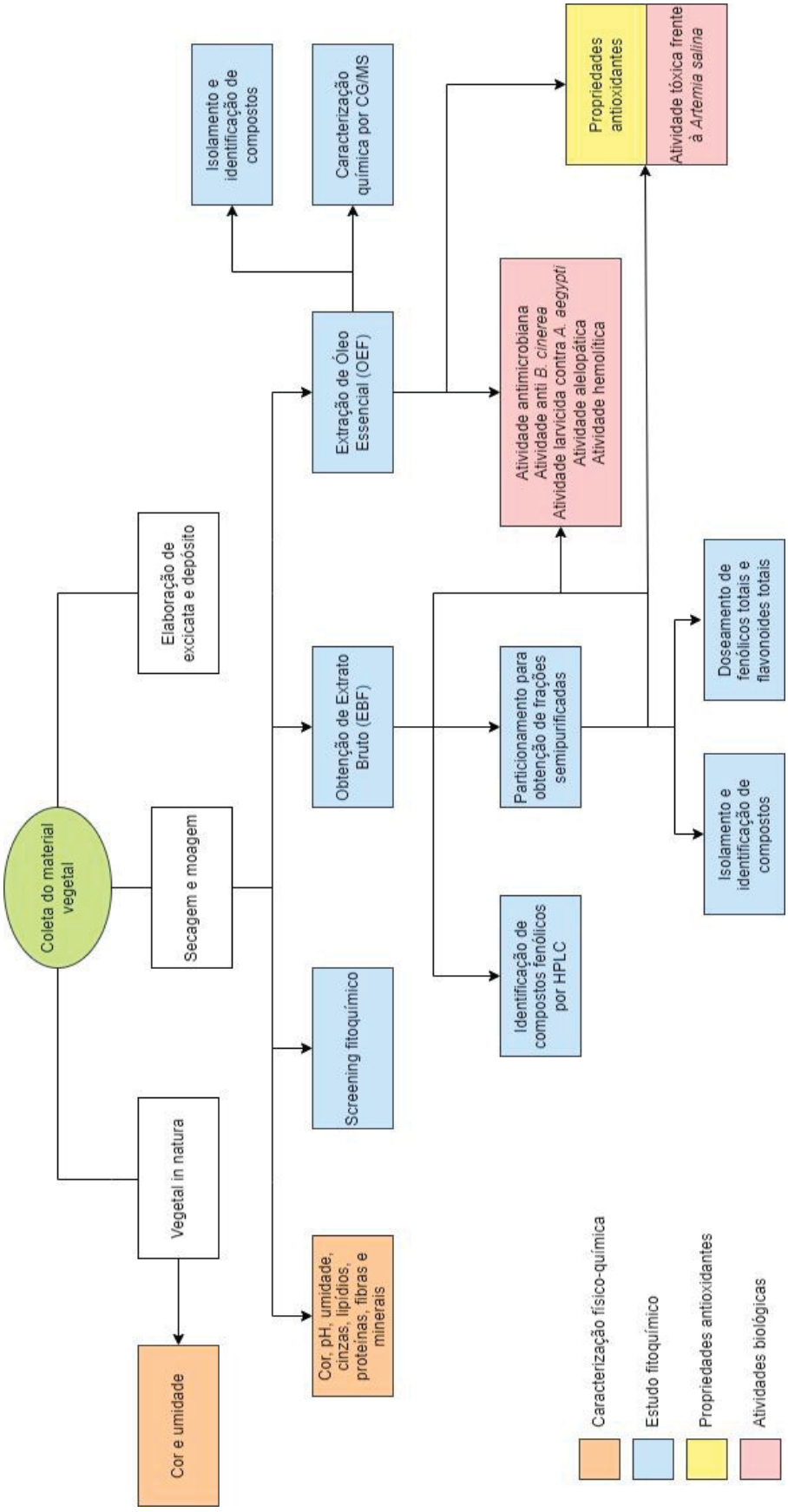
Trata-se de estudo experimental, no qual foram realizadas análises físico-químicas, fitoquímicas e de avaliação de propriedades antioxidantes e atividades biológicas de folhas de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil. *et al*) Hieron. ex Niederl, (FIGURA 5). A presente pesquisa está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A42FF90 (ANEXO 1).

## 3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em uma propriedade rural de Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil (25º19’13.2”S; 49º20’47.5”W). Duas exsicatas foram preparadas (FIGURA 6) e depositadas no Museu Botânico Municipal de Curitiba (Paraná, Brasil) sob número de registro MBM 415392 (ANEXO 2), que confirmou a identificação como *A. edulis*.

A primeira coleta foi realizada durante a primavera, no mês de novembro de 2018, e a segunda foi realizada durante o verão, em dezembro de 2018. As folhas de *A. edulis* coletadas foram acondicionadas em sacos vazados de polipropileno e mantidas à sombra e em temperatura ambiente (25º±2ºC) pelo período de 15 dias para secagem natural do material. Após o processo de secagem, o material vegetal foi moído em moinho de facas e martelos. A porção destinada a primeira extração do óleo essencial foi imediatamente congelada (-18ºC) e o restante foi mantido em sacos de polietileno em local seco, fresco e ao abrigo da luz.

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DA PESQUISA




FONTE: A autora (2023).

FIGURA 6 - PREPARO DE EXSICATAS DE *A. edulis*

FONTE: A autora (2023).

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, exceto a análise de cor, que foi conduzida no departamento de Engenharia de Alimentos, e a quantificação de minerais, conduzida no departamento de Química, ambos da Universidade Federal do Paraná. Para as análises de cor e umidade foi utilizada a planta *in natura* e o material vegetal seco e moído. Para as demais análises foi utilizado apenas o material vegetal seco e moído.

### 3.2.1 Análise de Cor

Os parâmetros do espaço de cores CIELAB - luminosidade (L*) e coordenadas cromáticas (a* e b*) - foram analisados em quintuplicata utilizando o colorímetro digital MiniScan XE Plus (HunterLab®, EUA). O parâmetro L* pode variar de 0 a 100, sendo 0 equivalente preto e 100 a branco, já os parâmetros a* e b* não apresentam valores máximos e mínimos. O parâmetro a* representa a coordenada do eixo verde-vermelho (-a*: verde; +a*: vermelho) e b* representa a coordenada do eixo azul-amarelo (-b*azul; +b*: amarelo). Os valores de a* e b* foram utilizados para

cálculo dos parâmetros de saturação ou *Chroma* (C) e ângulo matiz (hº) conforme as equações 1 e 2 (ARGYROPOULOS; MÜLLER, 2014).

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (1)$$

$$h° = 180 + \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (2)$$

### 3.2.2 Determinação Potenciométrica do pH

A análise do pH da amostra se deu por processo potenciométrico, conforme descrito da metodologia 5.2.19 da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). Aproximadamente 3g de folhas secas trituradas foram adicionadas a 100mL de água destilada, em triplicata, e o pH foi aferido em pH-metro (Analyser®, Brasil) previamente calibrado. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

### 3.2.3 Umidade

A determinação da umidade ou perda por dessecação foi conduzida por método gravimétrico, em triplicata, com 2 g de folhas previamente trituradas. Os pesa filtros com as amostras foram levados à secagem em estufa a 105 ± 5 °C até obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à planta *in natura* e ao material vegetal seco (BRASIL, 2019).

### 3.2.4 Cinzas Totais

Em triplicata, 2 g de amostra foram incinerados em mufla (Fornitec®, Brasil) a 550 ± 5 °C até a eliminação do carvão. Os cadinhos com amostra foram resfriados e pesados novamente para obtenção do teor de cinzas totais. O resultado foi expresso em porcentagem de cinzas totais em relação ao material vegetal seca (BRASIL, 2019).

### 3.2.5 Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl modificado. Para produção de sulfato de amônia, 0,5 g de amostra foram

levadas à digestão, sob aquecimento, com solução de ácido sulfúrico e catalisador. Em seguida, para a destilação por arraste a vapor e coleta da amônia liberada, solução de ácido bórico a 4% foi utilizada. Por fim, para identificação da quantidade de nitrogênio, a amostra foi titulada com ácido sulfúrico 0,02 N (fator de correção de 1,084) até viragem de coloração (de verde para cor de rosa). Foi utilizado o fator de conversão de 6,25 para estimar o teor de proteína na amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A análise se deu tem triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de proteínas em relação ao material vegetal seco.

### 3.2.6 Fibra Solúvel e Insolúvel

O conteúdo de fibra solúvel e insolúvel foi determinado, em triplicata, com 1g de amostra pelo método enzimático gravimétrico. O material foi submetido ao tratamento enzimático com α-amilase termorresistente, protease e amiloglucosidase (Sigma-Aldrich®) em condições de tempo, temperatura e pH ajustados para cada enzima. A solução obtida após o processamento enzimático foi filtrada em cadinhos de vidro com placa de vidro sinterizado e celite. O resíduo retido no cadinho foi lavado com água destilada e levado à secura em estufa (Quimis®, Brasil) à 105 °C por 12 horas para determinação de fibras insolúveis. Foi adicionado álcool etílico 95% (4 partes de álcool para 1 parte de solução) na solução filtrada e, após repouso de 24h, a solução foi filtrada em cadinhos de vidro com placa de vidro sinterizado e celite. O resíduo retido no cadinho foi lavado com álcool etílico 78%, álcool etílico 95% e acetona e, posteriormente, foi submetido à secagem em estufa (Quimis®, Brasil) a 105 °C por 12 horas para determinação de fibra solúvel. Após secagem dos resíduos, foi conduzida a determinação de proteína e cinzas para posterior cálculo do teor de fibras no vegetal (Equação 3 e 4). O mesmo processo ocorreu com frascos sem amostra para controle do experimento (branco).

$$\text{Fibra insolúvel} = [(RTi - Pi - Ci - BTi) \div m] \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Fibra solúvel} = [(RTs - Ps - Cs - BTs) \div m] \times 100 \quad (4)$$

Nota: RTi: resíduo da amostra insolúvel; Pi: teor de proteína no resíduo insolúvel; Ci: teor de cinzas no resíduo insolúvel; BTi: branco da amostra insolúvel; m: massa da tomada de amostra; RTs: resíduo da amostra solúvel; Ps: teor de proteína no resíduo solúvel; Cs: teor de cinzas no resíduo solúvel; BTs: branco da amostra solúvel

Os teores de fibra insolúvel e solúvel foram somados para estimativa do teor de fibra total e os resultados foram expressos em porcentagem de fibras em relação ao material vegetal seco (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 3.2.7 Lipídeos

Para análise do teor de lipídeos por extração direta em aparelho extrator de Soxhlet foram utilizados, em triplicata, 3 g de material vegetal e éter de petróleo como líquido extrator. A extração ocorreu por 12h, até a observação da limpidez do solvente. O éter de petróleo foi destilado, o resíduo extraído foi levado à estufa a 105 °C por 1 hora, resfriado em dessecador por 20 minutos e pesado em balança analítica. O resultado foi expresso em porcentagem de lipídios em relação ao vegetal seco.

### 3.2.8 Carboidratos

O teor de carboidratos foi estimado matematicamente pela diferença existente entre cem e a soma do teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibras obtidos para folhas secas de *A. edulis* (MULLER; TOBIN, 1980).

### 3.2.9 Valor energético

A estimativa do valor energético foi obtida pelo fator de conversão de *Atwater*, utilizando coeficientes específicos para proteína (4 kcal), carboidratos (4 kcal) e lipídios (9 kcal) e realizando a somatória do valor total (OSBORNE; VOOGT, 1978).

### 3.2.10 Minerais

O conteúdo de minerais das folhas de *A. edulis* foi obtido por espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES -*Inductively Coupled Plasma Optical Emisssion Spectrometry*). Foram avaliados 21 elementos, dentre eles elementos tóxicos como alumínio, cádmio e chumbo.

As amostras foram primeiramente submetidas ao processo de digestão (JIMÉNEZ-AGUILAR; GRUSAK, 2017). 70 mg de amostra foram levados ao banho de ultrassom com 6 mL de $NHO_3$ por 15 minutos e, na sequência, foram submetidas a aquecimento em chapa elétrica a 70 °C. Ainda sob a chapa de aquecimento, duas alíquotas de 1 mL de $H_2O_2$ 35% foram adicionadas, homogeneizadas delicadamente e mantidas sob aquecimento até cessar a liberação de bolhas. Após resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi diluída em água deionizada até atingir volume de 25 mL. A solução foi filtrada em filtro seringa de 0,45 µm e encaminhada para determinação instrumental. Foram preparadas sete soluções da prova em branco para a determinação dos parâmetros de desempenho do método de digestão. O branco consistiu em proceder todo o processo de digestão, com as mesmas concentrações de reagentes, mas sem adição de amostra.

Para determinação experimental foi empregado um espectrômetro de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) Thermo Scientific modelo ICAP 6500 com vista axial (Waltham, EUA). As condições experimentais foram as seguintes: fluxo de gás do plasma: 12,0 L/min; fluxo de gás auxiliar: 0,5 L/min; fluxo de gás de arraste: 0,7 L/min; radiofrequência de 40 MHz; potência de radiofrequência (RF) de 1,15 kW; tempo de estabilização de 10s; tocha de quartzo, vista axial. Considerando o procedimento simultâneo para determinação dos elementos, os comprimentos de onda variaram de 182,034nm a 766,490nm em linhas de emissão atômicas (I) e linhas de emissão iônicas (II): Ag 328,068 (I); Al 396,152 (I); B 249,773 (I); Ba 455,403 (II); Ca 422,673 (I); Cd 226,502 (II); Co 228,616 (II); Cr 283,563 (II); Cu 327,395 (I); Fe 238,204 (II); K 766,490 (I); Li 670,784 (I); Mg 280,270 (II); Mn 257,610 (II); Mo 281,6 ; Na 589,595 (I); Ni 231,604 (II); P 214,9; Pb 220,353 (II); S 182,034 (I); Zn 213,856 (I).

Para quantificação dos minerais, curvas analíticas foram construídas a partir de padrão multielementar preparado em concentrações entre 0,01 e 2,0 µg/L (APÊNDICE 1).

Os limites de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e os limites de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) foram obtidos considerando a intensidade do sinal de sete soluções sem a amostra (branco). O LOD foi calculado como 3 vezes a estimativa do desvio padrão de 7 medidas da prova em branco, divididos pelo coeficiente angular de cada curva analítica, e o LOQ, calculado como 10 vezes a estimativa do desvio padrão de 7 medidas da prova em branco divididos

pelo coeficiente angular de cada curva analítica. Os limites de detecção e quantificação encontram-se descritos na TABELA 1 e foram utilizados para análise dos resultados.

TABELA 1 - VALORES DE LOD E LOQ PARA MINERAIS ANALISADOS

| Elemento | LOD (mg/l) | LOQ (mg/l) |
|---|---|---|
| Al | 0,029 | 0,098 |
| Ag | 0,00042 | 0,00141 |
| B | 0,015 | 0,05 |
| Ba | 0,0053 | 0,01764 |
| Ca | 0,11 | 0,36 |
| Cd | 0,00021 | 0,0007 |
| Co | 0,00054 | 0,0018 |
| Cr | 0,005 | 0,017 |
| Cu | 0,0011 | 0,0035 |
| Fe | 0,051 | 0,17 |
| K | 0,023 | 0,075 |
| Li | 0,00012 | 0,0004 |
| Mg | 0,011 | 0,036 |
| Mn | 0,0007 | 0,0023 |
| Mo | 0,0035 | 0,012 |
| Na | 0,39 | 1,31 |
| Ni | 0,003 | 0,01 |
| P | 0,5 | 1,6 |
| Pb | 0,0033 | 0,011 |
| S | 0,036 | 0,12 |
| Zn | 0,036 | 0,12 |

FONTE: A autora (2023).

As análises foram conduzidas em duplicata e os resultados foram expressos como teor de minerais (mg) por grama de amostra seca.

## 3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Os ensaios de caracterização fitoquímica foram conduzidos nos laboratórios de Fitoquímica e Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, com exceção do doseamento de compostos fenólicos totais e flavonoides totais que foram conduzidos no laboratório de Pesquisa e Pós-graduação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná.

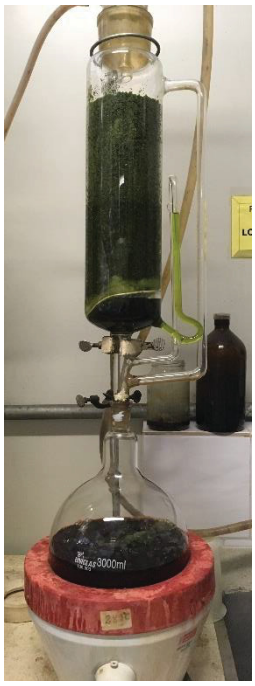
### 3.3.1 *Screening* Fitoquímico Preliminar

O *screening* fitoquímico preliminar foi realizado com a finalidade de verificar qualitativamente as principais classes de metabólitos secundários presentes em folhas de *A. edulis* por meio de reações de coloração e/ou precipitação. Por maceração, foi obtido extrato aquoso 20% (m/v) e extrato etanólico 20% (m/v), sendo esse último, fracionado com solventes de polaridade crescente. A busca dos grupamentos químicos foi realizada nas frações do extrato etanólico (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica) e no extrato aquoso, conforme descrito por Miguel (2003). Nas frações do extrato etanólico foi realizada a análise qualitativa para alcaloides, heterosídeos flavônicos, heterosídeos antociânicos, cumarinas, iridoides, esteroides, triterpenos e antraquinonas. No extrato aquoso, procedeu-se e busca por antocianinas, saponinas, taninos, ácidos fixos, ácidos voláteis, heterosídeos cianogênicos e amino grupo. Os resultados foram expressos como presença ou ausência das classes de metabólitos secundários analisados.

### 3.3.2 Obtenção de Extrato Bruto e Frações Semipurificadas

Para obtenção do extrato bruto de folhas de *A. edulis* (EBF), o material vegetal seco e triturado foi submetido à extração continuada em aparelho extrator de Soxhlet modificado (FIGURA 7), conforme descrito por Carvalho *et al.* (2009). Foram utilizados 293 g de material vegetal e empregou-se 2,5 L de etanol 80% como líquido extrator. A extração ocorreu até a observação da limpidez do solvente (cerca de 12 horas).

FIGURA 7 - OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*



FONTE: A autora (2023).

O extrato foi filtrado e, para determinação do teor de sólidos, 1mL de extrato bruto (correspondente a 0,12g de material vegetal seco) foi submetido a secagem em estufa a 105 °C ± 5 °C até obtenção de peso constante (BRASIL, 2019). A diferença entre o peso do pesa filtro contendo o extrato seco e o pesa filtro vazio forneceu o teor de sólidos em 1mL do extrato. O cálculo do rendimento do extrato em relação ao material vegetal foi realizado conforme a equação 5.

$$\text{Rendimento (\% p/p)} = \frac{\text{teor de sólidos (g) em 1 mL de EBF X 100}}{\text{massa do material vegetal seco (g) em 1 mL de EBF}} \qquad (5)$$

O extrato bruto foi concentrado até 410 mL e uma alíquota de 15 mL foi submetida a secagem em chapa de aquecimento a 40ºC para obtenção do extrato bruto seco, o qual foi reservado para realização dos bioensaios. Os 295 mL restantes foram utilizados para obtenção das frações semipurificadas por meio de sistema de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, sendo hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para este processo foi empregado o aparelho de Soxhlet modificado acoplado a condensador de bolas, balão e manta de aquecimento. Ao final, foram obtidas 4 frações semipurificadas: fração hexano das

folhas (FHF), fração clorofórmio das folhas (FCF), fração acetato de etila das folhas (FAEF) e fração remanescente das folhas (FRF), as quais foram concentradas em rotaevaporador e levadas à secura em chapa de aquecimento a 40ºC até evaporação do solvente. O peso das frações secas foi considerado para cálculo do rendimento das frações em relação à quantidade de extrato bruto seco utilizado para o particionamento (50,20 g).

### 3.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A fim de confirmar resultados obtidos no *screening* fitoquímico preliminar, as frações semipurificadas foram diluídas em metanol e depositadas em cromatoplacas de sílica para análise por cromatografia de camada delgada. Foram utilizados fases móveis e reveladores específicos para análise de esteroides e triterpenos, cumarinas, flavonoides e antraquinonas (QUADRO 3).

QUADRO 3 - CONDIÇÕES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

| **Classe de compostos** | **Fase móvel** | **Revelador** |
|---|---|---|
| Esteroides e triterpenos | Tolueno : Acetato de etila (93:7) | Vanilina sulfúrica 1% |
| Cumarinas | Tolueno : Acetato de etila (80:20) | Reativo de NEU e NaOH 1N |
| Flavonoides | Acetato de etila : Ácido fórmico : Ácido acético glacial : Água (100:11:11:26) | Reativo de NEU e Cloreto Férrico |
| Flavonoides | Acetato de etila : Acetona : Água (15:8:2) | Reativo de NEU |
| Flavonoides | Hexano : Acetato de etila : Ácido fórmico (6:6:0,3) | Reativo de NEU |
| Antraquinonas | Hexano : Acetato de etila : Ácido fórmico (6:6:0,3) | Dimetilamina |

FONTE: WAGNER; BLADT (1996).
Nota: Reativo de NEU - difenilboriloxietilamina 1% em metanol e polietilenoglicol 4000 5% em etanol.

Os resultados foram expressos de forma qualitativa, de acordo com o desenvolvimento de bandas coloridas após a aplicação dos reveladores.

### 3.3.4 Isolamento e Identificação de Compostos das Frações Semipurificadas

A cromatografia em coluna foi conduzida com as frações semipurificadas hexano e acetato de etila. Para montagem da coluna, sílica – gel 60; 0,063 – 0,200 mm (Merk®, Alemanha) suspensa em n-hexano foi adicionada na coluna cromatográfica. Sobre a sílica foi adicionada a pastilha a ser cromatografada

(FIGURA 8). A pastilha foi preparada com sílica gel 60 e as frações semipurificadas solubilizadas em metanol (3,6 g de fração hexano e 2,4 g de fração acetato de etila).

As fases móveis utilizadas nas colunas cromatográficas de cada fração encontram-se descritas no QUADRO 4.

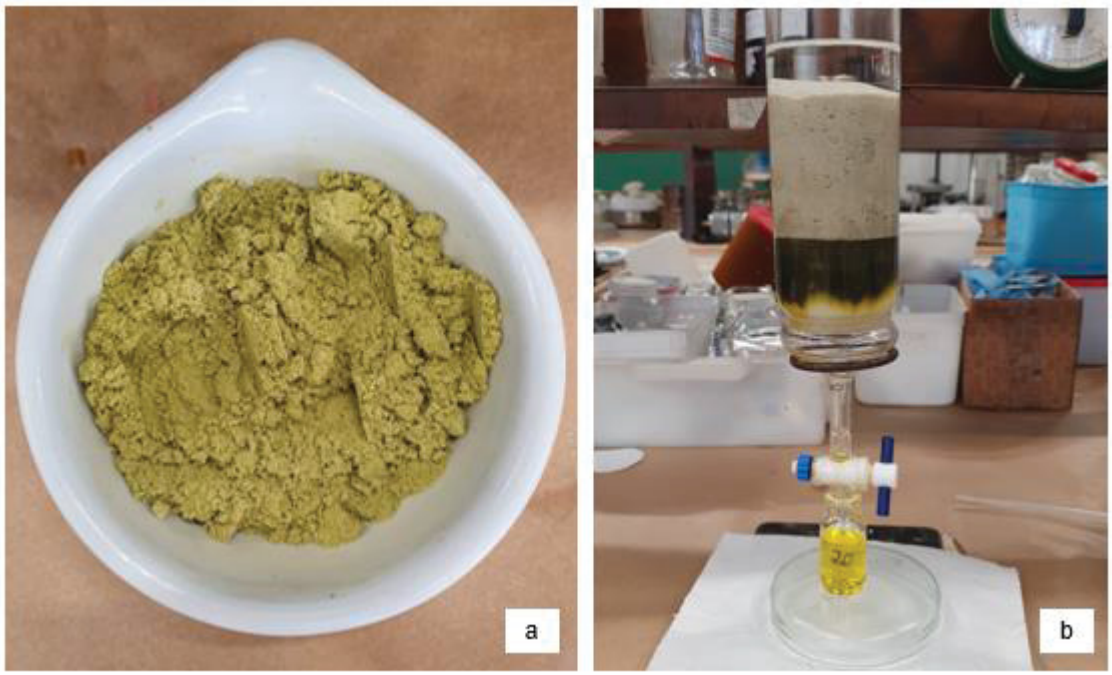
QUADRO 4 - FASES MÓVEIS UTILIZADAS NAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

| **Fração semipurificada** | **Fase móvel** |
|---|---|
| Fração hexano | Hexano : acetato de etila (gradiente de concentração de 5%, iniciando em 100% de hexano até atingir 100% de acetato de etila)<br>Acetato de etila : metanol (gradiente de concentração de 5%, até atingir 30% de metanol) |
| Fração acetato de etila | Hexano : acetato de etila (gradiente de concentração de 5%, iniciando em 30% de hexano até atingir 100% de acetato de etila)<br>Acetato de etila : metanol (gradiente de concentração de 5%, até atingir 100% de metanol)<br>Metanol : água (gradiente de concentração de 10%, até atingir 50% de água) |

FONTE: A autora (2023).

As amostras foram coletadas em frascos de vidro de 10 mL e armazenadas abertas em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente para visualização de precipitados.

FIGURA 8 - COLUNA CROMATOFRÁFICA DA FRAÇÃO HEXANO




FONTE: A autora (2023).
Nota: a – pastilha da fração hexano; b – coluna da fração hexano

Os precipitados foram purificados com éter de petróleo para remoção de pigmentos e solubilizados em clorofórmio deuterado. Para identificação da substância isolada, foi utilizado o espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker® (Bruker Biospin, Alemanha) modelo DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de $^{1}H$ e $^{13}C$ a 200,13 MHz e 50,62 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano – $(CH_3)4Si$) como referência em δ 0 ppm.

### 3.3.5 Extração e Caracterização Química de Óleo Essencial

Para extração de óleo essencial das folhas de *A. edulis* (OEF) foi utilizado o processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger (FIGURA 9) (BRASIL, 2019). A extração ocorreu em dois momentos, sendo a primeira conduzida logo após o processo de secagem das folhas, em dezembro de 2018, e a segunda após 12 meses de armazenamento das folhas a temperatura ambiente, em dezembro de 2019. Para a primeira extração, 361g do material vegetal seco e triturado foram destilados com cerca de 4 L de água destilada por 6h. Decorrido o tempo de extração e após 10 minutos de resfriamento, foi conduzida a leitura do volume do óleo essencial recolhido. O óleo extraído foi imediatamente congelado à -18 °C, protegido da luz, para análises posteriores. Para a segunda extração, foram mantidas as mesmas condições, empregando 874,5 g de material vegetal e 5,5 L de água destilada. O rendimento do óleo essencial foi calculado a partir da relação de mililitros de óleo essencial por 100g do material vegetal.

O óleo essencial proveniente da primeira extração foi utilizado para avaliação de todas as análises de atividades biológicas do presente trabalho.

A caracterização química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS), conforme descrito por Silva *et al.* (2019). A análise foi conduzida empregando-se o sistema CG/MS – QP 2010 Plus (Shimadzu®, China) equipado com detector de massas quadrupolar e coluna capilar Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), empegando-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,02 mL/min. A amostra (1 µL) foi injetada em modo *splitless* em uma temperatura inicial de forno de 60°C, com programa de temperatura de 60 a 250°C (3°C/min) e a temperatura do injetor e detector foi ajustada para 250°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons, com energia de

ionização de 70 eV e temperatura de 180 °C. Os componentes presentes no óleo essencial foram identificados por comparação entre os índices de retenção (IR) e os espectros de massa apresentados com dados espectrais da biblioteca Adams (ADAMS, 1995) e do banco de dados usando Wiley 275, NIST 21, NIST 107 (NIST, 1998). A quantidade relativa de cada componente do óleo foi expressa como porcentagem da área do pico em relação à área total dos picos no óleo.

FIGURA 9 - EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*

FONTE: A autora (2023).
Nota: a – extração de óleo essencial por hidrodestilação; b- volume de óleo essencial obtido

### 3.3.6 Isolamento e Identificação de Compostos do Óleo Essencial

Visando isolar compostos presentes no óleo essencial de *A. edulis* foi conduzida cromatografia em coluna. Para montagem da coluna, sílica – gel 60 0,063 – 0,200 mm (Merk®, Alemanha) previamente suspensa em éter de petróleo foi adicionada a coluna cromatográfica e, sobre ela, foi adicionada a pastilha a ser cromatografada. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 e 1,3 mL do óleo essencial. A fase móvel foi composta de éter de petróleo: acetato de etila com gradiente de concentração de 10%, iniciando em 100% de éter de petróleo até atingir 100% de acetato de etila. Por fim, a pastilha foi lavada com metanol, filtrada e

a fração metanólica da coluna foi coletada em frascos. Para identificação de frações obtidas com a coluna, foi empregado CG/MS, conforme descrito no item 3.3.5.

### 3.3.7 Doseamento de Compostos Fenólicos Totais (TPC)

O doseamento de compostos fenólicos totais foi determinado conforme a metodologia descrita originalmente por Singlenton e Rossi (1965) com adaptações para microplaca por Hornung *et al.* (2020). Foram adicionados, em placas de 96 poços, 240 µL de água destilada, 10 µL de amostra (1000 µg/mL) ou solução padrão e 15 µL do reagente de *Folin-Ciocalteau.* Após incubação por 3 minutos, foram adicionados 15 µL de solução de carbonato de sódio 20% ($Na_2CO_3$). A placa foi mantida por 60 minutos em repouso no escuro e a absorbância foi medida a 690nm (FIGURA 10). Como padrão foi utilizado ácido gálico (y=0,4251x-0,015; $R^2$=0,9973) (Apêndice 2). O experimento foi realizado em quadruplicata para extrato bruto e frações semipurificadas obtidos de folhas de *A. edulis* e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / g de extrato seco.

FIGURA 10 – METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

FONTE: A autora (2023).

### 3.3.8 Doseamento de Flavonoides Totais (TFC)

Os flavonoides totais foram doseados de acordo com a metodologia descrita originalmente por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) com adaptações para microplaca por Hornung *et al.* (2020). Em placas de 96 poços foram adicionados 10 µL de amostra (1000 µg/mL) ou solução padrão e 90 µL de nitrito de sódio 5% ($NaNO_2$) e, após 5 minutos, foram adicionados 10 µL de cloreto de alumínio a 10% ($AlCl_3$). Após 5 minutos, foram adicionados 90 µL de hidróxido de sódio 1 mol/L (NaOH) e a placa foi mantida por 60 minutos em repouso no escuro. A absorbância

foi medida a 540 nm (FIGURA 11). Como padrão foi utilizada catequina (y=2,1911x-0,0935; $R^2$=0,9974), conforme Apêndice 2. O experimento foi realizado em quadruplicata para extrato bruto e frações semipurificadas obtidos de folhas de *A. edulis* e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CE) / g de extrato seco.

FIGURA 11 – METODOLOGIA PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES TOTAIS

FONTE: A autora (2023).

### 3.3.9 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos

A identificação e quantificação de compostos fenólicos do extrato bruto foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O extrato bruto foi diluído em metanol 80% (v/v) e filtrado em filtro seringa de 0,22 µm (HV Millipore, DuraPore, Burlington, MA, USA). Foi utilizado um aparelho de HPLC (Pro Star, Varian®) equipado com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) (Pro Star, Varian®) (Millford, MA, USA) e coluna analítica C18 800 4,6 mm x 15 cm, 5 µm (TSKgel ODS-80Tm, TOSOH Bioscience, Japan). As condições de separação foram temperatura da coluna a 25 °C, vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi composta de ácido fórmico 0,1% em água (solução A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (solução B), sendo o gradiente de eluição transcorrido conforme o QUADRO 5.

QUADRO 5 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL

| Tempo (min) | Solução A | Solução B |
|---|---|---|
| 0 – 3,81 | 91% | 9% |
| 3,81 – 4,85 | 86% | 14% |
| 4,85 – 8,32 | 85% | 15% |
| 8,32 – 9,71 | 83% | 17% |
| 9,71 - 12,48 | 81% | 19% |
| 12,48 – 13,17 | 74% | 26% |
| 13,17 - 14,21 | 72% | 28% |
| 14,21 – 15,95 | 65% | 35% |
| 15,95 - 16,64 | 60% | 40% |
| 16,64 – 18,37 | 52% | 48% |
| 18,37 - 22,53 | 57% | 53% |
| 22,53 – 22,88 | 30% | 70% |
| 22,88 – 30 | 91% | 9% |

FONTE: A autora (2023).

Os compostos fenólicos foram detectados em comprimento de onda de 280 nm e 254 nm e a identificação foi feita por comparação do tempo de retenção e dos espectros com padrões de referência. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) do método foram: quercetina LOD: 0,026 µg/L; LOQ: 0,085 µg/L; ácido gálico LOD: 0,027 µg/L; LOQ: 0,086 µg/L; e ácido cafeico LOD: 0,006 µg/L; LOQ: 0,020 µg/L.

A quantificação foi feita com a equação da reta obtida com as curvas analíticas das substâncias padrão, quercetina, ácido gálico e ácido cafeico (Apêndice 3).

## 3.4 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As propriedades antioxidantes do extrato bruto, frações semipurificadas e óleo essencial foram determinadas por três métodos baseados na transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio (SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018). Os ensaios conduzidos foram redução do radical DPPH, redução do radical ABTS e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), realizados no laboratório da Pós-graduação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, em quadruplicata, e os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox/100g de extrato seco, fração semipurificada ou óleo essencial.

### 3.4.1 Redução do Radical DPPH

O método de redução de elétrons ou átomos de hidrogênio do radical estável de coloração roxa DPPH que se torna amarelo pálido na presença de moléculas antioxidantes foi descrito originalmente por Blois (1958) e modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A fim de reduzir o uso de solventes, foi realizada a análise em microplaca, conforme descrito por Hornung *et al*. (2020).

Foram adicionados nos poços da microplaca 190µL de solução de DPPH (0,12 mmol/L) e 10 µL de amostra (1000 µg/mL) ou solução padrão (Trolox – 0,00008 a 0,0016 mmol/L). Após 30 minutos de repouso no escuro, a absorbância foi medida a 517nm. Como padrão foi utilizado Trolox (y= -0,0025x + 0,0028; $R^2$=0,9923) (Apêndice 4).

### 3.4.2 Redução do Radical ABTS

O método de redução do radical $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), que apresenta coloração verde-azulada intensa e quando em contato com uma substância antioxidante de natureza hidrofílica ou lipofílica, reduz sua coloração, foi descrito originalmente por Re *et al.* (1999) e adaptado para microplaca por Hornung *et al.* (2020). Para condução do experimento, a solução de radical $ABTS^{\bullet+}$ foi previamente preparada com 5 mL da solução aquosa de ABTS e 88 µL de solução aquosa de persulfato de potássio. A solução foi mantida a temperatura ambiente por 16h e, decorrido esse período, foi diluída em água destilada até obtenção de absorbância de 0,70 ± 0,05 a 690 nm.

Para o ensaio, 300 µL de radical $ABTS^{\bullet+}$ e 10 µL de amostra (1000 µg/mL) ou solução padrão (Trolox – 0,00008 a 0,0016 mmol/L) foram adicionados nos poços e, após repouso no escuro por 30 minutos, a absorbância foi medida a 690 nm. Como padrão foi utilizado Trolox (y=-0,0017x + 0,0045; $R^2$=0,9915) (Apêndice 4).

### 3.4.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

O método de poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), descrito originalmente por Benzie e Strain (1996) e modificado para microplaca por Hornung *et al.* (2020), mede a redução do íon férrico ($Fe_3^+$) em ferroso ($Fe_2^+$) por moléculas

antioxidantes e a solução FRAP de coloração âmbar passa para coloração azul intensa quando em complexo com o 2,4,6- tripidil-s-tri-azine (TPTZ).

A solução de FRAP foi composta por 100 mL de tampão acetato 300mM pH 3,63 (1,87 g de acetato de sódio anidro, 16 mL de ácido acético glacial e água destilada até completar 1L), 10 mL de cloreto férrico 20 mM e 10 mL de solução de TPTZ 10 mM em HCL 40 mM.

Para o ensaio, 300 µL de solução de FRAP e 10 µL de amostra (1000 µg/mL) ou solução padrão (Trolox – 0,00008 a 0,0016 mmol/L) foram adicionados nos poços e, após repouso no escuro por 30 minutos, a absorbância foi medida a 570 nm. Como padrão foi utilizado Trolox (y= 0,0015x - 0,0001; $R^2$=0,9933) (Apêndice 4).

## 3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 3.5.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente à 4 cepas (3 bactérias e 1 fungo): *Escherichia coli* ATCC 8738, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os testes foram conduzidos no Laboratório de Controle de Qualidade II do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito por Veiga *et al.* (2019).

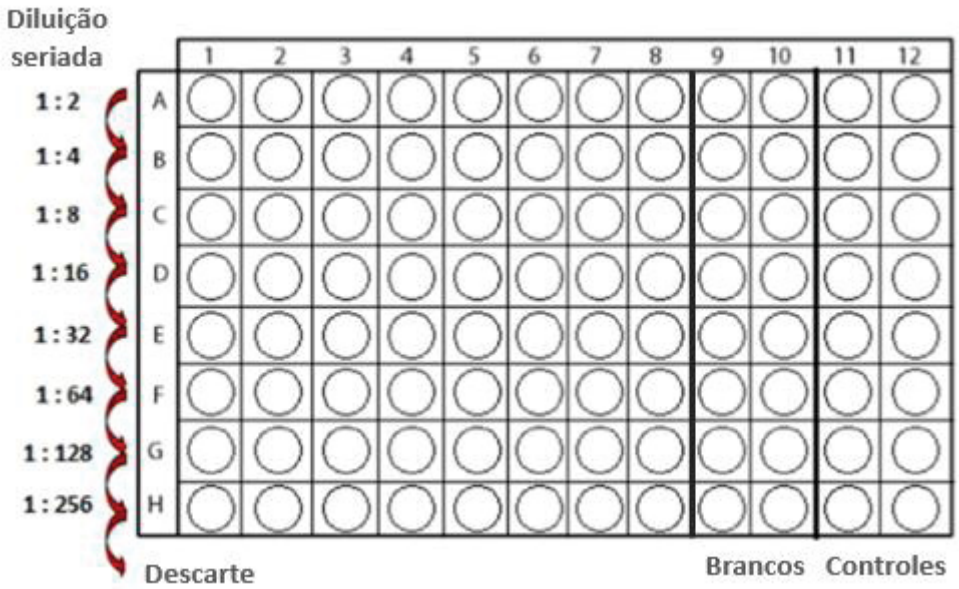
Inicialmente, o inóculo foi preparado utilizando solução salina (0,9%) e colônias crescidas em ágar sabouraud (*C. albicans*) e ágar triptona de soja (*E. coli, S. aureus e P. aeruginosa*) pelo período de 22h a 34 °C ±1 °C. A turbidez do inóculo foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland em densitômetro DEN-1 (Biosan®, Letônia).

As amostras de óleo essencial e extrato bruto de folhas de *A. edulis* foram preparadas em solução aquosa com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para o óleo essencial foram testadas as concentrações (v/v) de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µL/mL, e para o extrato bruto foram avaliadas as concentrações (m/v) de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 µg/mL. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado cloranfenicol 250 µg/mL (*E. coli, S. aureus e P. aeruginosa*) e

cetoconazol 500 µg/mL (*C. albicans*). Como controle negativo foi utilizada água destilada. Também foi conduzido um controle com DMSO 1%.

O ensaio foi conduzido em microplaca de 96 poços. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de caldo Mueller Hinton para bactérias ou caldo Sabouraud para fungo em todos os poços da placa. Na sequência, foram adicionados 100 µL da solução de maior concentração da amostra na primeira linha da microplaca e a diluição seriada foi conduzida transferindo 100 µL da solução da linha A para a linha B, depois para a linha C e assim sucessivamente (FIGURA 12). Após diluição e homogeneização da amostra no caldo, foram adicionados 10 µL de inóculo. Para o controle, foram adicionados 100 µL de caldo e 100 µL de substância controle (clorofenicol ou cetoconazol para controle positivo, água destilada para controle negativo e solução de DMSO 1% para controle DMSO) e 10 µL de inóculo.

FIGURA 12 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO SERIADA EM MICROPLACA




FONTE: Veiga (2019).

As placas foram incubadas a 35 °C ± 0,5 °C por 22 horas e, após esse período, foram adicionados 20 µL de solução de 2, 3, 5 – trifeniltetrazólio cloreto (TTC) a 0,125%, seguida por nova incubação a 35 °C ± 0,5 °C por 2 horas. Após o período de incubação foram conduzidas análises qualitativas por meio de leituras visuais visando avaliar a presença ou ausência de coloração vermelha. A presença da cor vermelha ocorre pela redução do TTC, referente a presença de células ativas

no poço, enquanto a ausência indicou inibição do crescimento do microrganismo testado. As placas contendo o inóculo preparado com *C. albicans* foram avaliadas novamente após 48h de incubação. Foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM) a concentração do último poço da coluna (A até H) em que não ocorreu crescimento microbiano.

### 3.5.2 Atividade Anti-*Botrytis cinerea*

A atividade anti - *Botrytis cinerea* do óleo essencial e do extrato bruto de *A. edulis* foi avaliada de acordo com ensaio de inibição de crescimento em caldo batata-dextrose descrito por Fehlbaum *et al.* (1994), com modificações realizadas por Fieira *et al*. (2013). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas II (LEMID II) do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

O isolado de *B. cinerea* foi obtido de uma propriedade de cultivo de morangos da variedade San Andreas, no município de São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. A coleta foi realizada em 7 de abril de 2017 e o seu isolamento em 10 de abril de 2017. O repique das culturas foi realizado periodicamente em placas com ágar batata dextrose, sendo o cultivo realizado a 25 °C por oito dias em estufa tipo BOD. Para preparo do inóculo, uma quantidade de esporos foi retirada da placa após crescimento e adicionados a 10 mL de caldo batata-dextrose. A solução foi submetida a agitação e posterior contagem de esporos na câmera de Neubauer. A concentração final do inóculo utilizada foi de $10^5$ esporos/mL.

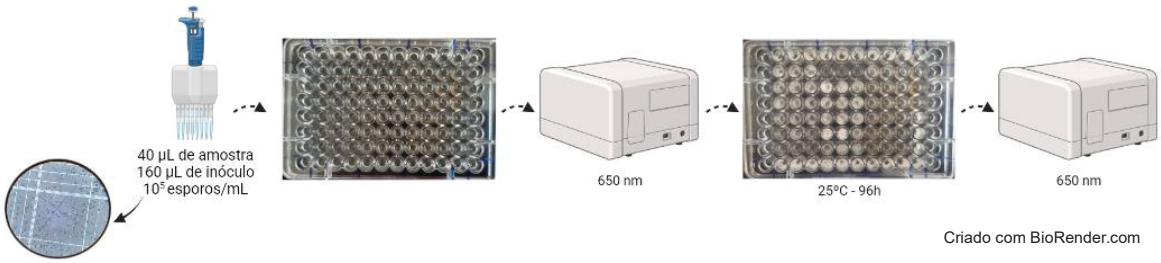
Foram testadas dezenove concentrações das amostras (1 µg/mL a 1200 µg/mL) em solução de água destilada e DMSO. O ensaio consistiu em adicionar a microplaca de 96 poços 40 µL de solução de amostra e 160 µL inóculo. Foi conduzida a leitura inicial da placa no tempo zero em espectrofotômetro BioTek (Vermont, EUA) modelo ELX 800 GIDX a 650 nm. As microplacas com *B. cinerea* foram incubadas a 25 °C por 96 h em estufa incubadora BOD e nova leitura foi conduzida após esse período (FIGURA 13). Como controle positivo foi empregado o fungicida Sumilex® que tem como princípio ativo a procimidona, nas mesmas concentrações das amostras. O controle negativo ou testemunha consistiu em poços contendo água e inóculo. O ensaio foi realizado em triplicata e a taxa de inibição do crescimento fúngico foi determinada pela equação 6.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(L_{f\ \text{controle-}} - L_{i\ \text{controle-}}) - (L_{f\ \text{amostra}} - L_{i\ \text{amostra}})}{(L_{f\ \text{controle-}} - L_{i\ \text{controle-}})} \times 100 \qquad (6)$$

Na qual, $L_f$: leitura final. $L_i$: leitura inicial

A taxa de inibição igual a 100%, foi considerada como inibição do crescimento fúngico, a partir da qual é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

FIGURA 13 – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Botrytis cinerea*




FONTE: A autora (2023).

Além do teste em microplacas de 96 poços, foi conduzida a avaliação da inibição do crescimento micelial *in vitro*, com 1 µL de amostra (extrato bruto e óleo essencial) nas concentrações de 50 e 100 ppm incorporados a 10 mL de meio batata-dextrose-ágar (Kasvi, Brasil) previamente autoclavado com 1% de Tween 80%. O meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm e, após cerca de 2 horas, um disco de micélio de cerca de 5 mm foi depositado no centro de cada placa. As placas foram incubadas a 25 °C por 72 h em estufa incubadora BOD e o crescimento micelial foi aferido com auxílio de um paquímetro. Como controle negativo ou testemunha, utilizou-se apenas o meio de cultura e o micélio e como controle positivo, foi aplicado no meio batata-dextrose-ágar o fungicida Sumilex® nas mesmas concentrações das amostras testadas. O teste foi conduzido em duplicata e a taxa de inibição do crescimento micelial foi determinada pela equação 7.

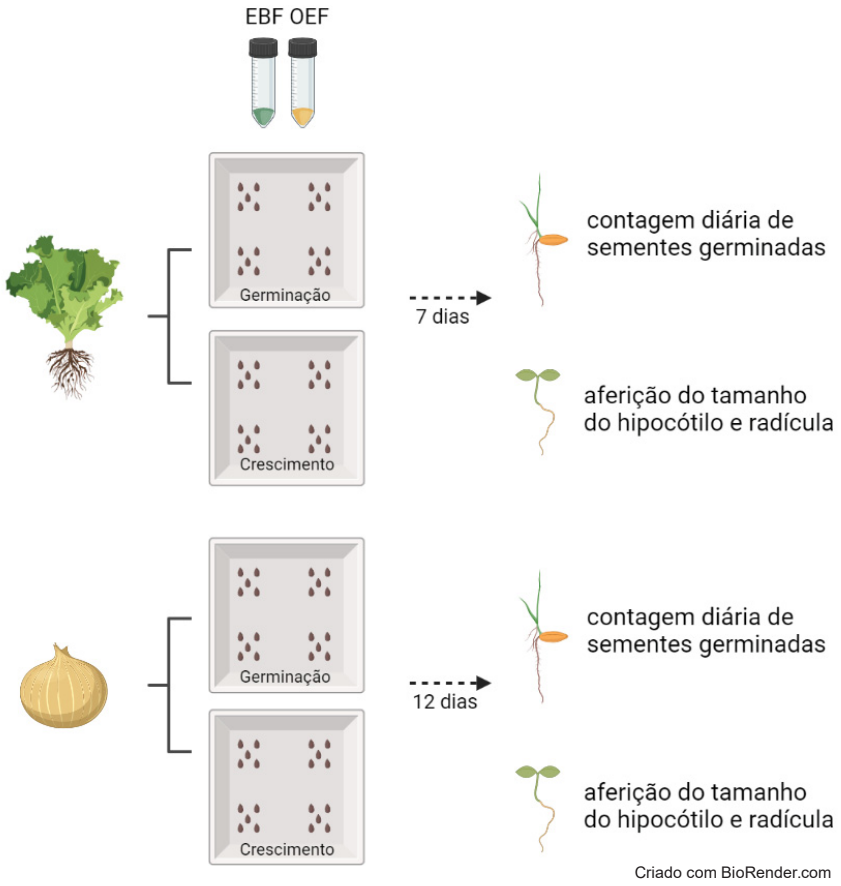
$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(L_{f\ \text{controle-}} - L_{i\ \text{controle-}}) - (L_{f\ \text{amostra}} - L_{i\ \text{amostra}})}{(L_{f\ \text{controle-}} - L_{i\ \text{controle-}})} \times 100 \qquad (7)$$

Na qual, $L_f$: leitura final. $L_i$: leitura inicial

### 3.5.3 Atividade Alelopática

A atividade alelopática do extrato bruto e óleo essencial de folhas de *A. edulis* foi avaliada segundo metodologia descrita por Dias *et al.* (2005) e Silva, Overbeck e Soares (2014), considerando a germinação e crescimento de sementes de alface (*Lactuca sativa*) variedade Babá de verão (Isla®) (dicotiledônea) e de cebola (*Allium cepa*) variedade Baia Periforme (Isla®) (monocotiledônea) (FIGURA 14). Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

FIGURA 14 – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA




FONTE: A autora (2023).

Para a avaliação da atividade do extrato bruto, foram preparadas soluções metanólicas do extrato nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. Para condução do ensaio, 2 papéis filtro de 11 cm² (Whatman® n°6) previamente autoclavados foram acomodados no fundo de caixas Gerbox (caixas de poliestireno cristal) previamente higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,9% v/v e

álcool 70% v/v. Na sequência, 6 mL da solução metanólica do extrato foi vertida em cada caixa. As caixas foram mantidas abertas em fluxo laminar até completa evaporação do solvente para então serem adicionados 6 mL de água destilada e 20 sementes de alface ou cebola, divididas em quatro quadrantes. As caixas foram fechadas e mantidas em condições monitoradas de umidade relativa e temperatura. Como controle negativo, utilizou-se água destilada e metanol previamente evaporado, nas mesmas condições das amostras.

Para avaliação da atividade do óleo essencial, a amostra foi solubilizada em Tween 80 na proporção de 1:1 (m/m) e diluída em água destilada para obtenção de soluções 1%, 0,1%, 0,001% e 0,001% de óleo essencial. Para condução do ensaio, 1 papel filtro de 11 cm² (Whatman® n°6) previamente autoclavado foi acomodado no fundo de caixas Gerbox (caixas de poliestireno cristal), sobre o qual foram vertidos 5mL de água destilada e depositadas 20 sementes de alface ou cebola divididas em 4 quadrantes. Outros 2 papéis filtro de 11 cm² (Whatman® n°6) previamente autoclavados foram colados à tampa da caixa Gerbox e, sobre esses, foi vertida a solução aquosa de óleo essencial nas diferentes concentrações. As caixas foram fechadas, vedadas com papel filme e mantidas em condições monitoradas de umidade relativa e temperatura (FIGURA 15). Como controle negativo, utilizou-se água destilada e solução aquosa de Tween 80 a 1%.

FIGURA 15 - DISPOSIÇÃO DAS CAIXAS GERBOX EM FLUXO LAMINAR PARA O ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

FONTE: A autora (2023).

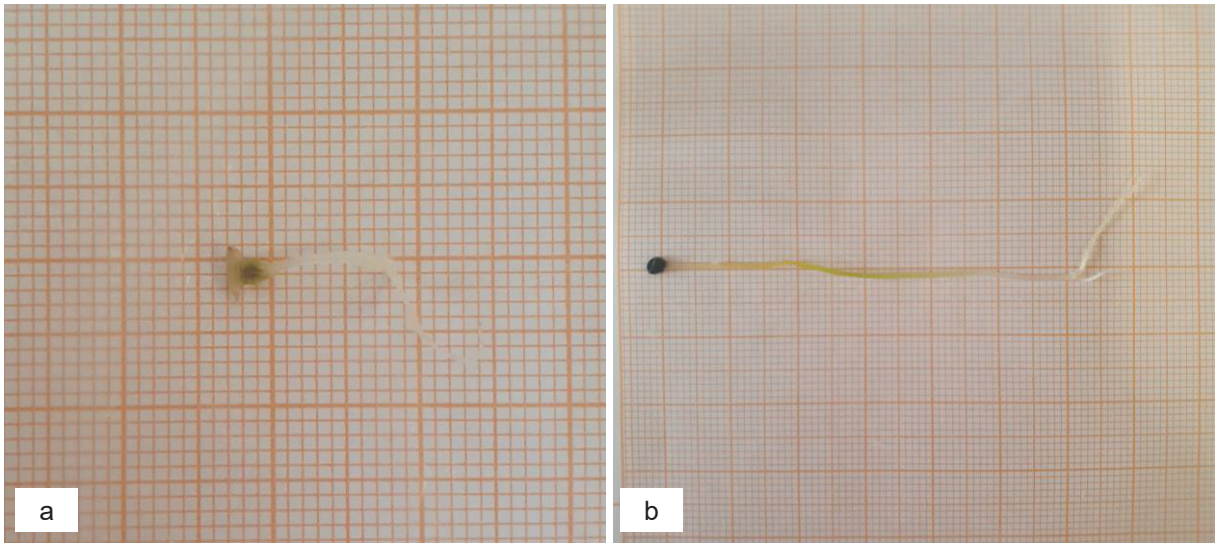
O ensaio foi conduzido com duas caixas Gerbox para cada concentração testada, sendo uma caixa destinada à avaliação da germinação das sementes e outra para avaliação do crescimento das plântulas. Durante 7 dias para o ensaio com alface (*Lactuca sativa*) variedade Babá de verão e durante 12 dias para o ensaio com cebola (*Allium cepa*) variedade Baia Periforme, as caixas destinadas ao teste de germinação foram avaliadas em fluxo laminar. As sementes germinadas foram retiradas e contabilizadas para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme equação 8 descrita por Maguire (1962). Foi conduzido o cálculo de IVG para cada quadrante e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

$$IVG = \Sigma (n_i/t_i) \quad (8)$$

Na qual, $n_i$ = número de sementes que germinaram no tempo i ($t_i$)
$t_i$ = tempo decorrido desde o início do teste

No sétimo dia de experimento com sementes de alface e no décimo segundo dia de experimento com sementes de cebola, as caixas destinadas à avaliação do crescimento foram analisadas e o comprimento do hipocótilo e radícula das plântulas foi medido com auxílio de papel milimetrado e pinça (FIGURA 16). Os resultados, em milímetros, foram expressos em média e desvio padrão.

FIGURA 16 - FORMA DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTULAS DE *L. sativa* e *A. cepa* NO ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA




Nota: a – plântula de *Lactuca sativa*; b – plântula de *Allium cepa*
FONTE: A autora (2023).

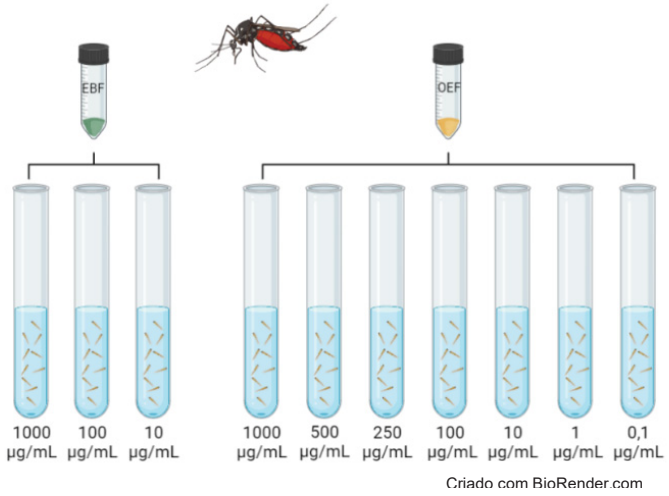
### 3.5.4 Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida do extrato bruto e óleo essencial de folhas de *A. edulis* foi avaliada por metodologia descrita originalmente pela Organização Mundial da Saúde (2005) e adaptada por Betim *et al.* (2019) e Betim *et al.* (2021).

Para o preparo das amostras, o óleo essencial foi diluído em solução aquosa de polissorbato 80 (Tween 80) a 0,5% para obtenção das concentrações 1000, 500, 250, 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL. O extrato bruto etanólico foi diluído em solução aquosa de DMSO a 0,9% para obtenção das concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL. Como controle negativo do experimento, foram utilizadas as soluções aquosas de polissorbato 80 (Tween 80) a 0,5% e de DMSO a 0,9%.

Para condução do ensaio, ovos de *A. aegypti* obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) foram adicionados em água declorada e mantidos em câmara BOD em temperatura (27 °C) e umidade (80%) controlados, com dieta a base de ração para peixes (Alcon Basic Mep200 Complex) até atingirem o estádio 3 de desenvolvimento larval. Ao atingirem esse estádio, dez larvas foram transferidas para frascos contendo as diferentes concentrações de óleo essencial e extrato bruto testadas, assim como os controles negativos. Após 24h a contagem de larvas vivas e mortas foi conduzida (FIGURA 17). O ensaio foi realizado em quadruplicata, totalizando 40 larvas para cada concentração testada. Os resultados foram expressos em percentual de mortalidade, concentração letal 50 ($CL_{50}$) e concentração letal 90 ($CL_{90}$).

FIGURA 17 – METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA *A. aegypti*




FONTE: A autora (2023).

### 3.5.5 Atividade Hemolítica *in vitro*

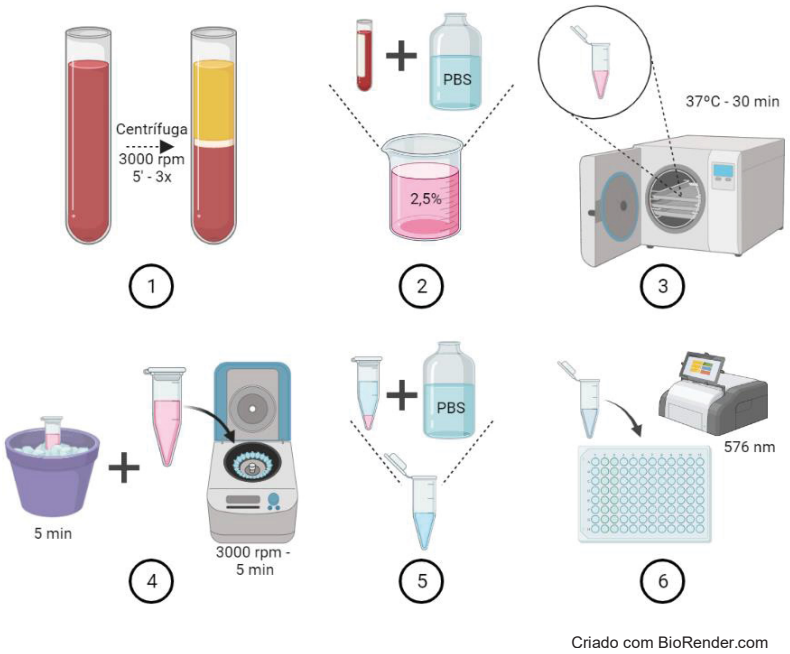
O teste de atividade hemolítica foi conduzido no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná conforme descrito por Aslam *et al.* (2011) com modificações, utilizando sangue de carneiro desfibrinado (Newprov®) como fonte de eritrócitos.

As amostras testadas (extrato bruto etanólico e óleo essencial), foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 ±0,1 (Laborclin®, Brasil) contendo 1% de metanol, com adição de 0,5% de DMSO para o óleo essencial. Foram testadas cinco concentrações de cada amostra (75, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL). Saponina e rutina foram utilizados como padrão fitoquímico, sendo preparadas nas mesmas condições e concentrações descritas para as amostras. Como controle positivo, utilizou-se solução de Triton 0,1% em água destilada e como controles negativos foram utilizados os solventes empregados na diluição das amostras (PBS, metanol e solução de DMSO 0,5% em PBS).

Para condução do ensaio, o sangue de carneiro foi centrifugado por 5 minutos a 3000rpm e o sobrenadante desprezado. O centrifugado foi lavado com tampão PBS e centrifugado por 2 vezes, até clarificação do sobrenadante, o qual foi desprezado. O sedimento de eritrócitos obtido foi suspenso a 2,5% (m/v) em PBS e mantido a 4 °C.

Uma alíquota de 20 µL da amostra, padrões e controles foi adicionada a 180 µL da suspensão de eritrócitos em PBS. A mistura foi mantida em estufa a 37°C por 30 minutos, resfriada na sequência em banho de gelo por 5 minutos e centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O mesmo procedimento foi conduzido para o branco do experimento, o qual consistiu na adição de 20 µL da amostra ou padrões a 180 µL de tampão PBS. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante após a centrifugação foi coletado e adicionado a 900 µL de tampão PBS. Na sequência, 200 µL dessa solução foi transferida para microplaca de 96 poços de fundo chato e a absorbância foi medida a 576 nm (FIGURA 18).

FIGURA 18 – METODOLODIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

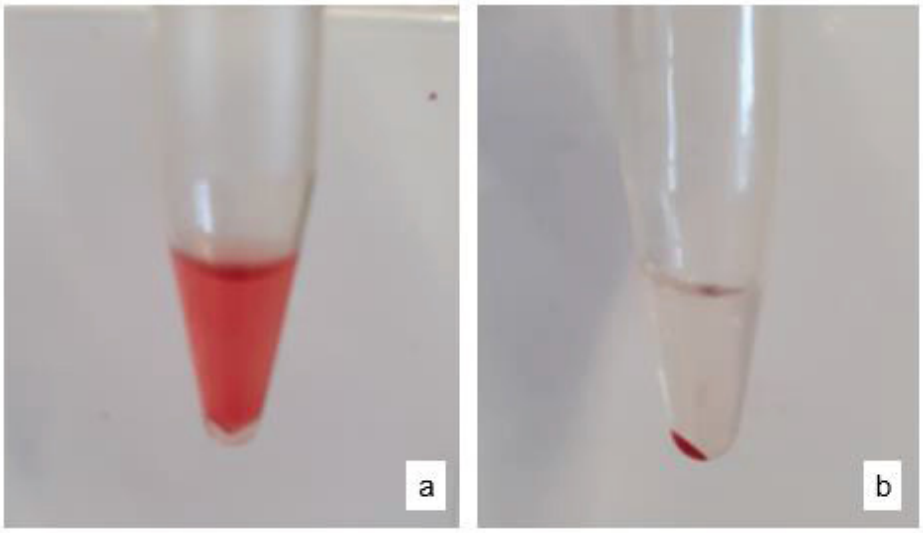



FONTE: A autora (2023).

Nota: 1 – centrifugação do sangue de carneiro; 2 – obtenção de solução de eritrócitos em PBS a 2,5%; 3 – incubação da solução; 4 – resfriamento da solução e centrifugação; 5 – obtenção de solução do sobrenadante em PBS; 6 – avaliação da absorbância.

Visualmente a hemólise pode ser detectada através da coloração vermelha do sobrenadante, conforme pode ser observado na FIGURA 19.

FIGURA 19 - ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA




FONTE: A autora (2023).

Nota: a – hemólise provocada pelo controle positivo Triton 0,1%; b – ausência de atividade hemolítica verificada com o padrão rutina

Para cálculo do percentual de hemólise provocado pela amostra ou padrões, foi utilizada a equação 9. Os controles negativos foram utilizados apenas para identificar se poderiam causar hemólise ou não.

$$\% \text{ de atividade hemolítica} = \frac{(\text{Absorbância}_{\text{amostra}} - \text{Absorbância}_{\text{branco}})}{\text{Absorbância}_{\text{triton}}} \times 100 \quad (9)$$

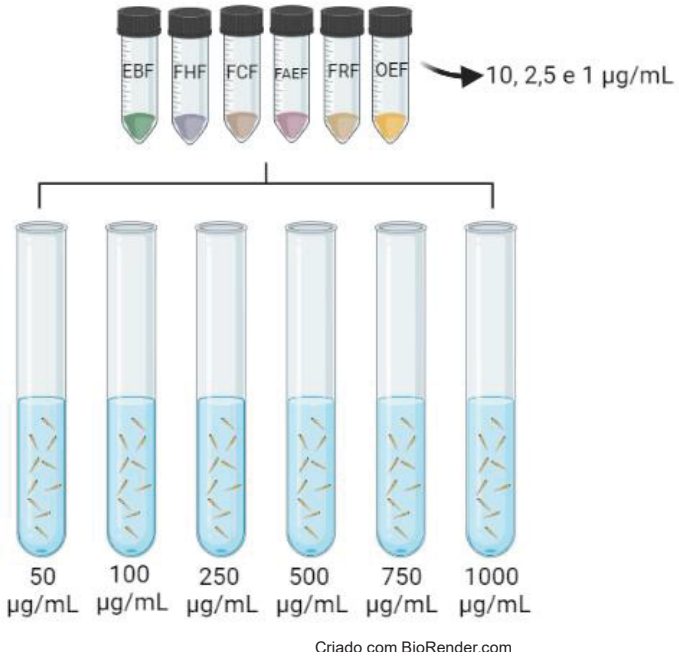
O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em média do percentual de atividade hemolítica e desvio padrão.

### 3.5.6 Atividade Tóxica em *Artemia salina*

A atividade tóxica de extratos, frações e óleo essencial foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina,* segundo metodologia descrita por Meyer *et al*. (1982) com adaptações. O ensaio foi realizado no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Inicialmente, o extrato bruto e as frações semipurificadas foram diluídos em metanol para elaboração de soluções em seis concentrações (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL). Os frascos contendo as amostras foram mantidos abertos em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. Para o ensaio com o óleo essencial, a diluição foi conduzida em solução salina com 2% de DMSO, não havendo necessidade de preparo prévio para evaporação do solvente. No ensaio com o óleo essencial, foram utilizadas as mesmas concentrações que no ensaio conduzido com extrato bruto e frações, acrescido das concentrações de 10 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1 µg/mL (FIGURA 20).

FIGURA 20 – METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA FRENTE A *Artemia salina* Lech.




FONTE: A autora (2023).

Com objetivo de eclosão dos cistos de *Artemia salina*, uma solução salina pH 8,0 foi preparada com sal marinho Instant Ocean Sea Salt e água destilada na concentração de 35 g/L. Os cistos foram mantidos na solução pelo período de 48h, sob agitação lenta, aeração e aquecimento por lâmpada de 40 W. Após eclosão, os náuplios foram atraídos para a extremidade do recipiente com uma fonte de luz e coletados com auxílio de pipeta de plástico. Dez cistos foram adicionados a cada frasco contendo amostra e o volume foi completado para 5 mL com solução salina. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por 24h e a contagem de náuplios vivos e mortos (náuplios sem movimentação) foi realizada após esse período. Como controle positivo utilizou-se o sulfato de quinidina e como controle negativo, solução salina. O ensaio foi conduzido em triplicata, totalizando 30 náuplios para cada concentração testada.

Os resultados foram expressos em percentual de mortalidade, concentração letal 50 ($CL_{50}$) e concentração letal 90 ($CL_{90}$). Segundo Meyer *et al.* (1982), o extrato pode ser considerado tóxico quando os valores de $CL_{50}$ forem inferiores a 1000 µg/mL.

## 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de cor das folhas *in natura* e do material vegetal seco foram realizadas em triplicata e os resultados das foram expressos em média e desvio padrão. Foi utilizado o teste F para análise de homogeneidade das amostras, com posterior aplicação do teste t-Student para amostras paramétricas e Mann-Whitney para não paramétricas, com nível de significância de 0,05 por meio do programa estatístico Action Stat® versão 2.8.29.357.515 (São Paulo, Brasil).

Para as análises de doseamento de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, propriedade antioxidante e atividade hemolítica, foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras e o teste de Tukey para comparação múltipla entre médias ($p \leq 0,05$) por meio do programa estatístico Sisvar® versão 5.6 (Minas Gerais, Brasil). A fim de verificar a correlação entre os resultados obtidos com a avaliação da propriedade antioxidante e o doseamento de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, foi conduzida a matriz de correlação de Pearson com nível de significância de 0,05 pelo software Action Stat® versão 2.8.29.357.515 (São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em valores numéricos variando de -1 a +1, sendo a relação linear entre os dois conjuntos de dados expressa por valores positivos.

No ensaio de atividade alelopática, os resultados obtidos para o extrato bruto e óleo essencial foram expressos em média e desvio padrão e analisados usando análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Scott-Knott com nível de significância de 0,05, por meio do programa estatístico Sisvar® versão 5.6 (Minas Gerais, Brasil).

Nos ensaios de atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* e atividade tóxica em *Artemia salina*, a concentração letal 50 ($CL_{50}$) e a concentração letal 90 ($CL_{90}$) foram obtidas utilizando o método Probitos no software IBM SPSS Statistics versão 22.0 (Armonk, NY, USA).

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A cor é uma característica visual de produtos naturais importante para o controle de qualidade. O valor negativo de a* encontrado (TABELA 2) está relacionado a coloração verde, característica das folhas pela presença de clorofila. Verifica-se que o processo de secagem diminuiu a tendencia ao verde, representado pelo aumento do valor de a*. O processamento do material vegetal pode alterar a saturação do verde por promover a degradação da clorofila e sua conversão a feofitina, que possui coloração mais amarronzada (STREIT *et al.*, 2005). O aumento dos valores de a* também foi observado durante o processo de secagem de folhas de *Melissa officinalis L.* (ARGYROPOULOS; MÜLLER, 2014) e *Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen (THERDTHAI; ZHOU, 2009). De acordo com as coordenadas de cor obtidas para o vegetal verifica-se que o processo de secagem também alterou os parâmetros de L* e hº. Os valores de L* indicam luminosidade escura, já que são valores que estão mais próximos de 0 (preto) do que de 100 (branco), o valor de h° próximo de 180º demonstra que o verde é a cor mais familiar para a amostra. Não foi observada diferença estatística nos parâmetros de b* e C* com o processo de secagem. Valores positivos de b* indicam a presença de coloração amarela e valores de C* próximo a 22 indicam opacidade, tanto nas folhas frescas quanto nas secas (GASPARIN *et al.*, 2014).

TABELA 2 - PARÂMETROS PARA ANÁLISE DE COR DE FOLHAS DE *A. edulis*

| **Amostra** | **a*** | **b*** | **L*** | **hº** | **C*** |
|---|---|---|---|---|---|
| Folhas *in natura* | -6,28 (±0,16) | 21,54 (±1,24) | 32,92 (±1,21) | 178,49 (±0,01) | 22,07 (±1,23) |
| Folhas secas | -1,32 (±0,32) | 22,03 (±0,23) | 37,84 (±0,62) | 178,72 (±0,01) | 22,15 (±0,15) |
| *p* valor homogeneidade | 0,230 | 0,006 | 0,223 | 0,635 | 0,005 |
| *p* valor variância | ≤0,05 | 0,15 | ≤0,05 | ≤0,05 | 0,22 |

FONTE: A autora (2023).
Nota: Teste F para avaliação da homogeneidade da amostra. Teste t-Student para amostras paramétricas independentes (p homogeneidade ≥ 0,05) e teste Mann-Whitney para amostras não paramétricas independentes (p homogeneidade ≤ 0,05) - diferenças entre médias do grupo de folhas *in natura* vs folhas secas.

O pH do material vegetal foi avaliado, resultando em 5,68 (±0,04). Não foram encontrados dados de pH de folhas de *A. edulis* na literatura e, por isso, esse

resultado torna-se importante, uma vez que o pH pode ser um parâmetro empregado no controle de qualidade de drogas vegetais em conjunto com o teor de cinzas e de umidade. A alteração do pH pode ser indicativa de deterioração do produto ou contaminação microbiana (ROMEU *et al.*, 2022).

Os estudos destinados a conhecer a composição nutricional de folhas de *A. edulis* são inexistentes, sendo a avaliação do teor de proteína, lipídios, fibras e carboidratos limitadas aos frutos (KINUPP; BARROS, 2008; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FOLHAS DE *A. edulis*

| **Determinações** | **Folhas secas M (± DP)** |
|---|---|
| Umidade (%) | 11,26 (± 0,08) |
| Cinzas (g/100g) | 4,92 (± 0,08) |
| Proteína (g/100g) | 18,42 (± 0,05) |
| Lipídeos (g/100g) | 2,63 (± 0,16) |
| Carboidratos (g/100g) | 9,74 (± 0,34) |
| Fibra insolúvel (g/100g) | 52,37 (± 0,48) |
| Fibra solúvel (g/100g) | 0,67 (± 0,06) |
| Fibra total (g/100g) | 52,59 (± 0,86) |
| Valor energético total (kcal) | 136,26 (± 1,44) |

FONTE: A autora (2023).

Folhas *in natura* de *A. edulis* apresentaram 68,70% (±0,04) de umidade, enquanto folhas secas, 11,26% (±0,08) (TABELA 3). Umidade e cinzas são parâmetros importantes para o controle de qualidade de drogas vegetais e podem ser dados importantes para autenticação de espécies (BALEKUNDRI; MANNUR, 2020; BRASIL, 2019). Além disso, o baixo teor de umidade em drogas vegetais é fundamental para minimizar a ação de enzimas e de microrganismos que possam deteriorar o material (BORGES *et al.*, 2005). Sendo assim, a secagem das folhas de *A. edulis* foi efetiva na redução do percentual de umidade para 11,26%.

Embora a fração comestível da espécie *A. edulis* sejam os frutos, as folhas apresentaram maior conteúdo de proteínas e fibras do que relatado anteriormente para frutos inteiros (12% de proteína e 18% de fibras totais) (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005). O teor proteico também foi superior ao encontrado em folhas de outra espécie do gênero *Allophylus*, o *Allophylus abyssinicus* cultivado na Etiópia (10 a 14%) (ALI; GURMESSA; MEKONNIN, 2020). Condições de cultivo

como solo e fatores climáticos e a idade da planta podem influenciar a composição nutricional de vegetais (RIBEIRO *et al.*, 2019).

No presente estudo, as fibras insolúveis representaram 98% das fibras totais presentes nas folhas de *A. edulis*. Celulose, hemicelulose e lignina são exemplos de fibras insolúveis presentes na parede celular dos vegetais e que podem ser responsáveis pelo elevado teor de fibras insolúveis nas folhas (MENEZES; GIUNTINI, 2013). O elevado teor de fibras encontrado no presente trabalho pode influenciar negativamente na biodisponibilidade de nutrientes como vitaminas, minerais, gorduras e proteínas (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). Por outro lado, compostos bioativos de interesse à saúde como taninos, carotenoides e fitosteróis podem estar associados à fibra alimentar (MENEZES; GIUNTINI, 2013).

O teor de proteínas e fibras encontrado poderia apontar para o potencial alimentício das folhas de *A. edulis*, sobretudo na forma de farinha para enriquecimento de preparações. Entretanto, mais estudos em relação a toxicidade precisam ser conduzidos para o consumo seguro.

O teor de minerais em folhas de *A. edulis* é apresentado na TABELA 4. Dos 21 elementos analisados, 8 ficaram abaixo do limite de detecção do método, sendo eles, prata (Ag), boro (B), cadmio (Cd), cobalto (Co), lítio (Li), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e chumbo (Pb).

TABELA 4 - TEOR DE MINERAIS E METAIS TÓXICOSEM FOLHAS DE *A. edulis*

| **Mineral** | **Folhas secas (mg/g)** |
|---|---|
| Cálcio | 6,87 ± 0,25 |
| Potássio | 5,52 ± 0,18 |
| Fósforo | 3,78 ±0,04 |
| Enxofre | 2,68 ±0,06 |
| Magnésio | 2,35 ± 0,04 |
| Sódio | 0,63 ± 0,01 |
| Ferro | 0,072 ± 0,012 |
| Alumínio | 0,053 ± 0,017 |
| Zinco | 0,019 ± 0,005 |
| Manganês | 0,014 ± 0,0003 |
| Bário | 0,004 ± 0,0002 |
| Cobre | 0,004 ± 0,0002 |
| Cromo | 0,003 ± 0,0002 |

FONTE: A autora (2023).

Cálcio, potássio e fósforo foram os minerais predominantes em folhas de *A. edulis*, corroborando com resultados obtidos em frutos de *A. edulis* cultivados no Rio

Grande do Sul (KINUPP; BARROS, 2008). Esses minerais desempenham funções regulatórias importantes no organismo humano. O cálcio é componente essencial dos ossos e dentes, está envolvido na contração muscular e na transmissão neural. O potássio é o principal cátion intracelular, sendo importante para o balanço hidroeletrolítico. O fósforo e o magnésio, atuam em conjunto com o cálcio na saúde óssea e o enxofre é componente de vários aminoácidos, sendo considerado um elemento essencial (OTTEN; HELLWIG; LINDA, 2006). Além disso, zinco, cobre, ferro e manganês, que também foram quantificados em folhas de *A. edulis* são minerais relacionados à capacidade antioxidante (NIRMALA *et al.*, 2018).

Dentre as formas de se obter os minerais presentes em folhas de *A. edulis* evidencia-se a infusão das folhas ou confecção de tererê em conjunto com a erva mate. Estudo realizado por Olivari *et al.* (2020) demonstrou que o percentual de extração de minerais de erva mate em água quente variou de 1,3% a 13,5% e em água fria de 1,1% a 12,2%. Considerando tais percentuais de extração como referência, pode-se sugerir que o consumo de infusão com 20 g de folhas secas de *A. edulis* oferta 2,61 mg de cálcio (1,9% de extração), 10,37 mg de potássio (9,4% de extração) e 3,34 mg de magnésio (7,1% de extração).

No presente estudo foi avaliada a presença de elementos como alumínio, cádmio e chumbo que são considerados elementos tóxicos, pois, mesmo em pequenas quantidades, podem provocar efeitos indesejáveis à saúde humana. Além disso, não desempenham nenhuma função essencial no organismo humano. Esses elementos não são encontrados de maneira uniforme nas plantas, havendo grande variação dependendo do local onde são cultivados e da espécie vegetal (MAIHARA; FAVARO; BARBOSA JÚNIOR, 2012). Para o uso seguro das plantas, esses elementos devem estar ausentes ou em quantidades abaixo do limite superior tolerado. Verifica-se na TABELA 4 que apenas o alumínio foi detectado em folhas de *A. edulis*. O consumo diário de infusão preparada com 20 g de folhas secas representaria 0,371 mg de alumínio por semana (5,0% de extração) (OLIVARI *et al*., 2020), correspondendo a 0,62% do limite máximo de alumínio a ser ingerido por um indivíduo de 60kg (1mg / kg de peso corporal / semana) (EFSA, 2011). Dessa forma, pode-se dizer que os níveis são baixos e não representam risco à saúde humana.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

### 4.2.1 *Screening* Fitoquímico Preliminar

Os resultados positivos do screening fitoquímico em folhas de *A. edulis* são apresentados na TABELA 5. Apesar de positivas, as reações apresentaram-se fracas para cumarinas e antraquinonas. Já para alcaloides, saponinas, ácidos voláteis e heterosídeos cianogênicos, as reações de precipitação e/ ou coloração foram negativas.

TABELA 5 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS PELO SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR EM FOLHAS DE *A. edulis*

| **Extratos** | **Extrato Etanólico** | | | | **Extrato Aquoso** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **FHF** | **FCF** | **FAEF** | **FRF** | |
| Classes de metabólitos secundários | Iridoides<br>Esteróides triterpenos | Iridoides<br>Esteróides triterpenos<br>Cumarinas<br>Heterosídeos flavônicos | Cumarinas<br>Heterosídeos antociânicos<br>Antraquinonas | Heterosídeos flavônicos | Antocianinas<br>Taninos<br>Ácidos fixos<br>Aminogrupo |

FONTE: A autora (2023).
Nota: fração hexano (FHF), fração clorofórmio (FCF), fração acetato de etila (FAEF), fração remanescente (FRF)

Com o desenvolvimento de coloração verde escura no teste de floroglucinol e ácido clorídrico, verificou-se reação positiva para iridoides nas frações hexano e clorofórmio. Até onde se tem conhecimento, é a primeira vez que a presença de iridoides é descrita em folhas de *A. edulis*.

A reação positiva de heterosídeos flavônicos nas frações clorofórmio e remanescente foi avaliada pelo desenvolvimento de coloração variando de amarelo a vermelho no teste com limalha de magnésio, a qual pode ser indicativa da presença de flavonas. Quando conduzida a reação de Taubock, não foi identificado mudança de coloração, reforçando que as flavonas são o subgrupo dos flavonoides que podem estar presentes na amostra avaliada. Flavonas como apigenina e luteolina já foram isoladas de folhas e raízes de outra espécie do gênero Allophylus, o *A. africanus* (FERRERES *et al.*, 2018) e autores salientam que as flavonas

desempenham papel importante na proteção contra o excesso de incidência dos raios UV-B nas folhas dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Na análise qualitativa da presença de esteroides e triterpenos, foi observada coloração verde nas frações hexano e clorofórmio, fato que indica a presença de hidroxila e dupla ligação na molécula. A reação de coloração foi mais intensa na fração hexano, quando comparado à fração clorofórmio.

A presença de flavonoides, esteroides, triterpenoides, naftoquinonas, antraquinonas e leucoantocianidinas já foi reportada na literatura para folhas *A. edulis* (YAJÍA *et al.*, 1999). Esteroides e triterpenos, flavonoides e taninos foram previamente descritos em prospecção fitoquímica realizada em outra espécie do gênero *Allophylus*, o *A. africanus*. Além desses grupamentos, a espécie *A. africanus* apresentou resultado positivo para alcaloides, fenóis e quinonas (KAMUNGU *et al.*, 2015).

### 4.2.2 Obtenção de Extrato Bruto e Frações Semipurificadas

Foram obtidos 2.370 mL de extrato bruto da folha (EBF) com teor de sólidos de 0,026g ± 0,001g por mililitro de extrato bruto, o que representa um rendimento de 20,97 ± 0,85% p/p. O rendimento do EBF foi superior ao já relatado na literatura por Castillo *et al.* (2009) em extrato bruto obtido por Soxhlet de folhas de *A. edulis* cultivadas no Uruguai (10,3%). O extrato bruto foi obtido por extração continuada em aparelho de Soxhlet modificado e a escolha desse método se justifica pelo fato do mesmo permitir o esgotamento de compostos extraíveis do material vegetal com estabilidade térmica (CARVALHO e*t al.*, 2009). Além disso, o tempo e a quantidade de solventes empregues na extração via Soxhlet costumam ser menores que em outras técnicas tradicionais de extração (GIL-MARTÍN *et al.*, 2022).

O rendimento das frações semipurificadas de folhas de A*. edulis* variaram de 7 a 71% em relação ao extrato bruto (TABELA 6).

TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*

| Amostra | Massa (g) | Rendimento (%) |
|---|---|---|
| EBF | 50,20 | - |
| FHF | 3,76 | 7,49 |
| FCF | 5,93 | 11,81 |
| FAEF | 3,58 | 7,13 |
| FRF | 35,65 | 71,01 |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto folha (EBF); fração hexano (FHF), fração clorofórmio (FCF), fração acetato de etila (FAEF), fração remanescente (FRF)

### 4.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Considerando que a cromatografia em camada delgada é um método rápido e de baixo custo (FERNANDES; SALGADO, 2016), foi possível realizar uma varredura de alguns grupamentos químicos presentes nas frações semipurificadas (TABELA 7).

TABELA 7 – PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS EM FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS DE FOLHA DE *A. edulis*

| Grupamento químico | Fase móvel | Frações | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | FHF | FCF | FAEF | FRF |
| Esteroides e triterpenos | Tolueno:Acetato de etila (97:3) | + | - | - | - |
| Cumarinas | Tolueno:Acetato de etila (80:20) | - | + | + | - |
| Flavonoides | Acetato de etila:Acetona:Água (15:8:2) | | | + | + |
| Antraquinonas | Hexano:Acetato de etila:Ácido fórmico (6:6:0,3) | - | - | - | - |

FONTE: A autora (2023).
Nota: fração hexano (FHF); fração clorofórmio (FCF); fração acetato de etila (FAEF); fração remanescente (FRF).

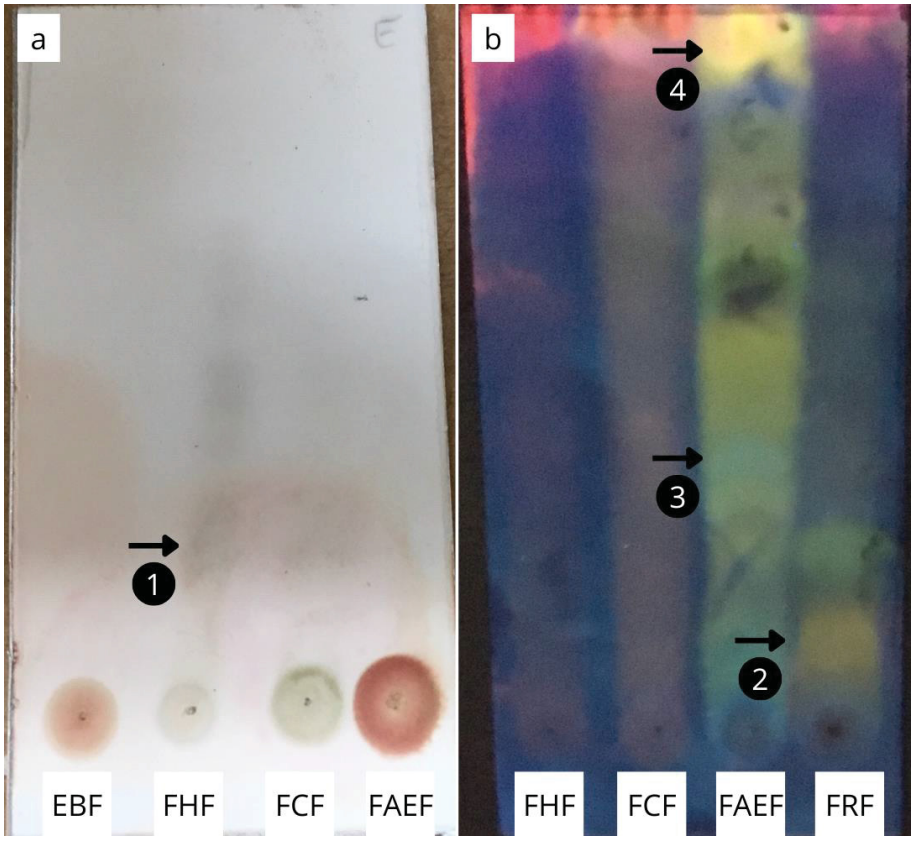
Para esteroides e triterpenos a reação foi positiva com banda esverdeada na fração hexano (TABELA 7, FIGURA 21a), resultado que corrobora com o obtido no *screening* fitoquímico, no qual, a reação mais intensa foi observada na fração hexânica. A classe dos triterpenos compreende mais de 20 mil moléculas que apresentam 30 átomos de carbono em sua estrutura molecular. São compostos com importância para a formação de membranas celulares e formação de moléculas de sinalização, como hormônios. Para as plantas, são importantes para proteção contra insetos, fungos e bactérias. Os triterpenos demonstram variedade de atividades

biológicas como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiparasitária, além de atuar em processos contra envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Os esteroides são derivados biossinteticamente dos triterpenos (PROSHKINA *et al.*, 2020; SANDJO; KUETE, 2013).

Para cumarinas, observou-se, em luz ultravioleta, banda azulada próximo ao ponto de aplicação da amostra para as frações clorofórmio e acetato de etila, semelhante ao obtido no *screening* fitoquímico. Para flavonoides, a fase móvel mais adequada para separação dos compostos foi acetato de etila : acetona : água (15:8:2), com a qual foi observada banda amarelo alaranjada próximo à aplicação da amostra na fração remanescente, sendo um indicativo da presença de rutina, ponto azulado na fração acetato de etila indicando a presença de ácido clorogênico e banda amarela mais intensa no alto da placa cromatográfica na fração acetato de etila, sendo indicativo da presença de quercetina e (FIGURA 21b) (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1983). Os flavonoides são um grande grupo de compostos fenólicos que abrange mais de 900 substâncias divididas em subgrupos como flavonas, flavanóis, flavanonas, flavononóis e isoflavonas (ZHAO *et al.*, 2019). Apresentam 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, sendo esse composto por três anéis (C6 – C3 – C6): dois benzenos unidos por um pirano (HORST, 2013). Diversas atividades biológicas já foram atribuídas aos flavonoides como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, anticâncer, antiangiogênica, anti-úlcera e anti-artrite (SULTANA *et al.*, 2023; KAUL *et al.*, 2021).

O resultado negativo para antraquinonas em todas as frações avaliadas após a aplicação do revelador diferiu do resultado obtido com o *screening* fitoquímico, no qual foi observada a possível presença de naftoquinonas na fração acetato de etila. A diferença de resultados obtidos com o *screening* fitoquímico e a avaliação por CCD pode ser atribuída as diferentes formas de extração para condução dos ensaios. Para o *screening* fitoquímico o extrato foi obtido por maceração e para a avaliação por CCD foram utilizadas as frações semipurificadas do extrato bruto obtido por Soxhlet.

FIGURA 21 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS DE FOLHAS DE *A. edulis*




FONTE: A autora (2023).

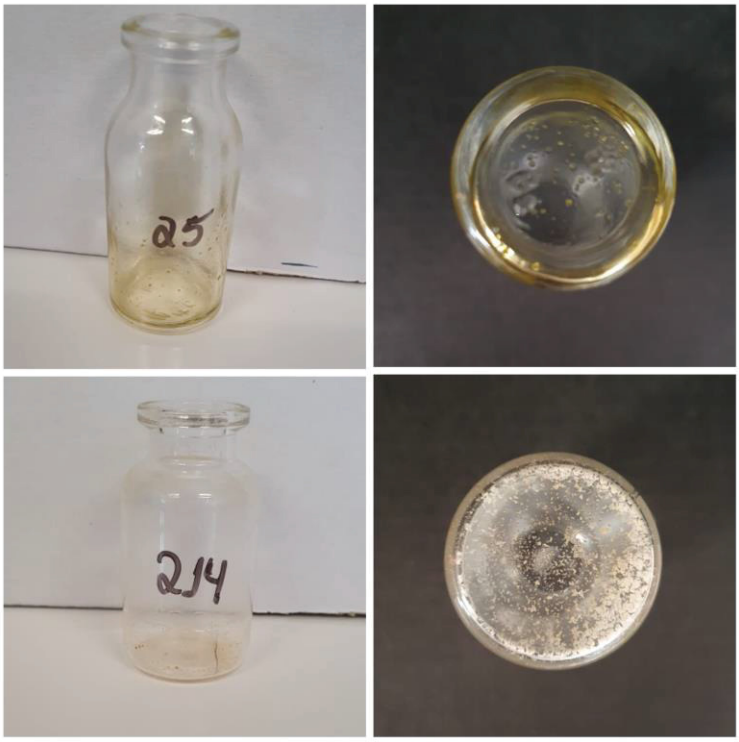
Notas: Extrato bruto folha (EBF); fração hexano folha (FHF); fração clorofórmio folha (FCF); fração acetato de etila folha (FAEF); fração remanescente folha (FRF).
a – CCD para esteroides e triterpenos (Fase móvel - tolueno : acetato de etila – 97:3); ponto 1 – banda esverdeada na fração hexano, característica da presença de esteroides e triterpenos.
b – CCD para flavonoides (fase móvel - acetato de etila : acetona : água – (15:8:2); ponto 2 – banda amarelo alaranjada na fração remanescente, indicativa de rutina; ponto 3 – banda azul na fração acetato de etila, característica de ácido clorogênico; ponto 4 – banda amarela na fração acetato de etila, indicativa da presença de quercetina.

### 4.2.4 Isolamento e Identificação de Compostos

Na coluna cromatográfica da fração hexano foram obtidas 236 subfrações. Formaram-se precipitados nos frascos 23 a 26 e 207 a 217 (FIGURA 22). Em virtude da pequena quantidade de precipitados obtidos, não foi possível a identificação do isolado presente entre os frascos 23 a 26. O precipitado de coloração branca presente nos frascos 207 a 217 foi analisado por RMN. Inicialmente, apenas o conteúdo do frasco 214 (4,3mg) foi avaliado, contudo, não foi possível a identificação da substância em virtude da pequena quantidade de amostra. Posteriormente, foram reunidos os precipitados dos frascos 209 a 212, totalizando 21,3 mg de amostra. Pelos espectros de $^{1}H$ (FIGURA 23) e $^{13}C$ (FIGURA 24) obtidos

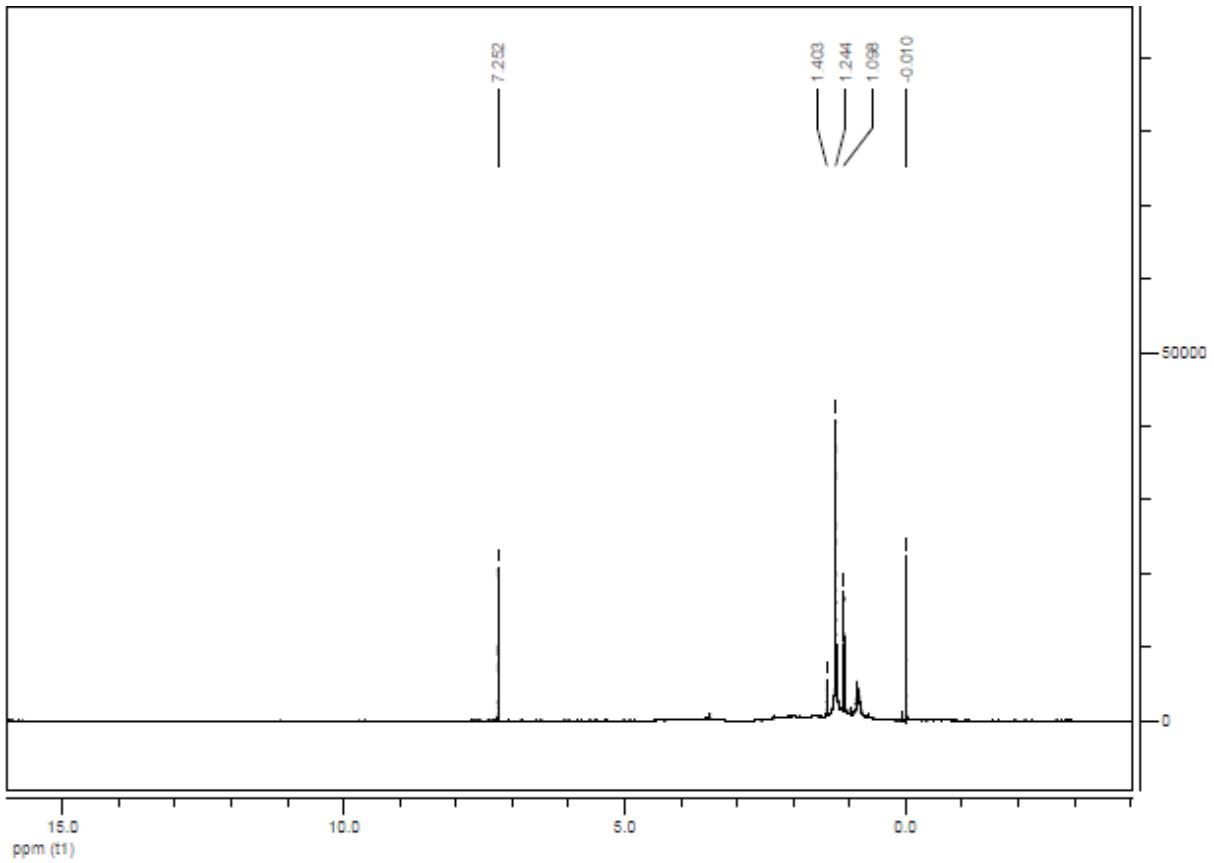
por ressonância magnética nuclear, os precipitados correspondem a um hidrocarboneto alifático saturado, uma vez que não são observados sinais de carbonilas, hidroxilas ou duplas ligações. Entretanto, não é possível definir via RMN, o número de carbonos presentes na molécula. No espectro de $^{1}H$ observam-se sinais característicos (1,244) de hidrogênios presentes em $CH_2$ e $CH_3$.

FIGURA 22 - PRECIPITADOS DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA HEXANO




FONTE: A autora (2023).

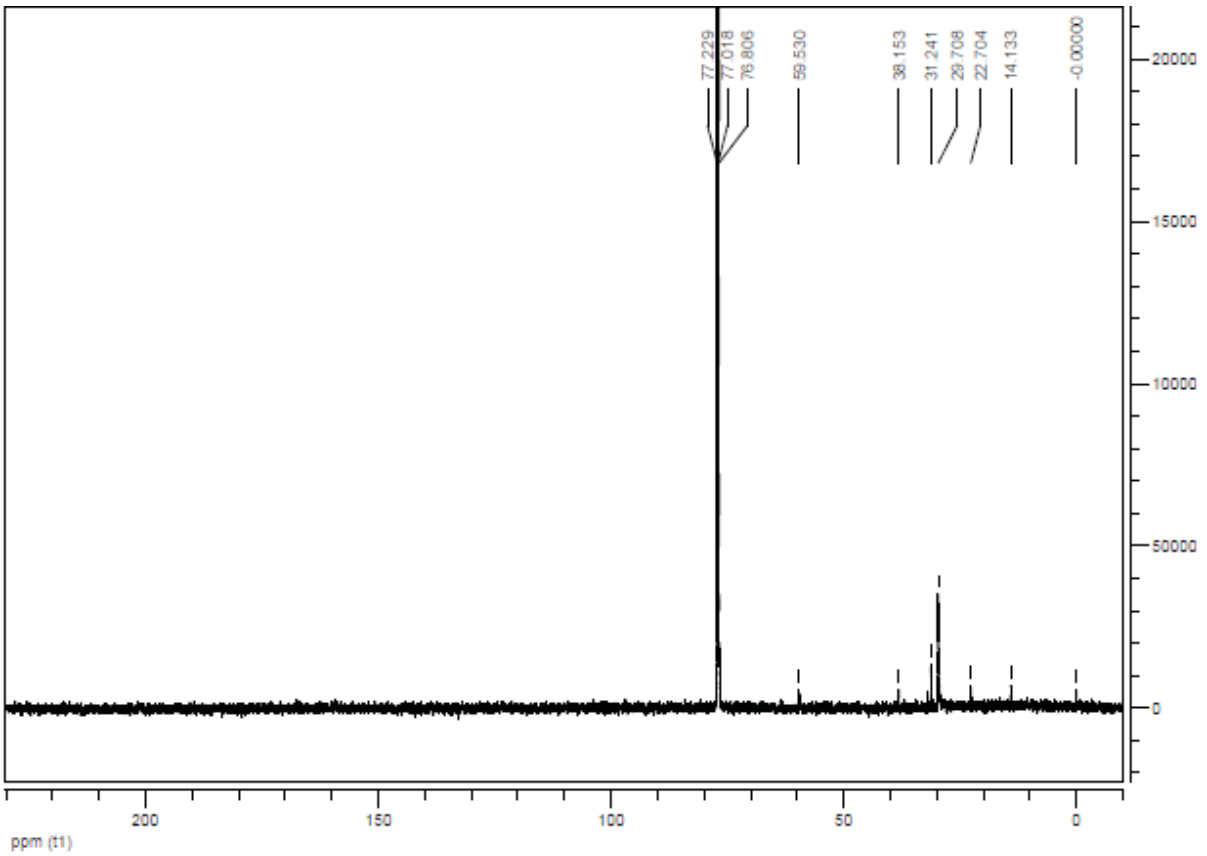
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN $^{1}H$ DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO (200,13MHz, $CDCl_3$)




FONTE: A autora (2023).

Apesar de não ser possível definir o tamanho da cadeia carbônica, o sinal 14,133 obtido é característico de grupamento metil ($CH_3$) e o sinal 29,708 de carbonos presentes no meio da cadeia carbônica ($CH_2$).

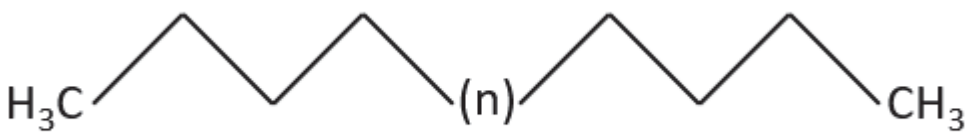
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN $^{13}C$ DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO (50,62MHz, $CDCl_3$)




FONTE: A autora (2023).

Dessa forma, sugere-se que a estrutura química do composto isolado seja uma cadeia linear e saturada, conforme a FIGURA 25, tratando-se de um hidrocarboneto alifático saturado de cadeia longa. Apesar de são ser possível confirmar o número de carbonos presentes na cadeia, sabe-se que estruturas com número ímpar de carbonos (C23, C25 e C31) predominam nos vegetais (LACOSTE, 2016).

FIGURA 25 - ESTRUTURA DO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA




FONTE: A autora (2023).

Hidrocarbonetos podem estar presentes em óleos essenciais de espécies vegetais, sobretudo em óleos extraídos de sementes (EVERGETIS; HAROUTOUNIAN, 2014). Entretanto, como o isolado foi obtido das folhas, é mais provável que corresponda a um componente de ceras presentes nas folhas dos vegetais. Os hidrocarbonetos de cadeia longa e saturada, também chamados de alcanos ($C_{21}$ – $C_{39}$) contribuem para a hidrofobicidade das ceras e atuam como barreiras contra agressores do meio externo e contra a evaporação de água em folhas de vegetais (BUSH; MCINERNEY, 2013).

Os hidrocarbonetos de cadeia linear e sem grupamentos funcionais, como é o caso da substância isolada da fração hexânica, são moléculas extremamente estáveis e podem ser encontradas em registros fósseis de milhões de anos. São substâncias que se acumulam rapidamente durante a maturação das folhas durante a primavera e início do verão (BUSH; MCINERNEY, 2013), período em que foi realizada a coleta do material vegetal na presente pesquisa.

Em relação à possível aplicação da substância, é descrito na literatura que hidrocarbonetos de cadeia longa apresentam aplicações na indústria petroquímica (YANG *et al.*, 2023) e hidrocarbonetos voláteis e suas misturas podem ser aplicados como propulsores em aerossóis substituindo compostos clorofluorcarbonos, que são danosos à camada de ozônio (EVERGETIS; HAROUTOUNIAN, 2014).

Além da fração hexano, a fração acetato de etila foi submetida a coluna cromatográfica e, a partir dessa, foram obtidas 277 subfrações. Em virtude da característica da amostra em relação a presença de compostos glicosilados e da pequena quantidade de amostra utilizada, não foi observada a precipitação em nenhuma subfração. É importante ressaltar que as frações hexano e acetato de etila foram as frações selecionadas para a condução da cromatografia em coluna por terem apresentado os resultados mais promissores na análise por cromatografia em camada delgada.

### 4.2.5 Extração e Caracterização Química de Óleo Essencial

Folhas de *A. edulis* colhidas em novembro de 2018 foram utilizadas para extração de óleo essencial em dois momentos distintos: o primeiro logo após o processo de secagem e o segundo após 12 meses de armazenamento das folhas secas. O óleo obtido de ambas as extrações apresenta coloração amarelo clara e

aroma marcante e característico, similar ao encontrado na planta seca. Da primeira extração, de 361g de material vegetal, foram obtidos 4,7 mL de óleo essencial, representando rendimento de 1,3% (v/m) em base seca. Na segunda extração, observou-se redução de 67% no rendimento no óleo essencial, com a obtenção de 3,8 mL a partir de 874,5 g de material vegetal e rendimento de 0,43% (v/m), também em base seca. O rendimento obtido no presente estudo, sobretudo na primeira extração, foi superior ao encontrado anteriormente para folhas de *A. edulis* cultivadas em Mato Grosso do Sul (0,07 a 0,6%) (SANTOS *et al.*, 2023) e em outras espécies da família Sapindaceae como *Deinbollia pinnata* (0,44%) (SOTUBO *et al.*, 2016), *Allophylus africanus* (0,12%) (BALOGUN; OLADOSU; LIU, 2014) e *Paullinia pinnata* L. (0,08%) (OGUNWANDE *et al.*, 2017).

A análise por CG/MS da primeira extração, realizada em dezembro de 2018, resultou em 18 compostos, representando 96,82% do óleo, com predominância de sesquiterpenos oxigenados e monoterpenos (TABELA 8). É importante ressaltar que foram identificados compostos presentes acima de 0,4%.

TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*

| **Composto** | **Classificação** | **Tempo de retenção (min)** | **IR** | **Área do pico (%)** |
|---|---|---|---|---|
| α-Pineno | Monoterpeno | 5,285 | 931 | 19,20 |
| trans-Sabinol | Monoterpeno oxigenado | 12,140 | 1142 | 0,62 |
| *p*-Mentha-1,5-dien-8-ol | Monoterpeno oxigenado | 13,030 | 1164 | 0,40 |
| Verbenona | Monoterpeno oxigenado | 14,755 | 1207 | 0,44 |
| α-Copaeno | Sesquiterpeno | 22,305 | 1388 | 0,64 |
| E-Cariofileno | Sesquiterpeno | 23,490 | 1417 | 0,44 |
| β-Selineno | Sesquiterpeno | 26,175 | 1484 | 0,54 |
| 10-epi-β-Acoradieno | Sesquiterpeno | 26,560 | 1493 | 0,60 |
| γ-Cadineno | Sesquiterpeno | 27,295 | 1512 | 0,60 |
| δ-Cadineno | Sesquiterpeno | 27,665 | 1522 | 0,86 |
| NI | - | 28,485 | 1543 | 0,52 |
| *E*-Nerolidol | Sesquiterpeno oxigenado | 29,270 | 1564 | 59,44 |
| Espatulenol | Sesquiterpeno oxigenado | 29,745 | 1576 | 0,68 |
| Oxido de cariofileno | Sesquiterpeno oxigenado | 29,940 | 1581 | 0,56 |
| 1, 10, di-epi-Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 31,160 | 1614 | 0,91 |
| 10-epi-γ-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 31,330 | 1618 | 9,00 |
| epi-α-Cadinol | Sesquiterpeno oxigenado | 32,230 | 1643 | 0,92 |
| 7-epi-α-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 32,550 | 1652 | 0,45 |
| ***Total de compostos*** | | | | ***96,82*** |
| *Monoterpenos* | | | | *19,20* |
| *Monoterpenos oxigenados* | | | | *1,46* |
| *Sesquiterpenos* | | | | *3,68* |
| *Sesquiterpenos oxigenados* | | | | *71,96* |
| *NI* | | | | *0,52* |

FONTE: A autora (2023).
Nota: IR – índice de retenção; NI – não identificado

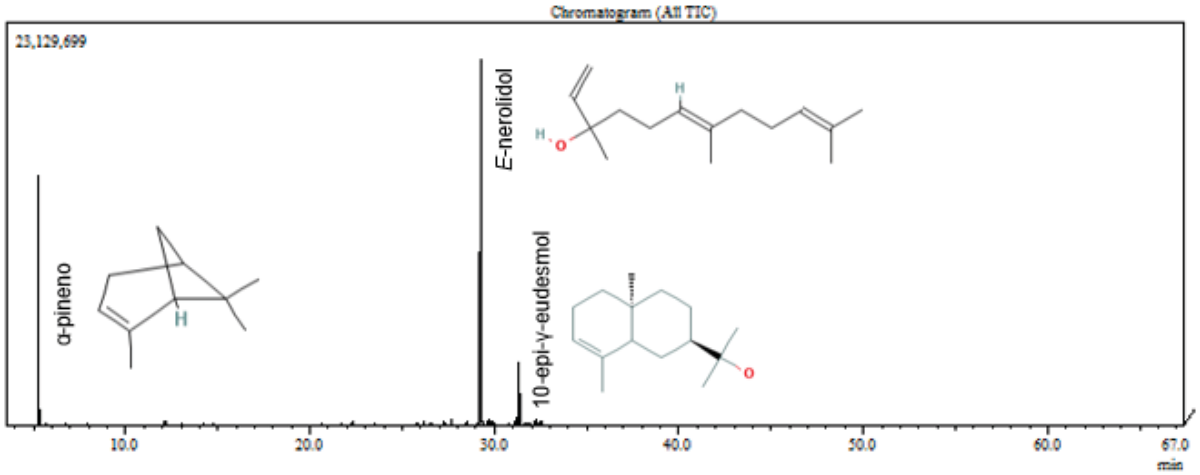
Conforme pode ser observado na TABELA 8 e na FIGURA 26, o *E*-nerolidol foi o composto majoritário (59,44%) do óleo essencial de folhas de *A. edulis* cultivados no Paraná. O nerolidol é um sesquiterpeno oxigenado, comumente presente em espécies vegetais (CHAN *et al.*, 2016). Além do nerolidol, estão presentes em maior quantidade o α-pineno (19,2%), um monoterpeno, e o 10-epi-γ-eudesmol (9,0%), outro sesquiterpeno oxigenado. Este resultado difere de achados em três pesquisas prévias sobre a composição química de óleo essencial de *A. edulis*. Trevisan *et al.* (2016), ao avaliar a composição do óleo essencial extraído de folhas de *A. edulis* cultivado na cidade de Dourados (MS, Brasil), identificaram 41 compostos, sendo o majoritário o viridiflorol (30,88%). Santos *et al*. (2021) e Santos *et al.* (2023) identificaram que óxido de cariofileno foi o composto majoritário do óleo essencial extraído de *A. edulis* cultivado em Dourados e que α-zingibereno foi o composto predominante no óleo essencial de *A. edulis* cultivado em Bonito. Dezessete compostos são comuns as duas amostras analisadas por Santos *et al.* (2021), sendo que destes, 3 compostos também estão presentes nas folhas de *A. edulis* analisadas no presente estudo (α-pineno, *E*-cariofileno e óxido de cariofileno). O E-nerolidol não se encontra entre os componentes dos óleos essenciais analisados por Trevisan *et al.* (2016) e Santos *et al.* (2021) e está presente em pequena quantidade (< 0,8%) no óleo essencial obtido de folhas de *A. edulis* cultivados em Bonito (MS, Brasil) (SANTOS *et al.*, 2023).

A composição distinta dos óleos essenciais obtidos da mesma espécie vegetal pode ocorrer devido a fatores genéticos que determinam polimorfismos, ou seja, a existência de dois ou mais fenótipos (SOUZA *et al.*, 2018) ou condições ambientais de cultivo da planta, pois em condições de cultivo distintas pode haver redirecionamento da rota metabólica, dando origem a diferentes componentes (MORAIS, 2009). Variações climáticas, estádio de desenvolvimento da planta, incidência de sol e suprimento de água e minerais podem afetar a composição química dos óleos essenciais (SANTOS *et al.*, 2021). A estação do ano em que foi realizada a colheita do material vegetal também pode influenciar na composição do óleo essencial. Marques e Kaplan (2011), por exemplo, identificaram maior presença de *E*-nerolidol em folhas de *Piper claussenianum* cultivadas no Brasil durante a primavera quando comparado às outras estações do ano. No presente estudo, a coleta do material vegetal ocorreu durante a primavera, enquanto em outras pesquisas envolvendo a caracterização do óleo essencial de *A. edulis* as coletas

ocorreram no verão (TREVIZAN *et al.*, 2016) e no inverno (SANTOS *et al.*, 2021). Conhecer a variabilidade de composição química do óleo essencial da mesma espécie, seja devido a diferentes genótipos ou a diferentes condições de cultivo, se torna importante para o adequado direcionamento da utilização dos óleos essenciais na indústria ou na área médica (SOUZA *et al.*, 2018).

Apesar dos compostos majoritários dos óleos essenciais de folhas de *A. edulis* analisados por essa e outras pesquisas serem diferentes, uma característica comum é a predominância de sesquiterpenos em comparação a outras classes de compostos (SANTOS, *et al.*, 2021; SANTOS, *et al.* 2023; TREVIZAN *et al.*, 2016).

FIGURA 26 - CROMATOGRAMA CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis*




FONTE: A autora (2023).

O nerolidol já foi identificado em outras espécies da família Sapindaceae. Em frutos de *Litchi chinensis* Sonn (lichia) foi considerado um dos mais importantes compostos ativos de aroma ao lado de metional, geraniol, furaneol, nerol e linalol (FENG *et al.*, 2018). Em folhas de *Paullinia pinnata* L. correspondeu a 2,1% da composição do óleo (OGUNWANDE *et al.*, 2017) e em folhas de *Allophylus africanus*, satisfez 3,63% dos compostos presentes no óleo essencial (BALOGUN; OLADOSU; LIU, 2014).

O *E*-nerolidol é um sesquiterpeno oxigenado acíclico que apresenta coloração amarela clara e aroma levemente floral, remetendo a rosa e maçã. Devido à sua característica aromática, é empregado na confecção de perfumes, shampoos, sabonetes e produtos de limpeza (CHAN *et al.*, 2016; LAPCZYNSKI *et al.*, 2008). O nerolidol é também um agente flavorizante aprovado pela *Food and Drug*

*Administration* (FDA, 2020) e pode ser aplicado na indústria alimentícia como um agente conservante (MOURA *et al.*, 2021). Na indústria farmacêutica, o *E*-nerolidol pode ser utilizado como facilitador da absorção cutânea de medicamentos (MOURA *et al.*, 2021). Esse composto apresenta diferentes formas isoméricas devido a presença de dupla ligação no carbono 6 (C6) e centro assimétrico no carbono 3 (C3). No presente estudo, identificou-se a presença de *E*-nerolidol, um isômero trans. Esse composto apresenta elevada hidrofobicidade, o que permite penetração em membranas celulares (CHAN *et al.*, 2016). Diversas atividades biológicas e farmacológicas já foram descritas na literatura, tanto para o *E*-nerolidol isolado, quanto para óleos essenciais que possuem o *E*-nerolidol como composto majoritário. Dentre essas atividades, pode-se citar antimicrobiana contra *C. albicans* (CURVELO *et al.*, 2014), contra *S. aureus* (FAHED *et al.*, 2016) e contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia* (MOURA *et al.*, 2021), antiparasitária contra *Leishmania donovani* e *Schistosoma mansoni* (PARREIRA *et al.*, 2010), larvicida contra *Aedes aegypti* (PARK *et al.*, 2011), anti-malária (MARQUES *et al.*, 2015), antiviral contra poliomavírus de roedores (RYABCHENKO *et al.*, 2008), anti-inflamatória (BASTAKI *et al.*, 2021; FONSÊCA *et al.*, 2016), antioxidante (MOURA *et al.*, 2021), anti-úlcera (BASTAKI *et al.*, 2021), antinociceptiva (FONSÊCA *et al.*, 2016) e anti-tumoral pela indução de apoptose em células de câncer colorretal (AMBROŽ *et al.*, 2015).

O fato da extração do óleo essencial de folhas de *A. edulis* ter apresentado bom rendimento (1,3%) e do *E*-nerolidol, um composto com diversas aplicabilidades farmacológicas e industriais, ser o composto majoritário pode indicar a relevância do estudo dessa espécie vegetal cultivada no Paraná e boas perspectivas da aplicação em processos biotecnológicos.

O α-pineno foi o segundo composto mais abundante. É um monoterpeno bicíclico ($C_{10}H_{16}$) que também está presente no óleo essencial de mais de 4000 espécies vegetais, dentre elas plantas aromáticas como canabis, coníferas, sálvia e alecrim (PATEIRO *et al.*, 2018; WAIDYANATHA *et al.*, 2021) e já foi identificado previamente em folhas de *A. edulis* (SANTOS *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2023). Apresenta-se como um óleo incolor com aroma de terebintina, sendo utilizado na fabricação de cânfora e, como fragrância, na indústria de cuidados pessoais e de limpeza em shampoos, perfumes, loções corporais, sabonetes e produtos de limpeza ambiental. Pode ser aplicado ainda em inseticidas, solventes, plastificantes

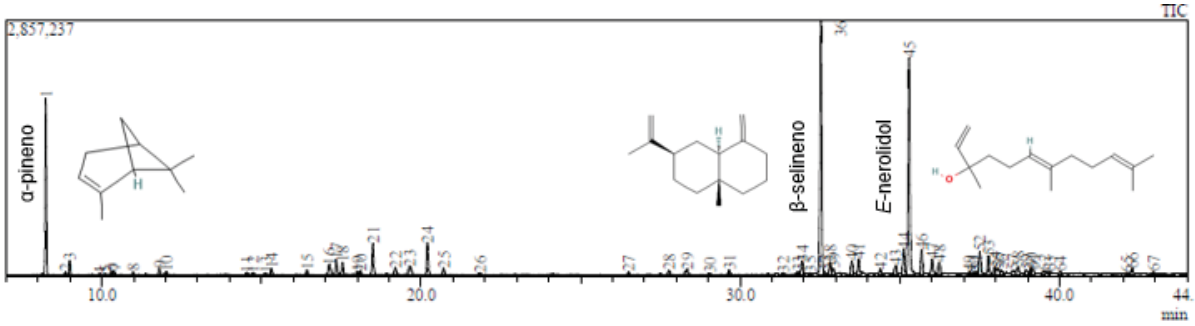
e óleo sintético de pinho (EVERGETIS; HAROUTOUNIAN, 2014; SILVESTRE *et al.*, 2019; WAIDYANATHA *et al.*, 2021). Também é aplicado na indústria alimentícia como flavorizante em alimentos e bebidas, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2020). O α-pineno já demonstrou atividade antiviral contra o vírus *Herpes simplex* (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2010) e apresenta importante atividade anti-inflamatória, atuando na inibição de edema, redução da expressão da COX-2 e redução de interleucina 6 (IL-6). Esse monoterpeno apresenta também potencial neuroprotetor durante acidente vascular cerebral isquêmico por atenuar a inflamação, inibir a apoptose e reduzir a lesão isquêmica (BOUYAHYA *et al.*, 2021; KHOSHNAZAR; PARVARDEH; BIGDEL, 2020). A presença do α-pineno nas folhas de *A. edulis* pode sofrer influência da estação do ano, conforme mostra a pesquisa conduzida por Santos *et al.* (2023), na qual o teor de α-pineno durante o inverno foi cerca de 8 vezes inferior ao encontrado em folhas durante a primavera. A presença do α-pineno, assim como do *E*-nerolidol, em um óleo essencial com bom rendimento pode tornar a espécie *A. edulis* atrativa para aplicação do óleo essencial em processos biotecnológicos. Nesse sentido, mais pesquisas na área de fitotecnia podem ser conduzidas, a fim de identificar formas mais otimizadas de cultivo.

O 10-epi-γ-eudesmol é um sesquiterpeno de eudesmano com um grupamento hidroxila no carbono 11 (C11), uma ligação dupla entre o carbono 4 (C4) e o carbono 5 (C5) e uma inversão de configuração no carbono 10 (C10) (PUBCHEM, 2022). Trata-se de um composto volátil com aroma adocicado (LE ROUX *et al.*, 2012). Em relação às atividades biológicas, apresenta atividade repelente descrita na literatura com resultados promissores contra o mosquito *Aedes aegypti* (PALUCH *et al.*, 2009) e contra o carrapato *Amblyomma americanum* (TABANCA *et al.*, 2013). Além disso, possui forte capacidade antioxidante pela presença do oxigênio em sua molécula (MARMOUZI *et al.*, 2019). O 10-epi-γ-eudesmol é um dos compostos majoritários de óleo essencial de malva (*Pelargonium graveolens*), (MARMOUZI *et al.*, 2019; TABANCA *et al.*, 2013), sendo considerado um marcador da origem do óleo essencial, já que o composto está presente em óleos de plantas cultivadas na África e ausente em óleos originários da França ou Estados Unidos (WANG *et al.*, 2014). A presença do 10-epi-γ-eudesmol também já foi relatada em óleo essencial de *Cannabis sativa* cultivada nos Estados Unidos (ZHELJAZKOV *et al.*, 2022), *Cyclopia subternata* (*Honeybush*) cultivada na

África do Sul (LE ROUX *et al.*, 2012) e na combinação de raízes de *Curcuma zedoaria* e *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham. utilizada na medicina tradicional chinesa (XU *et al.*, 2015).

A análise por CG/MS da segunda extração, realizada após um ano de armazenamento das folhas secas, resultou na visualização de 67 picos no cromatograma (FIGURA 27), com identificação de 30 compostos, havendo predominância de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (56,99%) (TABELA 9).

FIGURA 27 – CROMATOGRAMA CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* APÓS 12 MESES DE ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL




FONTE: A autora (2023).

Dentre os picos observados, 21 apresentam-se como banda de eluição impura e 8 como compostos não identificados. Foi possível identificar compostos presentes em quantidade inferior a 0,4%, o que não ocorreu na primeira análise do óleo essencial.

TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* APÓS 12 MESES DE ARMAZENAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

(continua)

| **Composto** | **Classificação** | **Tempo de retenção (min)** | **IR** | **Área do pico (%)** |
|---|---|---|---|---|
| α-Pineno | Monoterpeno | 8,240 | 933 | 10,84 |
| Canfeno | Monoterpeno | 8,860 | 950 | 0,24 |
| Tuja-2,4(10)-dieno | Monoterpeno | 8,990 | 953 | 0,97 |
| β-pineno | Monoterpeno | 9,925 | 978 | 0,11 |
| 6-metil-5-Hepten-2-ona | Cetona | 10,090 | 982 | 0,16 |
| Mirceno | Monoterpeno | 10,305 | 988 | 0,23 |
| NI | - | 10,385 | 990 | 0,30 |
| NI | - | 10,980 | 1005 | 0,23 |
| o-Cimeno | Monoterpeno | 11,800 | 1024 | 0,58 |
| Limoneno | Monoterpeno | 12,020 | 10,29 | 0,38 |
| ρ-Cimeneno | Monoterpeno | 14,730 | 1090 | 0,28 |

(conclusão)

| Composto | Classificação | Tempo de retenção (min) | IR | Área do pico (%) |
|---|---|---|---|---|
| Linalol | Monoterpeno | 15,135 | 1099 | 0,24 |
| 6-Metil-3,5-heptadien-2-ona | Cetona | 15,310 | 1103 | 0,57 |
| α-Camfolenal | Monoterpeno | 16,425 | 1127 | 0,44 |
| Trans-Pinocarveol | Monoterpeno | 17,115 | 11,41 | 1,24 |
| NI | - | 17,345 | 1146 | 1,35 |
| NI | - | 17,535 | 1150 | 1,10 |
| Pinocarvona | Monoterpeno oxigenado | 18,105 | 1163 | 0,37 |
| ρ-Mentha-1,5-dien-8-ol | Monoterpeno oxigenado | 18,490 | 1171 | 2,60 |
| ρ-Cimen-8-ol | Monoterpeno oxigenado | 19,200 | 1186 | 0,68 |
| Mirtenal | Monoterpeno oxigenado | 19,640 | 1196 | 1,25 |
| Verbenona | Monoterpeno oxigenado | 20,195 | 1208 | 2,75 |
| trans-Carveol | Monoterpeno oxigenado | 20,710 | 1219 | 0,61 |
| Carvona | Monoterpeno oxigenado | 31,835 | 12,44 | 0,20 |
| α-Cubebeno | Sesquiterpeno | 26,500 | 1348 | 0,28 |
| α-Ilangeno | Sesquiterpeno | 27,765 | 1377 | 0,43 |
| β-Elemeno | Sesquiterpeno | 28,335 | 1390 | 0,76 |
| (E)-Cariofileno | Sesquiterpeno | 29,655 | 1421 | 0,45 |
| γ-Muuroleno | Sesquiterpeno | 31,935 | 1476 | 1,46 |
| β-Selineno | Sesquiterpeno | 32,530 | 1490 | 22,41 |
| α-Muuroleno | Sesquiterpeno | 32,915 | 1500 | 0,60 |
| γ-Cadineno | Sesquiterpeno | 33,495 | 1514 | 1,19 |
| δ-Cadineno | Sesquiterpeno | 33,705 | 1520 | 1,45 |
| NI | - | 34,395 | 1537 | 0,57 |
| NI | - | 35,125 | 1556 | 2,30 |
| *E*-Nerolidol | Sesquiterpeno oxigenado | 35,290 | 1560 | 18,40 |
| NI | - | 34,685 | 1570 | 2,18 |
| Espatulenol | Sesquiterpeno oxigenado | 36,010 | 1578 | 1,55 |
| Óxido de Cariofileno | Sesquiterpeno oxigenado | 36,230 | 1584 | 1,32 |
| 1,10-di-epi-Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,505 | 1617 | 2,14 |
| 10-epi-γ-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,780 | 1625 | 1,86 |
| 1-epi-Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,970 | 1630 | 0,80 |
| Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 38,540 | 1645 | 0,60 |
| α-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 38,960 | 1656 | 0,66 |
| neo-Intermedeol | Sesquiterpeno oxigenado | 39,110 | 1660 | 0,63 |
| NI | - | 42,275 | 1747 | 0,65 |
| ***Total de compostos*** | | | | ***90,41*** |
| *Monoterpenos* | | | | *15,55* |
| *Monoterpenos oxigenados* | | | | *8,46* |
| *Sesquiterpenos* | | | | *29,03* |
| *Sesquiterpenos oxigenados* | | | | *27,96* |
| *Cetonas* | | | | *0,73* |
| *NI* | | | | *8,68* |

FONTE: A autora (2023).
Nota: NI – não identificado

O β-selineno, um sesquiterpeno, foi o composto majoritário da segunda extração, seguido pelo *E*-nerolidol e α-pineno (FIGURA 20, TABELA 9). Os selinenos foram originalmente isolados de sementes de aipo (*Apium graveolens*) (EVERGETIS; HAROUTOUNIAN, 2014). O β-selineno é um sesquiterpeno já descrito em outras espécies frutíferas encontradas no Brasil como goiabeira (*Psidium guajava L.*) (SOUZA *et al.*, 2018), araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) (PEREIRA *et al.*, 2018) e jatobá (*Hymenaea courbaril L.*) (AGUIAR *et al.*, 2010). Os

estudos a respeito das atividades biológicas de β-selineno são escassos, sendo possível observar atividade repelente contra a lagarta oriental (*Spodoptera litura*) e atividade inibitória da acetilcolinesterase (LIU *et al.*, 2021). Óleos essenciais contendo β-selineno como um dos três principais compostos, apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (AGUIAR *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2021) e anti-inflamatória por inibir a quimiotaxia de neutrófilos (SOARES; BORDIGNON; APEL, 2022), contudo, não pode-se afirmar que as atividades decorrem da presença desse composto.

Foi possível observar que o armazenamento das folhas de *A. edulis* impactou tanto no rendimento (redução de 67%) quanto na composição do óleo essencial, havendo mudança no teor de compostos majoritários e no perfil de composição do óleo essencial (TABELA 10).

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS E CLASSES DE COMPOSTOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. edulis* APÓS ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS PELO PERÍODO DE 12 MESES

| **Composto/classe** | **1ª extração** | **2ª extração** |
|---|---|---|
| **Compostos majoritários** | | |
| α-pineno | 19,20% | 10,84% |
| β-selineno | 0,54% | 22,41% |
| *E*-nerolidol | 59,44% | 18,40% |
| 10-epi-γ-eudesmol | 9,00% | 1,86% |
| **Classes de compostos** | | |
| Monoterpenos | 19,20% | 15,55% |
| Monoterpenos oxigenados | 1,46% | 8,46% |
| Sesquiterpenos | 3,68% | 29,03% |
| Sesquiterpenos oxigenados | 71,96% | 27,96% |
| Cetonas | - | 0,73% |

FONTE: A autora (2023).

Na primeira extração, os sesquiterpenos oxigenados e os monoterpenos eram as classes predominantes, enquanto, na segunda extração, os sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados passaram a predominar. A mudança no perfil de composição é explicada, sobretudo, pela alteração da concentração dos compostos majoritários. É possível observar redução de 69% na área do pico do composto majoritário do óleo essencial obtido na primeira extração, o *E*-nerolidol (59,44% para 18,40%), assim como redução na área do pico dos outros dois compostos presentes em maior concentração, o α-pineno (redução de 43,5%) e o 10-epi-γ-eudesmol (redução de 79%). Ainda, nessa segunda extração, o β-selineno passou a ser o composto majoritário.

Como a atividade biológica de um óleo essencial está associada aos seus compostos majoritários (SILVA *et al.*, 2022), esse resultado inédito para a espécie mostra que o armazenamento do material vegetal pode impactar nos efeitos do óleo essencial na saúde ou na aplicação industrial. Dessa forma, faz-se necessário o monitoramento da composição durante a estocagem do material vegetal ou anteriormente a aplicação do óleo essencial para garantir seus benefícios (JOFFARD *et al.*, 2017).

### 4.2.6 Isolamento e Identificação de Substâncias do Óleo Essencial

A coluna cromatográfica do óleo essencial resultou em 131 subfrações, sendo as subfrações 130 e 131 decorrentes da fração metanólica da coluna - a fração obtida pela adição de metanol à pastilha cromatografada. Não foi observada a formação de cristais ou precipitados em nenhuma subfração, possivelmente em decorrência da quantidade de óleo utilizada para a preparação da pastilha. Contudo, após a evaporação do solvente foi observado óleo residual no fundo do frasco da fração 131, o qual foi analisado por CG/MS e resultou na identificação de 20 compostos (TABELA 101).

TABELA 101 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PRODUTO OBTIDO APÓS COLUNA CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. edulis*

(continua)

| **Composto** | **Classificação** | **Tempo de retenção (min)** | **IR** | **Área do pico (%)** |
|---|---|---|---|---|
| NI | - | 17,340 | 1146 | 1,39 |
| p-mentha-1,5-dien-8-ol | Monoterpeno oxigenado | 18,490 | 1171 | 0,40 |
| ρ-Cimen-8-ol | Monoterpeno oxigenado | 19,190 | 1186 | 0,34 |
| α-Terpineol | Monoterpeno oxigenado | 19,605 | 1195 | 0,18 |
| Mirtenol | Monoterpeno oxigenado | 19,680 | 1197 | 0,39 |
| Verbenona | Monoterpeno oxigenado | 20,200 | 1208 | 1,56 |
| trans-Carveol | Monoterpeno oxigenado | 20,705 | 1219 | 0,30 |
| epi-Cubebol | Sesquiterpeno oxigenado | 32,775 | 1496 | 0,16 |
| Cubebol | Sesquiterpeno oxigenado | 33,575 | 1516 | 0,25 |
| α-Agarofuran | Sesquiterpeno oxigenado | 34,870 | 1550 | 0,88 |
| NI | - | 35,120 | 1556 | 0,96 |
| *E*-Nerolidol | Sesquiterpeno oxigenado | 35,120 | 1560 | 64,38 |
| NI | - | 35,685 | 1570 | 1,55 |
| Espatulenol | Sesquiterpeno oxigenado | 35,300 | 1578 | 1,76 |
| Óxido de Cariofileno | Sesquiterpeno oxigenado | 36,015 | 1584 | 0,87 |
| 5-epi-7-epi-α-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 36,235 | 1608 | 0,75 |
| 1,10-di-epi-Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,175 | 1617 | 1,20 |
| 10-epi-γ-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,780 | 1625 | 9,66 |
| 1-epi-Cubenol | Sesquiterpeno oxigenado | 37,980 | 1630 | 0,78 |
| γ-Eudesmol | Sesquiterpeno oxigenado | 38,125 | 1634 | 1,12 |

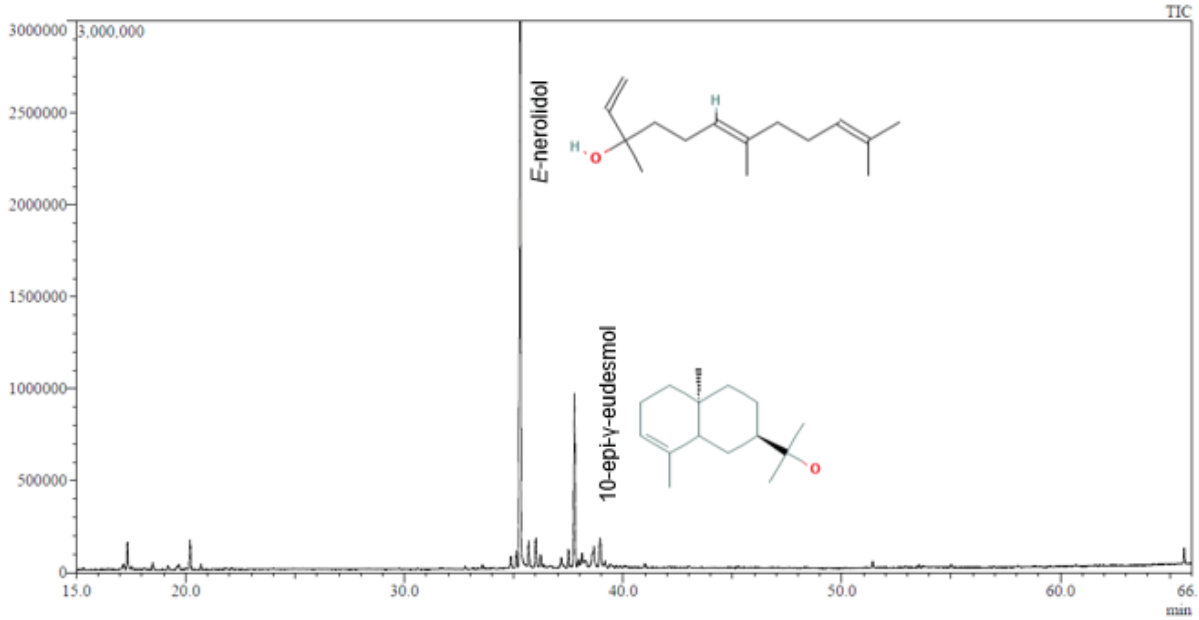
(conclusão)

| Composto | Classificação | Tempo de retenção (min) | IR | Área do pico (%) |
|---|---|---|---|---|
| NI | - | 38,285 | 1634 | 1,04 |
| Valerianol | Sesquiterpeno oxigenado | 38,950 | 1656 | 2,59 |
| (E,E)-Geranil linalool | Diterpeno oxigenado | 51,415 | 2022 | 0,37 |
| Metil linoleato | Éster de ácido graxo | 53,530 | 2090 | 0,23 |
| NI | - | 65,660 | 2140 | 0,80 |
| ***Total de compostos identificados*** | | | | **88,17** |
| *Monoterpenos oxigenados* | | | | *3,17* |
| *Sesquiterpenos oxigenados* | | | | *84,40* |
| *Diterpeno oxigenado* | | | | *0,37* |
| *Éster de ácido graxo* | | | | *0,23* |

FONTE: A autora (2023).
Nota: NI – não identidicado

A análise do óleo resultante da coluna cromatográfica resultou em 41 picos (FIGURA 28), sendo possível a identificação e quantificação de 20 compostos. Essa análise apresentou um número superior de compostos em relação análise do óleo essencial completo (primeira extração) em virtude da quantificação de compostos com área de pico inferior a 0,4%. Dos 20 compostos identificados no óleo proveniente da fração metanólica obtida da pastilha cromatográfica, 8 encontram-se em quantidade inferior a 0,4%.

FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* ISOLADO POR COLUNA CROMATOGRÁFICA




FONTE: A autora (2023).

Dos 20 compostos identificados e quantificados no óleo isolado, 19 são terpenos oxigenados, demonstrando que a coluna foi eficaz em separar compostos não oxigenados. O objetivo da realização da coluna cromatográfica era o isolamento do composto majoritário do óleo essencial, o *E*-nerolidol. Não foi possível realizar o isolamento, contudo foi possível aumentar o percentual do composto na amostra testada com a coluna cromatográfica. Enquanto no óleo essencial o *E*-nerolidol correspondeu a 59,44%, no isolado da coluna, a área do pico aumentou para 64,38%.

### 4.2.7 Doseamento de Compostos Fenólicos Totais (TPC) e Flavonoides Totais (TFC)

A fração acetato de etila apresentou os maiores teores de fenólicos e flavonoides totais comparando com o extrato bruto e demais frações semipurificadas obtidas de folhas de *A. edulis* (TABELA 12). Esse resultado é esperado devido a maior polaridade do solvente e sua capacidade de extração desses compostos, já que os compostos fenólicos tendem a ser polares e hidrofílicos (BABBAR *et al.*, 2014; GIL-MARTÍN *et al.*, 2022). Sobottka *et al.* (2021) ao avaliar folhas de *A. edulis* cultivados no Rio Grande do Sul também identificou maiores teores de fenólicos e flavonoides na fração acetato de etila quando comparadas ao extrato bruto e frações hexano e clorofórmio.

TABELA 112 - TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS EM FOLHAS DE *A. edulis*

| **Amostras** | **TPC (mg GAE/g) M (±DP)** | **TFC (mg CE/g) M (±DP)** |
|---|---|---|
| FAEF | 328,44 (± 14,18)[a] | 301,62 (± 19,87)[a] |
| EBF | 131,10 (± 9,78)[b] | 127,00 (± 6,13)[b] |
| FRF | 117,07 (± 4,80)[b] | 104,14 (± 4,48)[c] |
| FHF | 20,89 (± 3,56)[c] | 41,10 (± 2,84)[d] |
| FCF | 46,86 (± 3,66)[d] | 17,55 (± 0,89)[e] |

FONTE: A autora (2023).
Nota: teor de fenólicos totais (TPC); teor de flavonoides totais (TFC); extrato bruto (EBF); fração hexano (FHF); fração clorofórmio (FCF); fração acetato de etila (FAEF); fração remanescente (FRF); equivalentes de ácido gálico (GAE); equivalentes de catequina (CE). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey.

Os resultados apresentados são consideravelmente maiores que os obtidos por Tirloni *et al*. (2015) em estudo conduzido previamente com folhas de *A. edulis*. O extrato etanólico de folhas cultivadas em Dourados (MS, Brasil) apresentou 17,6 mg de GAE e 2,0 mg de CE por 100 mg de extrato, entretanto, o método de extração

utilizado pelos autores foi a maceração. Haja vista os maiores teores encontrados no presente estudo, pode-se sugerir que a extração por Soxhlet apresenta maior eficiência na extração destes compostos. Sabe-se que fatores como suprimento de água e características do solo empregados para o cultivo da planta, assim como métodos de extração empregados podem influenciar no teor de compostos bioativos (incluindo compostos fenólicos e flavonoides) em plantas (ZARGOOSH *et al.*, 2019).

### 4.2.8 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos

A partir do extrato bruto de folhas de *A. edulis* foram identificados e doseados, via HPLC, três compostos da classe dos fenólicos – ácido gálico, ácido cafeico e quercetina (TABELA 13, FIGURA 29).

Sabe-se que álcoois como metanol e etanol, assim como solventes orgânicos como acetato de etila e acetona são solventes com boa capacidade de extração de compostos fenólicos por conta de sua polaridade. No presente estudo, optou-se pela utilização do extrato bruto etanólico, já que o etanol é um solvente menos agressivo ao meio ambiente, apresenta baixa toxicidade e boa aplicabilidade em processos extrativos de larga escala. Além disso, é efetivo na extração de compostos fenólicos (GIL-MARTÍN *et al.*, 2022).

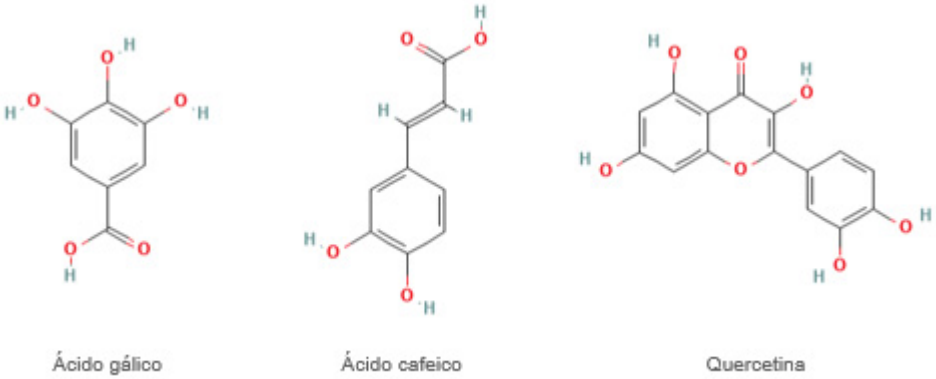
TABELA 123 - COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*

| **Composto** | **Tempo de retenção (min)** | **Área** | **Teor (mg/100g)** |
|---|---|---|---|
| Ácido gálico | 11,091 | 1145457 | 7,02 |
| Ácido cafeico | 21,321 | 372554272 | 313,63 |
| Quercetina | 25,282 | 32423266 | 129,88 |

FONTE: A autora (2023).

O teor de compostos fenólicos, metabólitos secundários mais abundantes em espécies vegetais, pode variar conforme o tipo de solo em que a planta foi cultivada, a incidência de chuvas, o modo de cultivo (estufas ou campos abertos) e o estádio de maturação (BABBAR *et al.*, 2014; THAKUR *et al.*, 2020). Dentre as diversas classes de compostos fenólicos encontrados em plantas, o ácido cafeico foi o composto fenólico mais prevalente na amostra. O ácido cafeico e o flavonoide quercetina já foram identificados previamente em folhas de *A. edulis* (ARISAWA *et al.*, 1989; HOFFMANN-BOHM *et al.*, 1992).

FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis*




FONTE: PubChem (2023).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) é um ácido fenólico que deriva da via do ácido chiquímico, sendo um componente de taninos hidrolisáveis em espécies vegetais (LIMA *et al.*, 2016). Segundo o screening fitoquímico preliminar conduzido em folhas de *A. edulis* na presente pesquisa, houve, de fato, reação positiva para taninos. O ácido gálico pode ser encontrado em alimentos como nozes, agrião e amora (ZAHRANI; EL-SHISHTAWY; ASIRI, 2020) e é industrialmente obtido a partir da ação da enzima tanase sobre o ácido tânico. Atividades biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antiulcerogênica, anti-HIV e anticâncer já foram associadas a esse ácido fenólico (FERNANDES; SALGADO, 2016; JIANG *et al.*, 2022). O ácido gálico possui, ainda, aplicações industriais na síntese do antimicrobiano trimetoprima e como conservante de alimentos sob a forma de propil galato (BAJPAI; PATIL, 2008).

O ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) é um ácido fenólico simples derivado do ácido hidroxicinâmico. Está presente em diversas espécies vegetais e em produtos consumidos frequentemente pela população como café, azeite de oliva, vinho, frutas e hortaliças. Apresenta atividades biológicas conhecidas como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética, antitumoral e anti-inflamatória (KHAN *et al.*, 2021; PINHO; SOARES; HENRIQUES, 2015). A estrutura química do ácido cafeico, um anel aromático com uma cadeia lateral insaturada e um grupamento carboxila, favorece sua atuação como antioxidante. O mecanismo de ação envolvido em tal atividade se dá pela doação de hidrogênio

para eliminar radicais livres, atuando nesse caso como um antioxidante primário, ou como quelante de metais com seus grupamentos hidroxila, agindo como um antioxidante secundário (PAVLÍKOVÁ, 2023). Nas plantas, o ácido cafeico age na proteção contra raios UV-B e participa do mecanismo de defesa contra infecções, pestes e predadores (ESPÍNDOLA *et al.*, 2019). Além disso, faz parte do ácido clorogênico junto com o ácido quínico (LU *et al.*, 2020).

A quercetina é um flavonoide, pertencente ao subgrupo dos flavonóis, vastamente distribuída na natureza e encontrada em alimentos como cebola, chá verde, alho, uvas, maçã e agrião (SINGH *et al.*, 2021). Normalmente é encontrada nos vegetais em sua forma glicosilada e apresenta diversas atividades biológicas reportadas na literatura como antibacteriana, antiviral, anti-diabética e anti-obesidade (DHANYA, 2022). A quercetina também já demonstrou atividade in vitro contra o SARS-CoV-2 *in vitro* (KAUL *et al.*, 2021).

Folhas de *A. edulis* são popularmente utilizadas como anti-inflamatório e os três compostos identificados via HPLC na presente pesquisa apresentam atividade anti-inflamatória reconhecida. O ácido gálico e o ácido cafeico podem reduzir a produção de prostaglandina 2 e suprimir o óxido nítrico, já a quercetina pode inibir as enzimas COX-1 e 12-LOX envolvidas na resposta inflamatória. Além disso, a quercetina e o ácido cafeico estão associados a redução da expressão de TNF-α em modelos animais (BOUYAHYA *et al.*, 2021).

O ácido cafeico e a quercetina já foram identificados via HPLC em folhas de outra espécie da família Sapindaceae, a *Blighia sapida*, conhecida popularmente na África e Reino Unido por Ackee (OLAYINKA; OZOLUA; AKHIGBEMEN, 2021).

## 4.3 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A fração acetato de etila foi a mais promissora em relação à propriedade antioxidante, seguida pelo extrato bruto e pela fração remanescente. As frações hexano e clorofórmio apresentaram menor atividade antioxidante pelas 3 metodologias utilizadas (TABELA 14), corroborando com Marwah *et al.* (2007) que evidenciou que extratos hidroalcóolicos apresentam melhores resultados em métodos de sequestro de radicais livres que extratos clorofórmicos.

Dentre os três ensaios empregados para avaliação da propriedade antioxidante, a fração remanescente, o extrato bruto e o óleo essencial

apresentaram diferença significativa apenas para ABTS. A diferença de resultados entre os métodos conduzidos pode estar relacionada ao diferente comportamento dos compostos antioxidantes frente ao radical ou compostos oxidantes testados (CHAVES; SANTIAGO; ALÍAS, 2020).

TABELA 134 - PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE FOLHAS DE *A. edulis*

| **Amostras** | **DPPH (mmol ET /100g) M (±DP)** | **ABTS (mmol ET /100g) M (±DP)** | **FRAP (mmol ET /100g) M (±DP)** |
|---|---|---|---|
| FAEF | 241,92 (± 9,53)[a] | 215,97 (± 10,09)[a] | 250,64 (± 14,80)[a] |
| EBF | 114,01 (± 7,96)[b] | 79,46 (± 4,24)[b] | 96,71 (± 2,77)[b] |
| FRF | 110,69 (± 10,94)[b] | 59,31 (± 3,48)[c] | 81,23 (± 1,84)[b] |
| OEF | 105,63 (± 12,32)[b] | 29,11 (± 3,69)[d] | 76,88 (± 4,06)[b] |
| FCF | 31,11 (± 4,98)[c] | 7,52 (± 1,51)[e] | 47,46 (± 14,34)[c] |
| FHF | 26,27 (± 2,34)[c] | 0(± 0,00)[f] | 27,36 (± 7,28)[d] |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto (EBF); fração hexano (FHF); fração clorofórmio (FCF); fração acetato de etila (FAEF); fração remanescente (FRF); óleo essencial (OEF); redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); redução do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS); poder antioxidante de redução do ferro (FRAP); equivalentes de Trolox (ET). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey.

Folhas de *A. edulis* foram anteriormente avaliadas quanto à propriedade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH. Tirloni *et al.* (2015), ao avaliar folhas de *A. edulis* cultivados em Mato Grosso do Sul, identificaram 94,5% de sequestro do radical DPPH com extrato etanólico de folhas na concentração de 1000 µg/mL e $IC_{50}$ de 17,7 µg/mL. Sobottka *et al.* (2021), identificaram $IC_{50}$ de 134,4 µg/mL para o extrato bruto de folhas cultivadas no Rio Grande do Sul e de 43,6 µg/mL para a fração acetato de etila. Já Trevizan *et al.* (2016) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. edulis* cultivado em Mato Grosso do Sul e identificaram $IC_{50}$ de 82,9 µg/mL. Frutos de *A. edulis* também já foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante. Frutos frescos cultivados na Argentina na concentração de 100 µg/mL reduziram o radical DPPH em 30% (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005). A comparação dos resultados previamente encontrados com os da presente pesquisa se torna difícil, uma vez que diferenças metodológicas são encontradas, tanto em relação aos métodos de extração quanto em relação ao método utilizado para a avaliação da propriedade antioxidante, incluindo a forma de expressar os resultados. Apesar dessas diferenças, verifica-se que folhas e frutos de *A. edulis* já demonstraram propriedades antioxidantes e isso ocorre porque plantas são uma fonte natural de compostos com potencial antioxidante, os quais podem interagir e inibir o início ou propagação de reações de oxidação provocadas por

radicais livres. Dessa forma, tais substâncias antioxidantes podem auxiliar na proteção celular contra o stress oxidativo, influenciando a saúde humana (CHAN *et al.*, 2016; ZARGOOSH *et al.*, 2019). O stress oxidativo pode provocar danos a biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA pela presença excessiva de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, relacionando-se com maior incidência de doenças como câncer e doenças cardiovasculares (CHAN *et al.*, 2016; MARWAH *et al.*, 2007). Além disso, extratos vegetais ou óleos essenciais com propriedades antioxidantes podem ser aplicados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Na indústria alimentícia, por exemplo, podem atuar impedindo a oxidação de compostos como ácidos graxos e, com isso, prevenindo a deterioração lipídica e aumentado a vida de prateleira dos produtos (PATEIRO *et al.*, 2018).

Em relação a associação da propriedade antioxidante com compostos bioativos presentes nas amostras testadas, a atividade antioxidante do óleo essencial possivelmente está relacionada a ação do seu composto majoritário, o *E*-nerolidol, o qual apresenta atividade antioxidante conhecida (BASTAKI *et al.*, 2021; MOURA *et al.*, 2021). A atividade do extrato bruto pode estar relacionada aos compostos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência: ácido gálico, ácido cafeico e quercetina. Os compostos fenólicos são os compostos bioativos com importante atividade antioxidante devido à presença do anel aromático e grupamentos hidroxila em sua estrutura química, o que facilita a doação de hidrogênio e elétrons (CHAVES; SANTIAGO; ALÍAS, 2020). As propriedades antioxidantes do ácido gálico, ácido cafeico e quercetina já são descritas na literatura (DHANYA, 2022; KASSA *et al.*, 2021; ZAHRANI; EL-SHISHTAWY; ASIRI, 2020).

A fração acetato de etila, que apresentou os resultados mais promissores em relação à atividade antioxidante, também foi a fração com maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. O grupamento hidroxila e as duplas ligações presentes na estrutura química de flavonoides e outros compostos fenólicos é responsável pela doação de hidrogênio ou elétrons para neutralização dos radicais livres (PATEIRO *et al.*, 2018; TIRLONI *et al.*, 2015). De fato, foi observada forte correlação entre os métodos utilizados para avaliação das propriedades antioxidantes fenólicos e flavonoides totais, com coeficientes próximos de 1 (TABELA 5).

TABELA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE (ABTS, DPPH E FRAP), FENÓLICOS TOTAIS (TPC) E FLAVONOIDES TOTAIS (TFC)

| | **ABTS** | **DPHH** | **FRAP** | **TFC** | **TPC** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Coeficiente (valor de p)** | | | | |
| ABTS | 1 | | | | |
| DPPH | 0,991(<0,001) | 1 | | | |
| FRAP | 0,994 (<0,001) | 0,977 (<0,001) | 1 | | |
| TFC | 0,994 (<0,001) | 0,989 (<0,001) | 0,983 (<0,001) | 1 | |
| TPC | 0,998 (<0,001) | 0,991 (<0,001) | 0,996 (<0,001) | 0,988 (<0,001) | 1 |

FONTE: A autora (2023).
Nota: redução do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS); redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); poder antioxidante de redução do ferro (FRAP); doseamento de flavonoides totais (TFC); doseamento de fenólicos totais (TPC). Matriz de correlação de Pearson (p <0,05).

## 4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.4.1 Atividade Antimicrobiana

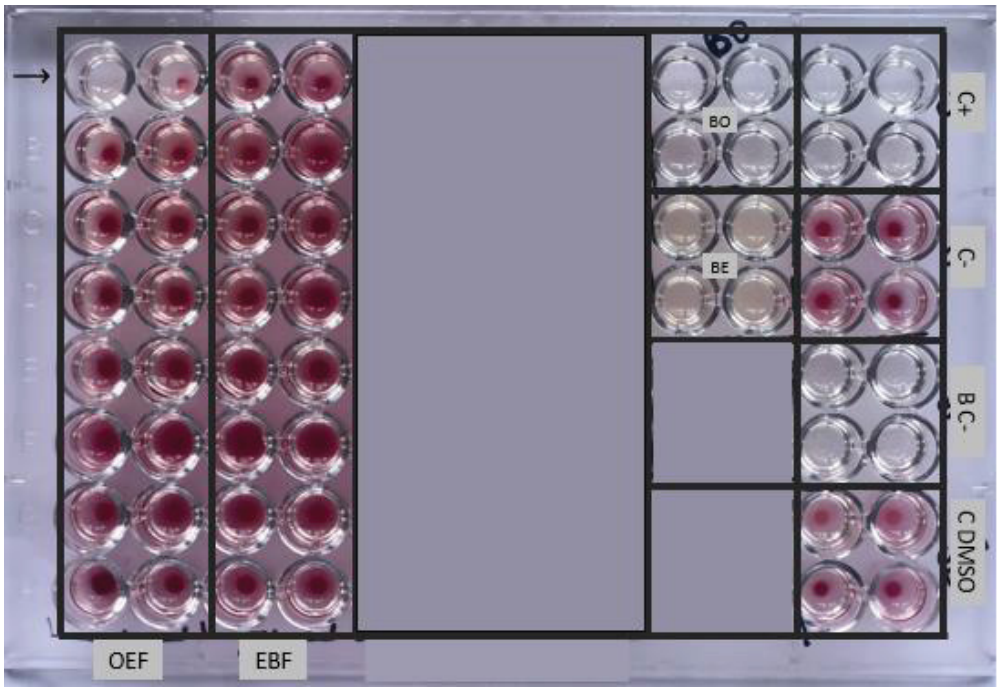
O extrato bruto e óleo essencial obtidos das folhas de *A. edulis* foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* ATCC 8738, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Não foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial ou extrato bruto para nenhuma das cepas avaliadas, uma vez que não foi observada inibição do crescimento microbiano nas concentrações testadas. Contudo, durante a leitura do experimento, foram visualizados resultados qualitativos relacionados a redução da coloração vermelha ou rosa nos poços. A coloração vermelha ou rosa surge após o reagente empregado no experimento (TTC), que é incolor, ser reduzido por microrganismos vivos. Nesse caso, assume-se que quanto menos microrganismos vivos estiverem presentes nos poços, menos intensa será a coloração. No caso do ensaio com *C. albicans*, é esperado que o aparecimento da coloração vermelha seja mais sutil (VEIGA *et al.*, 2019).

Na FIGURA 30 é possível observar que para *E.coli* houve discreta redução do crescimento bacteriano quando testado o óleo essencial na concentração de 200 µL/mL (Linha A, coluna 1 e 2), entretanto, não se pode considerar que essa concentração apresentou atividade antimicrobiana, já que não há inibição de crescimento. O extrato bruto não demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, resultado que vai ao encontro do obtido por Tirloni *et al*.

(2015) ao avaliar a atividade antimicrobiana frente à *E. coli* de extrato etanólico de folhas de *A. edulis*. Arruda *et al*. (2018) também avaliaram o efeito de extratos aquosos de folhas de *A. edulis* sobre *E. coli*, utilizando o método de difusão em placa, e não observaram atividade antimicrobiana. A *E. coli* é uma bactéria gram negativa associada a diversas doenças infecciosas que afetam principalmente o trato urinário e gastrointestinal (LIMA *et al.*, 2016).

FIGURA 30 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *E. coli* ATCC 8738




FONTE: A autora (2023).
Nota: Óleo essencial folha (OEF); Extrato bruto folha (EBF); Branco óleo essencial (OE); Branco extrato bruto (BE); Branco do controle negativo (B C -); Controle positivo (C+): cloranfenicol 250 µg/mL; Controle negativo (C-): água destilada; Controle DMSO (C DMSO): DMSO 1%

A redução de crescimento também foi observada frente à *P. aeruginosa* quando testado do óleo essencial na concentração de 100 µL/mL (linha B; coluna 1 e 2) (FIGURA 31). Óleos essenciais podem ser utilizados como antimicrobianos, tanto de maneira isolada quanto combinados a drogas comerciais para reduzir a toxicidade, aumentar a atividade da droga ou reduzir o risco de desenvolvimento de resistência ao medicamento (FAHED *et al.*, 2016). O mecanismo de ação envolvido na atividade antimicrobiana de óleos essenciais se deve a habilidade do óleo em penetrar a membrana celular, devido a característica lipofílica, levando a alterações nas propriedades físicas e funcionais da célula bacteriana (DAJIĆ-STEVANOVIĆ *et*

*al.*, 2018). A bactéria gram negativa *P. aeruginosa* está associada a infecções em seres humanos afetando pele, olhos, ouvidos e o sistema urinário (LIMA *et al.*, 2016). Ela tem a capacidade de formar biofilmes para se proteger de agentes antimicrobianos, aumentando a chance de desenvolvimento de resistência a fármacos (LI *et al.*, 2023).

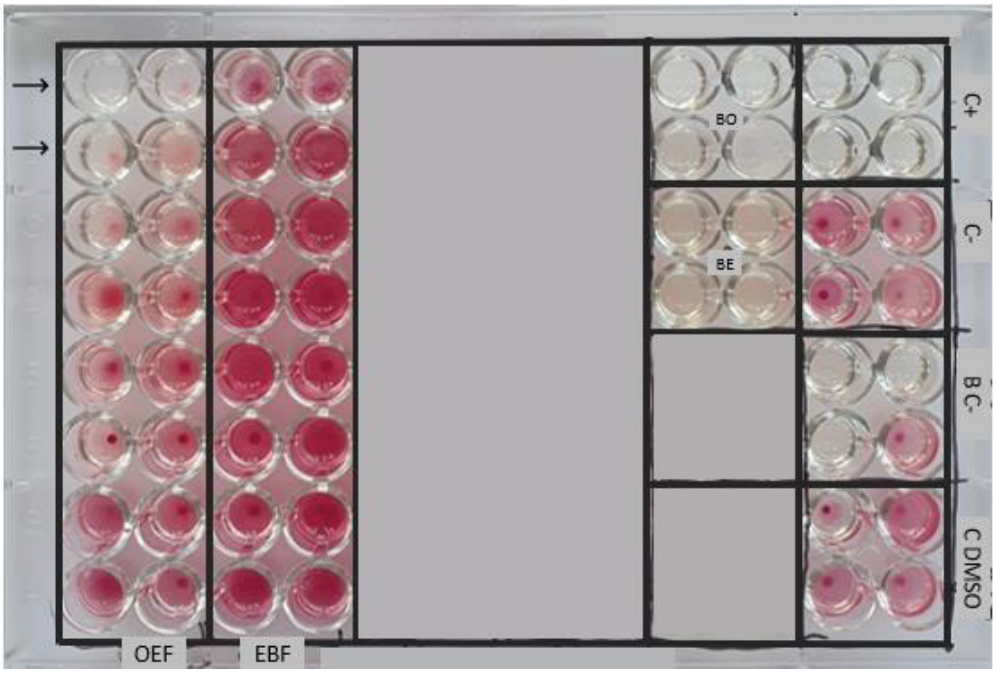
FIGURA 31 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *P. aeruginosa* ATCC 9027

FONTE: A autora (2023).
Nota: Óleo essencial folha (OEF); Extrato bruto folha (EBF); Branco óleo essencial (OE); Branco extrato bruto (BE); Branco do controle negativo (B C -); Controle positivo (C+): cloranfenicol 250 µg/mL; Controle negativo (C-): água destilada; Controle DMSO (C DMSO): DMSO 1%

Quanto a avaliação frente à *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 (FIGURA 32), a redução de crescimento foi mais evidente quando aplicado o óleo essencial nas concentrações de 200 µL/mL (linha A; coluna 1 e 2) e 100 µL/mL (linha B; coluna 1 e 2). Essa atividade pode estar associada ao composto majoritário do óleo essencial, o *E*-nerolidol, uma vez que o composto isolado já demonstrou atividade contra *S. aureus* com CIM de 128 µL/mL (FAHED *et al.*, 2016). Além disso, o óleo essencial de sementes de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), que também possui o *E*-nerolidol como composto majoritário, apresentou atividade antimicrobiana contra *S.*

*aureus* (BRACA *et al.*, 2008). Além de ter como alvo a membrana celular dos microrganismos, óleos essenciais com atividade antimicrobiana podem interferir na produção de ATP e na homeostase do pH da célula microbiana. Alguns óleos podem ainda atuar na inibição da síntese de biofilmes, utilizados para proteção dos microrganismos (LI *et al.*, 2023). No caso de análises envolvendo óleos essenciais, torna-se interessante um valor de CIM inferior a 1,0 µL/mL para que o óleo seja considerado ativo na inibição do microrganismo testado (CHAUDHARI *et al.*, 2019).

FIGURA 32 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *S. aureus* ATTC 6538




FONTE: A autora (2023).

Nota: Óleo essencial folha (OEF); Extrato bruto folha (EBF); Branco óleo essencial (OE); Branco extrato bruto (BE); Branco do controle negativo (B C -); Controle positivo (C+): cloranfenicol 250 µg/mL; Controle negativo (C-): água destilada; Controle DMSO (C DMSO): DMSO 1%

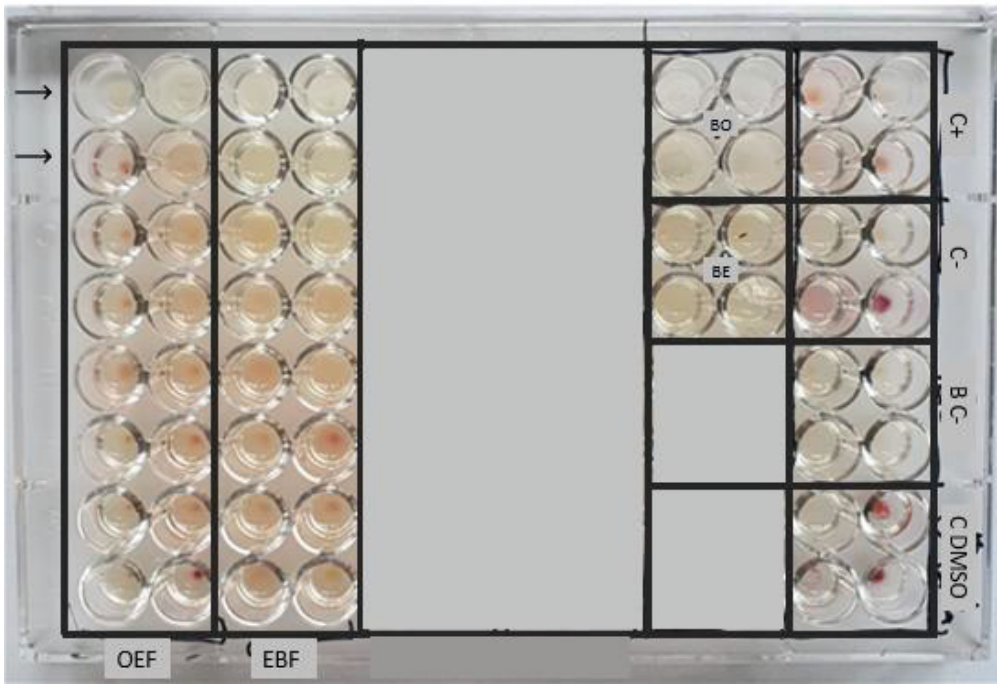
Estudo prévio conduzido com folhas de *A. edulis* demonstrou atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico contra *S. aureus*, contudo, a dose utilizada para tal inibição foi de 150 mg/mL, muito superior a utilizada no presente estudo (TIRLONI *et al.*, 2015). Outra espécie da família Sapindaceae também já demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureu*s, como é o caso do extrato alcoólico de raízes de *Allophylus rubifolius* (Hochst. ex A. Rich.) Engl. (CHHABRA; MAHUNNAH; MSHIU, 1991). O *S. aureus* é uma bactéria gram positiva frequentemente associada a infecções em seres humanos incluindo infecções de tecidos moles e endovasculares, além de pneumonia e sepse (SOUZA *et al.*, 2021).

O óleo essencial de *A. edulis* apresentou melhor atividade de redução do crescimento de bactéria gram positiva, que é o caso do *S. aureus*, quando comparado as bactérias gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Esse comportamento é esperado para óleos essenciais e pode ser observado pela presença de lipopolissacarídeos na membrana celular de bactérias gram negativas que dificultam a entrada de compostos do meio extracelular no microrganismo (DAJIĆ-STEVANOVIĆ *et al.*, 2018; MEHMOOD *et al.*, 2022).

Em relação à *Candida albicans* ATCC 10231, visualmente há inibição de crescimento na concentração 200 µl/mL do óleo essencial (linha A; coluna 1 e 2) e nas concentrações de 1000 (linha A; coluna 3 e 4) e 500 µg/mL (linha B; coluna 3 e 4) do extrato bruto (FIGURA 33). Esse resultado difere do encontrado por Tirloni *et al.* (2015), já que os autores não verificaram redução ou inibição de crescimento de *C. albicans* com a aplicação do extrato etanólico de *A. edulis*. A atividade antimicrobiana do extrato bruto pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos na amostra, como no caso do flavonoide quercetina e dos ácidos fenólicos cafeico e gálico, identificados no extrato bruto de *A. edulis* na presente pesquisa. Tais compostos apresentam atividade antimicrobiana pela reação com a membrana celular do microrganismo, seja pela inativação de enzimas essenciais ou formação de complexos com íons metálicos, influenciando o metabolismo do microrganismo (KHAN *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2018; SULTANA *et al.*, 2023). Além disso, compostos fenólicos também apresentam um potencial anti-biofilme (TEODORO *et al.*, 2015). O ácido cafeico, em específico, pode apresentar atividade antimicrobiana pela doação de prótons e acidificação do meio, levando a ruptura da célula bacteriana (PINHO; SOARES; HENRIQUES, 2015). Já a redução do crescimento apresentada com a aplicação do óleo essencial, pode estar relacionada a presença do *E*-nerolidol, composto majoritário do óleo que pode modular o crescimento de *Candida albicans* (CURVELO *et al.*, 2014).

Avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais é relevante, uma vez que é crescente a resistência a antibióticos conhecidos e compostos extraídos de plantas poderiam ser utilizados como nova estratégia de tratamento a infecções. Além disso, os efeitos colaterais em decorrência do uso de antibióticos sintéticos são muito maiores quando comparado ao uso de produtos naturais (KRIST *et al.*, 2015; MEHMOOD *et al.*, 2022).

FIGURA 33 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *A. edulis* FRENTE À *C. albicans* ATCC 10231




FONTE: A autora (2023).

Nota: Óleo essencial folha (OEF); Extrato bruto folha (EBF); Branco óleo essencial (OE); Branco extrato bruto (BE); Branco do controle negativo (B C -); Controle positivo (C+): cetoconazol 500 µg/mL; Controle negativo (C-): água destilada; Controle DMSO (C DMSO): DMSO 1%

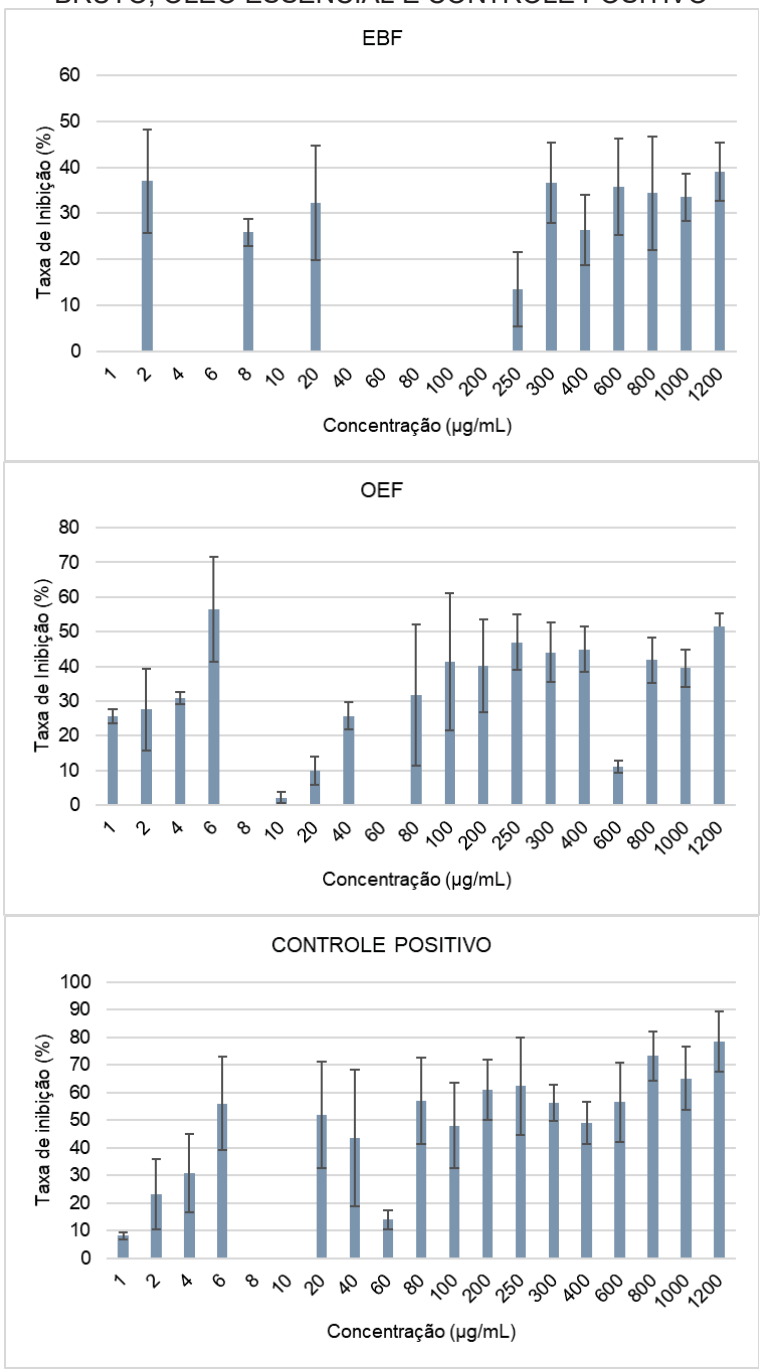
*Candida albicans* é um fungo que coloniza o trato gastrointestinal e genital dos seres humanos. Contudo, em determinadas situações, torna-se um patógeno relacionado a infecções que variam das mais leves, como as de mucosa, até infecções generalizadas que podem levar a morte do indivíduo. No caso de pacientes hospitalizados, sobretudo os em terapia intensiva, a infecção por *C. albicans* pode aumentar o tempo de internamento, as taxas de mortalidade e os custos com internamento. Conhecer mais uma opção para a restrição de crescimento do fungo é de grande valia, já que um desafio encontrado no tratamento é a resistência que a *C. albicans* pode apresentar a antifúngicos disponíveis no mercado (TEODORO *et al.*, 2015; WANG, YAN, 2015; WITCHLEY *et al.*, 2019).

### 4.4.2 Atividade Anti-*Botrytis cinerea*

O extrato bruto e o óleo essencial de folhas de *A. edulis* não apresentaram atividade antifúngica frente ao fungo *Botrytis cinerea* nas concentrações testadas. Essa afirmação se deve ao fato de não ser possível determinar a CIM, uma vez que

em nenhuma das concentrações testadas do óleo ou do extrato bruto houve 100% de inibição de crescimento fúngico. Analisando os dados de densidade ótica obtidos com a leitura das placas e, comparando com os dados de densidade ótica da testemunha (inóculo e água), foi possível calcular o percentual de inibição de crescimento fúngico (FIGURA 34).

FIGURA 34 - TAXA DE INIBIÇÃO DO FUNGO *Botrytis cinerea* PROVOCADA PELO EXTRATO BRUTO, ÓLEO ESSENCIAL E CONTROLE POSITIVO




FONTE: A autora (2023).
Nota: Extrato bruto folha (EBF); Óleo essencial folha (OEF); Controle positivo (Sumilex ®); Taxa de inibição (%) com relação à testemunha.

O óleo essencial de folhas de *A. edulis* apresentou maiores taxas de inibição do crescimento de *Botrytis cinerea* que o extrato bruto, inibindo 56,48% (± 15,22%) e 51,61% (± 3,62%) do crescimento fúngico nas concentrações de 6 µg/mL e 1200 µg/mL, respectivamente. O potencial antifúngico do óleo essencial poderia estar relacionado a presença de mono e sesquiterpenos na composição e na sinergia existente entre os compostos (AMIRI *et al.*, 2021). A natureza lipofílica do óleo essencial permite que haja interação com a membrana celular do fungo, levando a lise celular e inibição da síntese proteica (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

Os resultados de taxa de inibição não podem ser considerados como determinantes de atividade antifúngica, uma vez que se baseiam em dados de densidade ótica de misturas contendo inóculo e extrato ou óleo essencial ou inóculo e água. A adição do extrato ou óleo em meio aquoso poderia influenciar os resultados de densidade ótica, afetando os resultados. Adicionalmente, foi conduzido o ensaio de crescimento micelial a fim de verificar se o extrato bruto e o óleo essencial apresentavam resultado positivo em meio de cultura sólido. Os resultados são baseados na medida do crescimento do micélio (TABELA 6).

TABELA 16 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *B. cinerea*

| **Amostra** | **Concentração (µg/mL)** | **Diâmetro inicial (mm)** | **Diâmetro final (mm) M (±DP)** | **Taxa de inibição (%) M (±DP)** |
|---|---|---|---|---|
| Controle - | - | 5,15 | 50,44 (0,00) | 0 |
| EBF | 50 | 5,15 | 50,44 (0,00) | 0 |
| EBF | 100 | 5,15 | 50,44 (0,00) | 0 |
| OEF | 50 | 5,15 | 50,44 (0,00) | 0 |
| OEF | 100 | 5,15 | 50,44 (0,00) | 0 |
| Controle + | 50 | 5,15 | 17,01 (0,66) | 76,50 (1,30) |
| Controle + | 100 | 5,15 | 15,57 (0,25) | 79,34 (0,50) |

FONTE: A autora (2023).
Nota$_1$: extrato bruto (EBF); óleo essencial (OEF).
Nota$_2$: controle negativo: apenas inóculo; controle positivo: fungicida Sumilex®.

Como pode ser observado, nem o extrato bruto e nem o óleo essencial de folhas de *A. edulis* demonstraram atividade antifúngica frente a *B. cinerea* por redução do crescimento micelial, enquanto o fungicida Sumilex ® apresentou inibição superior a 75% nas duas concentrações testadas. Dessa forma, verifica-se que folhas de *A. edulis* não apresentam, de fato, atividade fungicida contra *B. cinerea*. Até onde se sabe, não foram publicados estudos acerca do potencial antifúngico contra *B. cinerea* de folhas de *A. edulis*, sendo esse um resultado inédito.

O fungo *Botrytis cinerea* é o responsável pela doença do mofo cinzento em mais de 1400 espécies vegetais, acometendo diferentes órgãos da planta como frutos, galhos, folhas e flores e gerando impactos negativos do ponto de vista de rendimento da produção e, consequentemente, econômico (GUO *et al.*, 2023). Devido à alta variabilidade genética, grande formação de esporos e necessidade de maior montante de pulverizações de antifúngicos para controle, o *B. cinerea* é um fungo com alto risco para desenvolvimento de resistência a antifúngicos sintéticos (FAN *et al.*, 2017). Nesse sentido, o desenvolvimento de um produto alternativo, advindo de fontes naturais, poderia ser uma alternativa promissora no controle fúngico.

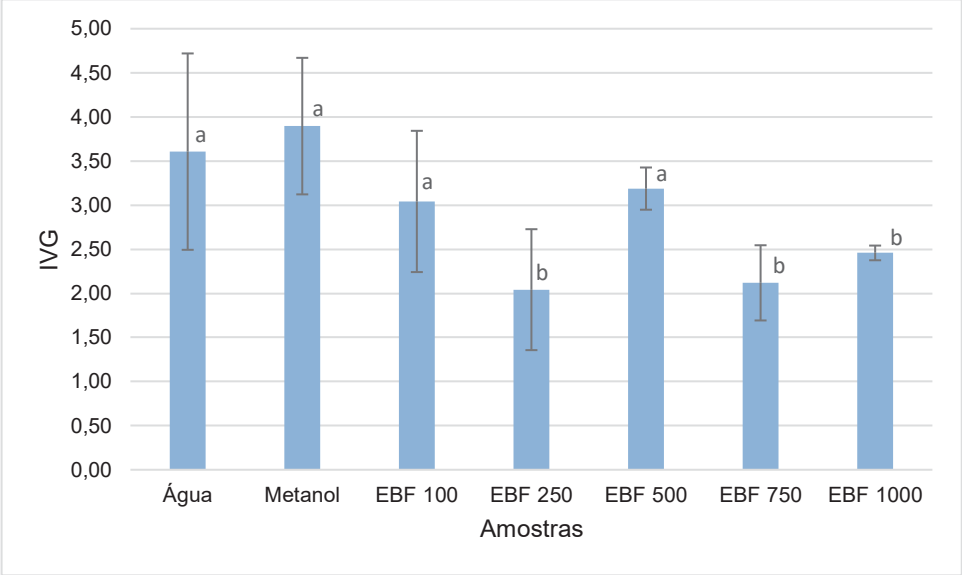
### 4.4.3 Atividade Alelopática

Ao avaliar a atividade alelopática, buscou-se analisar se o extrato bruto e o óleo essencial de folhas de *A. edulis* apresentavam efeito inibitório ou estimulante sobre o desenvolvimento de outras espécies vegetais. Para tanto, foram avaliados os impactos na germinação e no crescimento de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*). A modificação dos parâmetros de crescimento e germinação fornecem dados indiretos de alterações de processos fisiológicos das plantas provocadas pela ação de aleloquímicos (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000).

#### 4.4.3.1 Germinação

O extrato bruto nas concentrações de 250, 750 e 1000 µg/mL levou a redução da velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* quando comparado ao controle negativo do experimento (água), com percentuais de redução variando de 31,8% (1000 µg/mL) a 43,5% (250 µg/mL) (GRÁFICO 1). Já o óleo essencial, não demonstrou influência na germinação das sementes de alface (GRÁFICO 2). A inibição da germinação de sementes pode ocorrer por interações entre os compostos que levam a alteração da divisão celular e mobilização de nutrientes armazenados (RASHIDI *et al.*, 2021).

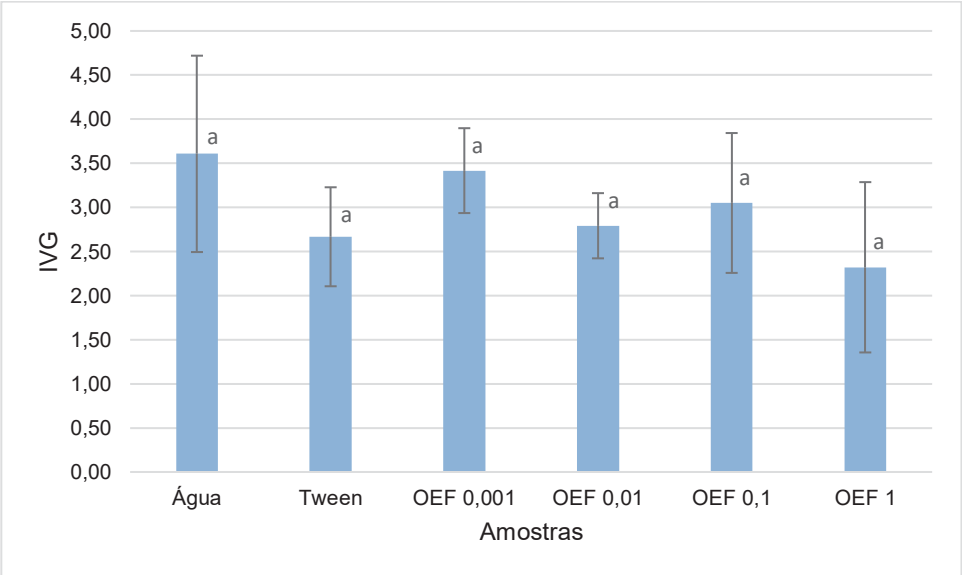
GRÁFICO 1 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *L. sativa*




FONTE: A autora (2023).

Nota: Índice de velocidade de germinação (IVG); extrato bruto a 100 µg/mL (EBF 100); extrato bruto a 250 µg/mL (EBF 250); extrato bruto a 500 µg/mL (EBF 500); extrato bruto a 750 µg/mL (EBF 750); extrato bruto a 1000 µg/mL (EBF 1000). Água e metanol: controles negativos. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de p <0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

GRÁFICO 2 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *L. sativa*



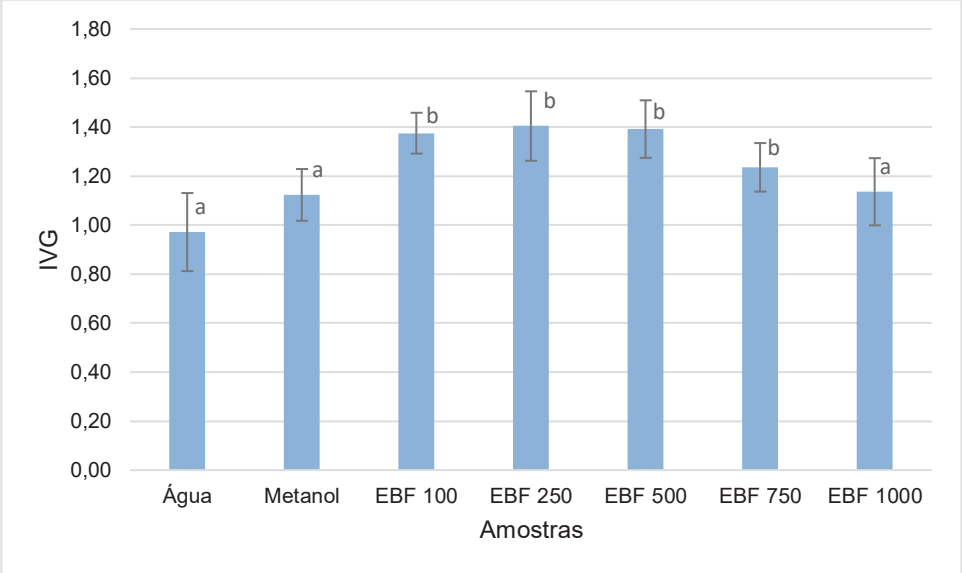

FONTE: A autora (2023).

Nota: Índice de velocidade de germinação (IVG); óleo essencial a 0,001% (OEF 0,001); óleo essencial a 0,01% (OEF 0,01); óleo essencial a 0,1% (OEF 0,1); óleo essencial a 1% (OEF 1). Água e Tween: controles negativos.Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de p <0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

Os controles metanol, tween ou água não diferiram significativamente (GRÁFICOS 1 e 2), ou seja, esses compostos não interfeririam na germinação das sementes.

Diferentemente do observado em sementes de *Lactuca sativa*, o extrato bruto nas concentrações de 100, 250, 500 e 750 µg/mL esteve associado ao aumento da velocidade de germinação das sementes de *Allium cepa*, conforme pode ser observado no GRÁFICO 3. Por se tratar de um sistema vivo, é esperado que diferentes espécies apresentem variabilidade de resposta aos tratamentos. Um mesmo composto, por exemplo, pode induzir a efeitos opostos em espécies diferentes, como é o caso do ensaio em questão (*Lactuca sativa* e *Allium cepa*) (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000).

GRÁFICO 3 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *A. cepa*

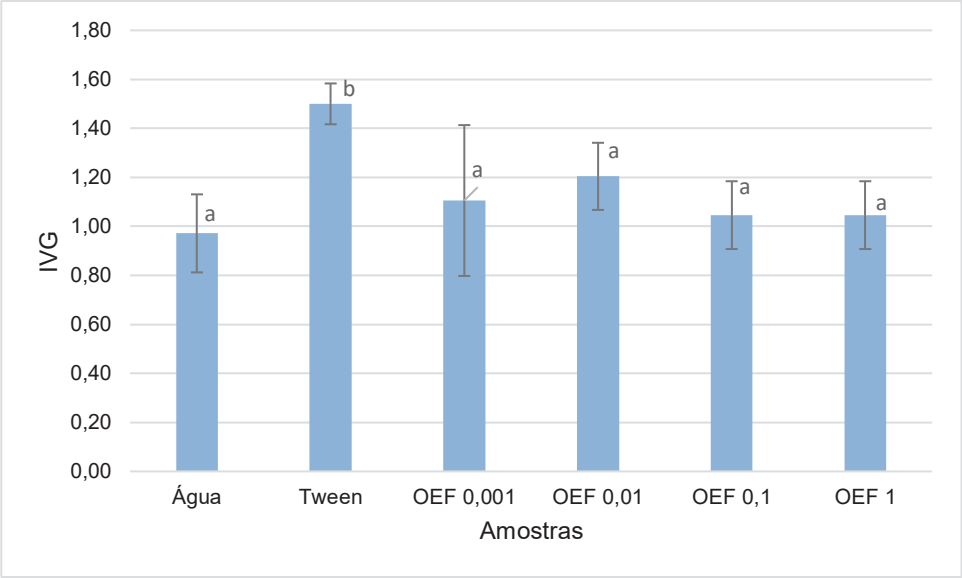



FONTE: A autora (2023).
Nota: Índice de velocidade de germinação (IVG); extrato bruto a 100 µg/mL (EBF 100); extrato bruto a 250 µg/mL (EBF 250); extrato bruto a 500 µg/mL (EBF 500); extrato bruto a 750 µg/mL (EBF 750); extrato bruto a 1000 µg/mL (EBF 1000). Água e metanol: controles negativos. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de p <0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

O óleo essencial não demonstrou efeito sobre o índice de velocidade de germinação das sementes, demonstrando ausência de influência do óleo essencial na germinação (GRÁFICO 4). A germinação pode ser menos afetada que o crescimento de espécies em virtude da composição de aleloquimicos (GURGEL *et al.*, 2019). É importante ressaltar que nesse experimento o controle Tween 80 diferiu

estatisticamente do controle água, indicando que o polisorbato poderia ter algum efeito sobre o aumento do IVG de sementes de *A. cepa*. Entretanto, o mesmo não se observa nas amostras testadas, diluídas em solução de Tween 80. De qualquer forma, estudos mais aprofundados sobre o efeito alelopático do óleo essencial de *A. edulis* sobre *A. cepa* ainda precisam ser conduzidos.

GRÁFICO 4 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *A. cepa*




FONTE: A autora (2023).
Nota: Índice de velocidade de germinação (IVG); óleo essencial a 0,001% (OEF 0,001); óleo essencial a 0,01% (OEF 0,01); óleo essencial a 0,1% (OEF 0,1); óleo essencial a 1% (OEF 1). Água e Tween: controles negativos.Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de p <0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

#### 4.4.3.2 Crescimento

O extrato bruto não apresentou atividade alelopática sobre o crescimento do hipocótilo da alface, mas nas concentrações de 250, 750 e 1000 µg/mL, foi capaz de reduzir o crescimento da radícula em até 28% (750 µg/mL). O óleo essencial a 1% teve ação inibitória no crescimento das plântulas, interferindo tanto no crescimento do hipocótilo (0,50 mm ± 1,47) quanto da radícula (5,33 mm ± 1,61), com redução de 96,7% e 56,8%, respectivamente quando comparado ao padrão água destilada. O óleo essencial a 0,1% também influenciou no crescimento do hipocótilo, levando a redução de 67% do comprimento (TABELA 17).

TABELA 147 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O CRESCIMENTO DE *L. sativa*

| **Amostras** | **Hipocótilo (mm)** | **Radícula (mm)** |
|---|---|---|
| Água destilada | 15,00 ± 12,76 [a] | 12,35 ± 6,28 [a] |
| Metanol | 13,35 ± 10,14 [a] | 12,77 ± 5,75 [a] |
| EBF 100 | 10,78 ± 5,83 [a] | 12,11 ± 3,86 [a] |
| EBF 250 | 15,53 ± 11,21 [a] | 10,63 ± 6,40 [b] |
| EBF 500 | 19,37 ± 9,19 [a] | 14,68 ± 4,96 [a] |
| EBF 750 | 13,00 ± 11,19 [a] | 8,87 ± 4,34 [b] |
| EBF 1000 | 17,78 ± 10,52 [a] | 10,44 ± 2,77 [b] |
| Água destilada | 15,00 ± 12,76 [a] | 12,35 ± 6,28 [a] |
| Tween 80 1% | 18,35 ± 10,46 [a] | 14, 15 ± 5,25 [a] |
| OEF 0,001% | 15,67 ± 11,55 [a] | 18,07 ± 10,35 [a] |
| OEF 0,01% | 12,19 ± 7,77 [a] | 15,13 ± 6,91 [a] |
| OEF 0,1% | 4,95 ± 5,15 [b] | 14,95 ± 7,32 [a] |
| OEF 1% | 0,50 ± 1,47 [b] | 5,33 ± 1,61 [b] |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto a 100 µg/mL (EBF 100); extrato bruto a 250 µg/mL (EBF 250); extrato bruto a 500 µg/mL (EBF 500); extrato bruto a 750 µg/mL (EBF 750); extrato bruto a 1000 µg/mL (EBF 1000); óleo essencial a 0,001% (OEF 0,001); óleo essencial a 0,01% (OEF 0,01); óleo essencial a 0,1% (OEF 0,1); óleo essencial a 1% (OEF 1). Água destilada, metanol e tween: controles negativos.
Letras iguais na mesma coluna e no mesmo bloco de amostras não apresentam diferença estatística significativa a nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Scott-Knott.

O extrato bruto na concentração de 250 µg/mL apresentou o maior potencial de restrição do crescimento tanto do hipocótilo (37,55%), quanto da radícula (35,43%) da cebola quando comparado ao padrão água destilada. A concentração de 1000 µg/mL também foi capaz de inibir o crescimento de ambas as partes avaliadas, enquanto a concentração de 100 µg/mL teve influência apenas no crescimento do hipocótilo e a de 750 µg/mL no crescimento da radícula. É possível observar também que o extrato bruto na concentração de 500 µg/mL estimulou o crescimento do hipocótilo (TABELA 18). Dessa forma, pode-se dizer que a ação do extrato bruto sobre plântulas de *Allium cepa* não foi dose dependente, diferentemente do já relatado em literatura. Yajía *et al.* (1999), ao avaliarem o efeito de extrato aquoso de folhas de *A. edulis* sobre *A. cepa,* identificaram que houve significativa redução no comprimento das raízes de *A. cepa* com o aumento da concentração de extrato aquoso de *A. edulis* testada. O extrato bruto de folhas *in natura* e a infusão de folhas secas de *A. edulis* também já demonstraram ser genotóxicos sobre células meristemáticas de *A. cepa*, provocando alterações cromossômicas durante a divisão celular em outro estudo (PASQUALLI; TEDESCO; TEDESCO, 2015).

A respeito do óleo essencial, verifica-se que, assim como foi observado com plântulas de alface, a maior concentração testada (1%) teve potencial de restringir

de forma mais intensa o crescimento tanto da radícula quanto do hipocótilo, com percentuais de redução de 84,8% para hipocótilo e 56,7% para radícula, quando comparados ao padrão água. A restrição de crescimento de hipocótilo e radícula pode estar associada à mecanismos de ação que levem a redução da divisão celular e a alterações nos hormônios de crescimento (RASHIDI *et al.*, 2021).

TABELA 158 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *A. edulis* SOBRE O CRESCIMENTO DE *A. cepa*

| **Amostras** | **Hipocótilo (mm)** | **Radícula (mm)** |
|---|---|---|
| Água destilada | 56,93 ± 12,88 [b] | 16,65 ± 9,90 [a] |
| Metanol | 61,72 ± 14,60 [b] | 16,61 ± 8,10 [a] |
| EBF 100 | 50,90 ± 16,57[c] | 20,00 ± 7,95 [a] |
| EBF 250 | 35,55 ± 7,92 [d] | 10,75 ± 3,11 [b] |
| EBF 500 | 74,32 ± 19,95 [a] | 16,79 ± 6,78 [a] |
| EBF 750 | 60,68 ± 22,56 [b] | 13,89 ± 8,25 [b] |
| EBF 1000 | 52,47 ± 18,46 [c] | 12,42 ± 6,95 [b] |
| Água destilada | 56,93 ± 12,88 [a] | 16,65 ± 9,90 [a] |
| Tween 80 1% | 66,75 ± 12,87 [a] | 25,67 ± 7,93 [a] |
| OEF 0,001% | 57,06 ± 29,88 [a] | 24,50 ± 13,05 [a] |
| OEF 0,01% | 45,33 ± 27,48 [b] | 13,00 ±13,18 [b] |
| OEF 0,1% | 42,94 ± 28,19 [b] | 17,50 ±15,96 [a] |
| OEF 1% | 8,64 ± 4,60 [c] | 7,21 ± 7,05 [b] |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto a 100 µg/mL (EBF 100); extrato bruto a 250 µg/mL (EBF 250); extrato bruto a 500 µg/mL (EBF 500); extrato bruto a 750 µg/mL (EBF 750); extrato bruto a 1000 µg/mL (EBF 1000); óleo essencial a 0,001% (OEF 0,001); óleo essencial a 0,01% (OEF 0,01); óleo essencial a 0,1% (OEF 0,1); óleo essencial a 1% (OEF 1). Água destilada, metanol e tween: controles negativos.
Letras iguais na mesma coluna e no mesmo bloco de amostras não apresentam diferença estatística significativa a nível de $p < 0,05$ pelo Teste de Scott-Knott.

Os impactos de restrição ou estímulo de germinação provocados pelo extrato bruto em sementes de *L. sativa* e *A. cepa*, respectivamente, e as alterações de comprimento de hipocótilo e radícula após o tratamento com extrato bruto e óleo essencial demonstram que a espécie *A. edulis* possivelmente apresenta compostos com atividade alelopática.

A respeito do efeito do extrato bruto, pode-se associar a presença de compostos fenólicos na amostra, pois substâncias pertencentes à classe dos fenólicos, terpenoides, ácidos graxos e ácidos orgânicos podem exercer atividade alelopática, ou seja, interferir na germinação e crescimento e outras espécies vegetais (BOUAFIANE *et al.*, 2021). A quercetina, um flavonoide identificado no extrato bruto, conhecidamente apresenta potencial alelopático por afetar a respiração mitocondrial (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004).

A atividade alelopática do óleo essencial pode estar associada a presença de α-pineno, um dos compostos majoritários (19,20%) identificados no presente estudo. O α-pineno pode influenciar o fluxo de elétrons na cadeia de citocromos durante a fotossíntese, podendo afetar a germinação e crescimento de plantas (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004). Como o α-pineno corresponde a apenas 19,20% do óleo essencial, a dose dependência para o efeito alelopático sobre o crescimento de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* estaria de acordo com os achados do presente estudo, no qual, a maior concentração testada apresentou os resultados mais promissores.

Apesar de serem citados os compostos que já apresentam descrição na literatura de atividade alelopática e foram encontrados na presente pesquisa como a quercetina ou α-pineno, é importante ressaltar que a mistura complexa de compostos presentes em uma espécie vegetal é mais determinante da atividade alelopática do que um único composto, visto que efeitos sinérgicos ou antagônicos podem ser observados (GATTO *et al.*, 2021).

Em suma, o extrato bruto apresentou efeito alelopático na diminuição do índice de velocidade de germinação de sementes de *L. sativa* e estímulo na germinação de *A. cepa*, mas não de forma dose dependente. Já o óleo essencial a 1% foi a amostra mais promissora na restrição do crescimento de *A. cepa* e *L. sativa* quando comparado ao controle negativo do experimento. Dessa forma, poderia ser considerada uma opção de herbicida natural, agindo tanto em uma monocotiledônea quanto em uma dicotiledônea. Para tanto, estudos mais aprofundados em estufas e campos de produção devem ser conduzidos. De qualquer forma, buscar alternativas naturais para o controle de pragas na produção agrícola é de grande valia, já que o uso de herbicidas é crescente e traz impactos negativos a saúde humana e ao meio ambiente (GURGEL *et al.*, 2019)

### 4.4.4 Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida do extrato bruto e óleo essencial de *A. edulis* foi avaliada contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Os resultados de percentual de mortalidade, concentração letal 50 ($CL_{50}$) e concentração letal 90 ($CL_{90}$) encontram-se descritos na TABELA 19. Tanto o extrato bruto quanto o óleo essencial apresentaram atividade larvicida, com destaque para o óleo que apresentou

concentração letal capaz de levar a morte 50% das larvas testadas de 1,18 µg/mL. É importante destacar que não foi observada mortalidade de larvas no controle negativo do experimento (água). Esse resultado é considerado inédito e promissor, pois, até onde se tem conhecimento, não existem estudos sobre a atividade larvicida de *A. edulis* contra *A. aegypti*. Além disso, óleos essenciais ou extratos que demonstrem $CL_{50}$ inferior a 50 µg/mL são considerados altamente ativos conta *A. aegypti* (KOMALAMISRA *et al*., 2005; ROCHA *et al*., 2022). A melhor atividade do óleo pode estar relacionada a polaridade dos compostos presentes na amostra, já que os compostos lipofílicos teriam maior facilidade em penetrar nas membranas celulares e cutículas das larvas quando comparado aos compostos mais polares presentes no extrato bruto (FALKOWSKI *et al.*, 2020).

TABELA 19 - ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE *Aedes aegypti* DE EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL *A. edulis*

| **Amostra** | **Concentração (µg/mL)** | **Mortalidade (%)± DP** | **$CL_{50}$ (µg/mL) (LI – LS)** | **$CL_{90}$ (µg/mL) (LI – LS)** | **$X^2$** | **df** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EBF | 1000 | 85 (±5,77) | 7,57 (0,24 – 25,48) | >1000 | 0,766 | 1 |
| | 100 | 77,5 (±5,00) | | | | |
| | 10 | 50 (±8,16) | | | | |
| OEF | 1000 | 97,5 (±5,00) | 1,18 (0,42 – 2,59) | 203,47 (85,03 – 682,52) | 4,494 | 5 |
| | 500 | 95 (±5,77) | | | | |
| | 250 | 85 (±5,77) | | | | |
| | 100 | 82,5 (±5,00) | | | | |
| | 10 | 77,5 (±9,57) | | | | |
| | 1 | 52,5 (±5,00) | | | | |
| | 0,1 | 22,5 (±5,00) | | | | |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto (EBF); óleo essencial (OEF), concentração letal 50% ($CL_{50}$), concentração letal 90% ($CL_{90}$); limite inferior (LI); limite superior (LS); qui-quadrado ($x^2$); graus de liberdade (df)

Outras espécies da família Sapindaceae já demonstraram atividade larvicida frente *A. aegypti*, entretanto, com CL50 superior a obtida no presente estudo para *A. edulis*. Extratos etanólicos de frutos de *Matayba arborescens* (espeturana-liso) e *Cupania scrobiculata* (cajuzinho) apresentaram $CL_{50}$ de 76,9 µg/mL e 105,3 µg/mL, respectivamente (FALKOWSKI *et al.*, 2020). A *Magonia pubescens* (timbó), outra espécie da família Sapindaceae, demonstrou apresentar atividade larvicida contra *A. aegypti* por provocar alterações morfológicas no tubo digestivo das larvas (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003).

Esse resultado torna-se ainda mais relevante, pois o *Aedes aegypti* é vetor para doenças prevalentes no Brasil como Dengue, Zika e Chikungunya, as quais

não possuem uma droga específica para tratamento e o controle do mosquito é a medida preventiva mais adequada (SILVA *et al.*, 2022). A dengue, em especial, é uma doença endêmica no Brasil e responsável pela morte de um elevado número de indivíduos. Em 2022, foram registrados 1.414.797 casos prováveis de dengue no país e 987 óbitos (BRASIL, 2022). Uma das formas de realizar o controle do mosquito é a nebulização com inseticidas sintéticos como organofosforados e piretroides, entretanto, o uso de tais inseticidas pode levar a presença de mosquitos resistentes e a contaminação do meio ambiente, além do potencial tóxico aos seres humanos e outros animais (FUJIWARA *et al.*, 2017; SPINOZZI *et al.*, 2021). Nesse sentido, o desenvolvimento de produtos naturais com ação efetiva contra o mosquito é uma alternativa sustentável, tanto no sentido de proteção do meio ambiente e da saúde dos indivíduos contra contaminação de produtos químicos, quanto no incentivo da preservação do *A. edulis*, uma espécie da biodiversidade brasileira.

A atividade do óleo essencial está possivelmente relacionada a presença de terpenos, uma classe de compostos que conhecidamente apresentam atividade larvicida (CARVALHO; CRUZ; SOUZA, 2023). Óleos com predominância de sesquiterpenos, assim como o óleo essencial de *A. edulis*, parecem apresentar resultados mais promissores na atividade inseticida (LUZ *et al.*, 2020). Dentre os compostos majoritários do óleo essencial, o sesquiterpeno *E*-nerolidol já demonstrou atividade larvicida contra *A. aegypti*, sendo que 100 µg/mL do composto isolado foi capaz de levar a mortalidade de 95 ± 2,8 % das larvas (PARK *et al.*, 2011). O monoterpeno α-pineno não foi considerado por Silva *et al*. (2022) um composto com potencial larvicida por levar a mortalidade menos de 10% das larvas testadas, contudo, há relatos na literatura que o α-pineno, assim como outros monoterpenos, agem como neurotóxicos no sistema colinérgico das larvas, levando a mortalidade (SPINOZZI *et al.*, 2021). Resultados apresentados por Park *et al.* (2011) mostram que o α-pineno apresenta, de fato, menor atividade larvicida que o *E*-nerolidol, pois, na mesma concentração testada, teve o poder de levar a mortalidade 40% das larvas, enquanto o *E*-nerolidol a 95%. O 10-epi-γ-eudesmol, terceiro composto mais abundante no óleo essencial de *A. edulis*, já demonstrou apresentar efeito repelente contra o *Aedes aegypti* (PALUCH *et al.*, 2009). Apesar de não serem compostos majoritários, cariofileno e espatulenol estão presentes no óleo essencial de *A. edulis* e são compostos que são frequentemente relacionados a atividade inseticida (CARVALHO; CRUZ; SOUZA, 2023). Dessa forma, poderiam contribuir de forma

sinérgica para a atividade inseticida do presente estudo (PARK *et al.*, 2011; SPINOZZI *et al.*, 2021).

A atividade larvicida apresentada pelo extrato bruto pode estar relacionada a presença de compostos bioativos da classe dos triterpenos e flavonoides (CARVALHO; CRUZ; SOUZA, 2023). Ambas as classes foram identificadas qualitativamente no presente estudo por meio de cromatografia de camada delgada e a quercetina, um flavonoide identificado por HPLC no extrato bruto.

Como mencionado anteriormente, não foram encontrados relatos na literatura da atividade larvicida ou inseticida de *A. edulis* contra *A. aegypti*. A atividade inseticida ou repelente da espécie *A. edulis* foi testada previamente frente à outros insetos, contudo, apenas extratos obtidos dos galhos da planta demonstraram atividade para *Myzus persicae* e *Epilachna paenulata*, insetos que atacam a produção de pêssego e abóbora, respectivamente (DÍAZ *et al.*, 2014).

### 4.4.5 Atividade Hemolítica *in vitro*

Verifica-se que as amostras testadas não apresentaram potencial hemolítico, assim como o padrão rutina, quando comparadas ao controle positivo do ensaio (Triton 1%) e ao padrão saponina (TABELA 20) uma vez que extratos vegetais são considerados tóxicos quando excedem 30% de atividade hemolítica (KUNDISHORA; SITHOLE; MUKANGANYAMA, 2020).

TABELA 20 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA IN VITRO DE EXTRATO BRUTO E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *A. edulis*

(continua)

| **Amostras** | **Concentração (µg/mL)** | **Atividade Hemolítica (%)** |
|---|---|---|
| EBF | 75 | 3,16 (±0,86) [a] |
| | 100 | 2,94 (±0,14) [a] |
| | 250 | 2,79 (±0,59) [a] |
| | 500 | 0,36 (±0,09) [a] |
| | 750 | 3,03 (±0,10) [a] |
| | 1000 | 5,31 (±0,92) [a] |
| OEF | 75 | 4,25 (±0,42) [a] |
| | 100 | 2,06 (±0,05) [a] |
| | 250 | 3,27 (±0,60) [a] |
| | 500 | 2,61 (±0,38) [a] |
| | 750 | 5,43 (±1,04) [a] |
| | 1000 | 4,10 (±0,27) [a] |

(conclusão)

| Amostras | Concentração (µg/mL) | Atividade Hemolítica (%) |
|---|---|---|
| Rutina | 75 | 5,10 (±0,18) [a] |
| | 100 | 0,96 (±0,04) [a] |
| | 250 | 3,12 (±0,45) [a] |
| | 500 | 4,59 (±1,02) [a] |
| | 750 | 5,83 (±1,29) [a] |
| | 1000 | 3,37 (±0,09) [a] |
| Saponina | 75 | 9,56 (±1,84) [a] |
| | 100 | 32,31 (±6,57) [b] |
| | 250 | 29,19 (±7,63) [b] |
| | 500 | 170,35 (±7,65) [d] |
| | 750 | 109,85 (±7,94) [c] |
| | 1000 | 185,80 (±7,65) [e] |
| Triton 1% (controle positivo) | - | 100 [c] |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto (EBF); óleo essencial (OEF); Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de p <0,05 pelo Teste de Tukey.

O padrão de saponinas utilizado apresentou atividade hemolítica, superando os resultados encontrados com o controle positivo (Triton 1%), nas concentrações superiores a 500 µg/mL. Saponinas são conhecidas por possuir toxicidade hemolítica devido a formação de complexo com o colesterol presente na membrana celular dos eritrócitos levando a aumento da permeabilidade e hemólise (FANG *et al.*, 2020). Os controles negativos do experimento (PBS, metanol e DMSO) não demonstraram atividade hemolítica.

No presente estudo não foi identificada uma relação dose-dependência no extrato bruto e óleo essencial avaliados, pois a atividade hemolítica não aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração testada. Esse fato pode ser justificado pela diversidade de compostos presentes nas amostras, já que plantas e extratos de plantas podem apresentar tanto compostos tóxicos aos eritrócitos, como compostos com ação protetora (KUNDISHORA; SITHOLE; MUKANGANYAMA, 2020). O extrato bruto, por exemplo, contém ácido cafeico, o qual é capaz de inibir a peroxidação lipídica da hemoglobina (KASSA *et al.*, 2021). Testes de toxicidade, incluindo a avaliação da atividade hemolítica *in vitro*, vem sendo bastante utilizados para identificar o potencial risco de uso de diversas plantas medicinais (KUNDISHORA; SITHOLE; MUKANGANYAMA, 2020).

### *4.4.6* Atividade Tóxica em *Artemia salina*

Os resultados de atividade tóxica frente ao microcrustáceo *Artemia salina* são apresentados na TABELA 1 a seguir. Verifica-se que o óleo essencial de folhas

de *A. edulis* se mostrou o mais tóxico dentre as amostras avaliadas, levando a mortalidade de todos os náuplios em todas as concentrações testadas. O óleo essencial apresentou maior toxicidade que o composto usado como controle positivo no experimento, o qual apresentou $CL_{50}$ de 12,71 µg/mL. Como o óleo essencial levou a mortalidade de todos os organismos testados, pressupõe-se que a $CL_{50}$ seja inferior a 1 µg/mL.

TABELA 21 - ATIVIDADE TÓXICA DE *A. edulis* FRENTTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina* Lech.

(continua)

| **Amostra** | **Concentração (µg/mL)** | **Mortalidade (%)** | **$CL_{50}$ (µg/mL) (LI – LS)** | **$CL_{90}$ (µg/mL) (LI – LS)** | **$X^2$** | **df** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EBF | 50 | 10,71 | - | - | - | - |
| | 100 | 6,90 | | | | |
| | 250 | 17,24 | | | | |
| | 500 | 15,38 | | | | |
| | 750 | 12,00 | | | | |
| | 1000 | 4,00 | | | | |
| FHF | 50 | 0 | > 1000 | > 1000 | 0,65 | 4 |
| | 100 | 0 | | | | |
| | 250 | 0 | | | | |
| | 500 | 0 | | | | |
| | 750 | 0 | | | | |
| | 1000 | 3,33 | | | | |
| FCF | 50 | 17,24 | - | - | - | - |
| | 100 | 6,90 | | | | |
| | 250 | 10,00 | | | | |
| | 500 | 17,24 | | | | |
| | 750 | 7,41 | | | | |
| | 1000 | 10,71 | | | | |
| FAEF | 50 | 44,83 | - | - | - | - |
| | 100 | 10,34 | | | | |
| | 250 | 0 | | | | |
| | 500 | 0 | | | | |
| | 750 | 0 | | | | |
| | 1000 | 3,33 | | | | |
| FRF | 50 | 31,03 | - | - | - | - |
| | 100 | 3,45 | | | | |
| | 250 | 10,34 | | | | |
| | 500 | 23,33 | | | | |
| | 750 | 17,86 | | | | |
| | 1000 | 7,41 | | | | |
| OEF | 1 | 100,00 | - | - | - | - |
| | 2,5 | 100,00 | | | | |
| | 10 | 100,00 | | | | |
| | 50 | 100,00 | | | | |
| | 100 | 100,00 | | | | |
| | 250 | 100,00 | | | | |
| | 500 | 100,00 | | | | |
| | 750 | 100,00 | | | | |
| | 1000 | 100,00 | | | | |

(conclusão)

| Amostra | Concentração (µg/mL) | Mortalidade (%) | $CL_{50}$ (µg/mL) (LI – LS) | $CL_{90}$ (µg/mL) (LI – LS) | $X^2$ | df |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SQ | 10 | 45,16 | 12,71 (5,42 – 21,70) | 123,79 (78,06 – 233,58) | 3,84 | 5 |
| | 50 | 73,33 | | | | |
| | 100 | 90,00 | | | | |
| | 250 | 100,00 | | | | |
| | 500 | 96,67 | | | | |
| | 750 | 96,77 | | | | |
| | 1000 | 100,00 | | | | |

FONTE: A autora (2023).
Nota: extrato bruto (EBF); fração hexano (FHF); fração clorofórmio (FCF); fração acetato de etila (FAEF); fração remanescente (FRF); óleo essencial (OEF); sulfato de quinidina (SQ) concentração letal 50% ($CL_{50}$), concentração letal 90% ($CL_{90}$); limite inferior (LI); limite superior (LS); qui-quadrado ($x^2$); graus de liberdade (df)

Apesar dos resultados direcionarem para a toxicidade do óleo essencial, produtos derivados de plantas com resultados positivos para atividade tóxica frente à *Artemia salina* sugerem resultados promissores para outras atividades biológicas, sobretudo para atividade citotóxica, sendo o ensaio com *Artemia salina* considerado um ensaio preliminar de atividade antitumoral (AMARANTE *et al.*, 2011; NTUNGWE N *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2021). A concentração letal capaz de levar a mortalidade de 50% dos organismos testados pode apresentar uma relação de ser 10 vezes a concentração necessária para inibir em 50% o crescimento de células tumorais (ROSA *et al.*, 2016). Dessa forma, o resultado da presente pesquisa pode direcionar a potencial atividade antitumoral do óleo essencial de *A. edulis* e sugere-se que ensaios de citotoxicidade sejam conduzidos. A atividade tóxica do óleo pode estar relacionada aos compostos majoritários. O *E*-nerolidol é clastogênico em altas concentrações, ou seja, pode levar a alterações cromossômicas (FONSÊCA *et al.*, 2016) e já demonstrou toxicidade frente a células HeLa possivelmente pela interação com a membrana celular, alteração da permeabilidade e consequente morte celular (KRIST *et al.*, 2015; RYABCHENKO *et al.*, 2008). O α-pineno, outro composto majoritário, já demonstrou atividade citotóxica frente a células de adenocarcinoma mamário MCF-7 com resultados similares a droga de referência doxorubicina (COLE *et al.*, 2007).

Quando analisados os extratos brutos e frações semipurificadas verifica-se que, em geral, não houve dose dependência para a ocorrência de mortalidade das larvas de *A. salina*. Dentre as frações, a acetato de etila e remanescente apresentaram maiores percentuais de mortalidade dos náuplios quando foram testadas as menores concentrações. Tais resultados poderiam corroborar com a teoria na hormese, na qual, baixas doses poderiam estimular respostas, enquanto

altas doses poderiam inibir (JALAL *et al.*, 2021). O extrato bruto apresentou taxa de mortalidade inferior a 18%, assim como a fração clorofórmio. A fração hexano não apresentou toxicidade, já que a $CL_{50}$ foi superior a 1000 µg/mL. Estudos prévios conduzidos com *A. edulis* não demonstraram toxicidade em extrato bruto etanólico de frutos (UMEO *et al.*, 2011) ou no extrato aquoso das folhas (ARRUDA *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos com o ensaio de atividade tóxica em *Artemia salina* não atestam a toxicidade das folhas do vegetal, pois se trata de um ensaio preliminar. Para afirmar que folhas de *A. edulis* apresentam toxicidade, seriam necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* de toxicidade aguda, crônica e hepatotoxicidade.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das características físico-químicas e fitoquímicas, assim como a avaliação das propriedades antioxidantes e atividades biológicas das folhas de *A. edulis* contribui para ampliação do conhecimento científico a respeito dessa espécie da biodiversidade brasileira.

Em relação às características físico-químicas, os resultados de cor, pH, umidade e cinzas das folhas de *A. edulis* podem ser utilizados como referência para controle de qualidade e autenticação da espécie. As folhas apresentam elevado teor de proteínas e fibras, com predominância das fibras insolúveis. Além disso, em sua composição, foram quantificados minerais como cálcio, potássio, fósforo, enxofre, magnésio e pequena quantidade de alumínio.

O estudo fitoquímico revelou a presença de compostos fenólicos como ácido gálico, ácido cafeico e quercetina no extrato bruto, assim como terpenos *E*-nerolidol, α-pineno e 10-epi-γ-eudesmol no óleo essencial. As folhas de *A. edulis* são fonte de óleo essencial, o qual apresentou bom rendimento e teve como característica marcante a predominância de sesquiterpenos oxigenados em sua composição, entretanto, o armazenamento de folhas secas de *A. edulis* levou a alteração da composição química e impactou negativamente no rendimento do óleo.

O óleo essencial, extrato bruto e frações semipurificadas demonstraram propriedades antioxidantes, com destaque para a fração acetato de etila, fração com os maiores teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais.

Foi verificada redução do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* com aplicação do óleo essencial e extrato bruto na análise de atividade antimicrobiana. Não foi observada atividade antifúngica contra *B. cinerea,* nem atividade hemolítica do extrato bruto e óleo essencial das folhas de *A. edulis* nas concentrações testadas. O óleo essencial e o extrato bruto obtidos de folhas de *A. edulis* apresentaram atividade alelopática em *Lactuca sativa* e *Allium cepa,* com destaque para inibição do crescimento de radícula e hipocótilo de ambas as espécies provocada pelo óleo essencial. O extrato bruto e o óleo essencial foram altamente ativos em relação à atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, resultado inédito para a espécie. O óleo essencial se mostrou tóxico no ensaio preliminar de toxicidade contra *Artemia salina*. Tais resultados direcionam para uma possível atividade antitumoral do óleo essencial de folhas de *A. edulis* e sugere-se que

estudos de citotoxicidade *in vitro* e estudos *in vivo* sejam performados a fim de identificar se a planta pode ser considerada uma espécie com potencial antitumoral.

Em suma, as folhas de *A. edulis*, planta alimentícia não convencional da biodiversidade brasileira, são fonte de compostos bioativos, com propriedades antioxidantes e atividades biológicas promissoras. Tais resultados podem nortear o melhor uso do vegetal e auxiliar na preservação ambiental com manutenção da espécie.

## REFERÊNCIAS

ABREU, D. C. A. de.; KUNIYOSHI, Y. S.; NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. DE S. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Allophylus edulis* (St.-Hil.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 59–66, dez. 2005. DOI. 10.1590/S0101-31222005000200009.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy**. 1º ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995.

ADEYEMI, T. O.; OGUNDIPE, O. T. Biodiversity of Sapindaceae in West Africa: A checklist. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 8, p. 326–331, 2012. DOI. 10.5897/IJBC12.032.

AGUIAR, J. C. D.; SANTIAGO, G. M. P.; LAVOR, P. L.; VERAS, H. N. H.; FERREIRA, Y. S.; LIMA, M; A. A.; ARRIAGA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; LIMA, J. Q.; JESUS, H. C. R. de.; ALVES, P. B.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Constituents and Larvicidal Activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1977–1980, 2010. DOI. 10.1177/1934578X1000501231.

AICHHOLZ, R; SPITZER, V; LORBEER, E. Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from sapindaceae seed oils with high-temperature gas chromatography and high- temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 787, n. 1–2, p. 181–194, 1997. DOI. 10.1016/S0021-9673(97)00650-X

ALI, M.; GURMESSA, K.; MEKONNIN, A. Identification and Nutritional Evaluation of Potential Indigenous Browse Species in Guba Lafto District, North Wollo, Ethiopia. **Journal of Animal Science and Research**, v. 4, n. 3, p. 1–6, 2020. DOI. 10.16966/2576-6457.144.

AMARANTE, C. B. do.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011. DOI. 10.1590/S0044-59672011000300015.

AMBROŽ, M.; BOUŠOVÁ, I.; SKARKA, A.; HANUŠOVÁ, V.; KRÁLOVÁ, V.; MATOUŠKOVÁ, P.; SZOTÁKOVÁ, B.; SKÁLOVÁ, L. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. **Molecules**, v. 20, p. 15343-15358, 2015. DOI. 10.3390/molecules200815343.

AMIRI, A.; SOURESTANI, M. M.; MORTAZAVI, S. M. H.; KIASAT, A. R.; RAMEZANI, Z. Efficiency of chemical composition of some essential oils against *Botrytis cinerea*, the pathogen of post-harvest strawberry fruits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, p. 66-75, 2021. DOI. 10.1007/s11694-

021-01133-z.

ANKAD, G. M.; UPADHYA, V.; PAI, S. R.; HEDGE, H. V.; ROY, S.; KHOLKUTE, S. D. Total Polyphenols, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Leaves and Stem Bark Extracts of *Allophylus cobbe* (L.) Raeusch. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 145–149, 2016. DOI. 10.1007/s40011-014-0424-6.

ARGYROPOULOS, D.; MÜLLER, J.. Kinetics of change in colour and rosmarinic acid equivalents during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 1, p. e15–e22, 2014. DOI. 10.1016/j.jarmap.2013.12.001.

ARISAWA, M.; MORINAGA, Y.; NISHI, Y.; UENO, H.; SUZUKI, S.; HAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N.; BERGANZA, L. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay Constituents of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Fraction from "Cocu," *Allophylus edulis* RADLK. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 43, n. 1, p. 78–80, 1989. Disponível em: <https://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I3239734-00?locale=en>. Acesso em: 9 mar. 2021.

ARRUDA, G.; PÉRICO, L. G. V.; PARPINELLI, R.; PERETTI, R. F.; SCUR, M. C.; FOLLADOR, F. A. C. Phytochemical Prospecting, Antimicrobial Activity, and Acute Toxicity of Aqueous Plant Extract of Two Plant Species *Allophylus edulis* (A. St. Hilaire, Cambessedes & A. Jussieu) RADLK ex WARM and *Matayba elaeagnoides* RADLK. **International Journal of New Technology and Research**, v. 5, n. 2, p. 10–13, 2018. DOI. 10.31871/IJNTR.5.2.7.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. da. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 17–25, 2003. DOI. 10.1590/S0037-86822003000100004.

ASLAM, F.; RASOOL, N.; RIAZ, M.; ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; ABBAS, M.; BUKHARI, T. H.; BUKHARI, I. H. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS Profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 567–578, 2011. Disponível em: < https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/8326435>. Acesso em: 15 set. 2021.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 673–679, 2010. DOI. 10.1002/ptr.2955.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDLU, S. K.; BHARGAV, V. K. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2568–2575, 2014. DOI. 10.1007/s13197-012-0754-4.

BAJPAI, B.; PATIL, S. A new approach to microbial production of gallic acid.

**Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4 p. 708–711, 2008. DOI. 10.1590/S1517-83822008000400021.

BALDERMANN, S.; BLAGOJEVIC, L.; FREDE, K.; KLOPSCH, R.; NEUGART, S.; NEUMANN, A.; NGWENE, B.; NORKEWEIT, J.; SCHROTER, D.; SCHROTER, A.; SCHWEIGER, F. J.; WIESNER, M.; SCHREINER, M. Are Neglected Plants the Food for the Future? **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, n. 2, p. 106–119, 2016. DOI. 10.1080/07352689.2016.1201399.

BALEKUNDRI, A.; MANNUR, V. Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI.10.1186/s43094-020-00091-5.

BALLESTRERI, A. A.; ARAUJO, M. M.; AIMI, S. C.; NASCIMENTO, N. F. DO.; BERGHETTI, A. L. P.; GASPARIN, E.; TABALDI, L. A.; ZAVISTANOVICZ, T. C. Morphophysiological responses of forest tree species conducted under different levels of shading in the enrichment of degraded ecosystem. **Forest Ecology and Management**, v. 488, n. 15, p. 1–12, 2021. DOI. 10.1016/j.foreco.2021.119032.

BALOGUN, S. O.; OLADOSU, I. A.; LIU, Z. Chemical Compositions and Antioxidant Potential of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Allophylus africanus*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 17, n. 5, p. 769–775, 2014. DOI. 10.1080/0972060X.2014.895176.

BALSALOBRE, N. de M.; SANTOS, E. dos.; SANTOS, S. M dos.; ARENA, A. C.; KONKIEWITZ, E. C.; ZIFF, E. B.; FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L. Potential anti-arthritic and analgesic properties of essential oil and viridiflorol obtained from *Allophylus edulis* leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 301, p. 115785, 2023. DOI.10.1016/j.jep.2022.115785.

BARREIRA, T. F.; PAULA FILHO, G. X.; RODRIGUES, V. C. C.; ANDRADE, F. M. C.; SANTOS, R. H. S.; PRIORE, S. E.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, **Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4 suppl 2, p. 964–974, 2015. DOI. 10.1590/1983-084X/14_100.

BASTAKI, S. M. A.; AMIR, N.; ADEGHATE, E.; OJHA, S. Nerolidol, a sesquiterpene, attenuates oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 9, p. 3497–3512, 2021. DOI. 10.1007/s11010-021-04094-5.

BEHR, A.; JOHNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. **Chemistry-Sustainability-Energy-Materials**, v. 2, n. 12, p. 1072–1095, 2009. DOI. 10.1002/cssc.200900186.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996. DOI. 10.1006/abio.1996.0292.

BETIM, F. C. M.; OLIVEIRA, C. F.; SOUZA, A. M.; SZABO, E. M.; ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. de F. G. *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae): chemical composition, antioxidant capacity and biological properties of essential oil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 18284, 2019. DOI. 10.1590/s2175-97902019000118284.

BETIM, F. C. M.; OLIVEIRA, C. F.; MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MAURER, J. B. B.; DIAS, J. de F. G. Preliminary evaluation of the larvicidal activity of extracts and fractions from *Ocotea nutans* (Nees) Mez against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 54, p. 1–4, 2021. DOI. 10.1590/0037-8682-0576-2020.

BHARAT, C. R.; KRISHNA, G. D. GC-MS Analysis of Young Leaves of *Allophylus cobbe* (L.) Raeusch. and *Allophylus serratus* (Roxb.) Kurz. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. 472–479, 2017. DOI. 10.5530/ijper.51.3.75.

BIONDI, D.; LEAL, L.; COBALCHINI, J. L. Tratamentos silviculturais em mudas de *Allophylus edulis* para arborização de ruas. **Floresta**, v. 37, n. 3, p. 437–444, 2007. DOI. 10.13140/RG.2.1.3827.8243.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958. DOI. doi.org/10.1038/1811199a0.

BONDAM, A. F.; SILVEIRA, D. D.; SANTOS, J. P.; HOFFMANN, J. F. Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 123, p. 172–186, 2022. DOI. 10.1016/j.tifs.2022.03.013.

BORGES, D.B.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 229–236, 2005. DOI. 10.1590/S0102-695X2005000300013.

BOUAFIANE, M.; KHELIL, A.; CIMMINO, A.; KEMASSI, A. Prediction and evaluation of allelopathic plants species in Algerian Saharan ecosystem. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 53, p. 1–10, 2021. DOI. 10.1016/j.ppees.2021.125647.

BOUYAHYA, A.; GUAOUGUAOU, F.; OMARI, N. .; MENYIY, N. E.; BALAHBIB, A.; EL-SHAZLY, M.; BAKRI, Y. Anti-inflammatory and analgesic properties of Moroccan medicinal plants: Phytochemistry, in vitro and in vivo investigations, mechanism insights, clinical evidences and perspectives. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 1, p. 35–57, 2021. DOI. 10.1016/j.jpha.2021.07.004.

BRACA, A.; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANO, M. P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.

79, n. 2, p. 123–125, 2008. DOI. 10.1016/j.fitote.2007.11.002.

BRAGA, F. C. Paving New Roads Towards Biodiversity-Based Drug Development in Brazil: Lessons from the Past and Future Perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–14, 2021. DOI. 10.1007/s43450-021-00181-2.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995. DOI. 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Farmacopeia Brasileira.** 6ª edição, v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Boletim Epidemiológico 47**. Brasília: n. 47, 2022.

BUERKI, S.; CALLMANDER, M. W.; ACEVEDO-RODRIGUEZ, P.; LOWRY 2ND, P. P.; MUNZINGER, J.; BAILEY, P.; MAURIN, O.; BREWER, G. E.; EPITAWALAGE, N.; BAKER, W. J.; FOREST, F. An updated infra-familial classification of Sapindaceae based on targeted enrichment data. **American Journal of Botany**, v. 108, n. 7, p. 1234–1251, 2021. DOI. 10.1002/ajb2.1693.

BUSH, R. T; MCINERNEY, F. A. Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 117, p. 161–179, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2013.04.016>. Acesso em: 17 mar. 2023.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107–120, 2018. DOI. 10.1016/j.tifs.2017.11.008.

CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. de F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de Nasturtium officinale R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031–1035, 2009. DOI. 10.1590/S0100-40422009000400034.

CARVALHO, K. da S.; CRUZ, R. C. D. da.; SOUZA, I. A. de. Plant species from Brazilian Caatinga: a control alternative for *Aedes aegypti*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 26, n. 2, p. 1–11, 2023. DOI. 10.1016/j.aspen.2023.102051.

CARVALHO, P. E. R. Vacum: *Allophylus edulis*. In: CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

CASTILLO, L.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GONZÁLEZ, A.; DÍAZ, M.; SANTOS, E.; ALONSO-PAZ, E.; BASSAGODA, M. J.; ROSSINI, C. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 235–240, 2009. DOI. 10.1016/j.indcrop.2008.05.004.

CAVALCANTI, S. B. T.; TELES, H. L.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. New Tetra-acetylated Oligosaccharide Diterpene from C*upania vernalis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 413–416, 2001. DOI. 10.1590/S0103-50532001000300014.

CHAN, W.; TAN, L. T.; CHAN, K., LEE, L.; GOH, B. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1-40, 2016. DOI. 10.3390/molecules21050529.

CHAUDHARI, A. K.; DWIVEDY, A. K.; SINGH, V. K.; DAS, S.; SINGH, A.; DUBEY, N. K. Essential oils and their bioactive compounds as green preservatives against fungal and mycotoxin contamination of food commodities with special reference to their nanoencapsulation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 25414–25431, 2019. DOI. 10.1007/s11356-019-05932-2.

CHAVAN, R. B.; GAIKWAD, D. K. GC-MS Analysis of Young Leaves of *Allophylus cobbe*. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. 472–479, 2017. DOI. 10.5530/ijper.51.3.75.

CHAVAN, R. B.; GAIKWAD, D. K. The Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Properties of Allophylus species used in traditional medicine: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 11, p. 664–682, 2016. DOI. 10.20959/wjpps201611-8039.

CHAVES, N.; SANTIAGO, A.; ALÍAS, J. C. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. **Antioxidants**, v. 9, n. 76, p. 1–15, 2020. DOI. 10.3390/antiox9010076.

CHHABRA, S. C.; MAHUNNAH, R. L. A.; MSHIU, E. N. Plants used in traditional medicine in eastern tanzania. V. Angiosperms (passifloraceae to sapindaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1–2, p. 143–157, maio 1991. DOI. 10.1016/0378-8741(91)90173-B.

COELHO, R. L. G.; SOUZA, V. C.; FERRUCCI, M. S.; FLORES, T. B. Revisão taxonômica de *Matayba sect. Matayba* (Sapindaceae, Cupanieae). **Rodriguésia**, v. 68, n. 2, p. 411–443, jun. 2017. DOI. 10.1590/2175-7860201768209.

COLE, R. A.; BANSAL, A.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of Eugenia zuchowskiae from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 414–417, 2007. DOI. 10.1007/s11418-007-0155-6.

CORRÊA, C. L. O.; PENHA, E. M.; ANJOS, M. R.; PACHECO, S.; FREITAS-SILVA, O.; LUNA, A. S.; GOTTSCHALK, L. M. F. Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 338, p. 1–6, 2021. DOI. 10.1016/j.foodchem.2020.128045.

CURVELO, J. A. R.; MARQUES, A. M.; BARRETO, A. L. S.; ROMANOS, M. T. V.; PORTELA, M. B.; KAPLAN, M. A. C.; SOARES, R. M. A. A novel nerolidol-rich

essential oil from *Piper claussenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 697–702, 2014. DOI. 10.1099/jmm.0.063834-0.

DAJIĆ-STEVANOVIĆ, Z.; BOSNJAK-NEUMUELLER, J.; PAJIĆ-LIJAKOVIĆ, I.; RAJ, J.; VASILJEVIĆ, M. Essential Oils as Feed Additives -Future Perspectives. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–20, 2018. DOI. 10.3390/molecules23071717.

DAS, S. K. Screening of Bioactive Compounds for Development of New Pesticides: A Mini Review. **Universal Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 15–20, 2016. DOI. 10.13189/ujar.2016.040103.

DHANYA, R. Quercetin for managing type 2 diabetes and its complications, an insight into multitarget therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, 2022. DOI. 10.1016/j.biopha.2021.112560.

DHARMANI, P.; MISHRA, P. K.; MAURYA, R.; CHAUHAN, V. S.; PALIT, G. *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 361–366, 2005. DOI. 10.1016/j.jep.2005.01.011.

DIAS, J. de F. G.; CÍRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 220–223, 2005. DOI. 10.1590/S0102-695X2005000300011.

DÍAZ, M.; Castillo, L.; Díaz, C. E.; Álvarez, R. G.; González-Coloma, A.; Rossini, C. Differential Deterrent Activity of Natural Products Isolated from *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Advances in Biological Chemistry**, v. 04, n. 02, p. 168–179, 2014. DOI. 10.4236/abc.2014.42021.

DÍAZ, M.; GONZALÉZ, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; GONZALEZ, D.; ROSSINI, C. First record of l-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 15, p. 2699–2700, 2008. DOI. 10.1016/j.carres.2008.07.014.

DIMA, C. ASSADPOUR, E.; DIMA, S.; JAFARI, S. M. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2862–2884, 2020. DOI. 10.1111/1541-4337.12623.

Discorver Life. *Allophylus edulis* (St. -Hil.) Radlk. ex Warm. Disponível em: <https://www.discoverlife.org/mp/20q>. Acesso em 05 mai 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. On the Evaluation of a new study related to the bioavailability of aluminium in food. **EFSA Journal,** v. 9, n. 5, 2011. DOI. 10.2903/j.efsa.2011.2157.

ESPÍNDOLA, K. M. M.; FERREIRA, R. G.; NARVAEZ, L. E. M.; ROSARIO, A. C. R. S.; SILVA, A. H. M. da.; SILVA, A. G. B.; VIEIRA, A. P. O.; MONTEIRO, M. C. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–10, 2019. DOI.

10.3389/fonc.2019.00541.

EVERGETIS, E.; HAROUTOUNIAN, S. A. Exploitation of Apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 70–77, 2014. DOI. 10.1016/j.indcrop.2014.01.009.

FAHED, L.; STIEN, D.; OUAINI, N.; EPARVIER, V.; BEYROUTHY, M. E. Chemical Diversity and Antimicrobial Activity of *Salvia multicaulis* Vahl Essential Oils. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 5, p. 591–595, 2016. DOI. 10.1002/cbdv.201500332.

FALKOWSKI, M.; JAHN-OYAC, A.; ODONNE, G.; FLORA, C.; ESTEVEZ, Y.; TOURÉ, S.; BOULOGNE, I.; ROBINSON, J.; BÉREAU, D.; PETIT, P.; AZAM, D.; COKE, M.; ISSALY, J.; GABORIT, P.; STIEN, D.; EPARVIER, V.; DUSFOUR, I.; HOUËL, E. Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 201, p. 1–12, 2020. DOI. 10.1016/j.actatropica.2019.105179.

FAN, F.; HAMADA, M. S.; LI, N.; LI, G. Q.; LUO, C. X. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 601–606, 2017. DOI. 10.1094/PDIS-09-16-1227-RE.

FANG, Z.; LI, J.; YANG, R.; FRANG, L. ZHANG, Y. A Review: The Triterpenoid Saponins and Biological Activities of *Lonicera Linn*. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 1–16, 2020. DOI. 10.3390/molecules25173773.

FAO. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacíon. Estado Actual de la Informacion sobre Productos Forestales no Madereros. IN: FAO. **Informacion y analisis para el manejo forestal sostenible: Integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 paises tropicales en America Latina.** Santiago, Chile: FAO - Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacíon, 2001. p. 282. Disponível em: <http://www.fao.org/3/AD393S/AD393s13.htm>. Acesso em: 8 jan. 2021.

FDA. Food and Drug Administration. **CFR - Code of Federal Regulations, Title 21** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.515>. Acesso em: 27 abr. 2021.

FEHLBAUM, P.; BULET, P. MICHAUT, L.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C.. HOFFMANN, J. A. Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry,** v. 269, n. 52, p. 33159–33163, 1994. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7806546/>. Acesso em: 03 jun 2022.

FENG, S. HUANG, M.; CRANE, J. H.; WANG, Y. Characterization of key aroma-active compounds in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 497–503, 1 abr. 2018. DOI. 10.1016/j.jfda.2017.07.013.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257–265, 2016. DOI. 10.1080/10408347.2015.1095064.

FERRERES, F.; GOMES, N. G. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, D. M.; GIL-IZQUIERDO, A.; ARAÚJO, L.; SILVA, T. C.; ANDRADE, P. B. Leaves and stem bark from *Allophylus africanus* P. Beauv.: An approach to anti-inflammatory properties and characterization of their flavonoid profile. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 430–438, 2018. DOI. 10.1016/j.fct.2018.05.045.

FIEIRA, C.; OLIVEIRA, F.; CALEGARI, R. P.; MACHADO, A.; COELHO, A. R. In vitro and in vivo antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Food Science and Technology**, v. 33, n. supl. 1, p. 40–46, 2013. DOI: 10.1590/S0101-20612013000500007.

FONSÊCA, D.; SALGADO, P. R. R.; CARVALHO, F. L.; SALVADORI, M. G. S. S.; PENHA, A. R. S.; LEITE, F. C.. BORGES, C. J. S.; PIUVEZAM, M. R.; PERDEUS, L. C. M.. SOUZA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: Involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 14–22, 2016. DOI. 10.1111/fcp.12166.

FRAGA, L. N.; OLIVEIRA, A. K. S.; ARAGÃO, B. P.; SOUZA, D. A.; SANTOS, E. W. P.; MELO, J. A.; SILVA, A. M. O. E.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; CORRÊA, C. B.; WARTHA, E. R. S. A.; BACCI, L.; CARVALHO, I. M. M. Mass spectrometry characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity of the peel and pulp extracts of Pitomba. **Food Chemistry**, v. 340, n. 127929, p. 1–10, 2021. DOI. 10.1016/j.foodchem.2020.127929.

FUJIWARA, G.; ANNIES, V.; OLIVEIRA, C. F.; LARA, R. A.; GABRIEL, M. M.; BETIM, F. C. M.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; DIAS, J. de F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. W. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 238–244, 2017. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2017.01.046.

GASPARIN, E.; ARAUJO, M. M.; AVILA, A. L.; WIELEWICKI, A. P. Identificação de substrato adequado para germinação de sementes de *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 625–630, 2012. DOI. 10.5902/198050986628.

GASPARIN, P. P.; ALVES, N. C. C.; CHRIST, D.; COLEHO, S. R. M. Qualidade de folhas e rendimento de óleo essencial em hortelã pimenta (*Mentha* x *Piperita* L.) submetida ao processo de secagem em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Medicionais,** v. 16, n. 2, p. 337–344, 2014. DOI. 10.1590/1983-084X/12_003.

GATTO, L. J.; VEIGA, A.; HIGAKI, N. T. F.; SWIECH, J. N. D.; SARTOR, E. B.; GRIBNER, C.; MOURA, P. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Antimicrobial and allelopathic effects of leaves extracts of *Myrcia hatschbachii*. **Research, Society and**

**Development**, v. 10, n. 8, 2021. DOI. 10.33448/rsd-v10i8.17160.
GBIF. Global Core Biodata Resource. *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk. ex Warm. in GBIF Secretariat (2019). GBIF Backbone Taxonomy. Disponível em: <https://doi.org/10.15468/39omei>. Acesso em 9 mai 2019.

GHAGANE, S. C.; PURANIK, S. I.; NERLI, R. B.; HIREMATH, M. B. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer activity of *Allophylus cobbe* leaf extracts on DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines. **Cytotechnology**, v. 69, n. 1, p. 167–177, 2017. DOI. 10.1007/s10616-016-0048-1.

GIL-MARTÍN, E.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.; ROMERO, A.; CIANCIOSI, D.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, v. 378, p. 1–39, 2022. DOI. 10.1016/j.foodchem.2021.131918.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. da. Notas Etnobotânicas de Espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botanica Brasilica***,* v. 14, n. 13, p. 327-334, 2000. DOI. 10.1590/S0102-33062000000300009.

GUERRIERO, G.; BERNI, R.; MUNOZ-SANCHES, J. A.; APONE, F.; ABDEL-SALAM, E. M.; QAHTAN, A. A.; ALATAR, A. A.; NATINI, C.; CAI, G.; HAUSMAN, J.; SIDDIQUI, K. S.; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T.; FAISAL, M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. **Genes**, v. 9, N. 6 p. 309, 2018. DOI. 10.3390/genes9060309.

GUIRADO, O. A. A. Potencial medicinal del género Sapindus L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. 3–4, 2005. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000300009>. Acesso em: 1 ago. 2019.

GUO, J.; XU, Y.; LIANG, S.; ZHOU, Z.; ZHANG, C.; LI, K.; PENG, X.; QIN, S.; XING, K. Antifungal activity of volatile compounds from Bacillus tequilensis XK29 against *Botrytis cinerea* causing gray mold on cherry tomatoes. **Postharvest Biology and Technology,** v. 198, p. 112239, 2023. DOI. 10.1016/j.postharvbio.2022.112239.

GURGEL, E. S. C.; OLIVEIRA, M. S.; SOUZA, M. C.; SILVA, S. G.; MENDINÇA, M. S.; SOUZA FILHO, A. P. S. Chemical compositions and herbicidal (phytotoxic) activity of essential oils of three Copaifera species (Leguminosae-Caesalpinoideae) from Amazon-Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 142, n. 15, p. 1–9, 2019. DOI. 10.1016/j.indcrop.2019.111850.

HOFFMANN-BOHM, K.; LOTTER, H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the leaves of *Allophyllus edulis* var. edulis and gracilis. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 544–548, 1992. DOI. 10.1055/s-2006-961546.

HORNUNG, P. S.; ÁVILA, S.; APEA-BAH, F. B.; LIU, J.; TEIXEIRA, G. L.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Sustainable Use of *Ilex paraguariensis* Waste in Improving Biodegradable Corn Starch Films' Mechanical, Thermal and Bioactive Properties.

**Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 1696–1709, 2020. DOI. 10.1007/s10924-020-01723-w.

HORST, M. A. Compostos bioativos em alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. **Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. 1º ed. Barueri: Ed. Manole, 2013. p. 593–615.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5º edição. São Paulo: Institulo Adolfo Lutz, 2008.

JAIN, P.; Hossain, S.; Fatema, K.; Hossain, A. A.; Mazumder, K. U.; Hossain, H.; Alam, A.; Reza, H. M. Anti-Inflammatory, Analgesic and Antioxidant Activities of *Allophylus Cobbe* Leaves. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 9, n. 4, p. 223–231, 2014. DOI. 10.3844/ajptsp.2014.223.231.

JALAL, A.; OLIVEIRA JUNIOR, J. C. O.; RIBEIRO, J. S.; FERNANDES, G. C.; MARIANO, G. G.; TRINDADE, V. D. R.; REIS, A. R. Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, 2021. DOI. 10.1016/j.ecoenv.2020.111225.

JAYASINGHE, U. L. B.; KUMARIHAMY, B. M. M.; BANDARA, A. G. D.; WAIBLINGER, J.; KRAUS, W. Antifeedant Activity of Some Sri Lankan Plants. **Natural Product Research**, v. 17, n. 1, p. 5–8, 2003. DOI. 10.1080/10575630290034285.

JIANG, Y.; PEI, J.; ZHENG, Y.; MIAO, Y.; DUAN, B.; HUANG, L. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 28, n. 7, p. 661–671, 2022. DOI. 10.1007/s11655-021-3345-2.

JIMÉNEZ-AGUILAR, D. M.; GRUSAK, M. A. Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of Amaranthus leafy vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 33–39, 2017. DOI. 10.1016/j.jfca.2017.01.005.

JOFFARD, N.; LEGENDRE, L.; GIBERNAU, M.; PASCAL, L. Differential accumulation of Volatile Organic Compounds (VOCs) by leaves and roots of two Guianese Philodendron species, *P. fragrantissimum* Kunth and *P. melinonii* Brongn. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, n. 4, 2017. DOI. 10.1002/cbdv.201600415.

KAISER, D. K.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C.; DRANSKI, J. A. L.; FREITAS, L. C. N.; KOSMANN, C. R.; ANDRIOLI, K. K. Physiological maturity of seeds and colorimetry of the fruits of *Allophylus edulis* [(A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Hieron. ex Niederl.]. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 2, p. 92–100, 2016. DOI. 10.1590/2317-1545v38n2154590.

KAMUNGU S.; BASABOSE, K.; BAGALWA, M.; BAGALWA, B.; MURHABALE, B.; YAMAGIWA, J. Phytochemical Screening of Food Plants Eaten by Sympatric Apes (*Gorilla beringei graueri* and *Pan troglodytes schweinfurthii*) Inhabiting Kahuzi-Biega National Park, Democratic Republic of Congo) and their Potential Effect on Gastro Intestinal Parasites. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical**

**Research**, v. 7, n. 2, p. 255–261, 2015. Disponível em: <www.ijppr.com>. Acesso em: 19 abr. 2021.

KASSA, T.; WHALIN, J. G.; RICHARDS, M. P.; ALAYASH, A. I. Caffeic acid: an antioxidant with novel antisickling properties. ***FEBS Openbio***, v. 11, n. 12, p. 3293–3303, 2021. DOI. 10.1002/2211-5463.13295.

KAUL, R.; PAUL, P.; KUMAR, S.; BUSSELBERG, D.; DWIVEDI, V. D.; CHAARI, A. Promising antiviral activities of natural flavonoids against sars-cov-2 targets: Systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, 2021. DOI. 10.3390/ijms222011069.

KHAN, F. BAMUNUARACHCHI, N. I.; TABASSUM, N.; KIM, Y. Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2979–3004, 2021. DOI. 10.1021/acs.jafc.0c07579.

KHOSHNAZAR, M.; PARVARDEH, S.; BIGDEL, M. R. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases,** v. 29, n. 8, p. 1–10, 2020. DOI. 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104977.

KINUPP, V. F. **Plantas Alimentícias Não-Convencionais Da Região Metropolitana De Porto Alegre, RS**. 2007. 590 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Setor de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. Rio Grande do Sul, 2007.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I.. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846, 2008. DOI. 10.1590/S0101-20612008000400013.

KNAPIK, J. G.; ALMEIDA, L. S.; FERREIRA, M. P.; OLIVEIRA, E. B.; NOGUEIRA, A. C. Crescimento Inicial de *Mimosa scabrella* Benth., *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radl. sob Diferentes Regimes de Adubação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 51, p. 33–44, 2005. Disponível em: https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/225. Acesso em: 24 mar. 2019.

KOMALAMISRA, N.; TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; APIWATHNASORN, C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1412-22, 2005. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16610643/. Acesso em 20 jun. 2023.

KRIST, S.; BANOVAC, D.; TABANCA, N.; WEDGE, D. E.; GOCHEV, V. K.; WANNER, J.; SCHMIDT, E.; JIROVETZ, L. Antimicrobial activity of nerolidol and its derivatives against airborne microbes and further biological activities. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 1, p. 143–148, 2015. DOI. 10.1177/1934578x1501000133.

KUJAWSKA, M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the Intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–17, 2018. DOI. 10.1155/2018/6849317.

KUJAWSKA, M.; ŁUCZAJ, L. Wild Edible Plants Used by the Polish Community in Misiones, Argentina. **Human Ecology**, v. 43, n. 6, p. 855-869, 2015. DOI. 10.1007/s10745-015-9790-9.

KUMAR, M.; RAWAT, P.; DIXIT, P.; MISHRA, D.; GAUTAM, A. K.; PANDEY, R.; SINGH, D.; CHATTOPADHYAY, N.; MAURYA, R. Anti-osteoporotic constituents from Indian medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 993–999, 2010. DOI. 10.1016/j.phymed.2010.03.014.

KUNDISHORA, A.; SITHOLE, S.; MUKANGANYAMA, S. Determination of the Cytotoxic Effect of Different Leaf Extracts from *Parinari curatellifolia* (Chrysobalanaceae). **Journal of Toxicology**, v. 28, p. 1–11, 2020. DOI. 10.1155/2020/8831545.

LACOSTE, F. International validation of the determination of saturated hydrocarbon mineral oil in vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 3 p. 1–9, 2016. DOI. 10.1002/ejlt.201500134.

LAPCZYNSKI, A.*;* BATHIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, s. 11, p. S247–S250, 2008. DOI. 10.1016/j.fct.2008.06.063.

LE ROUX, M.; CRONJE, J. C.; BURGER, B. V.; JOUBERT, E.Characterization of volatiles and aroma-active compounds in honeybush (*Cyclopia subternata*) by GC-MS and GC-O analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2657–2664, 2012. DOI. 10.1021/jf2048383.

LEAL, M. L.; ALVES, R. P.; HANAZAKI, N. Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 6, 2018. DOI. 10.1186/s13002-018-0209-8.

LI, J.; CHEN, W.; LIU, H.; LIU, H.; XIANG, S.; YOU, F.; JIANG, Y.; LIN, J.; ZHANG, D.; ZHENG, C. Pharmacologic effects approach of essential oils and their components on respiratory diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 304, p. 115962, 2023. DOI. 10.1016/j.jep.2022.115962.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; MACIEL, J. B.; FERNANDES, C. C.; OLIVEIRA, A. C.; TADEI, W. P.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from the leaves of *Onychopetalum periquino* (Rusby) D.M. Johnson & N.A. Murray. **Natural Product Research**, v. 35, n. 6, p. 1038–1041, 2021. DOI. 10.1080/14786419.2019.1613989.

LIMA, V. N.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; SANTOS, E. S.; MORAIS, L. P.;

TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L. S.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 56–61, 2016.DOI. 10.1016/j.micpath.2016.08.004.

LIU, J.; HUA, J.; QU, B.; GUO, X.; WANG, Y.; SHAO, M. Insecticidal Terpenes From the Essential Oils of *Artemisia nakaii* and Their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1–9, 2021. DOI. 10.3389/fpls.2021.720816

LU, H.; TIAN, Z.; CUI, Y.; LIU, Z.; MA, X. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3130-3158, 2020. DOI. 10.1111/1541-4337.12620.

LUZ, T. R. S. A.; MESQUITA, L. S. S.; AMARAL, F. M. M.; COUTINHO, D. F. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, v. 212, 2020. DOI. 10.1016/j.actatropica.2020.105705.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M.G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512–2521, 2000. DOI. 10.1021/jf9903051.

MAGALHÃES, P. K. A.; ARAÚJO, E. N.; SANTOS, A. M.; VANDERLEI, M. B.; SOUZA, C. C. L.; CORREIA, M. S.; FONSECA, S. A.; PAVÃO, J. M. J. S.; SOUZA, M. A.; COSTA, J. G.; SANTOS, A. F.; MATOS-ROCHA, T. J. Ethnobotanical and ethnopharmacological study of medicinal plants used by a traditional community in Brazil's northeastern. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1–11, 2022. DOI. 10.1590/1519-6984.237642.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176–177, 1962. DOI. 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.

MAIHARA, V. A.; FAVARO, D. I. T.; BARBOSA JÚNIOR, F. Elementos Tóxicos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4º ed. Barueri: Ed. Manole, 2012. p. 845–877.

MARMOUZI, Ilias *et al.* Modulatory effect of *Syzygium aromaticum* and *Pelargonium graveolens* on oxidative and sodium nitroprusside stress and inflammation. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 19, n. 2, p. 201–210, 2019. DOI. 10.1007/s13596-018-0335-9.

MARQUES, A. M.; PEIXOTO, A. C. C. P.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; SOARES, Phytochemical Investigation of Anti-plasmodial Metabolites from Brazilian Native Piper Species. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 74–81, 2015. DOI. 10.1080/0972060X.2014.974075

MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Seasonal evaluation and chemical composition of volatile fractions from piper claussenianum by hydrodistillation and SPME. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 15–19, 2011. DOI. 10.1080/10412905.2011.9700475.

MARWAH, R. G.; FATOPE, M. O.; MAHROOGI, R. A.; VARMA, G. B.; ABADI, H. A.; AL-BURTAMANI, S. K. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 465–470, 2007. DOI. 10.1016/j.foodchem.2006.02.001

MATSUNAGA, K.; SASAKI, S.; OHIZUMI, Y. Excitatory and Inhibitory Effects of Paraguayan Medicinal Plants *Equisetum giganteum*, *Acanthospermim australe*, *Allophylus edulis* and *Cordia salicifolia* on Contraction of Rabbit Aorta and Guinea-Pig Left Atrium. **Natural Medicines**, v. 51, n. 5, p. 478–481, 1997. Disponível em:< https://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I4355563-00>. Acesso em: 27 de março de 2021.

MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue Angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter L, a, b data. **Journal of Food Quality,** v. 18, n. 3, p. 235–240, 1995. DOI. 10.1111/j.1745-4557.1995.tb00377.x.

MEHMOOD, A.; JAVID, S.; KHAN, M. F.; AHMAD, K. S.; MUSTAFA, A. In vitro total phenolics, total flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of selected medicinal plants using different solvent systems. **BMC Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2022. DOI. 10.1186/s13065-022-00858-2.

MENEZES, E. W. de; GIUNTINI, E. B. Fibra Alimentar. In: COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. **Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. São Paulo: Manole, 2013. p. 136–153.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982. DOI. 10.1055/s-2007-971236.

MIGUEL, O. G. **Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica**. [S.l: s.n.], 2003.

MISRA, S.; MISRA, M. K. Ethnobotanical and Nutritional Evaluation of Some Edible Fruit Plants of Southern Odisha, India. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 2016. Disponível em: <www.ijaast.com>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050–S4063, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/143457/1/2009AA-051.pdf>. Acesso em: 26 set. 2019.

MOURA, D. F. de.; ROCHA, D. A.; BARROS, D. B.; SILVA, M. M.; SANTANA, M. S.; NETA, B. M.; CAVALCANTI, I. M. F.; MARTINS, R. D.; SILVA, M. V. Evaluation of

the antioxidant, antibacterial, and antibiofilm activity of the sesquiterpene nerolidol. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4303–4311, 2021. DOI. 10.1007/s00203-021-02377-5.

MULLER, H. G.; TOBIN, G. **Nutrition and food processing.** 1º ed. London, UK: Croom Helm., 1980.

MUTIE, F. M.; RONO, P. C.; KATHAMBI, V.; HU, G.; WANG, Q. Conservation of Wild Food Plants and Their Potential for Combatting Food Insecurity in Kenya as Exemplified by the Drylands of Kitui County. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1–25, 2020. DOI. 10.3390/plants9081017.

NASCIMENTO, J. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; GOELZER, A.; SILVA, O. B.; SANTOS, C. C. Intercropping with Tropaeolum majus and fertilization with chicken manure on yield of *Allophylus edulis*. **Revista Ceres**, v. 66, n. 5, p. 351–362, 2019. DOI. 10.1590/0034-737X201966050004

NIRMALA, C. BISHT, M. S.; BAJWA, H. K.; SANTOSH, O. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 77, p. 91–99, 2018. DOI. 10.1016/j.tifs.2018.05.003.

NIST. **PC version of the NIST/ EPA/NIH Mass Spectral Database, National Institute of Standards and Technology (NIST)**. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology, 1998.

NTUNGWE N, E.; DOMÍNGUEZ-MARTÍN, E. M.; ROBERTO, A.; TAVARES, J.; ISCA, V. M. S.; PEREIRA, P.; CEBOLA, M.; RIJO, P., Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design,** v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 2020. DOI. 10.2174/1381612826666200406083035.

OGUNWANDE, I.; Chemical constituents and insecticidal activity of essential oil of *Paullinia pinnata* L (Sapindaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 5, p. 455–462, 2017. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85652864001>. Acesso em: 6 maio 2020.

OLADOSU, I. A.; BALOGUN, S. O.; LIU, Z. Q. Chemical constituents of *Allophylus africanus*. **Chinese Journal of Natural Medicines,** v. 13, n. 2, p. 133–141, 2015. DOI. 10.1016/S1875-5364(15)60017-6.

OLAYINKA, J. N.; OZOLUA, R. I.; AKHIGBEMEN, A. M. Phytochemical screening of aqueous leaf extract of *Blighia sapida* K.D. Koenig (Sapindaceae) and its analgesic property in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 273, p. 113977, 2021. DOI. 10.1016/j.jep.2021.113977.

OLIVA-HERNÁNDEZ, Y.; SÁNCHEZ-CALERO, J.; ABAD-MARTÍNEZ, M. J.; BERMEJO-BENITO, P.; MARRERO-FAZ, E. Evaluación del efecto antiinflamatorio de un extracto orgánico de *Allophylus cominia* (L) Sw. sobre la actividad de COX-2 y FLA-2s. **Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 12, n. 2, p. 150–153, 2013. Disponível em:<

https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=93581>. Acesso em 27 set. 2021.

OLIVEIRA FILHO, J. G. de.; SILVA, G. da. C.; AGUIAR, A. C. de.; CIPRIANO, L. AZEREDO, H. M. C. de.; BOGUSZ JUNIOR, S.; FERREIRA, M. D. Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against Botrytis cinerea in strawberries. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 1815–1825, 2021. DOI. 10.1007/s11694-020-00765-x.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012. DOI. 10.1016/j.foodres.2012.03.011.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. Geneva: [s.n.], 2005.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**, 1981.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods**. London, UK: Academic Press, 1978.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; LINDA, D. ***Dietary reference intakes : the essential guide to nutrient requirements***, 2006.

PALAFOX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. R6-R15, 2011. DOI. 10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x.

PALUCH, G.; GRODNITZKY, J.; BARTHOLOMAY, L.; COATS, J. Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7618–7625, 2009. DOI. 10.1021/jf900964e.

PARK, H.; KIM, J.; CHANG, K.; KIM, B.; YANG, Y.; KIM, G.; SHIN, S; PARK, I. Larvicidal Activity of Myrtaceae Essential Oils and Their Components Against *Aedes aegypti*, Acute Toxicity on *Daphnia magna*, and Aqueous Residue. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 405–410, 2011. DOI. 10.1603/me10108.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAIS, D. R.; CAIXETA, S. C.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, . L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A. A. Antiprotozoal, Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity,** v. 7, n. 4, p. 993–1001, 2010. DOI. 10.1002/cbdv.200900292.

PASQUALLI, M.; TEDESCO, M.; TEDESCO, S. B. Potencial Antiproliferativo e Genotóxico de extratos de *Allophylis edulis* pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 2365–2372, 2015. Disponível em: < https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1959> Acesso em: 29 abr

2020.

PATEIRO, M.; BARBA, F. J.; DOMÍNGUEZ, R.; SANT'ANA, A. S.; KHANEGHAH, A. M.; GAVAHIAN, M.; GÓMEZ, B.; LORENZO, J. M. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. **Food Research International,** v. 113, p. 156–166, 2018. DOI. 10.1016/j.foodres.2018.07.014.

PAVLÍKOVÁ, N. Caffeic Acid and Diseases - Mechanisms of Action. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 1–18, 2023. DOI. 10.3390/ijms24010588.

PEREIRA, E. S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R. C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 2018. DOI. 10.1016/j.foodchem.2018.03.024.

PEREIRA, L. A. AMORIM, B. S.; ALVES, M.; SOMNER, G. V.; BARBOSA, M. R. V. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Sapindaceae. **Rodriguesia**, v. 67, n. 4, p. 1047–1059, 2016. DOI. 10.1590/2175-7860201667414.

PINELA, J.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, n. 7, p. 1658-188, 2017. DOI. 10.1016/j.fct.2017.10.020.

PINHO, E.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Evaluation of antibacterial activity of caffeic acid encapsulated by β-cyclodextrins. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 8, p. 804–810, 2015. DOI. 10.3109/02652048.2015.1094531.

PRIYA, E. S.; SELVAN, P. S.; TAMILSELVAN, R. Phytochemical Investigation of *Allophylus serratus* Kurz Leaves by UV and GC-MS Analysis. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 17–24, 2012. DOI. 10.3923/rjphyto.2012.17.24.

PROSHKINA, E.; PLYUSNIN, S.; BABAK, T.; LASHMANOVA, E.; MAGANOVA, F.; KOVAL, L.; PLATONOVA, E.; SHAPOSHNIKOV, M.; MOSKALEV, A. Terpenoids as potential geroprotectors. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 1–51, 2020. DOI. 10.3390/antiox9060529.

PUBCHEM. **PubChem.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10-epi-gamma-Eudesmol>. Acesso em: 11 out. 2022.

RASHIDI, S.; YOUSEFI, A. R.; GOICOECHEA, N.; POURYOUSEF, M.; MORADI, P.; VITALINI, S.; IRITI, M. Allelopathic interactions between seeds of *Portulaca oleracea* L. and various crop species. **Applied Sciences,** v. 11, n. 8, p. 1–11, 2021. DOI. 10.3390/app11083539.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999. DOI. 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

RIBEIRO, P. dos A.; MELO, C. M. T.; ANDRADE, R. R. de.; QUEIROZ, C. R. A. dos. A. Quantificação Do Teor De Fibra Alimentar Em Folhas De Ora-Pro-Nóbis. **Revista Inova Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 2, p. 38–42, 2019. Disponível em: <http://periodicos.iftm.edu.br/index.php/inova/>. Acesso em: 28 jan 2020.

ROCHA, M. M.; RODRIGUES, R. D. S.; GUIMARÃES, P. H. V.; GONSALVES, J. K. M. C. Larvicide potential of essential oils from Brazilian plants against Aedes aegyptI. **Research, Society and Development**, v. 11, n.2, 2022 DOI. doi.org/10.33448/rsd-v11i2.26140.

RODRIGUEZ, T. V.; GONZALES, J. W.; SANCHEZ, L. M.; PEREZ, M. N.; FAZ, E. M. Detection and determination of chemical groups in an extract of *Allophylus cominia* (L.). **Journal Of Herbal Pharmacotherapy**, v. 5, n. 4, p. 31–38, 2005. DOI. 10.1300/j157v05n04_04.

ROMEU, L. C. L.; BEZERRA, S. G. Q.; MEDEIROS, F. D.; SOBREIRA, A. L. C.; SOUZA, J. B. P. Preparação e controle de qualidade físico-químico de matéria-prima vegetal de flor sabugueiro (*Sambucus nigra L*.). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, 2022. DOI. http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29884

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente Aedes aegypti L. e Artemia salina Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 18, n. 1, p. 19–26, 2016. DOI. 10.1590/1983-084X/15_006.

RYABCHENKO, B.; TULUPOVA, E.; SCHMIDT, E.; WLCEK, K.; BUCHBAUERD, G. Investigation of Anticancer and Antiviral Properties of Selected Aroma Samples. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, p. 1085–1088, 2008. DOI. 10.1177/1934578X0800300710.

SANDJO, L. P.; KUETE, V. Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. In: KUETE, V. **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry,** Elsevier Inc., 2013. p. 135–202.

SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, C. A. N.; VARELLA, L.; MATOS, A. P.; TEREZAN, A. P.; LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. Contituintes Químicos e Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2080–2082, 2010. DOI. 10.1590/S0100-40422010001000014.

SANTOS, S. M.; CARDOSO, C. A. L.; OLIVEIRA JUNIOR, P. C.; SILVA, M. E.; PEREIRA, Z. V.; SILVA, R. M. M. F.; FORMAGIO, A. S. N. Seasonal and geographical variation in the chemical composition of essential oil from *Allophylus edulis* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 41–45, 2023. DOI. 10.1016/j.sajb.2022.12.013.

SANTOS, S. M.; OLIVEIRA JUNIOR, P. C.; BALSABORE, N. M.; KASSUYA, C. A.

L.; CARDOSO, C. A. L.; PEREIRA, Z. V.; SILVA, R. M. M. F.; FORMAGIO, A. S. N.. Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. 1, 2021. DOI. 10.1016/j.jep.2020.113495.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; HILGERT, N.; THEODULOZ, C. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 8, p. 1357–1364, jun. 2005. DOI.10.1002/jsfa.2098.

SCHUNKO, C.; LI, X.; KLAPPOTH, B.; LESI, F.; PORCHER, V.; PORCUNA-FERRER, A.; REYES-GARCÍA, V. Local communities' perceptions of wild edible plant and mushroom change: A systematic review. **Global Food Security**, v. 32, p. 1–8, 2022. DOI. 10.1016/j.gfs.2021.100601.

SEMAAN, D. G.; IGOLI, J. O.; YOUNG, L.; MARRERO, E.; GRAY, A. I.; ROWAN, E. G. Dataset on the kinetics of the inhibition of PTP1B by the flavonoids and pheophytin A from *Allophylus cominia*. **Data in Brief**, v. 17, p. 401–406, 2018. DOI. 10.1016/j.dib.2018.01.057.

SEMAAN, D. G.; IGOLI, J. O.; YOUNG, L.; MARRERO, E.; GRAY, A. I.; ROWAN, E. G. In vitro anti-diabetic activity of flavonoids and pheophytins from Allophylus cominia Sw. on PTP1B, DPPIV, alpha-glucosidase and alpha-amylase enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 39–46, 2017. DOI. 10.1016/j.jep.2017.03.023.

SHIRAHIGUE, L. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4, p. 1–17, 2020. DOI. 10.1590/0103-8478cr20190857.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L.G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 14–18, 2014. DOI. 10.1016/j.sajb.2014.03.006.

SILVA, R. L.*;* MELLO, T. R. B.; SOUSA, J. P. B.; ALBERNAZ, L. C.; MAGALHÃES, N. M. G.; MORAIS, L. S.; FRANCISCO, L. R.; LEAL, W. S.; ESPINDOLA, L. S. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, 2022. DOI. 10.1016/j.indcrop.2022.114568.

SILVA, S. E. B.; AUAD, A. M.; MORAES, J. C.; ALVARENGA, R.; FONSECA, M. G.; MARQUES, F. A.; SANTOS, N. C. S.; NAGATA, N. Olfactory response of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) to volatile organic compounds from forage grasses. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2019. DOI. 10.1038/s41598-019-46693-9.

SILVESTRE, W. P.*,* LIVINALLI, N. F.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, p. 42–52, 2019. DOI. 10.1016/j.tifs.2019.09.003.

SINGH, P.; ARIF, Y.; BAJGUZ, A.; HAYAT, A. The role of quercetin in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 10-19, 2021. DOI. 10.1016/j.plaphy.2021.05.023.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965. Disponível em:< https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 22 abr 2020.

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 795–800, 2018. DOI. 10.2116/analsci.18P014.

SOARES, K. D.; BORDIGNON, S. A. L.; APEL, M. A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Piper gaudichaudianum* and *Piper mikanianum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 297, n. 115533, p. 1–6, 2022. DOI. 10.1016/j.jep.2022.115533.

SOBOTTKA, A. M.; TESSARO, E.; SILVA, S. M.; PEDRON, M.; SEFFRIN, L. T. Polyphenol content and antioxidant potential of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil. et al.) Hieron. ex Niederl. and *Cupania vernalis* Cambess. (Sapindaceae). **Revista Árvore**, v. 45, n. e4507, p. 1–11, 2021. DOI. 10.1590/1806-908820210000007.

SOFIDIYA, M. O.; JIMOH, F. O.; ALIERO, A. A.; AFOLAYAN, A. J.; ODUKOYA, O. A.; FAMILONI, O. B. Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of six Sapindaceae members. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 1, p. 154–160, 2012. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/JMPR>. Acesso em: 5 maio 2021.

SOMNER, G. V.; FRAZÃO, A.; FERRUCCI, M. S. *Allophylus exappendiculatus* (Sapindaceae), a New Species from Rio de Janeiro, Brazil. **Annales Botanici Fennici,** v. 50, n. 6, p. 401–404, 2013. DOI. 10.5735/085.050.0605.

SOTUBO, S. E.; LAWAL, O. A.; OSUNSAMI, A. A.; OGUNWANDE, I. A. Constituents and Insecticidal Activity of *Deinbollia pinnata* Essential Oil. **Natural Product Communications,** v. 11, n. 12, p. 1889–1890, 2016. Disponível em: <http://www.nist.gov/>. Acesso em: 6 maio 2020.

SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, V. B.; OLIVEIRA, C. F.; BETIM, F. C. M.; PACHECO, S. D. G.; COGO, L. L.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil Obtained from *Eugenia pyriformis* Cambess. (Myrtaceae). **Brazllian Archives of Biology and Technology,** v. 64, 2021. DOI. 10.1590/1678-4324-2021200663.

SOUZA, T. S.; FERREIRA, M. F. S.; MENINI, L.; SOUZA, J. R. C. L.; BERNARDES, C. O.; FEREIRA, A. Chemotype diversity of Psidium guajava L. **Phytochemistry**, v. 153, p. 129–137, 2018. DOI. 10.1016/j.phytochem.2018.06.006.

SPINOZZI, E.; MAGGI, F.; BONACUCINA, G.; PAVELA, R.; BOUKOUVALA, M. C.;

KAVALLIERATOS, N. G.; CANALE, A.; ROMANO, D.; DESNEUX, N.; WILKE, A. B.B.; BEIER, J. C.; BENELLI, G. Apiaceae essential oils and their constituents as insecticides against mosquitoes—A review. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 1–19, 2021. DOI. 10.1016/j.indcrop.2021.113892.

SPITZER, V. Fatty acid composition of some seed oils of the Sapindaceae. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1357–1360, 1996. DOI. 10.1016/0031-9422(96)00140-9.

STREIT, N. M.*;* CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005. DOI. 10.1590/S0103-84782005000300043.

SU, P.; HU, T.; LIU, Y.; TONG, Y.; GUAN, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; HUANG, L.; GAO, W. Functional characterization of NES and GES responsible for the biosynthesis of (E)-nerolidol and (E,E)-geranyllinalool in *Tripterygium wilfordii.* **Scientific Reports**, v. 27, n. 7, p. 1–9, 2016. DOI. 10.1038/srep40851.

SULTANA, S.; HOSSAIN, L.; AKTER, S.; SHEIKH, S.; KARMAKAR, U. K. Phytochemical Analysis and In-vitro Bioactivity Study of Methanol Extract of *Byttneria pilosa* (Family: Malvaceae). **Journal of Research in Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 173–183, 2023. DOI. 10.29228/jrp.301.

TABANCA, N.; WANG, M.; AVONTO, C.; CHITTIBOYINA, A. G.; PARCHER, J. F.; CARROLL, J. F.; KRAMER, M.; KHAN, I. A. Bioactivity-guided investigation of geranium essential oils as natural tick repellents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4101–4107, 2013. DOI. 10.1021/jf400246a.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal. **Fisiologia Vegetal**. 4º ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 342–372.

TEIXEIRA, N.; MELO, J. C. S.; BATISTA, L. F.; PAUA-SOUZA, J.; FRONZA, P.; BRANDÃO, M. G. L. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. **Food Research International,** v. 119, p. 325–348, 2019. DOI. 10.1016/j.foodres.2019.01.058.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential use of phenolic acids as anti-Candida agents: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2015. DOI. 10.3389/fmicb.2015.01420.

THAKUR, N.; RAIGOND, P.; SINGH, Y.; MISHRA, T.; SINGH, B.; LAL, M. K.; DUTT, S. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, p. 366–380, 2020. DOI. 10.1016/j.tifs.2020.01.019.

THERDTHAI, N.; ZHOU, W. Characterization of microwave vacuum drying and hot air drying of mint leaves (*Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen) **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 3, p. 482–489, 2009. DOI. 10.1016/j.jfoodeng.2008.09.031.

TIRLONI, C. A. S.; MARCORINI, L. F. B.; SANTOS, U. P.; ROCHA, P. S.; BARROS, S. V.; MELLO, A. M. M. F.; VIEIRA, M. C.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Evaluation

of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity of leaves from *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess &.) Hieron. ex Niederl. **African Jounal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 11, p. 353–362, 2015. DOI. 10.5897/AJPP2015. 4270

TOMAZI, L. B.; AGUAR, P. A.; CITADINI-ZANETTE, V.; ROSSATO, A. E. Estudo etnobotânico das árvores medicinais do Parque Ecológico Municipal José Milanese, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 450–461, 2014. DOI. 10.1590/1983-084X/09_116.

TREVIZAN, L. N. F.; NASCIMENTO, K. F.; SANTOS, J. A.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; MOREIRA, F. M. F.; CRODA, J.; FORMAGIO, A. S. N. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-Mycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 510–515, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.053>.

TSUZUKI, J. K.; SVIDZINSKI; T. I. E.; SHINOBU, C. S.; SILVA, L. F. A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 577–583, 2007. DOI. 10.1590/s0001-37652007000400002.

TULER, A. C.; PEIXOTO, A. L.; SILVA, N. C. B. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2019. DOI. 10.1590/2175-7860201970077.

UMEO, S. H.; ITO, T. M.; YOKOTA, M. E.; ROMAGNOLO, M. B.; LAVERDE-JUNIOR, A. Avaliação das Propriedades Antioxidantes, Anticolinesterásticas e Citotóxicas dos Frutos de *Allophylus edulis* (A.ST.-HL.,Cambess. &A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 167–171, 2011. Disponível em: <http://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/viewFile/3712/2412>. Acesso em: 29 ago. 2019.

VÁSQUEZ-REYES, S.; VELÁZQUEZ-VILLEGAS, L. A.; VARGAS-CASTILLO, A.; NORIEGA, L. G.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. Dietary bioactive compounds as modulators of mitochondrial function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 96, n. 15, p. 1–18, 2021. DOI. 10.1016/j.jnutbio.2021.108768.

VEIGA, A.; TOLEDO, M. G. T.; ROSSA, L. S.; MENGARDA, M.; STOFELLA, N. C. F.; OLIVEIRA, . J.; GONÇALVES, A. G.; MURAKAMI, F. S. Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC 50% , and IC 90% of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50-61, 2019. DOI. 10.1016/j.mimet.2019.05.003.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. 1º ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2º ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen.** 1. ed. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 1983.

WAIDYANATHA, S.; HACKETT, M.; BLACK, S. R.; STOUT, M. D.; FENNELL, T. R.; SILINSKI, M. R.; WATSON, S. L.; LICAUSE, J.; ROBINSON, V. G.; SPARROW, B.; FERNANDO, R. A.; COOPER, S.; RIDER, C. V. Toxicokinetic evaluation of the common indoor air pollutant, α-pinene, and its potential reactive metabolite, α-pinene oxide, following inhalation exposure in rodents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 418, 1 maio 2021. DOI. 10.1016/j.taap.2021.115496.

WANG, M.; CHITTIBOYINA, A. G.; AVONTO, C.; PARCHER, J. F.; KHAN, I. A. Comparison of current chemical and stereochemical tests for the identification and differentiation of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae) essential oils: Analytical data for (-)-(1S, 4R, 5S)-Guaia-6,9-diene and (-)-(7R,10S)-10-epi-γ-eudesmol. **Records of Natural Products,** v. 8, n. 4, p. 360–372, 2014. DOI. 10.1055/s-0034-1382645.

WANG, Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. **Virulence,** v. 6, n. 4, p. 307–308, 2015. DOI. 10.1080/21505594.2014.1000752.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472–479, 2004. DOI. 10.1016/j.pbi.2004.05.007.

WITCHLEY, J. N.; Penumetcha, P.; ABON, N. V.; WOOLFORD, C. A.; MITCHELL, A. P.; NOBLE, S. M. *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. **Cell Host Microbe**, v. 25, n. 3, p. 432–443, 2019. DOI. 10.1016/j.chom.2019.02.008.

XU, G. L.; GENG, D.; XIE, M.; TENG, K.; TIAN, Y.; LIU, Z.; YAN, C.; WANG, Y.; ZHANG, X.; SONG, Y.; YANG, Y.; SHE, G. Chemical composition, antioxidative and anticancer activities of the essential oil: *Curcumae rhizoma-sparganii rhizoma*, a traditional herb pair. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 15781–15796, 2015. DOI. 10.3390/molecules200915781.

YAJÍA, M. E.*;* MARTI, D. A.; BIDAU, C. J.; AMAT, A. G.; RIGLOS, A. G.; SILVESTRONI, A. Genotoxicity evaluation of *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. **Acta Horticulturae**, v. 501, p. 31–35, 1999. DOI. 10.17660/ActaHortic.1999.501.2

YANG, T.; SHEN, J.; ZHU, C.; WU, J. Molecular dynamics investigation on the vapor-liquid interface behavior of long-chain alkanes, alcohols, and their mixtures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 375, p. 1–11, 2023. DOI. 10.1016/j.molliq.2023.121283.

ZAHRANI, N. A. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of

gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, 2020. DOI. 10.1016/j.ejmech.2020.112609.

ZARGOOSH, Z.; GHAVAM, M.; BACCHETTA, G.; TAVILI, A. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. **Scientific Report**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. DOI. 10.1038/s41598-019-52605-8.

ZHANG, X. Y.; CAI, X. H.; LUO, X. D. Chemical constituents of *Allophylus longipes*. **Chinese Journal of Natural Medicines,** v. 10, n. 1, p. 36–39, 2012. DOI. 10.1016/S1875-5364(12)60008-9.

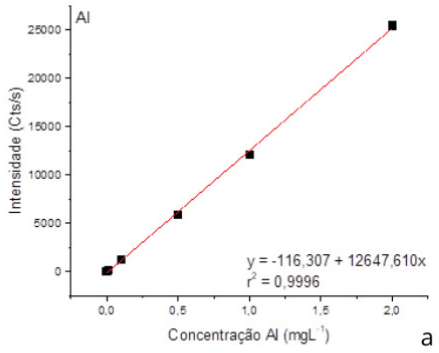
ZHAO, L.; YUAN, X.; WANG, J.; FENG, Y.; JI, F.; LI, Z.; BIAN, J. A review on flavones targeting serine/threonine protein kinases for potential anticancer drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry,** v. 27, n. 5, p. 677–685, 2019. DOI. 10.1016/j.bmc.2019.01.027.

ZHELJAZKOV, V. D.; NOLLER, J. S.; MAGGI, F.; DALE, R. Terpenes and Cannabinoids Yields and Profile from Direct-Seeded and Transplanted CBD - *Cannabis sativa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 34, p. 10417–10428, 2022. DOI. 10.1021/acs.jafc.1c06912.

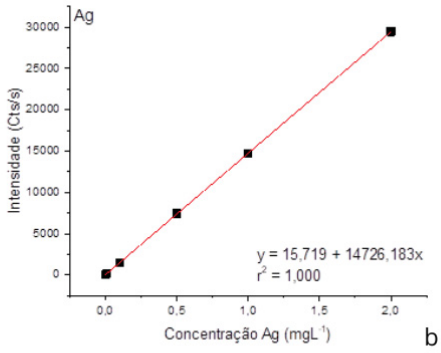
ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**. v. 64, n. 4, p. 555-559 , 1999. DOI. 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1-10, 2020. DOI. 10.1016/j.pbi.2020.01.005.

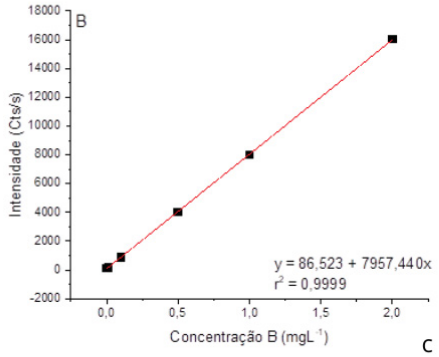
# APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS DOS MINERAIS ANALISADOS POR ICP OES



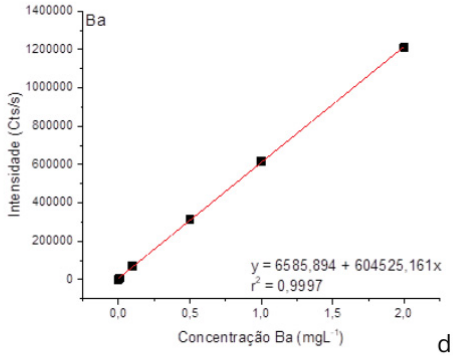

a



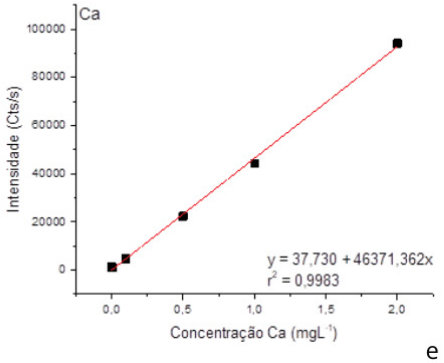

b



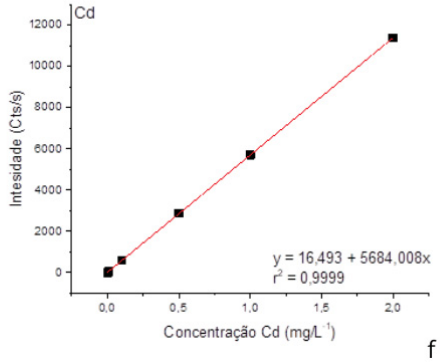

c



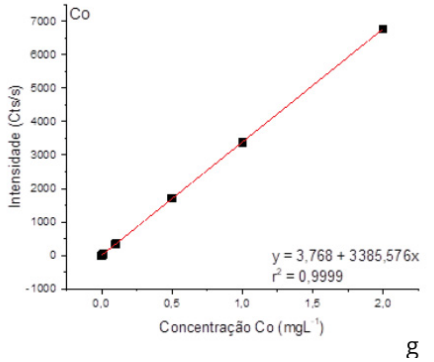

d



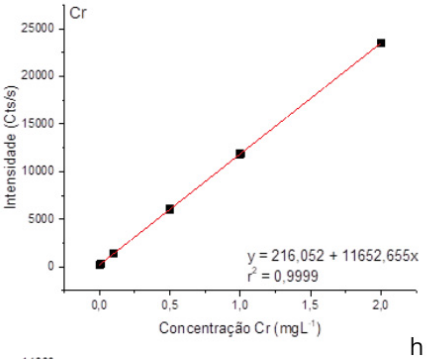

e




f

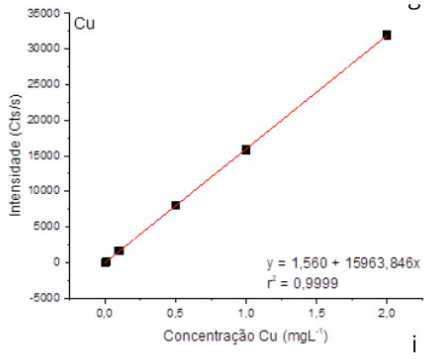



g

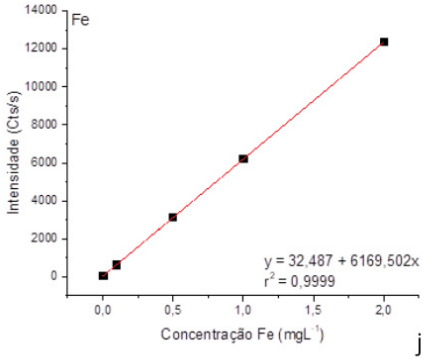



h

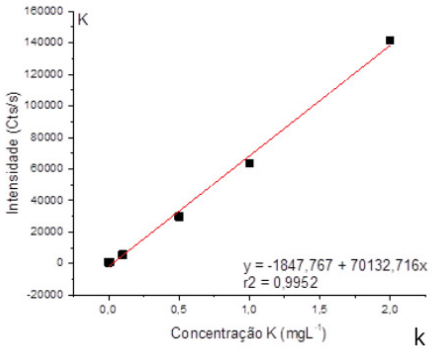
# APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS DOS MINERAIS ANALISADOS POR ICP OES



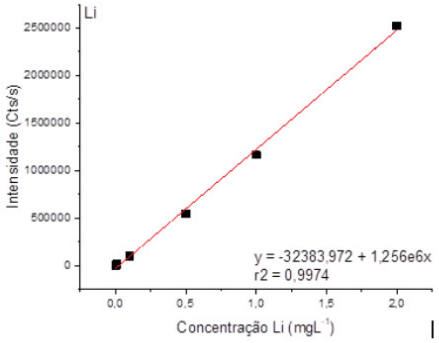

i



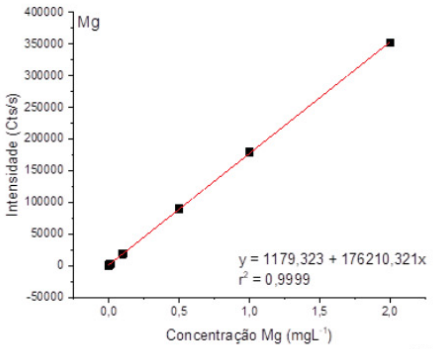

j



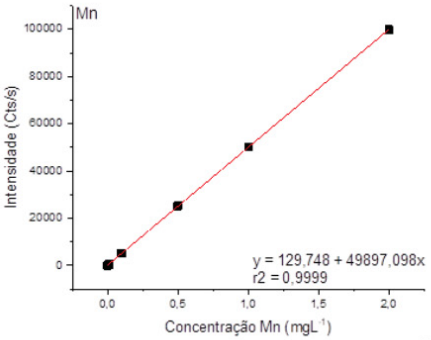

k



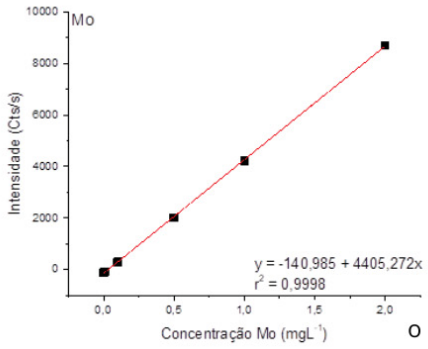

l



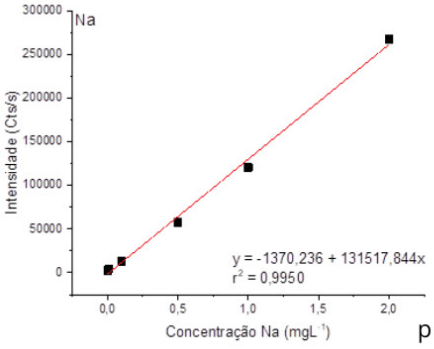

m




n

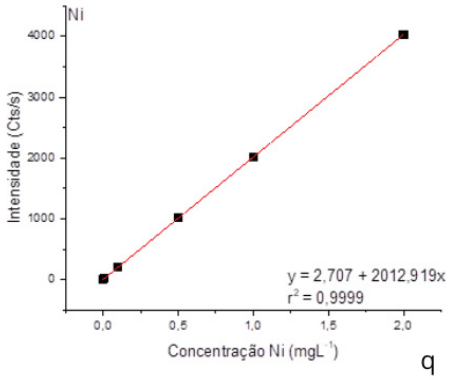



o

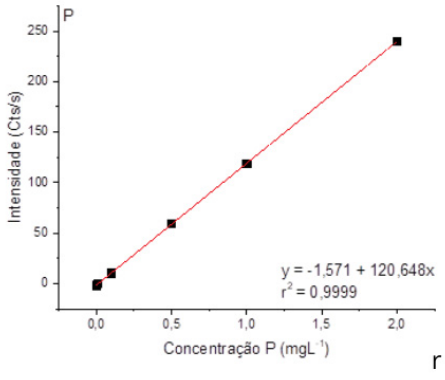



p

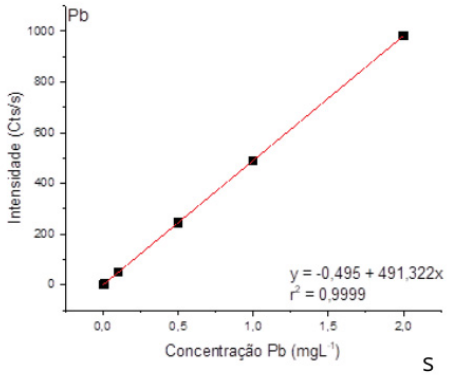
# APÊNDICE 1 – CURVAS ANALÍTICAS DOS MINERAIS ANALISADOS POR ICP OES



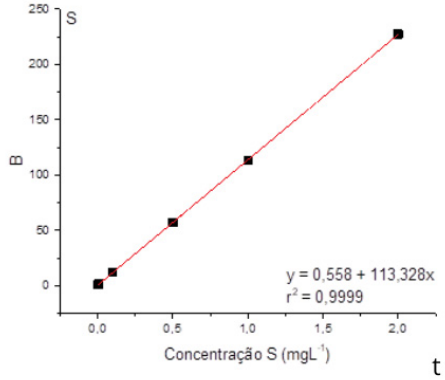

q



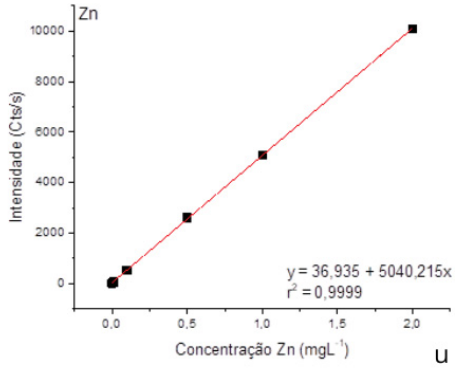

r




s




t

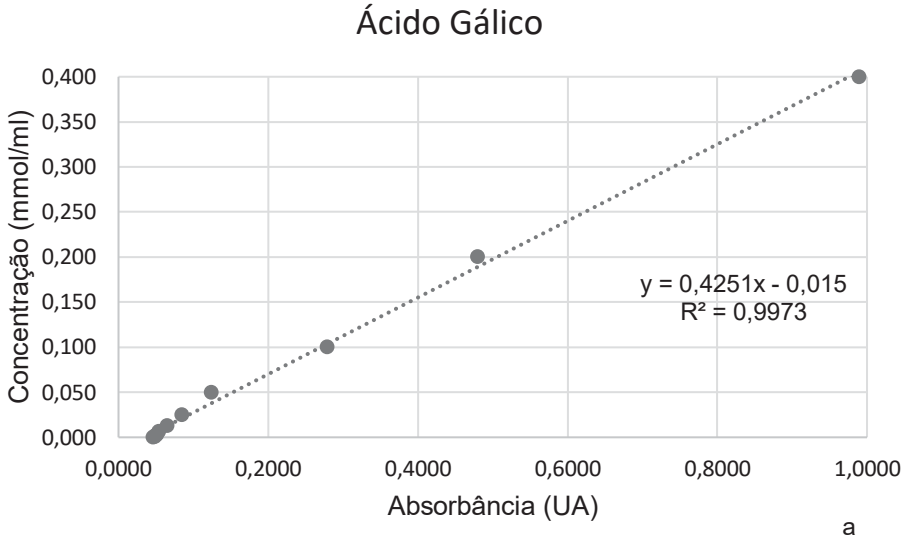



u

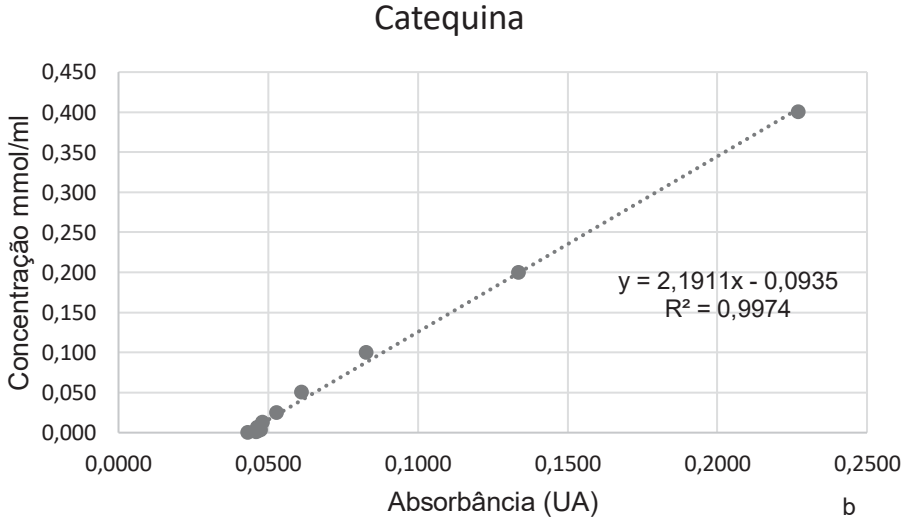
FONTE: A autora (2023).

Nota: a – curva analítica para Ag; b - curva analítica para Al; c - curva analítica para B; d - curva analítica para Ba; e - curva analítica para Ca; f- curva analítica para Cd; g - curva analítica para Co; h - curva analítica para Cr; i - curva analítica para Cu; j - curva analítica para Fe; k - curva analítica para K; l - curva analítica para Li; m - curva analítica para Mg; n - curva analítica para Mn; o - curva analítica para Mo; p - curva analítica para Na; q - curva analítica para Ni; r - curva analítica para P; s - curva analítica para Pb; t - curva analítica para S; u - curva analítica para Zn.

# APÊNDICE 2 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS



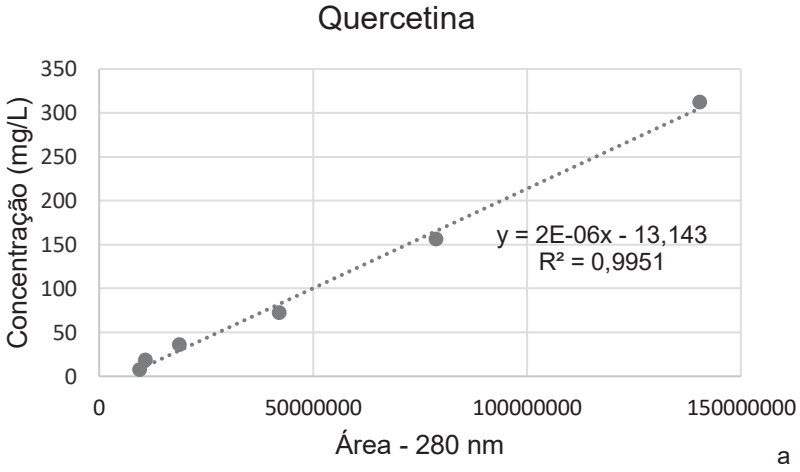

a



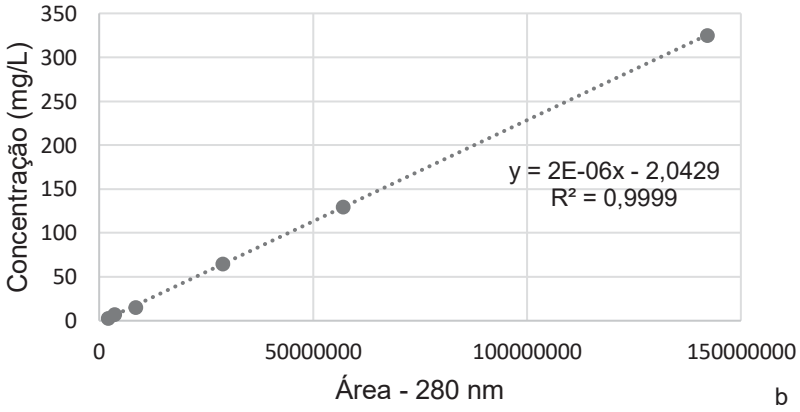

b

FONTE: A autora (2023).
Nota: a – curva analítica do ácido gálico para doseamento de compostos fenólicos totais; b – curva analítica da catequina para doseamento de flavonoides totais.

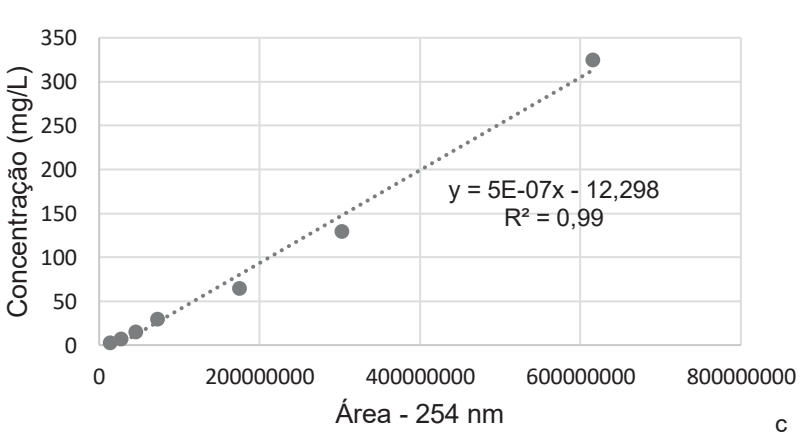
# APÊNDICE 3 – CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS VIA HPLC




a




b

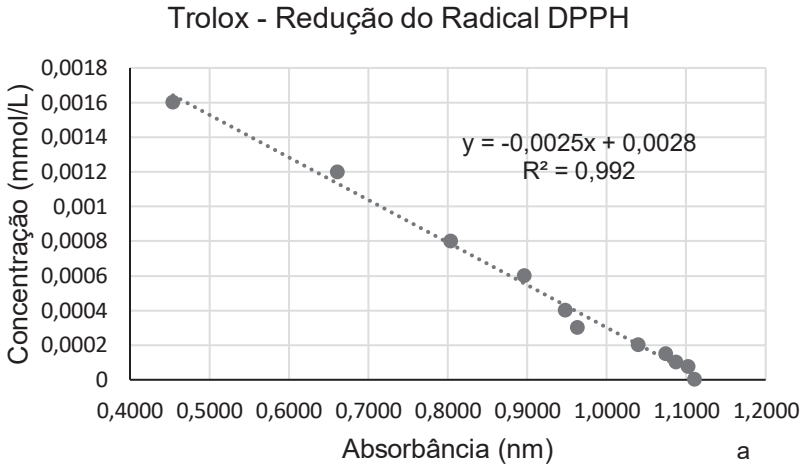



c

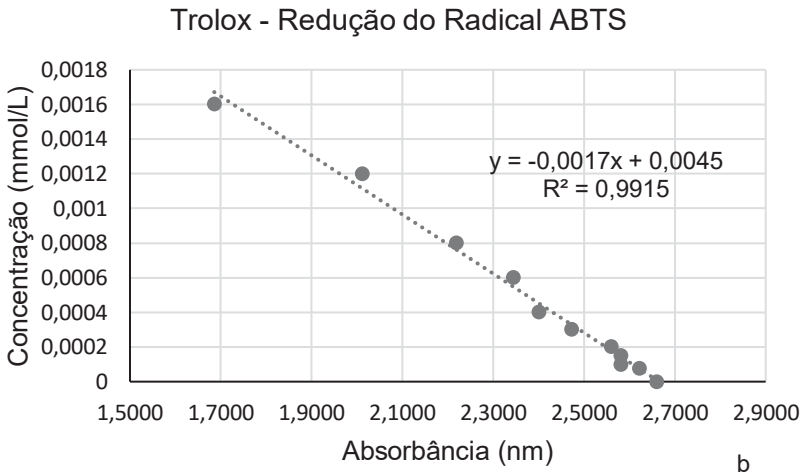
FONTE: A autora (2023).

Nota: Curvas analíticas para quantificação de compostos fenólicos no extrato bruto das folhas de *A. edulis* via HPLC: a – quercetina; b – ácido gálico; c – ácido cafeico.

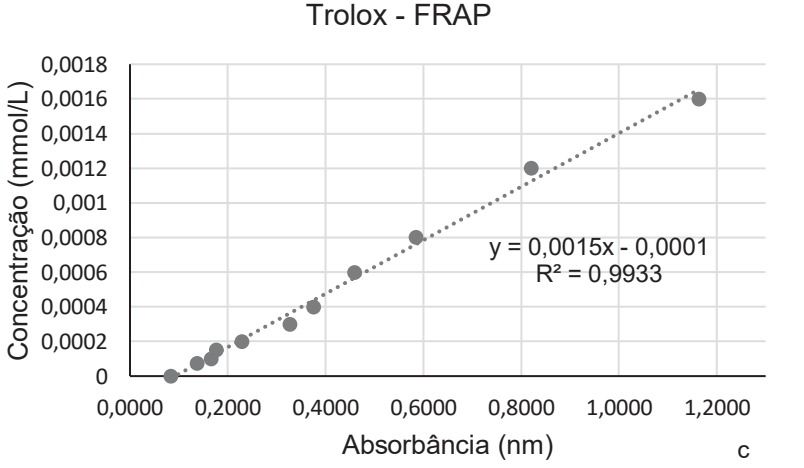
# APÊNDICE 4 – CURVAS ANALÍTICAS DO TROLOX PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE




a




b




c

FONTE: A autora (2023).

Nota: Curvas analíticas do padrão Trolox para determinação da propriedade antioxidante de extratos brutos, frações semipurificadas e óleo essencial obtidos das folhas de *A. edulis* via 3 metodologias: a – redução do radical DPPH; b –redução do radical ABTS; c – FRAP.

# ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO - SISGEN

**Ministério do Meio Ambiente**
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**
**Cadastro nº A42FF90**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

| | |
|---|---|
| Número do cadastro: | **A42FF90** |
| Usuário: | **Universidade Federal do Paraná** |
| CPF/CNPJ: | **76.086.878/0001-48** |
| Objeto do Acesso: | **Patrimônio Genético** |
| Finalidade do Acesso: | **Pesquisa** |

**Espécie**

**Allophylus edulis**

| | |
|---|---|
| Título da Atividade: | **COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL ESTUDO FITOQUÍMICO, E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE Allophylus edulis** |

**Equipe**

| | |
|---|---|
| **Obdulio Gomes Miguel** | **Universidade Federal do Paraná** |
| **Paula Piekarski Barchik** | **UFPR** |
| **Josiane de Fatima Gaspari Dias** | **UFPR** |
| **Marilis Dallarmi Miguel** | **UFPR** |
| **Sila Mary Rodrigues Ferreira** | **UFPR** |

| | |
|---|---|
| Data do Cadastro: | **18/02/2021 14:53:20** |
| Situação do Cadastro: | **Concluído** |

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:13 de 24/02/2021.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN

# ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DE TOMBAMENTO DE AMOSTRA DE *A. EDULIS*

PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA
SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO VEGETAL
DIVISÃO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que se encontra tombada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM) uma amostra de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil. et al.) Hieron. ex Niederl. coletada em Almirante Tamandaré por J. Pierarski. Essa amostra foi registrada com o número de tombo MBM 415392.

Curitiba, 16 de janeiro de 2019.

Marcelo Leandro Brotto
Curador do Herbário MBM
Matrícula 177474

# ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO

doi.org/10.1002/cbdv.202100257

COMMUNICATION

CHEMISTRY & BIODIVERSITY

# Mineral Content, Antioxidant Activity and Essential Oil of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. Leaves: Plant from South American Biodiversity

Paula Piekarski-Barchik,*[a] Suelen Ávila,[b] Sila M. R. Ferreira,[b] Nayana C. S. Santos,[c] Francisco A. Marques,[c] Mayara P. dos Santos,[c] Marco T. Grassi,[c] Marilis D. Miguel,[d] and Obdulio G. Miguel[d]

[a] Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná, Health Science Sector, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil, e-mail: piekarskipaula@gmail.com

[b] Nutrition Department - Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Paraná, Health Science Sector, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil

[c] Department of Chemistry, Federal University of Paraná, 81531-980, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brazil

[d] Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Health Science Sector, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brazil

*Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. (Sapindaceae) is an edible plant from the South American biodiversity that is a potential source of bioactive compounds. The mineral content and antioxidant activity of *Allophylus edulis* leaves were investigated, as well as the composition and the antioxidant activity of the essential oil. The mineral content was determined by ICP – OES and the antioxidant assays were assessed by ABTS, DPPH and FRAP. The essential oil was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. Calcium, potassium, phosphorus, sulfur, and magnesium were the main minerals found in *A. edulis* leaves. Of the toxic metals that were present, a low level of aluminum was detected. The essential oil of *A. edulis* has (*E*)-nerolidol as major compound and both, the leaves, and the essential oil isolated from the leaves have antioxidant potential. These findings could provide a framework for developing new food and non-food products with *A. edulis* leaves.

**Keywords:** alkali metals, mass spectrometry, natural products, sapindaceae, (*E*)-nerolidol.