

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CÍNTIA APARECIDA DOS ANJOS

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS: ALELOPÁTICA, FARMACOLÓGICA  
E DE TOXICIDADE DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

CURITIBA  
2024

CINTIA APARECIDA DOS ANJOS

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS: ALELOPÁTICA, FARMACOLÓGICA  
E DE TOXICIDADE DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Josiane de Fatima G. Dias

CURITIBA

2024

Anjos, Cíntia Aparecida dos

Estudo morfoanatômico, fitoquímico, capacidade antioxidante e atividades biológicas [recurso eletrônico]: alelopática, farmacológica e de toxicidade de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral / Cíntia Aparecida dos Anjos – Curitiba, 2024.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Profa. Dra. Josiane de Fátima G. Dias

1. Farmacologia. 2. Celastraceae. 3. Antioxidantes. 4. Toxicidade. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615



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

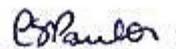
## TERMO DE APROVAÇÃO

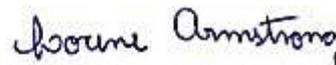
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de CÍNTIA APARECIDA DOS ANJOS intitulada: Estudo Morfoanatômico, Fitoquímico, Capacidade Antioxidante E Atividades Biológicas: Alelopática, Farmacológica E De Toxicidade De *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral., sob orientação da Profa. Dra. MARILIS DALLARMI 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, 08 de Julho de 2024.

  
MARILIS DALLARMI MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora

  
CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
LORENE ARMSTRONG  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
DEISE PREHS MONTRUCCHIO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Esse trabalho é dedicado a Olila Maria da Conceição dos Anjos  
(*in memoriam*), a minha amada mãezinha que, apesar de analfabeta,  
sempre me incentivou a estudar.

## AGRADECIMENTOS

Um dos grandes segredos da vida é aprendermos a dar valor a tudo aquilo que temos. Por vezes, não é fácil encontrarmos as palavras certas para expressarmos quão grande é o sentimento que nutrimos por pessoas que de alguma forma nos ajudaram no decorrer da nossa trajetória.

Começo com a palavra GRATIDÃO... Gratidão a Deus, pela minha vida, pela minha trajetória, pelas oportunidades que me proporcionou, pela clareza e o discernimento nas escolhas que me conduziram até aqui.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (código nº 001).

Gratidão ao Departamento de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pelo acolhimento, oportunidade e pela abertura para realização de análises nos laboratórios.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela realização dos ensaios de ressonância magnética nuclear e Difratomia de raio X de monocristal (Francielli Santana).

Gratidão ao Centro c-Labmu da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela disponibilidade de execução dos testes de morfoanatomia.

Gratidão à professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel pelo seu sim em fevereiro de 2017, pela orientação, pela paciência, pelo incentivo e por todos os ensinamentos que vão muito além dos temas presentes nesse trabalho, professora se hoje estou aqui, foi porque um dia a senhora acreditou em mim e me deu seu voto de confiança, à senhora gratidão eterna.

Gratidão à professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, pela coorientação, pela disponibilidade, pelo auxílio com os resultados das atividades biológicas e por todos os ensinamentos, pelos momentos únicos em nosso laboratório e compartilhamento de seus conhecimentos sempre com muita disposição e paciência, professora muito obrigada.

Gratidão ao professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, meu professor querido, pelo incentivo, pela paciência e por todos os ensinamentos, pela oportunidade de compartilhar a sua presença, o seu conhecimento, professor muito obrigada.

Gratidão à professora Dra. Deise Prehs Montrucchio, pelo auxílio e disposição nas atividades farmacológicas, nas atividades antioxidantes, pelo auxílio nas redações dos artigos publicados e por todos os ensinamentos. Além dos grandes ensinamentos acadêmicos agradeço à amizade, compreensão e estímulo no decorrer de todos esses anos. Professora muito obrigada. Aprendi muito com essa pesquisadora e professora que admiro tanto.

Gratidão à professora Dra. Luciane Dalarmi, pelo auxílio e parceria na publicação de artigos, muito obrigada.

Gratidão à Dra. Suelen Ávila pelo auxílio com a avaliação de compostos fenólicos, flavonoides e propriedades antioxidantes, pelo auxílio e por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada. Pesquisadora admirável.

Gratidão a professora Dra. Lorene Armstrong, por todo auxílio na condução dos estudos morfoanatômicos, pelo conhecimento, pela disponibilidade, pela paciência, pela parceria, pelo companheirismo, pela dedicação, principalmente pela amizade. Pessoa incrível que levo para minha vida, muito obrigada.

Gratidão ao meu filho, João Gabriel de Campos, que mesmo sem saber sempre foi o incentivo para eu enfrentar desafios, alçar novos voos e me tornar uma pessoa mais forte.

Gratidão ao meu querido namorado, companheiro, amigo, confidente, Lincoln Neri Menezes, por todo o amor, paciência, dedicação e auxílio nos momentos mais difíceis, por ser meu parceiro de vida e meu maior incentivador. Se hoje estou aqui foi porque ele está presente na minha vida, meu muito obrigado.

Gratidão à Central do Nobreak® pelo apoio incondicional por todos esses anos, a conclusão deste trabalho foi possível porque esta empresa me apoiou.

Gratidão à minha mãezinha, Olila Maria da Conceição dos Anjos, que há muito tempo me deixou, mas apesar disso foi pelo seu sim a mim, que hoje estou aqui... a minha trajetória começou no dia que ela disse “sim, eu quero essa criança para mim” ... por todo amor, carinho, apoio, educação e incentivo nos primórdios da minha existência.

Gratidão à minha irmã e segunda mãe Eva de Fátima Recofk Garbin e meu cunhado e por vezes pai, Elizeu Garbin, pelo seu sim quando eu mais precisei, pelo meu acolhimento, pela educação e os valores a mim passados, por estarem sempre presentes, me incentivando, me aconselhando.

Gratidão a minha sobrinha e irmã Cleide Francielle Garbin Rodrigues e sobrinho e irmão Helton Eligar Garbin, que embora pequenos, me acolheram quando cheguei na família, nunca se diferenciaram em relação a mim.... esta é a minha família, que tanto amo e sou muito grata por pertencer.

Gratidão a todos os meus familiares, estendo a minha cunhada Larissa Carolina Holthman Garbin e meu cunhado e compadre Jozimar Dionízio Rodrigues que sempre estiveram presentes ora com ações ora com palavras de incentivo e as novas

gerações agradeço a oportunidade de ser estímulo ao José Eduardo Rodrigues, João Pedro Rodrigues, Maria Eloisa Rodrigues, Davi Holthman Garbin e Beatriz Holthman Garbin meus sobrinhos queridos.

Gratidão eterna ao Sr. Vagner de Azevedo Campos e sua família que por tantos anos foram meus patrões.... não somente patrões.... eles sabem, foram muito mais que isso, se cheguei até aqui foi porque um dia eles me ajudaram... e como me ajudaram... sou muito grata a eles e nada que escreva aqui será suficiente para expressar o quanto sou grata.

Gratidão ao Sr. Arcelino Moreira pela contribuição, por dividir o seu conhecimento popular no processo de secagem, conhecimento este que fez toda a diferença no início da pesquisa, muito obrigada Sr. Moreira.

Gratidão a doutoranda Karine Amorin Fladzinski, pela amizade e companhia dentro e fora do laboratório. Foram tantos momentos juntas, tantas histórias, tantas alegrias, tantos desafios, foi muito bom conviver com essa pessoa maravilhosa. Amizade que levo para minha vida. Muito obrigada.

Gratidão a doutoranda Keli Daiane Camargo Rocha, pela amizade e companhia dentro e fora do laboratório. foram muitos os aprendizados. Nossa amizade já vem de longa data e permanecerá para sempre, muito obrigada.

Gratidão a doutoranda Elisiane de Bona Sartor pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo auxílio com as metodologias, por todo suporte a mim concedido em todos esses anos de Pós-graduação, muito mais que colega de laboratório, minha amiga, por vezes minha confidente, agradeço de todo o meu coração... muito obrigada querida Elisiane.

Gratidão aos colegas de laboratório Letícia Mazepa, Paula Piekarski Barchik, Idonilton da Conceição Fernandes, Leandro Taborda da Rocha, Juliana Garcia, Marco

Franceschi, Luciane Tiemi Sugita, Alessandro Castanha, Cleber Marcio Flores, Verônica S. Bednarczuk, Jean Paulo Godoi, pelo incentivo, pela amizade e parceria na condução de ensaios fitoquímicos, nas atividades biológicas, pela parceria nas aulas da Pós-Graduação, por todos os momentos de convivência.

Gratidão ao Dr Fernando Cesar Martins Betim e Camila Freitas de Oliveira pelo auxílio com as análises de atividade larvicida.

Gratidão a Ms 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.

Gratidão a mestranda Elisa Mansur Gomes e a professora Dra. Morgana Duarte da Silva do Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina pelo auxílio, apoio e dedicação nas atividades farmacológicas.

Gratidão ao técnico Jair José de Lima do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio com as análises antioxidantes, pela disponibilidade e pela paciência e pela prontidão em ajudar.

Gratidão a técnica Ms Maria da Graça e Mauricio Passos pelo apoio e ajuda com os equipamentos da Central Analítica. E por sempre estarem dispostos a ouvir com um sorriso no rosto.

Gratidão aos técnicos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal, Paulo Diniz, Gustavo Melo, e Edneia Hitomi de Araujo por toda a ajuda.

Gratidão aos engenheiros florestais Inti Souza e Mateus Lee pelo auxílio com a coleta do material vegetal.

Gratidão ao técnico Rodrigo Trompinski do Herbário Escola de Florestas Curitiba-EFC, com o auxílio na identificação da espécie.

Por fim, gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

(ALBERT EINSTEIN)

## RESUMO

*Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral, popularmente conhecida como coração-de-bugre, é uma espécie nativa do Brasil e está presente nos domínios fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica. Seus exemplares na maioria são de grande porte e fonte de compostos bioativos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros farmacopeicos, estudo morfoanatômico e fitoquímica de folhas e caules de *M. evonymoides*; isolar e identificar compostos bioativos e avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas do extrato bruto e frações. O material vegetal foi coletado em Curitiba, Paraná, Brasil. Após a coleta uma parte foi direcionada ao estudo morfoanatômico, histoquímico e microscopia eletrônica por varredura. Foram identificadas as características morfoanatômicas presentes no gênero, bem como a presença compostos fenólicos, compostos lipofílicos e lignina. Outra parte foi direcionada a preparação e realização dos testes físico-químicos, incluindo teor de sólidos, teor de água e teor de cinzas. Os parâmetros farmacopeicos analisados estão de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Em seguida foram realizados o screening fitoquímico, paralelamente foram obtidos os extratos brutos etanólico e cetônico de folhas e caules (EBF e EBC) em aparelho de Soxhlet, ambos foram direcionados ao particionamento com solventes de polaridade crescente. Foram conduzidas cromatografias em coluna e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , a fim de identificar substâncias bioativas. O EBF e EBC hidroalcoólico apresentou rendimento de 14,74% e 9,46% respectivamente. O EBF e EBC cetônico apresentou rendimento de 9,46% e 6,43% respectivamente. A partir de seu particionamento foram obtidas 4 frações semipurificadas (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente) de cada extrato. Da fração clorofórmio folhas (FCF) foi isolado uma mistura de esteroides campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Da fração clorofórmio folhas cetônico (FCFC) foi isolado uma mistura de friedelina e friedelinol. Extrato bruto e frações hidroalcoólico de folhas e caules foram direcionadas doseamento de fenóis totais (TPC) pelo método de Folin Ciocalteu; doseamento de flavonoides totais (TFC) e às atividades antioxidantes pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP. Destaque para FAEC que apresentou TPC e TFC mais elevados e potencial antioxidante em todos os testes, seguida do EBC. Extrato bruto e frações hidroalcoólico de folhas e caules foram direcionadas as atividades biológicas. Foram avaliados quanto a toxicidade frente à *Artemia franciscana* e potencial hemolítico. Nos ensaios biológicos não foram observadas toxicidade frente a *A. salina* e atividade hemolítica. O efeito alelopático foi verificado em *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. No teste alelopático foi possível observar influência inibitória em ambas as amostras. Foram submetidos a avaliação de atividades biológicas: potencial larvicida contra *Aedes aegypti*; atividade antimicrobiana. Extratos e frações apresentaram potencial larvicida contra *A. aegypti*. Na análise da atividade antimicrobiana não foi observada atividade frente as cepas testadas (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*) nas condições pré-estabelecidas. O EBF foi submetido a ensaios farmacológicos de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, no qual a atividade antinociceptiva foi observada. EBF e EBC foram submetidos ao ensaio de nocicepção induzido pela injeção intraplantar de carragenina, porém os extratos não apresentaram diferença estatística significativa. Os resultados revelam que *M. evonymoides* apresenta segurança, atividade alelopática, potencial larvicida, atividade antioxidante e antinociceptiva

**Palavras-chave:** *Monteverdia*; antioxidante; antinociceptivo; esteroides; friedelina; *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

*Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral, popularly known as buggy heart, is a species native to Brazil and is present in the Phytogeographical Domains of the Cerrado and Atlantic Forest. Most of its specimens are large and a source of bioactive compounds. The objective of the present study was to evaluate the pharmacopoeial parameters, morphoanatomical and phytochemical studies of leaves and stems of *M. evonymoides*; isolate and identify bioactive compounds and evaluate the antioxidant properties and biological activities of the crude extract and fractions. Plant material was collected in Curitiba, Paraná, Brazil. After collection, part was sent to morphoanatomical, histochemical and scanning electron microscopy studies. The morphoanatomical characteristics present in the genus were identified, as well as the presence of phenolic compounds, lipophilic compounds and lignin. Another part was directed at preparing and carrying out physical-chemical tests, including solids content, water content and ash content. The pharmacopoeial parameters analyzed are in accordance with the Pharmacopoeia 6th edition. Phytochemical screening was then carried out, in parallel the crude ethanolic and ketonic extracts of leaves and stems (EBF and EBC) were obtained in a Soxhlet apparatus, both were directed to partitioning with solvents of increasing polarity. Column chromatography and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were conducted in order to identify bioactive substances. The hydroalcoholic EBF and EBC presented yields of 14.74% and 9.46% respectively. The ketonic EBF and EBC showed yields of 9.46% and 6.43% respectively. From its partitioning, 4 semi-purified fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder) were obtained from each extract. A mixture of steroids campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol was isolated from FCF. A mixture of friedelin and friedelinol was isolated from FCFC. Crude extract and hydroalcoholic fractions of leaves and stems were measured for total phenols (TPC) using the Folin Ciocalteou method; determination of total flavonoids (TFC) and antioxidant activities using the ABTS, DPPH and FRAP methods. Highlight for FAEC which presented higher TPC and TFC and antioxidant potential in all tests, followed by EBC. Crude extract and hydroalcoholic fractions of leaves and stems were directed to biological activities. They were evaluated for toxicity against *Artemia franciscana* and hemolytic potential. In biological tests, no toxicity was observed against *A. franciscana* and it did not present hemolytic activity. As for biological tests, the allelopathic effect was verified in monocotyledons (*Allium cepa*) and dicotyledons (*Lactuca sativa*). In the allelopathic test it was possible to observe an inhibitory influence in both samples. They were subjected to evaluation of biological activities: larvicidal potential against *Aedes aegypti*; antimicrobial, antifungal activity. Extracts and fractions showed larvicidal potential against *A. Aegypti*. In the analysis of antimicrobial activity, no activity was observed against the strains tested (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*) under pre-established conditions. EBF was subjected to pharmacological trials of nociception induced by intraplantar injection of formalin, in which the antinociceptive activity was observed. EBF and EBC were subjected to a nociception test induced by intraplantar injection of carrageenan, but the extracts did not show a statistically significant difference. The results reveal that *M. evonymoides* presents safety, allelopathic activity, larvicidal potential, antioxidant and antinociceptive activity.

**Keywords:** *Monteverdia*; antioxidant; antinociceptive; steroids; friedelina; *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA CELATRACEAE.....	35
FIGURA 2	- COMPOSTOS ISOLADOS NA FAMÍLIA CELASTRACEAE R.Br. COM ATIVIDADE BIOLÓGICAS DESCRITA NA LITERATURA.....	37
FIGURA 3	- COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Monteverdia distichophylla</i> (MART. EX REISSEK) BIRAL.....	38
FIGURA 4	- PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	58
FIGURA 5	- DIVERSIDADE ESTRUTURAL DOS FLAVONOIDES.....	59
FIGURA 6	- CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENOS DE ACORDO COM A QUANTIDADE DE ISOPRENO.....	60
FIGURA 7	- EXEMPLOS DE ALCALOIDES PRESENTES NA NATUREZA.....	61
FIGURA 8	- DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral NO BRASIL.....	63
FIGURA 9	- <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral, LOCAL DA COLETA.....	64
FIGURA 10	- EXSICATA DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	65
FIGURA 11	- PROCESSO DE SECAGEM DAS FOLHAS DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	66
FIGURA 12	- PROCESSO DE SECAGEM DOS CAULES DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	66
FIGURA 13	- FLUXOGRAMA DAS FASES DA PESQUISA COM <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	67
FIGURA 14	- FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral EM SOXHLET MODIFICADO.....	81
FIGURA 15	- FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓLICO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	82

FIGURA 16	- FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	83
FIGURA 17	- COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	84
FIGURA 18	- ELUATO OBTIDO A PARTIR DA COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE <i>Monteverdia evonymoides</i> .....	85
FIGURA 19	- COMPOSTO ISOLADO DA FCF DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	86
FIGURA 20	- ENSAIO DE ALELOPATIA EM CAIXA GERBOX.....	93
FIGURA 21	- ÁRVORE, RAMO E FOLHAS DE <i>M. evonymoides</i> .....	102
FIGURA 22	- VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPECIE <i>M. evonymoides</i> .....	103
FIGURA 23	- SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DE <i>M. evonymoides</i> .....	104
FIGURA 24	- SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECIOLO DE <i>M. evonymoides</i> .....	107
FIGURA 25	- SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	109
FIGURA 26	- TESTES HISTOQUÍMICOS DE <i>M. evonymoides</i> .....	111
FIGURA 27	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM OS VALORES DE DESLOCAMENTO.....	127
FIGURA 28	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM VALORES DE DESLOCAMENTO EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0 A 3,0 δ....	128
FIGURA 29	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM VALORES DE DESLOCAMENTO EXPANDIDO NA REGIÃO DE 3,0 A 8,0 δ.	128
FIGURA 30	- ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA FCF02B.....	129

FIGURA 31	- ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA FCF02B EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0 A 70 δ.....	130
FIGURA 32	- ESPECTRO DE RMN DEPT 135 <sup>a</sup> SUBSTÂNCIA FCF02B EXPANDIDO NA REGIÃO ENTRE.....	130
FIGURA 33	- ESTRUTURA QUÍMICA DE CAMPESTEROL, ESTIGMASTEROL E β-SITOSTEROL.....	132
FIGURA 34	- ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES.....	133
FIGURA 35	- BIOSÍNTESE DOS FITOESTEROIDES A PARTIR DO ESQUALENO.....	133
FIGURA 36	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA 1EBCCL.....	135
FIGURA 37	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA 1EBCCL COM VALORES DE DESLOCAMENTO.....	136
FIGURA 38	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA 2EBCAE COM VALORES DE DESLOCAMENTO.....	136
FIGURA 39	- ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL.....	137
FIGURA 40	- ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL EXPANDIDO NA REGIÃO DE 14,65 A 72,75.....	137
FIGURA 41	- ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2EBCAE.....	138
FIGURA 42	- ESPECTRO DE RMN DEPT 135 <sup>o</sup> DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL EXPANDIDO NA REGIÃO ENTRE 6,8 A 61,34.....	139
FIGURA 43	- ESTRUTURA QUÍMICA DA FRIEDELINA E DO FRIEDELINOL.....	141
FIGURA 44	- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS	

	E CAULE DE <i>Monteverdia evonymoides</i> A PARTIR DA CURVA DE GAE, CE E TE.....	149
FIGURA 45	- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE <i>M. evonymoides</i> .....	155
FIGURA 46	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AOS EBF E EBC DE <i>M. evonymoides</i> .....	162
FIGURA 47	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AOS FHF E FHC DE <i>M. evonymoides</i> .....	163
FIGURA 48	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AOS FCF E FCC DE <i>M. evonymoides</i> .....	164
FIGURA 49	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AOS FAEF E FAEC DE <i>M. evonymoides</i> .....	165
FIGURA 50	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> FRENTE AOS FRF E FRC DE <i>M. evonymoides</i> .....	166
FIGURA 51	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE AOS EBF E EBC DE <i>M. evonymoides</i> .....	171
FIGURA 52	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE AOS FHF E FHC DE <i>M. evonymoides</i> .....	172

FIGURA 53	-	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE AOS FCF E FCC DE <i>M. evonymoides</i> .....	173
FIGURA 54	-	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE AOS FAEF E FAEC DE <i>M. evonymoides</i> .....	174
FIGURA 55	-	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>A. cepa</i> FRENTE AOS FRF E FRC DE <i>M. evonymoides</i> .....	175
FIGURA 56	-	RESULTADO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Monteverdia evonymoides</i> .....	180
FIGURA 57	-	EFEITO DO EBF DE <i>M. evonymoides</i> NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	184
FIGURA 58	-	EFEITO DO EBF E EBC DE <i>M. evonymoides</i> NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	186

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	-	HIERARQUIA TAXONÔMICA DE <i>Monteverdia</i> <i>evonymoides</i> (Reissek) Biral.....	62
QUADRO 2	-	REATIVOS UTILIZADOS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS.....	69
QUADRO 3	-	COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS, REVELADORES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD.....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- ESPÉCIES, DISTRIBUIÇÃO E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICA DISTINTIVAS PARA OS GÊNEROS DE ACORDO COM A NOVA DELIMITAÇÃO.....	40
TABELA 2	- NOVAS COMBINAÇÕES PARA ESPÉCIES DE <i>Maytenus</i> QUE PASSARAM A PERTENCER AO GÊNERO <i>Monteverdia</i> .....	42
TABELA 3	- NOMES E INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DESCRITAS NA MEDICINA POPULAR DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO <i>Monteverdia</i> .....	54
TABELA 4	- RESULTADOS DO PARÂMETRO PERDA POR DESSECAÇÃO DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	113
TABELA 5	- DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	114
TABELA 6	- RENDIMENTO* DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO E CETÔNICO DE <i>M. evonymoides</i> .....	115
TABELA 7	- EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO DAS FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> RESERVADOS PARA AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	115
TABELA 8	- COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	116
TABELA 9	- COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. evonymoides</i> .....	117
TABELA 10	- PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS NO EXTRATO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> POR CCD.....	120
TABELA 11	- RENDIMENTO* DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO E CETÔNICO DAS FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	124

TABELA 12	- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DE RMN $^{13}\text{C}$ (50MHz, $\text{CDCl}_3$ ) DOS ESTEROIDES CAMPESTEROL, ESTIGMASTEROL E $\beta$ -SITOSTEROL.....	131
TABELA 13	- VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DE RMN $^{13}\text{C}$ /DEPT PARA 1EBCCL E DADOS DA LITERATURA PARA FRIDELINA E FRIEDELINOL.....	139
TABELA 14	- TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> A PARTIR DA CURVA DE EAG E CE.....	143
TABELA 15	- CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> A PARTIR DA CURVA DE TE.....	146
TABELA 16	- ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ABTS, DPPH• E FRAP PELO MÉTODO DE PEARSON.....	150
TABELA 17	- MORTALIDADE DE <i>A. franciscana</i> E $\text{CL}_{50}$ UTILIZANDO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULE DE <i>M. evonymoides</i> .....	152
TABELA 18	- AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE <i>M. evonymoides</i> .....	153
TABELA 19	- INFLUÊNCIA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. evonymoides</i> NO IVG E NA GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....	157
TABELA 20	- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE <i>M. Evonymoides</i> .....	159
TABELA 21	- INFLUÊNCIA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. evonymoides</i> NO IVG E NA GERMINAÇÃO DE <i>A. cepa</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....	167

TABELA 22	- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E COLEÓPTILO DE SEMENTES DE <i>A. cepa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DA <i>M. Evonymoides</i> .....	169
TABELA 23	- INDUÇÃO DE MORTALIDADE EM LARVAS DE <i>A. aegypti</i> POR EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>M. evonymoides</i> .....	177
TABELA 24	- RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE EXTRATOS E FRAÇÕES <i>M. evonymoides</i> .....	179

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. C.	-	Antes de Cristo
ARRIVE	-	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i> (Pesquisa Animal: Relatórios de Experimentos <i>In Vivo</i> )
ANVISA	-	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
ATCC®	-	<i>The American Type Culture Collection</i>
ABTS	-	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	-	Análise de variância unidirecional
BOD	-	<i>Biochemical oxygen demand</i>
C	-	Caule
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CDC	-	Centro de controle de doenças
CE	-	Equivalentes de catequina
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	-	Concentração letal 50%
CL <sub>90</sub>	-	Concentração letal 90%
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSA	-	Ensaio de micro diluição em caldo
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DEPT	-	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DL <sub>50</sub>	-	Dose letal 50%
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DPPH•	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	-	Equivalentes de ácido gálico
EB	-	Extrato bruto
EBF	-	Extrato bruto folhas
EBFC	-	Extrato bruto folhas cetônicas
EBC	-	Extrato bruto caule
EBCC	-	Extrato bruto caule cetônico
ECL	-	Extrato clorofórmio
EDS	-	Espectroscopia de raio X por dispersão de energia

EFC	-	Escola de Florestas Curitiba
EH	-	Extrato Hexano
ET	-	Equivalentes de trolox
F	-	Folhas
FAA	-	Formaldeído, ácido acético e etanol 70% (1:1:18 v/v/v)
FAE	-	Fração acetato de etila
FAEC	-	Fração acetato de etila caule
FAECC	-	Fração acetato de etila caule cetônico
FAEF	-	Fração acetato de etila folhas
FAEFC	-	Fração acetato de etila folhas cetônicas
FC	-	Fração clorofórmio
FCC	-	Fração clorofórmio caule
FCCC	-	Fração clorofórmio caule cetônico
FCF	-	Fração clorofórmio folhas
FCFC	-	Fração clorofórmio folhas cetônico
FESEM	-	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
FFFB	-	Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
FH	-	Fração hexano
FHC	-	Fração hexano caule
FHCC	-	Fração hexano caule cetônico
FHF	-	Fração hexano folhas
FHFC	-	Fração hexano folhas cetônicas
FR	-	Fração remanescente
FRAP	-	Poder antioxidante de redução do ferro
FRF	-	Fração remanescente folhas
FRFC	-	Fração remanescente folhas cetônicas
FRC	-	Fração remanescente caule
FRCC	-	Fração remanescente caule cetônico
FTN	-	Formulário Terapêutico Nacional
G%	-	Porcentagem de germinação
IC	-	Intervalo de confiança
IVG	-	Índice de velocidade de germinação
LANDI	-	Laboratório de Neurociência da Dor e Inflamação

MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	-	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MHB	-	Caldo Miller-Hinton
NEU	-	Difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 5% em etanol.
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PBS	-	Tampão fosfato salino
RENAME	-	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	-	Rotações por minuto
RPMI	-	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SE	-	Solução estoque
SISGEN	-	Sistema Nacional de Proteção ao Patrimônio Genético
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TFC	-	<i>Total Flavonoids Content</i>
TPC	-	<i>Total Phenolic Compounds</i>
TPTZ	-	2,4,6 - tripidil-s-tri-azine
TSA	-	<i>Tryptic Soy Agar</i> (Agar Triptona de Soja)
TSB	-	<i>Trypticase Soy Broth</i> (Caldo de Soja Trypticase)
TTC	-	2, 3, 5 - trifeniltetrazólio cloreto
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UFCS	-	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	-	Raios ultravioleta
UV/VIS	-	Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
1.1	OBJETIVOS .....	33
1.1.1	Objetivo geral .....	33
1.1.2	Objetivos específicos.....	33
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
2.1	FAMÍLIA CELASTRACEAE R.BR.....	35
2.2	GÊNERO <i>Monteverdia</i> A. RICH .....	38
2.2.1	Grupos fitoquímicos e compostos isolados do gênero <i>Monteverdia</i> A. Rich.....	56
2.3	ESPÉCIE <i>Monteverdia evonymoides</i> (REISSEK) BIRAL .....	62
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	64
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	68
3.2.1	Preparo de lâminas semipermanentes .....	68
3.2.2	Técnica de diafanização ou clareamento .....	68
3.2.3	Testes histoquímicos .....	69
3.2.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	69
3.2.5	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva .....	70
3.3	PARÂMETROS FARMACOPEICOS .....	70
3.3.1	Umidade (Perda por dessecação) .....	70
3.3.2	Determinação de cinzas .....	71
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E CETÔNICOS .....	71
3.4.1	Teor de sólidos .....	72
3.5	ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	72
3.5.1	Preparo do extrato aquoso a 20% .....	73
3.5.1.1	Pesquisa de heterosídeos antocianícos.....	73
3.5.1.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos .....	73
3.5.1.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos.....	74
3.5.1.4	Pesquisa de taninos .....	74
3.5.1.5	Pesquisa de aminogrupos .....	74
3.5.1.6	Pesquisa de ácidos fixos .....	74
3.5.1.7	Pesquisa de ácidos voláteis .....	75
3.5.2	Preparo do extrato hidroalcolico a 20% .....	75

3.5.2.1	Pesquisa de alcaloides .....	76
3.5.2.2	Pesquisa de leucoantocianidinas .....	76
3.5.2.3	Pesquisa de flavonoides .....	76
3.5.2.4	Pesquisa de cumarinas .....	77
3.5.2.5	Pesquisa de substâncias iridoidais .....	78
3.5.2.6	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos .....	78
3.5.2.7	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos.....	79
3.6	PERFIL FITOQUÍMICO POR CCD.....	79
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	81
3.7.1	Fracionamento.....	81
3.7.2	Isolamento dos compostos .....	83
3.7.2.1	Identificação de substâncias isoladas das frações FCF, FCFC e FAEFC ....	85
3.8	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDEOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	86
3.8.1	Teor de compostos fenólicos totais pelo método de <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	86
3.8.2	Teor de Flavonoides .....	87
3.8.3	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> .....	87
3.8.3.1	Captura do cátion radical ABTS•+ .....	88
3.8.3.2	Redução do Radical DPPH• .....	89
3.8.3.3	Poder de redução do ferro (FRAP) .....	89
3.9	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	90
3.9.1	Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia franciscana</i> .....	90
3.9.2	Avaliação da atividade hemolítica <i>in vitro</i> .....	91
3.9.3	Avaliação da atividade alelopática.....	92
3.9.4	Avaliação da capacidade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> .....	94
3.9.5	Avaliação da atividade antibacteriana de <i>M. evonymoides</i> .....	95
3.9.5.1	Avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações.....	96
3.9.5.2	Atividade antifúngica do extrato e frações .....	96
3.9.5.3	Interpretação dos resultados .....	97
3.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	97
3.10.1	Caracterização e local da pesquisa .....	97
3.10.2	Animais experimentais.....	98
3.10.3	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%).....	99
3.10.4	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina.....	99

3.10.5	Análise estatística.....	100
<b>4</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	101
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO E HISTOQUÍMICO.....	101
4.2.1	Morfoanatomia da folha.....	101
4.2.2	Morfoanatomia do pecíolo.....	107
4.2.3	Morfoanatomia do caule.....	109
4.2.4	Análises histoquímicas.....	110
4.3	PARÂMETROS FARMACOPEICOS.....	112
4.3.1	Perda por dessecação.....	113
4.3.2	Determinação de cinzas.....	113
4.4	PREPARO DO EXTRATO BRUTO E RENDIMENTO.....	114
4.5	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	115
4.6	PERFIL FITOQUÍMICO POR CCD.....	119
4.7	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	123
4.7.1	Fracionamento.....	123
4.7.2	Isolamento dos compostos de folhas de <i>M. evonymoides</i> .....	124
4.7.3	Identificação estrutural da substância FCF02B.....	125
4.7.4	Identificação estrutural da substância 1EBCCL e 2EBCAE.....	134
4.8	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDEOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	142
4.9	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	151
4.9.1	Avaliação da Toxicidade Frente a <i>Artemia franciscana</i> .....	151
4.9.2	Avaliação da Atividade Hemolítica.....	153
4.9.3	Avaliação da Atividade Alelopática.....	156
4.9.3.1	Teste de Germinação e de Crescimento de <i>Lactuca sativa</i> .....	157
4.9.3.2	Teste de Germinação e Crescimento de <i>Allium cepa</i> .....	167
4.9.4	Avaliação da capacidade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> .....	176
4.9.5	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	179
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	182
4.10.1	Nocicepção induzida por formalina.....	183
4.10.2	Nocicepção induzida por carragenina.....	185
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>188</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>191</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>192</b>
-------------------------	------------

<b>APÊNDICE A CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....</b>	<b>219</b>
<b>APÊNDICE B CURVAS ANALÍTICAS DO TROLOX PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>220</b>
<b>ANEXO A APROVAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO..</b>	<b>221</b>
<b>ANEXO B APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 23075.027346/2013-18.....</b>	<b>222</b>
<b>ANEXO C APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS CEUA: 3328200323.....</b>	<b>223</b>
<b>ANEXO D ARTIGO PUBLICADO 1.....</b>	<b>224</b>
<b>ANEXO E ARTIGO PUBLICADO 2.....</b>	<b>225</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas nos últimos séculos têm sido foco de estudos científicos no campo de produtos naturais em virtude de apresentarem propriedades medicinais (Valli; Bolzani, 2019; Newman; Cragg, 2020; Ribeiro *et al.*, 2021). Existem diversas formas de se pesquisar novos fármacos, sendo a química de produtos naturais uma importante ferramenta (Barreiro; Bolzani, 2009; Aware *et al.*, 2022), que vem ganhando espaço ao longo dos anos, seja *per-se*, seja como fonte de bioativos (Viegas; Bolzani; Barreiro, 2006; Aware *et al.*, 2022). No *Dictionary of Natural Products* estão catalogados aproximadamente 160.000 compostos, desses estima-se que 80% apresentam características favoráveis com potencial para serem modelos de fármacos (Berlink *et al.*, 2017). As florestas tropicais apresentam potencial para a descoberta de novos compostos biologicamente ativos e essa diversidade pode ser útil na investigação de novos modelos e compostos químicos (Braz Filho, 2010; Valli; Bolzani, 2019).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que cerca de 80% da população, de países em desenvolvimento, já fez ou faz uso de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e destes, 85% utilizam plantas medicinais. No Brasil, a situação não é diferente, e muitas vezes, o uso de plantas medicinais é o único recurso terapêutico acessível de algumas comunidades e grupos étnicos (Melro *et al.*, 2020).

Diante deste cenário, o Brasil destaca-se das demais nações, pois é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, com seis biomas terrestres (Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pampas, Pantanal e Savana) distribuídos em uma área de aproximadamente 8.511.996 Km<sup>2</sup> (Valli; Russo; Bolzani, 2018).

Dessa forma, ressalta-se como fonte de compostos bioativos naturais que podem servir para o desenvolvimento de diversas áreas, dentre os quais, destacam-se indústria alimentícia, botânica, farmacologia, biotecnologia, química orgânica, medicina, agricultura e veterinária (Braz Filho, 2010; Valli; Bolzani, 2019), justificando a importância de sua preservação tanto pelo seu valor intrínseco, quanto pelo seu potencial farmacológico (Barreiro; Bolzani, 2009).

Dentro da família Celastraceae R.Br.(angiospermas) estão descritos aproximadamente 100 gêneros com mais de 1200 espécies (Simmons *et al.*, 2008;

Callies *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2017), dividida em 5 subfamílias, Celastroideae, Hippocrateoideae, Salacioideae, Parnassioideae e Stackhousioideae (Lombardi; Biral, 2016) que estão presentes em todo o território nacional (Flora e Funga do Brasil, 2020).

O gênero *Monteverdia* possui origem nativa e ocorre em todas as regiões brasileiras, estão listadas 49 espécies com domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal. Destas, 36 espécies são endêmicas (Flora e Funga do Brasil, 2022). Espécies do gênero são utilizadas para tratamento de gastrites, dispepsias e no tratamento coadjuvante de úlceras pépticas (Brasil, 2022; Brasil 2021), dois exemplos popularmente conhecidos são as espécies *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral e *Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral, (Mariot; Barbieri, 2008; Flora e Funga do Brasil, 2022). Ambas são conhecidas como espinheira-santa, cancorosa e apresentam importantes atividades farmacológicas (Leme *et al.*, 2013). As duas espécies, embora distintas, são assim chamadas popularmente por apresentarem as folhas com margens espinescentes e são associadas ao mesmo efeito terapêutico (Mariot; Barbieri, 2008; Veloso *et al.*, 2017).

*Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral é conhecida popularmente como coração-de-bugre (Flora e Funga do Brasil, 2020). Está presente nos Domínios Fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica com ocorrências confirmadas nas regiões Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Flora e Funga do Brasil, 2020) e estudos são escassos na literatura.

Diante do exposto, a pesquisa com plantas medicinais continua sendo importante na descoberta de novas substâncias dotadas de atividade farmacológica que podem fazer parte da composição de futuros fármacos, que poderão ser utilizados no tratamento e controle de patologias, bem como, na prevenção de doenças. As perspectivas apresentadas mostram o interesse na pesquisa de espécies vegetais ainda sem estudo. A riqueza vegetal brasileira somada a escassez de espécies estudadas, denotam uma variedade de moléculas a serem descobertas. Ademais, devido a existência de poucas informações em literaturas técnicas e científicas acerca da composição química e atividades biológicas de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral, se faz relevante e justifica-se o seu estudo, em busca de substâncias providas de atividades de interesse científico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar o estudo morfoanatômico, fitoquímico e investigar o potencial antioxidante, biológico e farmacológico de extratos e frações provenientes das folhas e dos caules de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar coleta do material vegetal, fazer a identificação e depósito da exsicata de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral;
- Realizar o estudo morfoanatômico de folhas e caules;
- Avaliar os parâmetros farmacopeicos;
- Preparar os extratos etanólico e cetônico e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e residual a partir das folhas e caules;
- Pesquisar o perfil fitoquímico da espécie;
- Fracionar os extratos e identificar as principais classes de constituintes presentes nos extratos etanólico e cetônico e nas frações;
- Isolar e identificar compostos químicos de extratos e frações;
- Identificar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais;
- Verificar o potencial antioxidante do extrato etanólico e frações por meio da captura do cátion radical ABTS; da capacidade sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•); redução do ferro (FRAP);
- Verificar a toxicidade do extrato etanólico e frações frente ao microcrustáceo *Artemia franciscana*;
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato etanólico e frações;
- Verificar o potencial alelopático do extrato etanólico e frações frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) por ensaios de germinação e crescimento;
- Avaliar o potencial larvicida de extrato etanólico e frações de folhas e caules em *Aedes aegypti*;

- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico e frações de folhas e caules;
- Verificar atividade antinociceptiva do extrato etanólico de folhas e caules em modelos *in vivo*.

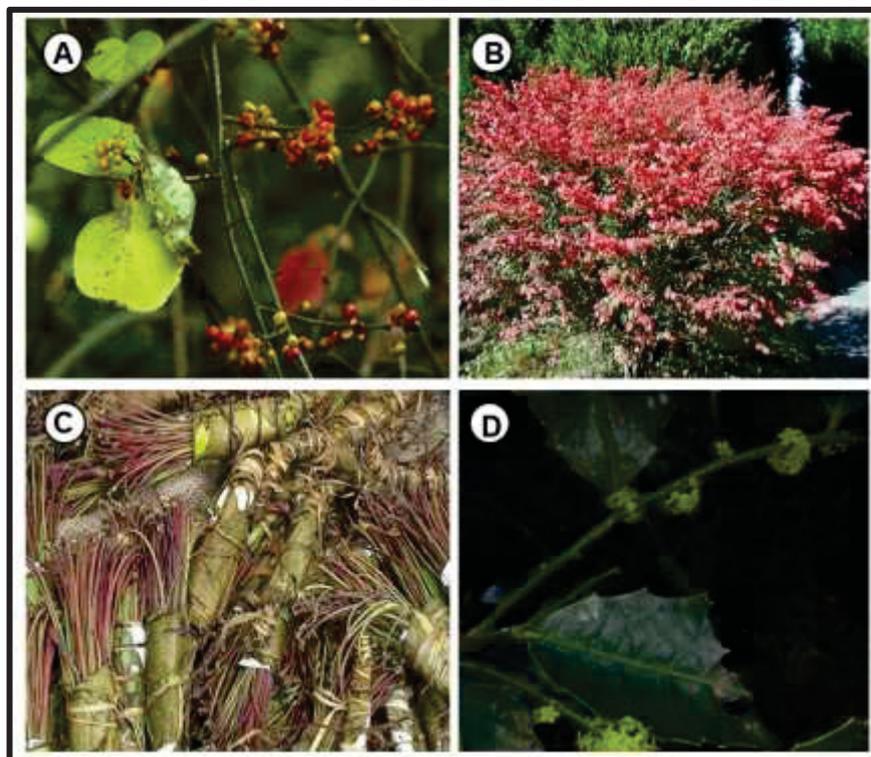
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA CELASTRACEAE R.BR.

A família Celastraceae R.Br. é conhecida mundialmente como família agridoce, estima-se que pertençam a esta família aproximadamente 100 gêneros com mais de 1200 espécies (Simmons *et al.*, 2008; Callies *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2017). É dividida em 5 subfamílias, Celastroideae, Hippocrateoideae, Parnassioideae Salacioideae, e Stackhousioideae (Lombardi; Biral, 2016).

Estão presentes nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Bazzocchi; Nuñez; Reyes, 2017; Callies *et al.*, 2017; Camargo *et al.*, 2020). No Brasil, estão presentes em todo o território nacional, apresenta 48 espécies nativas, destas, 35 espécies são endêmicas (Biral *et al.*, 2017; Flora e Funga do Brasil, 2020). A FIGURA 1 apresenta alguns exemplos de espécies pertencentes a Família Celastraceae: *Celastrus orbiculatus* Thunb., *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold, *Catha edulis* Forsk., *Monteverdia aquifolium* (Mart.) Biral.

FIGURA 1 – DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA CELASTRACEAE



FONTE: Flora e Funga do Brasil (2020).

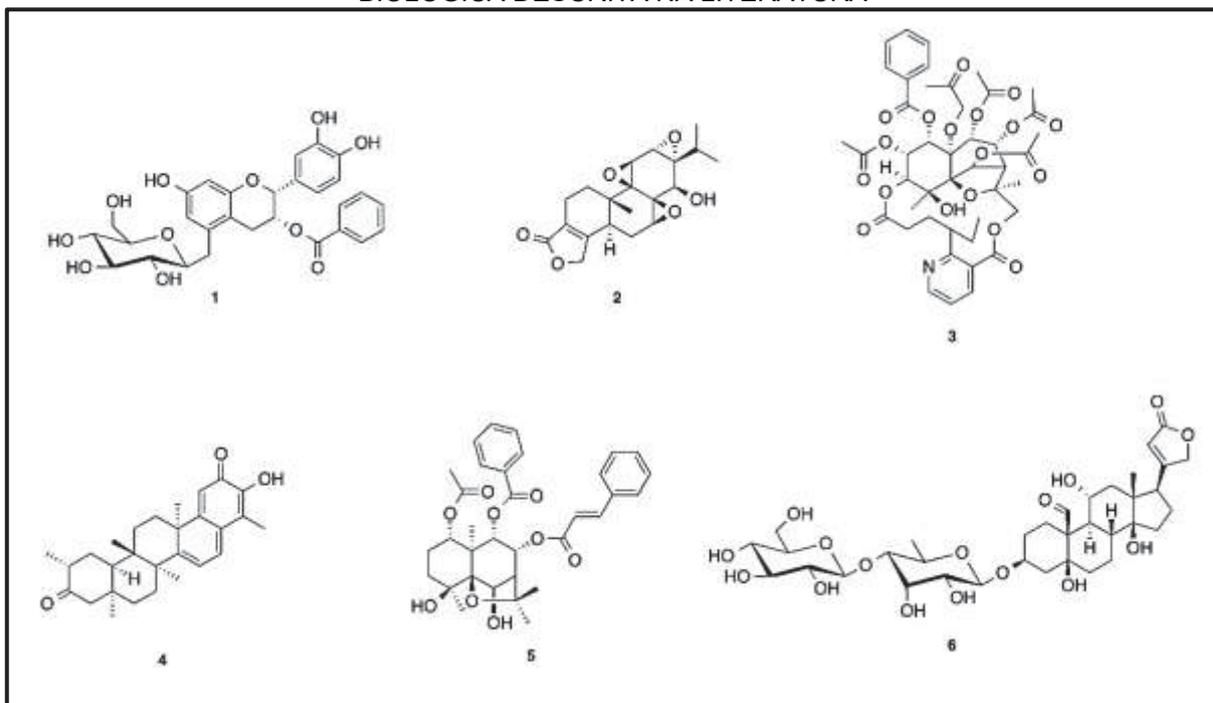
NOTA: A: *Celastrus orbiculatus*; B: *Euonymus alatus*, C: *Catha edulis*, D: *Monteverdia aquifolium*.

Todas as espécies são lenhosas, sendo árvores, arbustos, subarbustos, lianas ou trepadeiras e possuem folhas, com margem inteiras, crenadas e frequentemente serreadas, de filotaxia alterna ou oposta, raramente verticilada, (Bukhari; Jantan; Seyed, 2015; Callies *et al.*, 2017; Camargo *et al.*, 2020). Apresentam flores bissexuadas, por vezes funcionalmente unissexuais, pequenas, actinomorfas, hipóginas a epíginas (Carvalho-Okano, 2005).

Pertencem a família Celastraceae espécies que são utilizadas na medicina popular e na agricultura há muitos anos, a exemplo de: *Monteverdia aquifolia*, *Monteverdia ilicifolia* (González, 2000; Bazzocchi; Nuñez; Reyes, 2017; Callies, *et al.*, 2017; Camargo *et al.*, 2020). Destacam-se as atividades abortivas, antipiréticas, antiartrites, antileucêmicas, antimaláricas (Bukhari; Jantan; Seyed, 2015; Callies *et al.*, 2017), antibacterianas, anticancerígenas, anti-inflamatória, antioxidante, inibidora da acetilcolesterase (Camargo *et al.*, 2020) e para tratar distúrbios digestivos (Bazzocchi; Nuñez; Reyes, 2017; Bukhari; Jantan; Seyed, 2015).

A partir da família Celastraceae muitas classes de metabólitos secundários foram identificadas, predominantemente os terpenos que são importantes para a quimiofenética dessa família (Camargo *et al.*, 2020). Destacam-se ainda compostos isolados (FIGURA 2) que apresentam diversas atividades biológicas (Veloso *et al.*, 2017): (-)-epicatequina-5-O- $\beta$ -D-glucosil 3-benzoato (1) que apresenta atividade antioxidante (Hwang *et al.*, 2001), triptólido (2) que apresenta atividade inseticida (Luo *et al.*, 2004), opositina A (3) com atividade citotóxica contra células tumorais no cólon humano (Whitson *et al.*, 2006), tingenona (4) que apresenta atividades antimicrobiana e antinociceptiva (Veloso *et al.*, 2014), 1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-dihidro- $\beta$ -agarofurano (5) com atividade de inibição da fotossíntese (Torres-Romero *et al.*, 2008) e elaeodendrosídeo W (6) com atividade antiproliferativa no tratamento de câncer de ovário humano (Hou *et al.*, 2009).

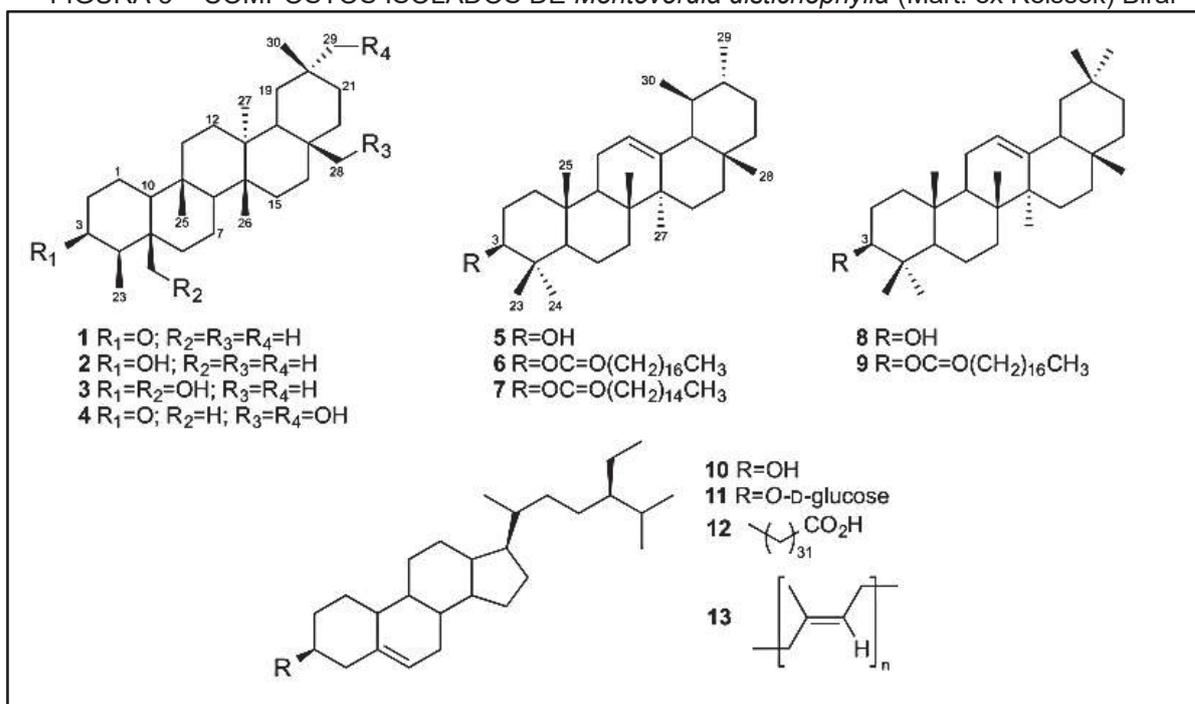
FIGURA 2 – COMPOSTOS ISOLADOS NA FAMÍLIA CELASTRACEAE R.Br. COM ATIVIDADE BIOLÓGICA DESCRITA NA LITERATURA



FONTE: Adaptado de Veloso *et al.*, (2017).

NOTA: (1) composto (-)-epicatequina-5-O-β-d-glucosil 3-benzoato; (2) composto triptólido; (3) opositina A; (4) tingenona; (5) 1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-di-hidro-β-agarofurano; (6) elaeodendrosídeo W.

Ferreira *et al* (2017) investigou a atividade inibitória da acetilcolinesterase *in vitro* em espécies da família Celastraceae, *Monteverdia distichophylla* (Mart. ex Reissek) Biral e *Salacia crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don. Os autores observaram que apesar das espécies pertencerem a biomas distintos, ambas apresentaram uma série de compostos similares, indicando que possivelmente a família Celastraceae faz uso de rotas biossintéticas semelhantes na produção dos metabólitos secundários (Ferreira *et al.*, 2017). No estudo foram isolados e identificados (FIGURA 3): 3-oxofriedelano (1), 3β-hidroxifriedelano (2), 3β, 24-di-hidroxifriedelano (3) e 3-oxo-28,29-di-hidroxifriedelano (4), mistura de α-amirina (5) e β-amirina (8), mistura de derivados de PCTT 3β-esteariloxi-urs-12-eno (6) e 3β-esteariloxi-olean-12-eno (9), 3β-palmitiloxi-urs-12-eno (7), o esteróide β-sitosterol (10) e seu derivado glicosilado β-glucosil-β-sitosterol (11), ácido tritriacontanóico (12) e o polímero natural guta percha (13). Ambas as espécies apresentam os compostos 1, 2, 5, 10, 12 e 13 (Ferreira *et al.*, 2017).

FIGURA 3 – COMPOSTOS ISOLADOS DE *Monteverdia distichophylla* (Mart. ex Reissek) Biral

FONTE: Adaptado de Ferreira *et al.*, (2017).

Nota: (1) 3-oxofriedelano; (2) 3 $\beta$ -hidroxifriedelano; (3) 3 $\beta$ , 24-di-hidroxifriedelano; (4) 3-oxo-28,29-di-hidroxifriedelano; (5) mistura de  $\alpha$ -amirina; (6) mistura de derivados de PCTT 3 $\beta$ -esteariloxi-urs-12-eno; (7) 3 $\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno; (8)  $\beta$ -amirina; (9) 3 $\beta$ -esteariloxi-olean-12-eno; (10)  $\beta$ -sitosterol; (11) glicosilado  $\beta$ -glucosil- $\beta$ -sitosterol; (12) ácido tritriacontanóico; (13) guta percha.

## 2.2 GÊNERO *Monteverdia* A. Rich

Inicialmente o gênero *Monteverdia* A. Rich foi descrito por Richard (1845) com base em uma única espécie, a *Maytenus buxifolia* (A.Rich.) Griseb. de Cuba. De acordo com Biral *et al* (2017), a princípio:

Richard (1845) distinguiu *Monteverdia* de *Celastrus*, *Euonymus* e *Myginda*, com base em seus frutos coriáceos e indeiscentes, com arilos que cobrem completamente as sementes. Dado que os espécimes do herbário de Richard, que desde então foram depositados em P, só têm frutos imaturos, sua inferência de que eles são indiscutíveis está equivocada. Grisebach (1866) tratou *Monteverdia* como sinônimo de *Maytenus*, devido a seus frutos e arilos semelhantes. Ele tratou *Monteverdia* provisoriamente como uma seção de *Maytenus*, mas não publicou a seção validamente. Esta seção também incluiu *Maytenus cochearearolia* Griseb., *M. elaeidendroides* Griseb. e *M lineata* C. Wright ex Griseb., todos endêmicos de Cuba.

Por muito tempo *Monteverdia* foi considerada como sendo sinônimo de *Maytenus*. A delimitação do gênero *Maytenus* vem sendo debatido há muitos anos, em relação a sua segregação e fusão (Biral *et al.*, 2017).

Loesener (1942) delimitou *Gymnosporia* como espécie do Velho Mundo com espinhos e / ou braquilblastos e folhas fasciculadas, enquanto plantas semelhantes desarmadas com folhas espirais ou distichous (mas não fasciculadas) foram atribuídas a *Maytenus*.

Loesener (1942) transferiu várias espécies de *Gymnosporia* para *Maytenus* com base nessas distinções morfológicas (Sebsebe Demissew 1985). Brennan (1953) e Exell (1953) afirmaram que a proposta de Loesener (1942) era artificial e optou por tratar ambos os gêneros em um *Maytenus* amplamente circunscrito. Ding Hou (1955, p. 216) considerou *Celastrus* L., *Gymnosporia* e *Maytenus* como gêneros intimamente relacionados, mas distintos por "vários caracteres reunidos e nenhum caractere único".

Com base em características moleculares e morfodados (estudo morfoanatômico somados a análise molecular) foram realizadas análises filogenéticas que demonstraram que o gênero *Maytenus* é polifilético (Simmons *et al.*, 2008; Mickenna *et al.*, 2011). Em seus estudos Simmons *et al.* (2008), verificou que *Maytenus* era derivado independentemente de diferentes linhagens e apresentava uma terceira linhagem representando as espécies do Pacífico Austral (Simmons *et al.*, 2008; Biral *et al.*, 2017). Conseqüentemente o gênero *Maytenus* foi redefinido, mas ainda assim continua sendo um grupo desafiador quando se trata de delimitação do gênero (Mickenna *et al.*, 2011; Biral *et al.*, 2017).

Mickenna *et al.*, (2011), delimitou o gênero *Maytenus* e o definiu como o Novo Mundo *Maytenus*, no qual os autores separaram o gênero em três linhagens diferentes, cada uma com características distintas morfolologicamente (Mickenna *et al.*, 2011; Biral *et al.*, 2017). Dentro das características importantes para delimitação do gênero estão caracteres de identificação de espécies. No estudo realizado por Biral *et al.*, (2017), os autores se propuseram a finalizar as delimitações de quatro gêneros, dentro deles o gênero *Maytenus*, reconhecendo as diferenças morfológicas e monofiléticas (Biral *et al.*, 2017). Para tanto, os autores aumentaram o número amostral, adicionaram espécies abrangendo a diversidade através das características morfológicas, incluíram 21 caracteres que foram recentemente pontuados e aplicaram métodos moleculares (Biral *et al.*, 2017).

A partir desse estudo o gênero *Maytenus* foi dividido em dois, *Maytenus* Molina e *Monteverdia*. O gênero *Tricerma* Liebm. foi resgatado. *Plenckia* Reissek e *Fraunhofer* Mart. foram mantidos como sendo gêneros separados, com o objetivo de delimitar gêneros monofiléticos que são morfolologicamente distintos (Biral *et al.*, 2017). Com isso as espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* na linhagem tropical passaram a ser do gênero *Monteverdia* (Biral *et al.*, 2017). Na TABELA 1 estão

listadas o número de espécies, a distribuição e as principais características de acordo com a nova delimitação do gênero.

TABELA 1 - ESPÉCIES, DISTRIBUIÇÃO E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DISTINTIVAS PARA OS GÊNEROS DE ACORDO COM A NOVA DELIMITAÇÃO

(continua)

<b>Gênero</b>	<b>Espécies</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Principais características morfológicas</b>
<i>Fraunhoferia</i> Mart.	1	Terras secas do nordeste do Brasil	Folhas membranáceas ou cartáceas dispostas disticamente; inflorescências racemose axilares e terminais; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; cápsulas indeiscentes de frutas (ou drupas); aril ausente.
<i>Plenckia</i> Reissek	4	Brasil Central, Paraguai e Bolívia (nas savanas)	Folhas cartáceas dispostas disticamente; inflorescências cymose axilares; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; frutos samaroides com uma asa apical; aril ausente.
<i>Maytenus</i> Molina	15-24	América do Sul subtropical, Andes da Argentina à Venezuela, partes da Costa Rica e Panamá	Folhas cartáceas ou coriáceas, raramente carnudas, dispostas em espiral ou disticamente; inflorescências fasciculadas ou cimosas axilares, às vezes reduzidas a uma flor individual; flores com dois ou três carpelos, um ou dois óvulos por carpelo; frutos capsulares com pericarpo membranáceo que se abrem por duas ou três válvulas reflexas; arilos vermelhos ou amarelados que cobrem total ou parcialmente as sementes

				(conclusão)
<i>Monteverdia</i> A. Rich.	120	Amplamente distribuído nos Neotrópicos		Folhas membranáceas, cartáceas ou coriáceas dispostas em espiral ou disticamente; inflorescências axilares fasciculadas ou cimose que às vezes são reduzidas a uma flor individual; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por duas válvulas reflexas ou (raramente) verticais; arilos brancos que cobrem completamente as sementes
<i>Tricerma</i> Liebm	4 ou 5	Noroeste da Argentina, Bolívia, Peru, Equador (incluindo Ilhas Galápagos), México, Cuba, Bahamas, Flórida e Texas		Folhas grossas e carnudas dispostas em espiral; inflorescências fasciculadas axilares; flores com três carpelos, um óvulo por carpelo; frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por três válvulas reflexas; arilos vermelhos que cobrem completamente as sementes

FONTE: Adaptado de Biral *et al.*, (2017).

Logo, uma das opções de delimitação do gênero seria simplesmente tratar todas as espécies como membros de um único gênero, *Maytenus*, pois para isso seria necessário apenas três novas combinações e conseqüentemente novos nomes para *Fraunhoferia multiflora* e *Plenckia microcarpa* (Biral *et al.*, 2017). Contudo essa alternativa delimitaria um gênero grande, sem levar em consideração importantes características morfológicas, no qual estão inseridos cinco tipos de frutos, presença ou ausência de um arilo e três cores diferentes de arilo (Biral *et al.*, 2017).

Portanto, Biral *et al.*,(2017) propôs 123 novas combinações para espécies que pertenciam ao gênero *Maytenus* e passaram a pertencer ao gênero *Monteverdia*. Estes apresentam frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por duas válvulas e têm arilos brancos que cobrem completamente as sementes e estão apresentados na TABELA 2 (Biral *et al.*, 2017).

TABELA 2 - NOVAS COMBINAÇÕES PARA ESPÉCIES DE *Maytenus* QUE PASSARAM A PERTENCER AO GÊNERO *Monteverdia*

(continua)

<b>Espécies com gênero novo</b>	<b>Espécies com gênero antigo</b>	<b>Referência</b>
<i>Monteverdia acanthophylla</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus acanthophylla</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 6. 1861
<i>Monteverdia agostini</i> (Steayerm.) Biral,	<i>Maytenus agostinii</i> Steyerm.	Ernstia 23: 24. 1984.
<i>Monteverdia amazonica</i> (Mart. ex Reissek) Biral	<i>Maytenus amazonica</i> Mart. ex Reissek	Fl. Bras. 11: 25. 1861.
<i>Monteverdia apiculata</i> (Steayerm.) Biral	<i>Maytenus apiculata</i> Steyerm., Fieldiana	Bot. 28: 334. 1952.
<i>Monteverdia apurimacensis</i> (Loes.) Biral,	<i>Maytenus apurimacensis</i> Loes.	Bot. Jahrb. Syst. 50(Beibl. 111): 8. 1913.
<i>Monteverdia aquifolia</i> (Mart.) Biral,	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	Flora 24(Beibl.): 91. 1841.
<i>Monteverdia ardisiifolia</i> (Reissek) Biral,	<i>Maytenus ardisiifolia</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 26. 1861
<i>Monteverdia basidentata</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus basidentata</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 7. 1861.
<i>Monteverdia belizensis</i> (Standl) Biral	<i>Maytenus belizensis</i> Standl.	Publ. Carnegie Inst. Wash. 461: 69. 1935.
<i>Monteverdia cassineformis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus cassineformis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 15. 1861.
<i>Monteverdia cassinoides</i> (Poir.) Biral	<i>Rhamnus cassinoides</i> Poir <i>Maytenus cassinoides</i> (Poir.) Urb	Encycl.4: 474. 1798. Symb. Antill. 5: 67. 1904.
<i>Monteverdia catingarum</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus catingarum</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 26. 1861.

		(continua)
<i>Monteverdia cestrifolia</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus cestrifolia</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 24. 1861
<i>Monteverdia chapadensis</i> (R. M. Carvalho-Okano ex Biral & Groppo) Biral	<i>Maytenus chapadensis</i> R. M. Carvalho-Okano ex Biral & Groppo	Brittonia 66: 330. 2014.
<i>Monteverdia chiapensis</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus chiapensis</i> Lundell	Wrightia 1: 156. 1946.
<i>Monteverdia claredonensis</i> (Britton) Biral	<i>Maytenus claredonensis</i> Britton	Bull. Torrey Bot. Club. 39: 8. 1912.
<i>Monteverdia communis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus communis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 22. 1861.
<i>Monteverdia comocladiformis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus comocladiformis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 8. 1861.
<i>Monteverdia corei</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus corei</i> Lundell	Wrightia 4: 136. 1970.
<i>Monteverdia crassipes</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus crassipes</i> Urb	Symb. Antill. 5: 404. 1908.
<i>Monteverdia cuzcoina</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus cuzcoina</i> Loes	Bot. Jahrb. Syst. 37: 574. 1906.
<i>Monteverdia cymosa</i> (Krug & Urb.) Biral	<i>Maytenus cymosa</i> Krug & Urb	Symb. Antill. 5: 61. 1904.
<i>Monteverdia dasyclada</i> (Mart.) Biral	<i>Maytenus dasyclada</i> Mart.	Flora 24(Beibl.): 89. 1841.
<i>Monteverdia distichophylla</i> (Mart. ex Reissek) Biral,	<i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	Fl. Bras. 11: 17. 1861.
<i>Monteverdia domingensis</i> (Krug & Urb.) Biral	<i>Maytenus domingensis</i> Krug & Urb	Symb. Antill. 5: 56. 1904.

		(continua)
<i>Monteverdia duqueana</i> (Cuatrec.) Biral	<i>Maytenus duqueana</i> Reissek	Brittonia 11: 163. 1959.
<i>Monteverdia ebenifolia</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus ebenifolia</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 18. 1861.
<i>Monteverdia eggersii</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus eggersii</i> Reissek	Bot. Jahrb. Syst. 20: 39. 1895.
<i>Monteverdia elaeodendroides</i> (Griseb.) Biral	<i>Maytenus elaeodendroides</i> Griseb	Cat. Pl. Cub. 54. 1866.
<i>Monteverdia elongata</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus elliptica</i> (Lam.) <i>Maytenus elongata</i> (Urb.) Britton	Symb. Antill. 5: 66. 1904 Sci. Surv. Porto Rico & Virgin Island 5: 516. 1924.
<i>Monteverdia erythroxyloides</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus erythroxyloides</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 21. 1861.
<i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus evonymoides</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 11. 1861.
<i>Monteverdia ficiformis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus ficiformis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 20. 1861.
<i>Monteverdia flagellata</i> (Rusby) Biral	<i>Maytenus flagellata</i> Rusby	Mem. Torrey Bot. Club 6: 20. 1896.
<i>Monteverdia floribunda</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus floribunda</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 16. 1861.
<i>Monteverdia fugax</i> (Biral & Lombardi) Biral	<i>Maytenus fugax</i> Biral &Lombardi	Phytotaxa 261: 99. 2016.
<i>Monteverdia glaucescens</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus glaucescens</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 10. 1861.
<i>Monteverdia gonoclada</i> (Mart.) Biral	<i>Maytenus gonoclada</i> Mart	Flora 24(Beibl.): 89. 1841.

		(continua)
<i>Monteverdia grenadensis</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus grenadensis</i> Urb	Symb. Antill. 5: 63. 1904.
<i>Monteverdia haitiensis</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus haitiensis</i> Urb	Ark. Bot. 22A: 67. 1928.
<i>Monteverdia harrisii</i> (Krug & Urb.) Biral	<i>Maytenus harrisii</i> Krug & Urb	Notizbl. K"onigl Bot. Gart. Berlin 1: 78. 1895.
<i>Monteverdia horrida</i> (Reissek) Biral,	<i>Maytenus horrida</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 5. 1861.
<i>Monteverdia hotteana</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus hotteana</i> Urb	Ark. Bot. 22A: 67. 1928.
<i>Monteverdia huberi</i> (Steyerm.) Biral	<i>Maytenus huberi</i> Steyerm	Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1063. 1988.
<i>Monteverdia insculpta</i> (Steyerm.) Biral	<i>Maytenus insculpta</i> Steyerm	Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1063. 1988.
<i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. ex Reissek) Biral	<i>Maytenus ilicifolia</i> (Mart. ex Reissek)	Fl. Bras. 11: 8. 1861.
<i>Monteverdia imbricata</i> (Mart. ex Reissek) Biral	<i>Maytenus imbricata</i> Mart. ex Reissek	Fl. Bras. 11: 16. 1861.
<i>Monteverdia jamaicensis</i> (Krug & Urb.) Biral	<i>Maytenus jamaicensis</i> Krug & Urb., Notizbl	K"onigl Bot. Gart. Berlin 1: 78. 1895.
<i>Monteverdia jefeana</i> (Lundell) Biral, comb.	<i>Maytenus jefeana</i> Lundell	Phytologia 53: 414. 1983.
<i>Monteverdia kanukuensis</i> (A. C. Sm.) Biral	<i>Maytenus kanukuensis</i> A. C. Sm	Lloydia 2: 189. 1939.
<i>Monteverdia karstenii</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus karstenii</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 19. 1861.

		(continua)
<i>Monteverdia krukovii</i> (A. C. Sm.) Biral	<i>Maytenus krukovii</i> A. C. Sm.	J. Arnold Arbor. 20: 294. 1939.
<i>Monteverdia laevigata</i> (Vahl) Biral	<i>Rhamnus laevigata</i> Vahl, <i>Ceanothus laevigata</i> (Vahl) DC., Prodr. <i>Maytenus laevigata</i> (Vahl) Griseb. ex Eggers	Symb. Bot. 3: 41. 1794 Prodr. 2: 30. 1825 Vidensk. Meddel. Naturhist. Foren. Kjøbenhavn 3: 109. 1876.
<i>Monteverdia laevis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus laevis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 27. 1861
<i>Monteverdia lineata</i> (C. Wright ex Griseb.) Biral	<i>Maytenus lineata</i> C. Wright ex Griseb.	Cat. Pl. Cub. 54. 1866.
<i>Monteverdia littoralis</i> (R. M. Carvalho-Okano) Biral	<i>Maytenus littoralis</i> R. M. Carvalho-Okano	Hoehnea 32: 467. 2005.
<i>Monteverdia loeseneri</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus loeseneri</i> Urb	Symb. Antill. 5: 56. 1904.
<i>Monteverdia longifolia</i> (Reissek ex Loes.) Biral	<i>Maytenus longifolia</i> Reissek ex Loes	Bot. Jahrb. Syst. 15(Beibl): 9. 1893.
<i>Monteverdia longistipitata</i> (Steyerm.) Biral	<i>Maytenus longistipitata</i> Steyerm	Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1064. 1988.
<i>Monteverdia lucayana</i> (Britton) Biral, comb	<i>Maytenus lucayana</i> Britton	Bull. New York Gard. 4: 140. 1906.
<i>Monteverdia macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Biral	<i>Celastrus macrocarpa</i> Ruiz & Pav <i>Haenkea macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Steud <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	Fl. Peruv. 3: 8. 1802. Bot. 1: 170, 387. 1821. Annuaire Conserv. Jard. Bot. Gen`eve 20: 361. 1919.

		(continua)
<i>Monteverdia macrophylla</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus macrophylla</i> Mart	Flora 24(Beibl.): 95. 1841.
<i>Monteverdia maestrensis</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus maestrensis</i> Urb	Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 21: 215. 1925
<i>Monteverdia manabiensis</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus manabiensis</i> Loes	Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 1: 161. 1905.
<i>Monteverdia matudae</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus matudae</i> Lundell	Lilloa 4: 383. 1939.
<i>Monteverdia megalocarpa</i> (Groppo & Lombardi) Biral	<i>Maytenus megalocarpa</i> Groppo & Lombardi	Syst. Bot. 39: 480. 2014.
<i>Monteverdia meguillensis</i> (Rusby) Biral	<i>Maytenus meguillensis</i> Rusby	New York Bot. Gard. 7: 289. 1927.
<i>Monteverdia microcarpa</i> (Fawc. & Rendle) Biral	<i>Maytenus microcarpa</i> Fawc. & Rendle	J. Bot. 59: 19. 1921.
<i>Monteverdia microphylla</i> (Urb., Ekman & Loes.) Biral	<i>Maytenus microcarpa</i> Urb., Ekman & Loes	Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 33: 182. 1933.
<i>Monteverdia monticola</i> (Sandwith) Biral	<i>Maytenus monticola</i> Sandwith	Fl. Trinidad & Tobago 1: 174. 1930.
<i>Monteverdia mucugensis</i> (R. M. Carvalho-Okano ex Biral & Groppo) Biral	<i>Maytenus mucugensis</i> R. M. Carvalho-Okano ex Biral & Groppo	Brittonia 66: 332. 2014.
<i>Monteverdia myrsinoides</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus myrsinoides</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 21. 1861.
<i>Monteverdia neblinae</i> (Steyerm.) Biral	<i>Maytenus neblinae</i> Steyerm	Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1064. 1988.
<i>Monteverdia nitida</i> (Mart.) Biral	<i>Maytenus nitida</i> Mart.	Flora 24(Beibl.): 91. 1841.

		(continua)
<i>Monteverdia oblongata</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus oblongata</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 25. 1861.
<i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart.) Biral	<i>Maytenus obtusifolia</i> Reissek	Flora 24(Beibl.): 88. 1841.
<i>Monteverdia ocoensis</i> (M. M. Mejía & Zanoni) Biral	<i>Maytenus ocoensis</i> M. M. Mejía & Zanoni	Moscoso 4: 112. 1986
<i>Monteverdia opaca</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus opaca</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 28. 1861.
<i>Monteverdia patens</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus patens</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 13. 1861.
<i>Monteverdia peruana</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus alaternoides</i> Reissek var. peruana Loes. <i>Maytenus peruana</i> (Loes.) Liesner	Bot. Jahrb. Syst. 37: 574. 1906. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 127: 1271. 2014.
<i>Monteverdia pittieriana</i> (Steyerm.) Biral	<i>Maytenus pittieriana</i> Steyerm	Fieldiana, Bot. 28: 338. 1952.
<i>Monteverdia planifolia</i> (A. C. Sm.) Biral	<i>Maytenus planifolia</i> A. C. Sm	Lloydia 2: 189. 1939.
<i>Monteverdia ponceana</i> (Britton) Biral	<i>Maytenus ponceana</i> Britton, Bull	Torrey Bot. Club 51: 10. 1924.
<i>Monteverdia pruinosa</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus pruinosa</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 20. 1861.
<i>Monteverdia psammophila</i> (Biral & Lombardi) Biral	<i>Maytenus Biral &amp; Lombardi</i> , Harvard Pap	Bot. 18: 129. 2013.
<i>Monteverdia purpusii</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus purpusii</i> Lundell	Amer. Midl. Naturalist 20: 238. 1938.

		(continua)
<i>Monteverdia pustulata</i> (Steayerm.) Biral	<i>Maytenus pustulata</i> Steyerm	Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1084. 1988.
<i>Monteverdia quadrangulata</i> (Schrاد.) Biral	<i>Celastrus quadrangulata</i> Schrاد <i>Maytenus quadrangulata</i> (Schrاد) Loes	Goett. Gel. Anz. 1: 716. 1821. Nat. Pflanzenfam 2: 142. 1942.
<i>Monteverdia radlkoferiana</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus radlkoferiana</i> Loes	Bot. Jahrb. Syst. 15(Beibl.): 7. 1893
<i>Monteverdia recondita</i> (Hammel) Biral	<i>Maytenus recondita</i> Hammel	Novon 7: 150. 1997
<i>Monteverdia reflexa</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus reflexa</i> Urb	Symb. Antill. 5: 64. 1904
<i>Monteverdia retusa</i> (Poir.) Biral	<i>Celastrus retusa</i> Poir. <i>Maytenus retusa</i> (Poir.) Briq	Encycl. Suppl. 2: 146. 1811. Annuaire. Conserv. Jard. Bot.
<i>Monteverdia revoluta</i> (Alain) Biral	<i>Maytenus revoluta</i> Alain	Geneve 20: 351. 1919. Contr. Ocas. Mus. His. Nat. Col. "De La Salle" 12: 5. 1953.
<i>Monteverdia revoluta</i> (Alain) Biral var. bissei Mory	<i>Maytenus revoluta</i> Alain var. bissei Mory	Feddes Repert. 96: 549. 1985.
<i>Monteverdia revoluta</i> (Alain) Biral var. jaucoensis Mory	<i>Maytenus revoluta</i> Alain var. jaucoensis Mory	Feddes Repert. 96: 549. 1985.
<i>Monteverdia revoluta</i> (Alain) Biral var. macrophylla Mory	<i>Maytenus revoluta</i> Alain var. macrophylla Mory	Feddes Repert. 96: 550. 1985.
<i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral	<i>Maytenus rigida</i> Mart	Flora 24(Beibl.): 90. 1841.
<i>Monteverdia robusta</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus robusta</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 15. 1861.

		(continua)
<i>Monteverdia rupestris</i> (Pirani & R. M. Carvalho-Okano) Biral	<i>Maytenus robusta</i> Pirani & R.M. Carvalho-Okano	Novon 9: 95. 1999.
<i>Monteverdia samydiformis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus samydiformis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 11. 1861.
<i>Monteverdia sapotiformis</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus sapotiformis</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 27. 1861.
<i>Monteverdia saxicola</i> (Britton & Wilson) Biral	<i>Maytenus saxicola</i> Britton & Wilson	Bull. Torrey Bot. Club 50: 41. 1923
<i>Monteverdia schippii</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus schippii</i> Lundell	Phytologia 1: 305. 1939.
<i>Monteverdia schumanniana</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus schumanniana</i> Loes	Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlen 13: 218. 1938.
<i>Monteverdia segoviarum</i> (Standl. & L. O. Williams) Biral	<i>Maytenus segoviarum</i> Standl. & L. O. Williams	Ceiba 1: 85. 1950.
<i>Monteverdia serpentinei</i> (Borhidi & O. Muniz) Biral	<i>Maytenus buxifolia</i> (A. Rich) Griseb. var. <i>serpentinei</i> Borhidi & O. Muniz	Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 17: 14. 1971;
<i>Monteverdia sieberiana</i> (Krug & Urb.) Biral	<i>Maytenus serpentinei</i> (Borhidi & O. Muniz) Borhidi & O. Muniz	Bot. Közlem 62: 25. 1975.
<i>Monteverdia splendens</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus sieberiana</i> Krug & Urb	Symb. Antill. 5: 60. 1904.
<i>Monteverdia spinosa</i> (Griseb.) Biral	<i>Maytenus splendens</i> Urb <i>Moya spinosa</i> Griseb. <i>Gymnosporia spinosa</i> (Griseb.) Loes. ex Hicken <i>Maytenus spinosa</i> (Griseb.) Lourteig & O'Donell	Symb. Antill. 9: 68. 1923. Abh. Konigl. Ges. Wiss. Gottingen 19: 111. 1874; Bol. Soc. Physis 1: 30. 1912;

		(conclusão)
<i>Monteverdia sprucei</i> (Briq.) Biral	<i>Maytenus sprucei</i> Briq	Natura 1: 188. 1955. Annuaire Cons. Jard. Bot. Gen`eve 20: 363. 1911.
<i>Monteverdia stipitata</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus stipitata</i> Lundell	Phytologia 56: 139. 1984.
<i>Monteverdia subalata</i> (Reissek) Biral	<i>Maytenus subalata</i> Reissek	Fl. Bras. 11: 12. 1861.
<i>Monteverdia tetragona</i> (Griseb.) Biral	<i>Maytenus tetragona</i> Griseb	Fl. Brit. W. I. 709. 1864.
<i>Monteverdia tikalensis</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus tikalensis</i> Lundell	Wrightia 4: 90. 1968.
<i>Monteverdia truncata</i> (Nees) Biral	<i>Ilex truncata</i> Nees <i>Maytenus truncata</i> (Nees) Reissek	Flora 4: 301. 1821. Fl. Bras. 11: 5. 1861.
<i>Monteverdia urbaniana</i> (Loes.) Biral	<i>Maytenus urbaniana</i> Loes.	Bot. Jahrb. Syst. 15(Beibl.): 10. 1893.
<i>Monteverdia urbanii</i> (Alain) Biral	<i>Maytenus urbanii</i> Alain	Sida 20: 1645. 2003.
<i>Monteverdia urquiolae</i> (Mory) Biral	<i>Maytenus urquiolae</i> Mory	Feddes Repert. 104: 432. 1993.
<i>Monteverdia versluysii</i> (Bold.) Biral	<i>Maytenus versluysii</i> Bold.	Fl. Dutch W. Ind. Is. 2: 58. 1914.
<i>Monteverdia virens</i> (Urb.) Biral	<i>Maytenus virens</i> Urb., Symb	Antill. 5: 60. 1904.
<i>Monteverdia wendtii</i> (Lundell) Biral	<i>Maytenus wendtii</i> Lundell	Phytologia 51: 28. 1984.

FONTE: Adaptado de Biral *et al* (2017).

O gênero *Monteverdia* possui origem nativa e ocorre em todas as regiões brasileiras com confirmação no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (Flora e Funga do Brasil, 2022). Estão listadas no gênero 49 espécies com domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (Flora e Funga do Brasil, 2022). Destas, 36 espécies são endêmicas e podem apresentar os seguintes tipos de vegetação: Área Antrópica, Caatinga (*stricto sensu*), Campinarana, Campo de Altitude, Campo Limpo, Campo Rupestre, Carrasco, Cerrado (*lato sensu*), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta de Igapó, Floresta de Terra Firme, Floresta de Várzea, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), Floresta Ombrófila Mista, Manguezal, Restinga, Savana Amazônica, Vegetação Sobre Afloramentos Rochosos (Flora e Funga do Brasil, 2022).

Espécies do gênero são utilizadas para tratamento de algumas enfermidades. Dois exemplos popularmente conhecidos são as espécies *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (sinônimo *Maytenus officinalis* Mabb., *Maytenus muelleri* Schw. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) (Mariot; Barbieri, 2008; Flora e Funga do Brasil, 2022) e a espécie *Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral, (sinônimos *Maytenus aquifolia* Mart., *Maytenus briquetii* Loes. e *Maytenus oxyodonta* Reissek) (MARIOT; BARBIERI, 2008; Flora e Funga do Brasil, 2022). Ambas são conhecidas como espinheira-santa, cancorosa e apresentam atividades farmacológicas (Leme *et al.*, 2013). As duas espécies são assim chamadas por apresentarem as folhas com margens espinescentes e são associadas ao mesmo efeito terapêutico (Mariot; Barbieri, 2008; Veloso *et al.*, 2017), porém, são espécies distintas. Espinheira-santa parece ser, no entanto, o nome vernáculo mais usado para estas e outras espécies pertencentes ao gênero *Monteverdia*, por exemplo, *Monteverdia robusta* (Reissek) Biral e *Monteverdia truncata* (Nees) Biral que também são conhecidas como espinheira-santa, além de terem outros nomes populares (Niero; Andrade; Cechimel Filho, 2011). Enquanto *Monteverdia ilicifolia* (Mart.) Biral está distribuída nos Estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; também no Paraguai, Bolívia e leste da Argentina, a espécie *Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral está distribuída em Minas

Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Arberton, 2001; Mariot; Barbieri, 2008).

As folhas, as cascas e as raízes da espinheira-santa são utilizadas, tradicionalmente, pelos índios, no preparo de chás medicinais e infusões, contra alterações gástricas (Veloso *et al.*, 2017). Há relatos de que as mulheres indígenas usavam a infusão ou decocção por seu efeito contraceptivo, para induzir a menstruação e em preparações externas (Arberton, 2001; Brasil, 2016). Destacam-se, ainda, ação cicatrizante, analgésica, para emagrecimento, problemas na bexiga, problemas ou dores estomacais, problemas renais, diabetes, problemas intestinais, tratamento de úlceras gástricas, tratamento de gastrite e depurativa do sangue (Veloso *et al.*, 2017). A ação terapêutica mais importante da espinheira santa é a ação antiulcerogênica, devido aos taninos hidrolisáveis presentes na espécie (Mariot; Barbieri, 2007; Silva *et al.*, 2012; Leme *et al.*, 2013; Brasil, 2016), tanto que, após inúmeros estudos que comprovaram seus benefícios à saúde, a espinheira-santa passou a ser manipulada pela indústria farmacêutica na formulação de medicamentos (Brasil, 2016).

No Brasil, *M. ilicifolia* é considerada Produto Tradicional de Registro Simplificado. Desta forma para ser comercializada, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo regras, após notificação. A notificação é prévia comunicação à ANVISA é feita pelo fabricante informando que pretende comercializar o produto. A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 02 DE 13 DE MAIO DE 2014 (“Lista de medicamento fitoterápicos de registro simplificados” A IN traz todas as informações sobre nomenclatura, nome popular, parte utilizada, marcador químico, derivado vegetal, alegação de uso, dose diária, vias de administração e restrição de uso, além de informar que a comercialização é sem prescrição (Brasil, 2014). A normativa preconiza o uso da espécie para o tratamento de gastrites e úlceras duodenais mediante a padronização de seus derivados pelo conteúdo de taninos expressos em pirogalol (Brasil, 2014).

Também está descrita no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB) que contém 85 (oitenta e cinco) monografias de espécies medicinais e um total de 236 formulações indicadas (Brasil, 2021).

Na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) 2022, está descrito a quantidade diária de taninos expressos em pirogalol, nas formas farmacêuticas: tintura, suspensão oral e emulsão oral. A lista foi oficializada em 1975,

por meio da Portaria 233 do Ministério da Previdência e Assistência Social e desde então busca investir e aprimorar a lista de medicamentos essenciais como instrumento de garantia ao acesso a assistência farmacêutica e uso racional de medicamentos (Brasil, 2022).

O Formulário Terapêutico Nacional (FTN) é um dos documentos orientadores para o uso dos medicamentos, o qual contém informações científicas, isentas de conflitos de interesse e com base em evidências sobre os fármacos constantes na RENAME. São apresentados indicações terapêuticas, contraindicações, precauções, efeitos adversos, interações, esquemas de administração, orientação ao paciente, formas farmacêuticas e apresentações disponíveis, entre outras informações. Seu objetivo é auxiliar profissionais de saúde e gestores para a seleção, a prescrição, a dispensação e o uso dos medicamentos e insumos indispensáveis e adequados às condições clínicas mais prevalentes (Brasil, 2022).

Assim como *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral e *Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral, outras espécies do gênero também apresentam atividades terapêuticas e são utilizadas na medicina popular. A TABELA 3 ilustra as principais espécies.

TABELA 3 - NOMES E INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DESCRITAS NA MEDICINA POPULAR DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *Monteverdia*

(continua)

Nome Científico	Nome Popular	Uso Popular	Referências
<i>M. aquifolium</i> (Mart. ex Reissek) Biral <i>M. ilicifolia</i> (Mart.) Biral	'Espinheira-santa', "cancerosa'	Problemas gástricos,	(Duarte 2013; Calou <i>et al.</i> , 2014)
<i>M. cassineformis</i> (Reissek) Biral	"Coração-de-bugre"	Problemas gástricos	(Schwanz, 2012)
<i>M. dasyclada</i> (Mart.) Biral	"Coração-de-negra"	Problemas gástricos	(Schwanz, 2012)
<i>M. distichophylla</i> (Mart. ex Reissek) Biral	"Casca-amarela", "pau-colher"	Úlceras estomacais	(Duarte, 2013)
<i>M. guyanensis</i> (Reissek) Biral	"Chichuá"	Estimulante, relaxante muscular, reumatismo, artrites, hemorróidas e rins.	(Conceição, 2010)
<i>M. macroparca</i> (Ruiz & Pav.) Biral	"Chuchuhuasi", "chuchuguaso"	Dor nas costas, dor de estômago, dor de garganta, reumatismo.	(Torpoco <i>et al.</i> , 2007; Salazar-Granara <i>et al.</i> , 2008; Robles-Pizarro <i>et al.</i> , 2014)

<i>M. obtusifolia</i> (Mart.) Biral	“Carne-de-anta”, “carrancudo”, “bom-nome”	Tratamento de úlcera, inflamações, câncer.	(conclusão) (Sousa; Almeida, 2005; Motta et al., 2008)
<i>M. rígida</i> (Mart.) Biral	“Bom-nome”, “bom-homem”, “cabelo-de-negro”, “casca-grossa”, “pau-de-colher”, “chapéu-de-couro”	Inflamação, dor, reumatismo, infecções, processo de cura	(Lima et al., 2010; Vieira, 2013)
<i>M. robusta</i> (Reissek) Biral	-----	Úlcera gástrica	(Silva et al., 2015)
<i>M. spinosa</i> (Griseb.) Biral	“Abriboca”	Doenças estomacais	(Gutiérrez-Nicolas et al., 2014)
<i>M. truncata</i> (Nees) Biral	Todo-lado”, “todo-jeito”, “árvore-de-natal	Úlcera gástrica	(Fonseca et al., 2007)

FONTE: A autora (2020).

Extratos e substâncias isoladas das espécies do gênero *Monteverdia* apresentam atividades biológicas descritas na literatura, destacam-se *M. ilicifolia*, *M. truncata*, *M. robusta*, *M. rígida*, *M. obtusifolia* com atividade antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica, *M. salicifolia* com atividade antialérgica (Niero; Andrade; Cechinel Filho, 2011), *M. evonymoides* com atividade larvicida (Dos Anjos et al., 2023). A presença de compostos fenólicos, glicosídeos, terpenos, esteroides e alcaloides são descritos como os possíveis responsáveis pelas atividades biológicas do gênero (Niero; Andrade; Cechinel Filho, 2011). A espécie *Monteverdia aquifolia* (Mart.) Biral apresenta uma variedade de compostos como esteroides, terpenoides, flavonoides e flavonoides do tipo sacarídeos (Niero; Andrade; Cechinel Filho, 2011). A presença de flavonoides e triterpenos pode explicar as ações anti-inflamatórias e antiulcerosas atribuídas a esta espécie (Mossi et al., 2009) e a presença de taninos pode explicar as propriedades antimutagênica e anticancerígena (Mossi et al., 2009).

No estudo realizado por Andrade et al. (2007), verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *Monteverdia robusta* (Reissek) Biral apresenta atividade gastroprotetora, através da inibição significativa da formação de úlceras induzidas por diferentes modelos, bem como a capacidade de diminuir a secreção gástrica (Andrade et al., 2007). Fonseca et al, (2007) constatou em seus estudos a atividade analgésica e antiulcerosa nos extratos acetato de etila e metanólico das folhas de *Monteverdia*

*truncata* (Nees) Biral, sendo uma alternativa terapêutica no tratamento de problemas gástricos (Fonseca *et al.*, 2007).

Santos *et al.* (2007), constatou no extrato etanólico da espécie *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral as atividades anti-inflamatória, antiúlcera e antidiarreica (Santos *et al.*, 2007). Além desses efeitos, *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral também apresentou efeito antinociceptivo (Martins *et al.*, 2012).

Em estudos realizados a partir das espécies *Monteverdia imbricata* (Mart. ex Reissek) Biral e *Monteverdia gonoclada* (Mart.) Biral, foram isolados componentes triterpenos que exibiram propriedades de inibição da acetilcolinesterase (Veloso *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Grupos fitoquímicos e compostos isolados do gênero *Monteverdia* A. Rich.

O reino vegetal é o responsável pelo fornecimento de substâncias químicas com propriedades medicinais, neste contexto, os avanços científicos envolvendo estudos químicos e farmacológicos de espécies vegetais tem fomentado a utilização de produtos naturais e seus estudos são incentivados (Pinto *et al.*, 2002; Barreiro; Fraga; Araújo Jr, 2007; Newman; Cragg, 2020). Inicialmente a produção dessas substâncias químicas se dá por meio do metabolismo vegetal, este é dividido em metabolismo primário responsável pela produção dos metabolitos essenciais ao desenvolvimento vegetal, processo fotossintético, respiratório, na aquisição de nutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas) e metabolismo secundário responsável pela produção de metabolitos (alcaloides, flavonoides, terpenos, glicosídeos, entre outros) (Barreiro; Fraga; Araújo Jr, 2007), que desempenham papel fundamental na proteção ao stress (García; Carril, 2009).

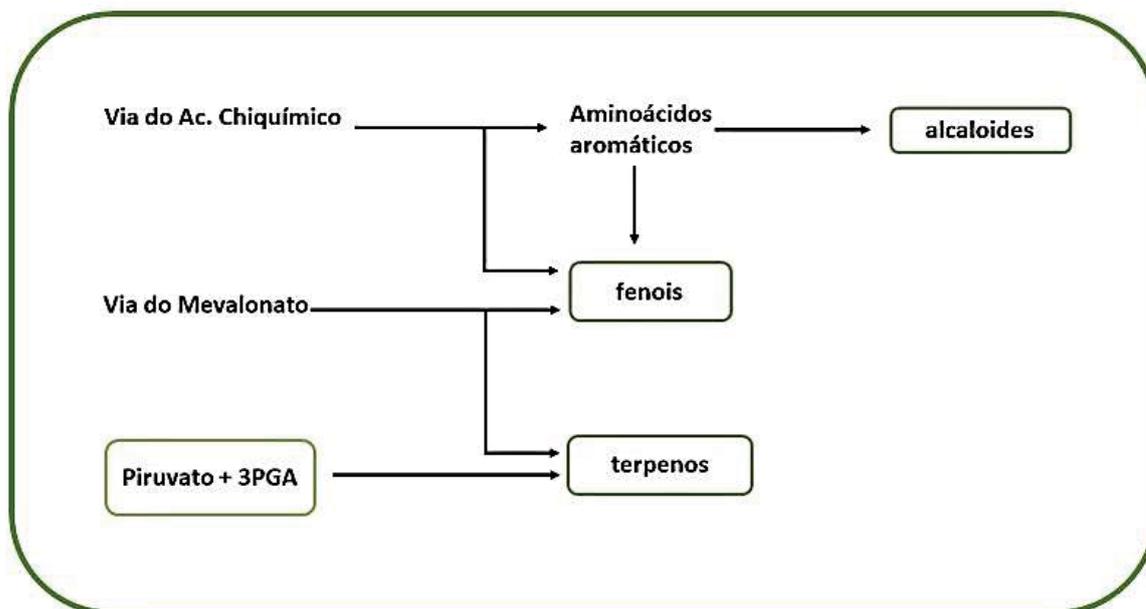
O objetivo da pesquisa fitoquímica é investigar os constituintes químicos presentes nas espécies vegetais, provenientes do metabolismo secundário, dessa forma, contribuir significativamente com estudos de plantas que não dispõem de dados sobre sua composição química (Barreiro; Fraga; Araújo Jr, 2007; Da Silva; Miranda; Conceição, 2010). Ademais, a investigação desses constituintes químicos, proporciona a descoberta de substâncias com atividades biológicas (Da Silva; Miranda; Conceição, 2010) e agregam valor devido às suas aplicações na indústria, como fármacos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Pinto *et al.*, 2002).

A descoberta dos salicilatos obtidos a partir da planta *Salix alba* L. foi um marco importante para o desenvolvimento de fármacos (Viegas; Bolzani; Barreiro, 2006), assim como a descoberta do ópio, a partir da planta *Papaver somniferum* L. com propriedades analgésicas e soporíferas, com relatos de uso desde a época dos Sumérios (4000 A.C.). A partir do ópio foi elucidado seu componente majoritário, a morfina, e a partir dele foi possível identificar substâncias como a codeína, a tebaina, a narcotina e a papaverina (Viegas; Bolzani; Barreiro, 2006).

Diante do exposto, as plantas são consideradas fontes de compostos naturais biologicamente ativos e servem de matéria-prima na síntese de fármacos (Costa-Lotufo *et al.*, 2002). Porém, estes compostos podem apresentar propriedades de absorção e distribuição fora dos parâmetros aceitáveis para se tornar efetivamente um fármaco e, portanto, têm sido foco de vários estudos químicos e farmacológicos que visam elucidar dúvidas em relação a estrutura/atividade (Niero *et al.*, 2003).

Os metabólitos secundários pertencem a três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (FIGURA 4). A partir da via do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) são sintetizados os terpenos; a partir da via do ácido chiquímico e da via do ácido mevalônico são sintetizados os compostos fenólicos e a partir da via dos derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) na via do ácido chiquímico, assim como os aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) são sintetizados os alcaloides (García; Carril, 2009).

FIGURA 4 - PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO



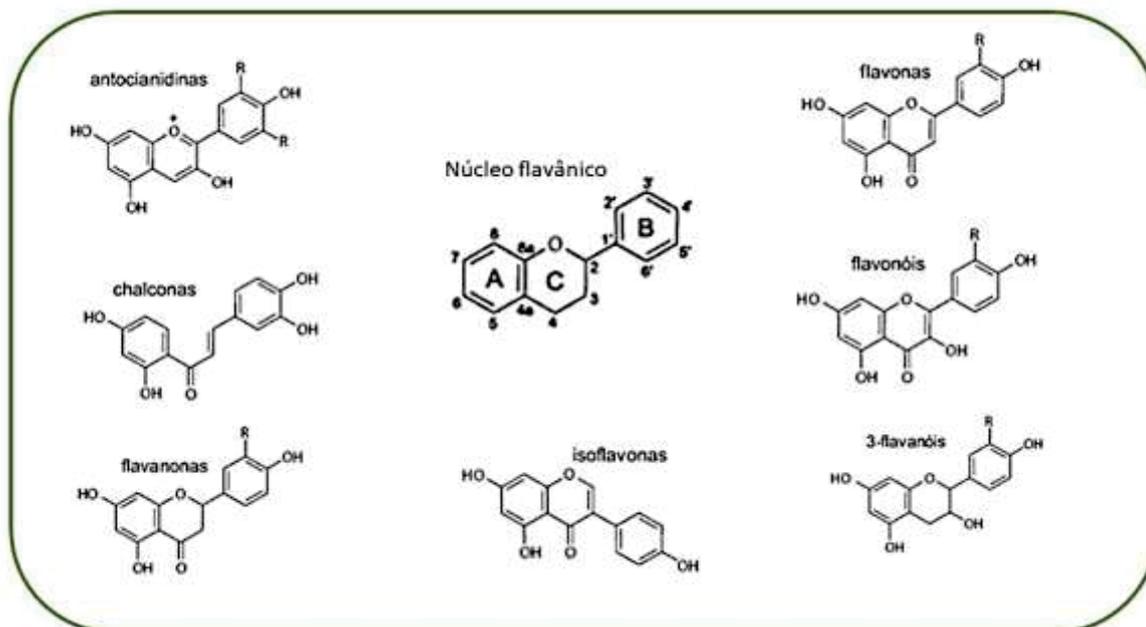
FONTE: Adaptado de García e Carril (2009)

NOTA: 3PGA: 3-ácido fosfoglicérico

Há relatos na literatura de estudos fitoquímicos com diversas espécies pertencentes ao gênero *Maytenus/Monteverdia* que descrevem a presença das classes de metabólitos secundários, dentre eles destacam-se compostos fenólicos (Antunes *et al.*, 2020), flavonoides e triterpenos (Yariwake *et al.*, 2005), esteroides (Niero *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2017), sesquiterpenos (Duarte, 2013), alcaloides (Gutiérrez-Nicolas *et al.*, 2014; Callies *et al.*, 2017) e taninos (Mossi *et al.*, 2009; Niero; Andrade; Cechinel filho, 2011).

Os flavonoides fazem parte dos metabólitos secundários provenientes da classe de compostos fenólicos, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, portanto, são considerados marcadores químicos (Zuanazzi; Montanha, 2007). Apresentam um núcleo característico C6-C3-C6 (FIGURA 5), sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético (Coutinho; Muzitano; Costa, 2009; Feng; Hao; Li, 2017).

FIGURA 5 - DIVERSIDADE ESTRUTURAL DOS FLAVONOIDES



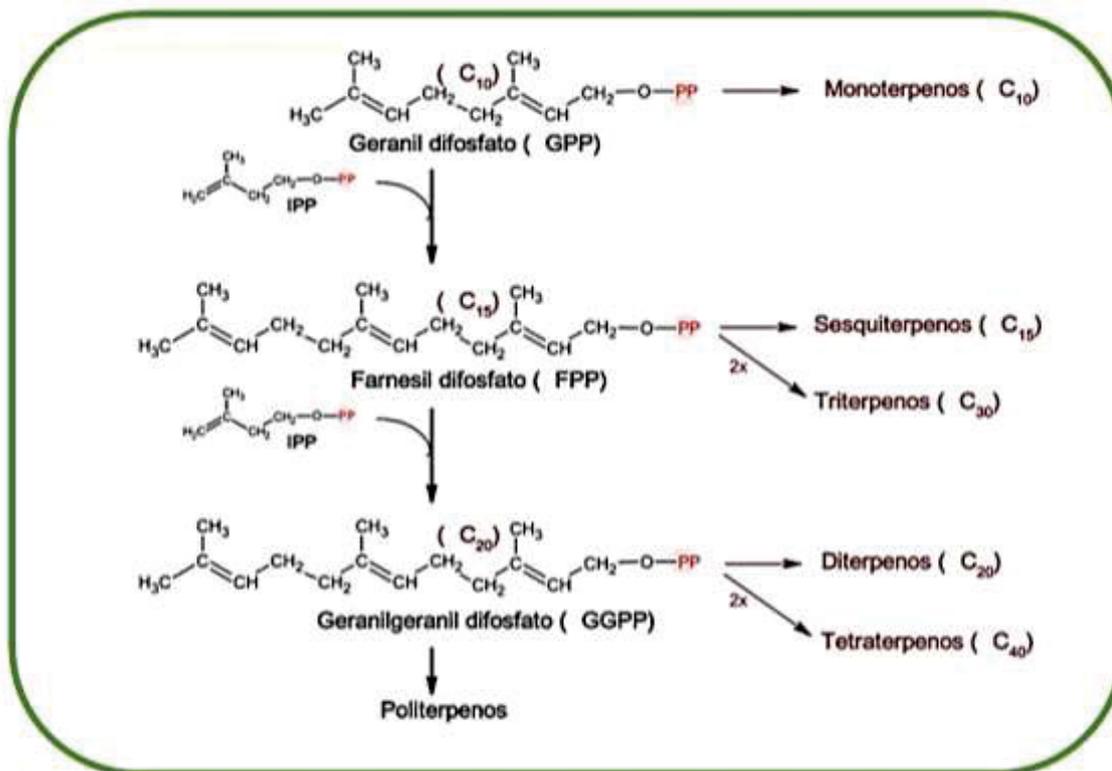
FONTE: Adaptado de García e Carril (2009).

Os flavonoides estão envolvidos na defesa das plantas (proteção contra raios UV, proteção contra insetos, fungos e bactérias) e na atração de polinizadores (Zuanazzi; Montanha, 2007; Tohge; Perez de Souza; Fernie, 2018; Babenko *et al.*, 2019). Dentre as atividades biológicas atribuídas à classe, destacam-se: atividade antioxidante, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória (Zuanazzi; Montanha, 2007; Coutinho; Muzitano; Costa, 2009). Diversos compostos químicos são relatados na literatura, a exemplo: canferol-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Lramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo proveniente da espécie *Monteverdia robusta* (Souza, 2016).

A classe dos terpenos (derivados da via do Mevalonato e da via do Piruvato+3PGA) estão amplamente distribuídos na família Celastraceae e no gênero *Monteverdia*. Nesta classe estão incluídos os hormônios (giberelinas e ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos e xantofilas), esteróis (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de esteróis (glicosídeos cardíacos), látex e óleos essenciais (fornecem o cheiro e sabor característicos das plantas) (García; Carril, 2009). Sua classificação se dá em torno da quantidade de cadeias de isoprenos (C5) agrupadas (FIGURA 6): monoterpênicos (2 cadeias de C5); sesquiterpeno (3 cadeias

de C5); diterpenos (4 cadeias C5); triterpenos (6 cadeias de C5); tetraterpenos (8 cadeias de C5); politerpenos (acima de 8 cadeias de C) (García; Carril, 2009).

FIGURA 6 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENOS DE ACORDO COM A QUANTIDADE DE ISOPRENO



FONTE: Adaptado de García e Carril (2009).

Ademais, os terpenos possuem uma ampla variedade de esqueletos, portanto, diversas atividades farmacológicas estão associadas a estrutura química (Figueiredo, 2019) a exemplo: atividade anti-inflamatória, antialérgica e analgésica (Veloso *et al.*, 2017).

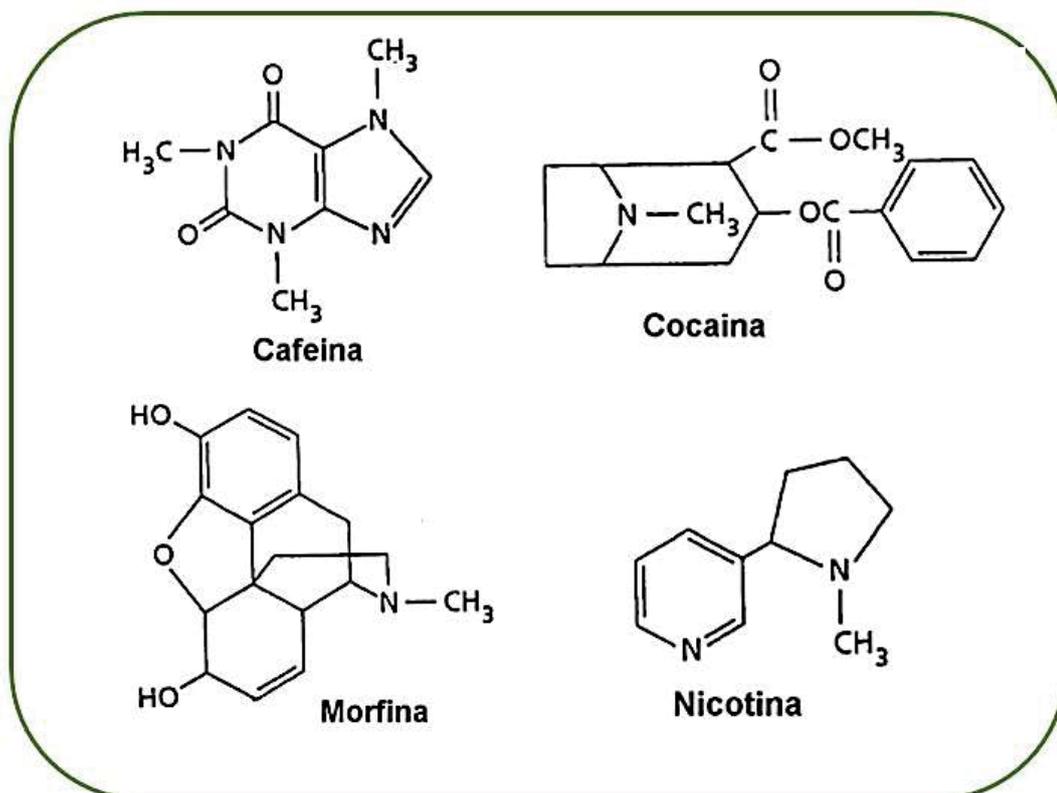
Há relatos na literatura de diversas substâncias químicas isoladas pela primeira vez: Figueiredo, (2019) isolou o composto 29-norlupan-3,20-diona da espécie *Maytenus erythroxylon*. Duarte (2013) isolou maytensifolona, da espécie *Maytenus distichophylla*. Silva *et al* (2011) isolou 3-oxo-12 $\alpha$ ,29-diidroxifriedelano, da espécie *Maytenus gonoclada*. Wibowo *et al.* (2016) isolou sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarofurânicos, as bilocularinas da espécie *Maytenus biloculares*.

A classe dos alcaloides deriva de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), provenientes da rota biossintéticas do ácido chiquímico, e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (García; Carril, 2009; Cushnie; Cushnie, 2014; Lorrai *et al.*, 2024). Uma particularidade da classe é a presença de um átomo de nitrogênio no seu

anel carbônico, este por sua vez, apresenta um par de elétrons não compartilhado (Henriques *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2023). Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, portanto, não aparecem em células jovens (Henriques *et al.*, 2007). A diversidade estrutural resulta de modificações no esqueleto 1-btiq por hidroxilações, reduções, oxidações, formação de ligações CC e O- e N-metilações, de tal forma que 13 subtipos podem ser basicamente distinguidos: simples, aporfinas, benzofenantridinas, bisbenziloquinolinas, cularinas, ftalideisoquinolinas, morfina, morfina, morfina, morfina, morfina, morfina, morfina, morfina e secoberberinas (Chacón; González-Esquínca; Riley-Saldaña, 2012).

A ornitina é precursora dos alcaloides pirrolidínicos e tropânicos, a lisina dá origem aos alcaloides piperidínicos. A tirosina e o triptofano são formados na via do ácido chiquímico e dão origem aos alcaloides isoquinolínicos e indólicos, respectivamente (Henriques *et al.*, 2007; García; Carril, 2009). A FIGURA 7 ilustra alguns exemplos encontrados na natureza.

FIGURA 7 - EXEMPLOS DE ALCALOIDES PRESENTES NA NATUREZA



FONTE: A autora (2022).

A cafeína é um alcaloide purínico, derivada de aminoácidos tais como glicina, ácido L- aspártico e L-glutamina, isolada pela primeira vez em 1819, seu principal representante é o *Coffea arabica*, também encontrado em *Camellia sinensis*, *Paullinia cupana* e *Ilex paraguariensis* (Lorrai *et al.*, 2024). A cocaína é um alcaloide tropânico derivado de ornitina. A morfina é um alcaloide isoquinolínico derivado de tirosina. A nicotina é um alcaloide pirrolidínico derivado de lisina (Henriques *et al.*, 2007).

Ademais, apresenta baixo peso molecular, ampla variedade estrutural e dessa forma, uma infinidade de atividades biológicas são atribuídas a esta classe (Chacón; González-Esquinca; Riley-Saldaña, 2012). A exemplo: anticolinérgica (atropina, hiosciamina e escopolamina); antimalárica (quinina); anti-hipertensiva (reserpina e protoveratrina A); antitussígeno (codeína e noscapina); antitumoral (vimblastina e vincristina); simpatomimético (efedrina); estimulante do SNC (cafeína); hipnoanalgésico (morfina); depressor cardíaco (quinidina); tratamento do mal de Alzheimer (galantamina); entre outras (Henriques *et al.*, 2007).

Callies *et al* (2017) relatou pela primeira vez o isolamento dos alcaloides sesquiterpenopiridínicos vulcanicolina-A, cuzcoina de *Maytenus segoviarum*, vulcanicolina-B, jelskiina de *Maytenus jelskii* e vulcanicolina-C de *Maytenus cuzcoina*.

### 2.3 ESPÉCIE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

Popularmente conhecida como coração de bugre a espécie *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral apresenta os sinônimos: *Maytenus evonymoides* var. *minarum* Briq; *Maytenus pseudocasearia* Reiss; *Maytenus evonymoides* Reissek (Flora e Funga do Brasil, 2020). No QUADRO 1 é apresentada a classificação da espécie em estudo.

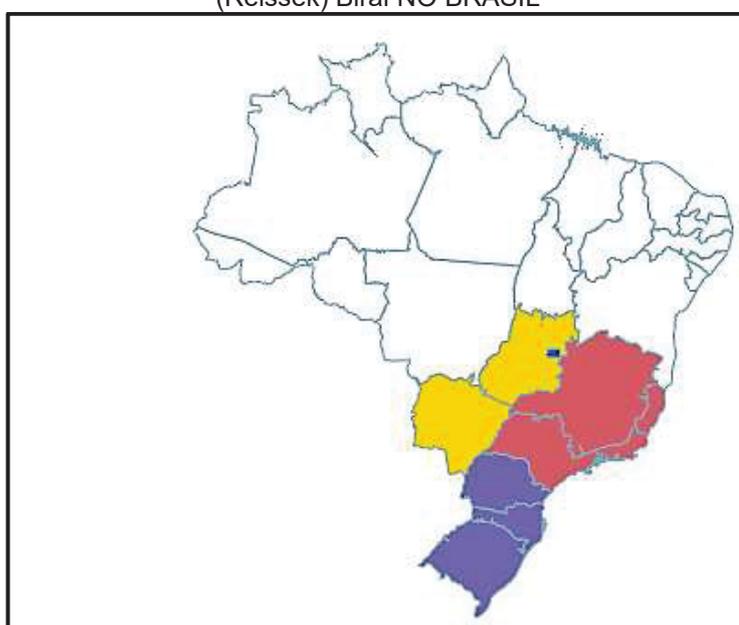
QUADRO 1 - HIERARQUIA TAXONÔMICA DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

HIERARQUIA	TAXONOMIA
REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Celastrales
FAMÍLIA	Celastraceae
GÊNERO	<i>Monteverdia</i> A. Rich
ESPÉCIE	<i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral

FONTE: Adaptado de Flora e Funga do Brasil (2020);

A *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral é uma espécie nativa no Brasil com distribuição geográfica ilustrada na FIGURA 8. Está presente nos Domínios Fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica com ocorrências confirmadas nas regiões Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Flora e Funga do Brasil, 2020).

FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral NO BRASIL



FONTE: Flora e Funga do Brasil (2020).

Apresenta arbustos a árvores que podem chegar até 20 m de altura, inermes; ramos jovens carenados, pubescentes, comumente lenticelados. As folhas são dísticas, patentes, com a presença de pecíolo subnulo com aproximadamente 3 mm de comprimento, a lâmina foliar apresenta entre 2,7-9,1 cm de comprimento por 1,2-3 cm de largura (Santos, 2016). Ainda em relação às folhas, elas são estreitamente elípticas a ovadoelípticas, apresentam base aguda e as margens crenadas, planas, com ápice agudo a obtuso, não mucronado, ainda são membranáceas, com glabras, concolores. A nervura primária é plana na face adaxial e prominula na face abaxial com nervuras secundárias 6-7 pares, inconspícuas na face adaxial. As inflorescências são fasciculadas, multifloras, com pedicelos em torno de 2-5 mm; flores pentâmeras, biloculares, dois óvulos por lóculo. Os frutos medem entre 6-8 x 4-7 mm, são

esferoides a obovóides, bivalvares, o pericarpo é lenhoso com 1-2 sementes, envoltas totalmente por carúncula (Santos, 2016). Como uma das espécies mais comuns do gênero, *Monteverdia evonymoides* apresenta grande amplitude ecológica se distribuindo por florestas estacionais semidecíduais, florestas ombrófilas densas e mistas, matas ciliares, e matas de altitude, de 100 a 2455 m de altitude. Teve seu primeiro registro de ocorrência confirmada para a flora da Argentina (Biral, 2014). Flores em janeiro, de junho a setembro, e em novembro; frutos de julho a janeiro (Santos, 2016).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal da espécie *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral foi coletado em dois períodos, a primeira coleta ocorreu em março de 2020, em que foram coletados material botânico de 6 indivíduos, coordenadas geográficas latitude 25° 26' 58" S, longitude 49° 14' 21" W. A segunda coleta ocorreu em outubro de 2020, no mesmo local, ambas na cidade de Curitiba-PR (FIGURA 9).

FIGURA 9 - *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral, LOCAL DA COLETA

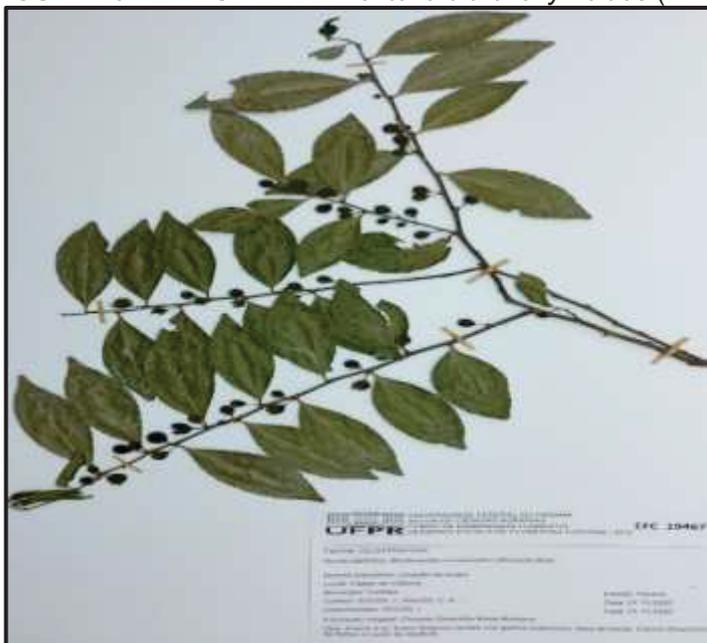


FONTE: A autora (2020).

Para a confirmação da identidade foram coletados material vegetal com estruturas reprodutivas, uma excicata foi confeccionada e sua identificação foi

realizada por comparação no Herbário Escola de Florestas Curitiba-EFC, por Rodrigo Trompinski, sob o número EFC 19467 (FIGURA 10). O presente estudo possui cadastro no SISGEN sob o número A13E001 (ANEXO A).

FIGURA 10 - EXSICATA DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral



FONTE: A autora (2020).

As folhas foram colocadas em sacos de papel pardo (FIGURA 11), secas em temperatura ambiente e posteriormente reduzidas a fragmentos de pequenas dimensões em moinho de facas/martelo, com a finalidade de promover maior área de contato entre o material vegetal e o líquido extrator e assim melhorar a eficácia do processo extrativo. Na primeira coleta foram obtidos 1.757,00 g de folhas secas, este foi submetido a extração hidroalcoólica para realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos propostos. Na segunda coleta foram obtidos 843,90 g, direcionados para obtenção do extrato cetônico e ensaios fitoquímicos.

FIGURA 11 - PROCESSO DE SECAGEM DAS FOLHAS DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral.

FONTE: A autora (2020).

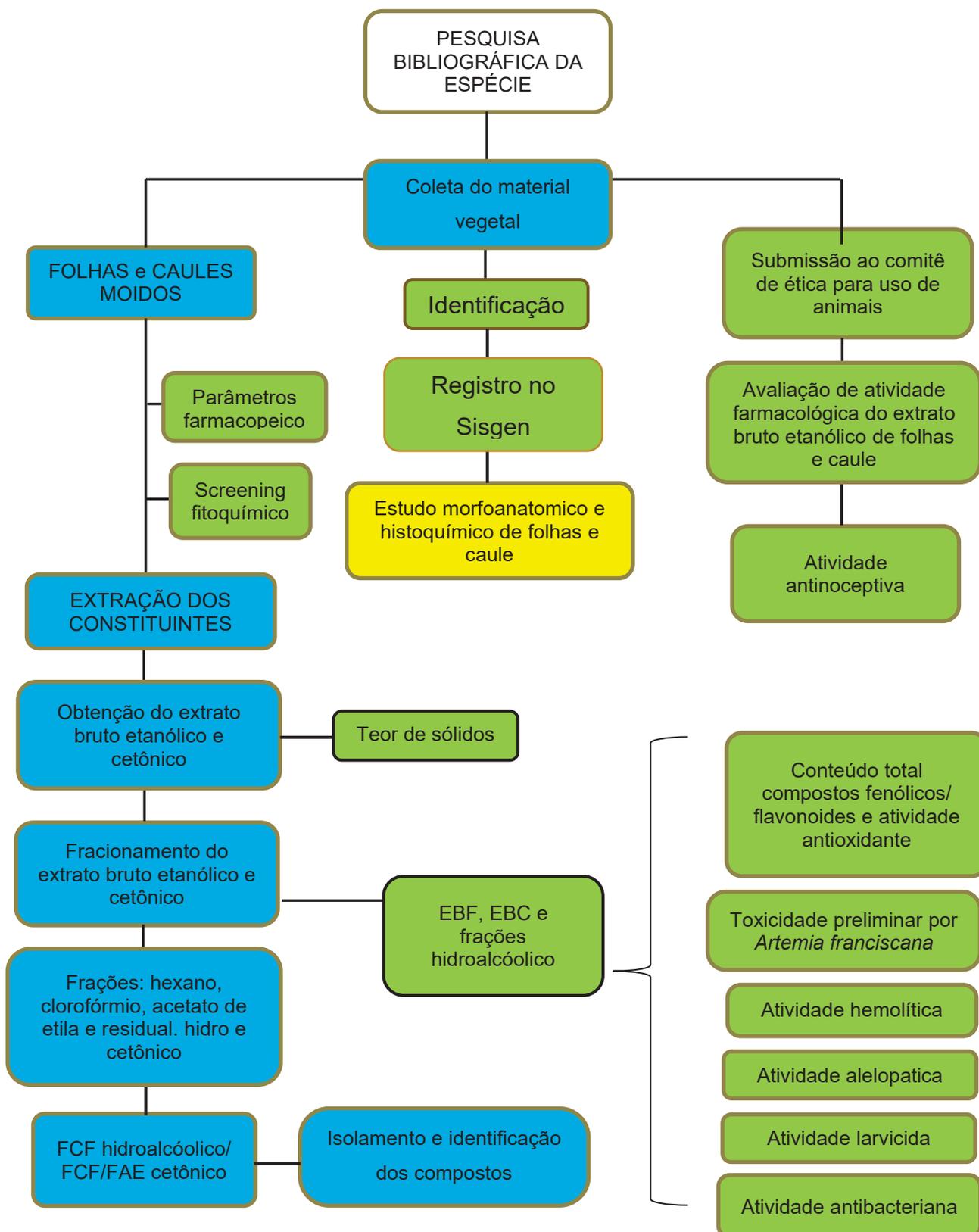
Os galhos foram colocados em sacos de nylon (FIGURA 12), após a completa secagem, em temperatura ambiente, o mesmo processo de moagem em moinho de facas/martelo foi realizado. Na primeira coleta foram obtidos 2.067 g de caules secos, este foi submetido a extração hidroalcoólica para realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos propostos. Na segunda coleta foram obtidos 760 g, direcionados para obtenção do extrato cetônico e ensaios fitoquímicos.

FIGURA 12 -PROCESSO DE SECAGEM DOS CAULES DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

FONTE: A Autora (2020).

O fluxograma (FIGURA 13) permite identificar e auxilia na compreensão de cada fase da pesquisa científica.

FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DAS FASES DA PESQUISA COM *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral.



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Azul: atividades realizadas com ambas as coletas; Verde: atividades realizadas com material da primeira coleta; Amarelo: atividade realizada com material da segunda coleta.

## 3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Folhas e caule foram coletados e fixados em solução de FAA, composto de formaldeído, ácido acético e etanol 70%, na proporção 0,5:0,5:9 (v/v). O objetivo da fixação é preservar as estruturas celulares, bloqueando o seu metabolismo e processos vitais de autólise (Johansen, 1940). Após 72 horas de fixação, as folhas, galhos e frutos foram mantidos em etanol 70% (Berlyn; Miksche, 1976; Akisue; Oliveira, 2000; Arruda, 2021) até o preparo das lâminas utilizadas na identificação das estruturas.

### 3.2.1 Preparo de lâminas semipermanentes

As lâminas semipermanentes foram obtidas por meio da técnica de cortes de secções transversais e, à mão livre, tendo o auxílio de um suporte de isopor (Cortez *et al.*, 2016). Os cortes obtidos foram corados pela técnica de dupla coloração, com azul de astra e fucsina básica, que permite identificar as estruturas acidófilas e basófilas respectivamente (Kraus *et al.*, 1998). Com o azul de astra é possível corar celulose e xilema. Com a fucsina básica é possível visualizar fibras esclerenquimáticas e floema. Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina 50%, com a função de manter os cortes hidratados (Berlyn; Miksche, 1976). Por fim foi realizada a análise dos cortes e fotografados em microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

### 3.2.2 Técnica de diafanização ou clareamento

Somente as folhas passaram pelo processo de diafanização. As folhas foram seccionadas e deixadas submersas em água destilada em vidro de relógio. Em seguida, foram clarificadas em placa de Petri, utilizando como alvejante uma solução de hipoclorito de sódio em água (80/20) preparada a partir de hipoclorito de sódio a 2,5% por um período de 72 horas. Após o clareamento, as partes das folhas foram lavadas com água destilada por 6 vezes de 15 em 15 minutos. Para neutralizar o pH, o material foi lavado em uma solução de ácido acético 5%, lavado novamente em

água destilada e corado com safranina 1% (Franklin, 1945). Foi efetuado o processo de montagem da lâmina com glicerina 50% (Kraus *et al.*, 1998).

### 3.2.3 Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado em solução FAA e utilizados os reativos conforme o QUADRO 2.

QUADRO 2 - REATIVOS UTILIZADOS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS

COMPOSTOS PESQUIZADOS	REATIVO	TEMPO DE REAÇÃO	RESULTADO POSITVO	REFERÊNCIAS
Compostos fenólicos	Dicromato de potássio/ Cloreto férrico	10 min	Avermelhado/ preto	Johansen,1940.
Compostos Lipofílicos	Sudam III	10 – 20 min	Vermelho alaranjado	Foster, 1949
Lignina	Floruglucina clorídrica	5 min	Vermelho/ Róseo	Sass, 1951 Figueiredo <i>et al.</i> , 2007
Amido	Lugol	5 min	Azul escuro ou marrom escuro	Berlyn, Miksche, 1976.
Mucilagem	Azul de metileno	5 min	Coloração azulada ou violeta	Lemos; Chaves, 2022

FONTE: A Autora (2022).

Os resultados foram registrados através de fotomicrografias em microscópio óptico acoplado à câmera digital modelo Olympus CX 31 com unidade de controle C 7070) do laboratório de Farmacognosia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

### 3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Foi realizada a análise ultra estrutural de superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em alto vácuo. Esta análise permite observar o tipo de cutícula, características do caule, folhas, pecíolo e frutos, tipo e forma de cristal. Para tal procedimento, as amostras fixadas em FAA 70% foram desidratadas em serie etanólica crescente (80%, 90%, 100%) sendo trocadas a cada 15 minutos (Gross; Pires; Fernandes., 2014). Nessa fase, ocorreu a remoção completa do álcool por CO<sub>2</sub> com a finalidade de manter o material completamente seco, após passar pelo ponto

crítico. Na sequência foi realizada a metalização por 20 minutos, com ouro no aparelho SCD-030, Balzers®, a qual permite a deposição de metal na amostra com a finalidade de dar condutibilidade aos elétrons. Em seguida foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6360 LV) de emissão de campo Tescan Mira3, em modo de alto vácuo, com uma tensão de aceleração de 15 kV, no laboratório multiusuário (C-LABMU) na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

### 3.2.5 Espectroscopia de raios X por energia dispersiva

Para obter a composição química elementar dos cristais foi realizada a análise de espectroscopia de raios-x por dispersão de energia (EDS). Os cristais foram analisados e espectros elementares foram preparados utilizando o detector EDS anexado ao FESEM, no laboratório multiusuário (C-LABMU) na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Como controle negativo foram analisadas células sem cristais.

## 3.3 PARÂMETROS FARMACOPEICOS

### 3.3.1 Umidade (Perda por dessecação)

A metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019) foi utilizada para a determinação de quantidade de substância volátil presente nas folhas e caules da *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. Pesou-se 3 g da planta seca e fragmentada em cadinho de porcelana, previamente dessecado e tarado. Os cadinhos foram levados a estufa a 100 °C por 2 horas e posteriormente pesados, após resfriamento no dessecador, até a observação de peso constante. O valor da umidade foi obtido aplicando-se o seguinte cálculo:  $Pu - Ps / Pa \times 100$ , em que: Pa é o peso da amostra, Pu o peso da amostra + cadinho vazio, e Ps o peso do cadinho + amostra após dessecação. O resultado é apresentado em porcentagem de umidade em relação ao material vegetal seco. O teste foi realizado em quintuplicata.

### 3.3.2 Determinação de cinzas

Para a determinação de cinzas o método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019) foi empregado, em que 3 g do material vegetal foi pesado em cadinhos de porcelana, previamente dessecados e tarados até peso constante, levados a mufla e incinerados por 6 horas a 600 °C, restando apenas cinzas. Foram então resfriados em dessecador e levados a peso constante novamente e realizado o cálculo da porcentagem de cinzas em relação ao material seco. O teor de cinzas foi obtido seguindo o seguinte cálculo:  $100 \times N/P$ , em que: N é o peso em gramas de cinzas e P é o peso em gramas de amostra. O mesmo processo foi realizado tanto para as folhas quanto para o caule. Ensaio realizado em quintuplicata.

## 3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E CETÔNICOS

Para obtenção do extrato etanólico as partes aéreas (folhas 1.757 g e caules 2.067 g) de *M. evonymoides* (Reissek) Biral, após fragmentação em moinho de facas foram acondicionados em Soxhlet modificado segundo Carvalho *et al.* (2009) (número de registro PI 0601703-7) e submetidos a extração. Foram utilizados 10 L e 9 L de etanol a 80%, respectivamente para extração, por um período de 82 horas para as folhas e 41 horas para o caule. Os extratos obtidos foram filtrados, foram separados 3 g de cada extrato hidroalcolico para os testes biológicos e posteriormente levado a banho-maria 70° até a completa secura. Os extratos restantes foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo com pressão reduzida à temperatura de 50°C e 90 rpm até que seu volume total foi reduzido a 1/3 do volume inicial. Após a completa redução o extrato foi acondicionado em frascos âmbar, a temperatura ambiente, até o momento de fracionamento. O extrato bruto etanólico de folhas foi denominado EBF e extrato bruto etanólico de caule foi denominado EBC.

Para obtenção do extrato cetônico as partes aéreas (folhas 843,90 g e caules 760 g) de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral foram acondicionados em Soxhlet modificado (número de registro PI 0601703-7), após a fragmentação em moinho de facas e submetidos a extração. Foram utilizados 2 L e 1,5 L de acetona, respectivamente para extração, por um período de 60 horas para as folhas e 36 horas

para o caule. Os extratos obtidos foram filtrados e em seguida submetidos a concentração em rotaevaporador pelo método de destilação até a evaporação completa do solvente. Em seguida os extratos foram acondicionados em frascos âmbar, a temperatura ambiente, até o momento de fracionamento.

O extrato bruto cetônico de folhas foi denominado EBFC e extrato bruto cetônico de caule foi denominado EBCC.

#### 3.4.1 Teor de sólidos

O teor de sólidos se baseia na eliminação da fase líquida do extrato bruto. A metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019) foi utilizada. Uma placa de pétri (tarada) contendo 10 mL do extrato etanólico e do extrato cetônico (folhas e caules) foram levados a estufa a 105 °C por 2 horas, após o resfriamento no dessecador, foram pesados até atingir peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo sólido do extrato e da placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato. O resultado foi apresentado em peso de extrato seco em relação a amostra do vegetal e foi realizado em quintuplicata. O teor de sólidos também permite o cálculo do rendimento dos extratos brutos conforme a fórmula 1:

$$\text{Rendimento (\% m/m)} = \frac{\text{Teor de sólidos} \times 100}{\text{Material vegetal seco}} \quad (1)$$

Em que:

Teor de sólidos (g) em 1 mL do extrato

Material vegetal seco = Quantidade de planta seca e triturada em g utilizada para a obtenção do extrato bruto em 1 mL.

### 3.5 ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O ensaio sistemático fitoquímico preliminar tem como objetivo caracterizar qualitativamente os principais grupos metabólitos que podem estar presentes na

espécie vegetal. A metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptado por Miguel (2003) foi utilizada. A partir do material vegetal seco e triturado, foram preparados extratos hidroalcolico e aquoso de folhas e caules a 20%, os quais passaram por reações colorimétricas ou de precipitação.

No extrato aquoso foram pesquisados: heterosideos antocianicos, heterosideos saponinicos, heterosideos cianogênicos, taninos, aminogrupos, ácidos fixos, ácidos voláteis.

No extrato hidroalcolico foram pesquisados: alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, compostos iridoides, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenos.

### 3.5.1 Preparo do extrato aquoso a 20%

Na preparação do extrato aquoso utilizou-se 40 g do material vegetal seco (folhas e caule) previamente triturados. Adicionou-se 200 mL de água purificada e levou-se ao banho-maria (70 °C) por 1 hora, com agitação manual ocasional. Em seguida o extrato foi filtrado e lavado com o líquido extrator até completar o volume de 200 mL.

#### 3.5.1.1 Pesquisa de heterosideos antociânicos

O extrato aquoso (5 mL) foi dividido em 3 tubos de ensaio. O primeiro tubo foi acidificado com ácido clorídrico 1 N até a atingir pH 1. O segundo tubo foi alcalinizado com hidróxido de sódio 1% até atingir pH 10 e o terceiro tubo foi neutralizado, até alcançar pH 7. A ação foi considerada positiva em caso de formação da coloração vermelhada em meio ácido; azulada para o meio alcalino e violácea para meio neutro. Em caso de formação de coloração verde, a reação é considerada positiva para flavonoides.

#### 3.5.1.2 Pesquisa de heterosideos saponínicos

Após a pesquisa de heterosideos antocianicos (item 3.5.1.1), os tubos 1, 2 e 3 foram agitados por 5 minutos e em seguida deixados em repouso por mais 30 minutos.

Após repouso a constatação de espuma persistente, maior ou igual a um centímetro, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

#### 3.5.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Foram transferidos 5 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Em seguida, suspendeu-se uma tira de papel picrossódico no tubo e este foi levado ao banho-maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de cor vermelha na tira de papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

#### 3.5.1.4 Pesquisa de taninos

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de extrato aquoso, acrescidos 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. A visualização de coloração verde pode indicar taninos condensados, a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, e a coloração marrom sugere a presença de polifenóis.

#### 3.5.1.5 Pesquisa de aminogrupos

Foram adicionados em cápsula de porcelana 10 mL de extrato aquoso à concentração em banho-maria (60 °C). Posteriormente foram colocadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado em uma tira de papel de filtro, em pontos previamente demarcados. Após secagem do papel filtro, este foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura (100 °C) por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva na ocorrência do aparecimento de coloração azul-violeta.

#### 3.5.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Neste ensaio, adicionou-se 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N em um balão de fundo chato, posteriormente foi deixado sob refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e extraídas 3 porções de 10 mL, com éter etílico. Os extratos etéreos obtidos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e levados em banho-maria (50 °C) até a completa secura. O resíduo foi levado a estufa para aquecimento por 10 minutos, em seguida foram adicionados 5

mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1N. Em tira de papel filtro foram demarcados 2 pontos, nos quais o resíduo amoniacal foi impregnado. O papel foi seco em estufa e posteriormente foi adicionado uma gota do reativo de Nessler em um dos pontos. O aparecimento de cor marrom indica a presença de ácidos fixos.

#### 3.5.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Neste teste, foram transferidos para um tubo de ensaio 5 mL do extrato aquoso com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N. Uma fita indicadora de pH foi suspensa no tubo e este levado ao banho-maria (60 °C) por 30 minutos. Valores de pH abaixo de 7 indicam a presença desses ácidos.

#### 3.5.2 Preparo do extrato hidroalcolico a 20%

Para o preparo do extrato hidroalcolico, foram pesados 40 g das folhas e caules previamente secas e trituradas de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral e colocadas em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v), em banho-maria (70°C) por 1 hora. O extrato alcoólico foi reduzido a 1/3 do volume inicial. A partir do extrato concentrado realizou-se extrações consecutivas utilizando-se solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O processo de fracionamento foi realizado agitando-se o solvente em funil de separação, por 10 vezes com volumes de 20 mL. Um seguido do outro. Ao final de cada extração, completou-se as porções extraídas resultantes para o volume de 200 mL com os respectivos solventes. Posteriormente foram acondicionados em frasco âmbar e identificados. Os extratos resultantes foram denominados fração hexano de folhas (FHF); fração clorofórmio folhas (FCF); fração acetato de etila folhas (FAEF); fração hexano caule (FHC); fração clorofórmio caule (FCC); fração acetato de etila caule (FAEC). O resíduo resultante do extrato de folhas foi chamado de fração remanescente folhas (FRF) e de caule foi chamado fração remanescente caule (FRC) e seus respectivos volumes foram completados para 200 mL com etanol 70%. As frações foram mantidas refrigeradas até a realização da pesquisa de cada marcador.

### 3.5.2.1 Pesquisa de alcaloides

Os alcaloides são compostos básicos e sua solubilidade varia de acordo com variações no pH. A pesquisa qualitativa se baseia na capacidade de combinação dos alcaloides, em estado de sal (extratos ácidos), com o iodo e metais pesados (bismuto, mercúrio, tungstênio), formando precipitados coloridos. Neste teste, 50 mL de cada fração, foram levados à secura em banho-maria a 70 °C. Após a concentração, o extrato e frações foram ressobilizados em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1% (v/v). Posteriormente, 2 mL das soluções obtidas foram transferidas para cada tubo de ensaio. No total obteve-se 4 tubos, sendo o quarto tubo o controle negativo. Para a identificação de alcaloides foram adicionados a cada tubo de ensaio os seguintes reativos: Reativo de Mayer (precipitado ou leve turvação branca), Reativo de Dragendorff (precipitado cor vermelho-tijolo), Reativo de Wagner Bouchadart (precipitado alaranjado).

### 3.5.2.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são flavonoides monoméricos 3,4-diois. A reação se explica pela redução da leucoantocianidinas em antocianidina, na presença de ácido clorídrico, com alteração de coloração de amarelo para vermelho. Neste ensaio, foram transferidos 10 mL do extrato hidroalcólico e frações para uma cápsula de porcelana e levados à secura em banho-maria (60 °C). O resíduo foi ressobilizado em 5 mL de álcool etílico P.A., seguido da adição de 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e posteriormente levados à ebulição. A reação caracteriza-se como positiva pelo aparecimento de coloração vermelha.

### 3.5.2.3 Pesquisa de flavonoides

#### a) Heterosídeos flavônicos:

Neste ensaio 20 mL do extrato hidroalcólico e frações foram levados à secura em banho-maria e ressobilizados em 10 mL de etanol absoluto. Destes, 5 mL foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de 1 cm de fita de magnésio, posteriormente foram adicionados lentamente 1 mL de ácido clorídrico fumegante. A reação foi considerada positiva para flavonas, em caso de formação da cor laranja. A

formação da cor violeta indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis.

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock:

Em cápsula de porcelana, foram adicionados 10 mL de cada fração e levados à secura em banho-maria (60 °C). Em seguida, foram adicionados de 5 gotas de acetona (P.A), 30 mg de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e a cápsula foi novamente levada a secura em banho-maria (60 °C). Por fim, adicionou-se 5 mL de éter etílico. A reação foi considerada positiva para flavonóis, quando observado sob lâmpada ultravioleta, o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada.

c) Ensaio de Pacheco

Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C), em seguida foram adicionados cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Posteriormente foram adicionados 0,1mL de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de aparecimento da coloração roxa.

d) Ensaio com Zinco (Zn) em Ácido clorídrico (HCl)

Neste ensaio, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura em banho-maria (60 °C) e ressolubilizados em 10 mL de etanol. Posteriormente, 5 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de pastilhas de Zn, em seguida foram adicionados lentamente HCl fumegante. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de formação da coloração roxa violeta.

#### 3.5.2.4 Pesquisa de cumarinas

Nesta pesquisa, 30 mL de cada extrato e frações, foram acidificadas com ácido clorídrico 2 N até atingir pH 1 e levados à banho-maria (60 °C), até a concentração de 5 mL. A fração hidroalcoólica foi transferida para um funil de separação, extraída duas vezes com 10 mL de éter etílico. Em seguida a fração etérea resultante, foi levada

diretamente à secura até a concentração de 5 mL. Dos volumes obtidos, 3 mL foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de 2 mL de hidróxido de sódio 1 N. Posteriormente foram levados a exposição de lâmpada ultravioleta (366 nm por 15 min) a observação de formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada, torna a reação positiva para cumarinas. Em seguida o extrato residual foi aplicado em papel filtro sob três pontos. A mancha 1 (coberta com papel alumínio) e mancha 2 (não coberta) foram tratadas com NaOH 1N. O papel filtro foi posto sob luz ultravioleta e a formação de fluorescência de cor azul ou verde-amarelada na mancha 2, é sugestivo de reação positiva.

#### 3.5.2.5 Pesquisa de substâncias iridoidais

Neste ensaio, foram transferidos 2 mL do extrato e frações, para três tubos de ensaio. No primeiro foram adicionados cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl. Em caso do aparecimento de coloração verde escura, a reação é considerada positiva. No segundo tubo, foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico e o aparecimento da coloração rosa violácea torna a reação positiva. No terceiro tubo, foram adicionados cristais de vanilina e duas gotas de ácido sulfúrico, o aparecimento de coloração rosa cereja é indicativo de reação positiva.

#### 3.5.2.6 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram transferidos para balões, adicionados de 5 mL de ácido sulfúrico a 10 % e deixados sob refluxo por 30 minutos. O volume final obtido foi filtrado, em seguida adicionado 30 mL de água destilada e a fração orgânica das frações foi extraída. O processo de extração da fração hidroalcoólica foi realizada 2 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos resultantes foram concentrados em banho-maria (60 °C) até o volume de 5 mL e submetidos à da reação de Borntraeger, na qual foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio. A reação é considerada positiva quando ocorre o aparecimento da cor vermelha.

### 3.5.2.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

#### a) Reação de Liebermann-Bourchard:

Na capsula de porcelana foram adicionados 30 mL do extrato e frações e levados à secura em banho-maria (60°C), em seguida ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio, seguidos de filtração. Os extratos obtidos foram transferidos para tubos de ensaio em diferentes volumes (0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL) completando-se para 2 mL com clorofórmio. Posteriormente, realizou-se a reação de Liebermann-Bourchard, na qual adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, a formação de cor rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A formação de coloração verde indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6, e a formação da cor amarela, indica a existência de uma metila no carbono 14.

#### b) Reação de Keller Kiliani:

Neste ensaio, 2 mL do extrato e frações foram acondicionados em cadinhos e levados à secura em banho-maria (60°C), seguidos da adição de 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de cloreto férrico a 1%. Posteriormente, realizou-se a transferência para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A obtenção de cor na zona de contato dos sistemas líquidos e/ou coloração na fase acética, sugere a presença de desoxi-açúcares, sendo verde para triterpenos e azul indicativo de esteroides.

## 3.6 PERFIL FITOQUÍMICO POR CCD

Os ensaios de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizados com extratos e frações de folhas e caules de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 UV254, da marca Whatman®, com aproximadamente 3 cm de largura e 5 cm de comprimento, dimensões que se ajustam

dentro da cuba cromatográfica. Foram aplicados de 5 a 10 µL de cada amostra, com capilar de modo que os pontos de aplicação ficassem concentrados em uma pequena área. A fase móvel foi colocada na cuba cromatográfica para saturação do meio. Após a eluição da fase móvel pela cromatoplaça, o solvente foi seco a temperatura ambiente e utilizado reveladores específicos para os grupos de metabólitos secundários de acordo com o QUADRO 3.

QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS, REVELADORES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD

<b>METABÓLITOS SECUNDÁRIOS</b>	<b>FASE MÓVEL</b>	<b>REVELADOR</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
<b>ALCALOIDES</b>	Cloroformio:metanol (95:5) + (universo amônia)	Dragendorff	Coloração alaranjado forte na presença de alcaloides	Valente, <i>et al.</i> 2006. Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<b>CUMARINAS</b>	Tolueno:acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N	Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV	Miguel, 2003.
<b>ESTEROIDES E TRITERPENOS</b>	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 1%	Coloração rosa/violácea após aquecimento em estufa a 105 °C	Wagner, 1996 Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<b>FLAVONOIDES</b>	Acetato de etila:ácido fórmico:água destilada (95:3:2)	Reativo de NEU	Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV	Wagner, 1996 Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<b>TANINOS</b>	Acetato de etila:ácido fórmico:água destilada (95:3:2)	Cloreto férrico 1%	Coloração verde: taninos condensados. Coloração azul: taninos hidrolisáveis Coloração marrom: compostos fenólicos	Wagner, 1996 Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<b>ANTRAQUINONAS</b>	Acetato de Etila:Metanol: Água (100:17:13)	Hidróxido de Potássio 5% em etanol	Coloração vermelha	Wagner, 1996

FONTE: A Autora (2020).

NOTA: Reativo de NEU: difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 5% em etanol.

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores. Para identificação de alcaloides espera-se a presença de coloração alaranjada. Para a identificação de cumarinas, espera-se a coloração azul ou verde sob luz UV. Para identificação dos esteroides e triterpenos, após colocar o reagente, a placa foi levada à estufa quente e carbonizada para visualização da

coloração azul à violácea. Para identificação de flavonoides espera-se a presença de fluorescência de coloração amarela, sob luz UV. Na identificação de taninos espera-se a coloração verde para presença de taninos condensados, azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e marrom indica a presença de compostos fenólicos. Na pesquisa de antraquinonas esperava-se a coloração vermelha. A análise foi realizada em triplicata (Oliveira *et al.*, 2014).

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

#### 3.7.1 Fracionamento

O extrato bruto das folhas e do caule resultantes tanto da extração etanólica (EBF e EBC) quanto da extração cetônica (EBFC e EBCC) após a evaporação dos solventes álcool e acetona respectivamente, foram fracionados por extração líquido - líquido, em aparelho de Soxhlet modificado (PI 0601703-7 A2) (FIGURA 14), com os solventes de polaridade crescente seguindo a ordem hexano, clorofórmio e acetato de etila. O aparelho contendo o extrato bruto concentrado foi conectado ao balão de fundo chato contendo pérolas de vidro e ao condensador de bolas. Após ser adicionado o primeiro solvente, hexano, este sistema foi então levado a refluxo, para que os solventes pudessem realizar uma extração adequada. Este processo foi repetido com os demais solventes até o completo esgotamento.

FIGURA 14 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral EM SOXHLET MODIFICADO



FONTE: A Autora (2021).

O produto remanescente da última etapa de fracionamento do extrato etanólico foi denominado fração residual de folhas (FRF) e fração residual do caule (FRC). Por fim, foram obtidas 6 frações resultantes do particionamento líquido-líquido, sendo três frações do extrato das folhas e três frações do extrato do caule, denominadas fração hexano de folhas (FHF), fração clorofórmio de folhas (FCF), fração acetato de etila das folhas (FAEF), fração hexano do caule (FHC), fração clorofórmio do caule (FCC) e fração acetato de etila do caule (FAEC) respectivamente (FIGURA 15).

FIGURA 15 - FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS E CAULE DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral



FONTE: A Autora (2021).

O produto remanescente da última etapa de fracionamento do extrato cetônico foi denominado fração residual de folhas cetônico (FRFC) e fração residual do caule cetônico (FRCC). Por fim, foram obtidas 6 frações resultantes do particionamento líquido-líquido, no qual, três frações do extrato das folhas e três frações do extrato do caule, denominadas fração hexano de folhas cetônico (FHFC), fração clorofórmio de folhas cetônico (FCFC), fração acetato de etila das folhas cetônico (FAEFC), fração hexano do caule cetônico (FHCC), fração clorofórmio do caule cetônico (FCCC) e fração acetato de etila do caule cetônico (FAECC) (FIGURA 16).

FIGURA 16 - FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE FOLHAS E CAULE DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral



FONTE: A Autora (2022).

Ao final do processo, todas as frações foram submetidas à destilação para remoção do solvente e levadas à secura em banho-maria com temperatura entre 40 - 60°C. As frações provenientes do extrato hidroalcoólico foram direcionadas as técnicas de identificação de compostos e avaliação das atividades biológicas. As frações obtidas a partir do extrato cetônico foram direcionadas as técnicas de extração de compostos somente.

O rendimento de cada fração foi calculado conforme a fórmula (2):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa da fração obtida em g} \times 100}{\text{Planta seca em g}} \quad (2)$$

Em que:

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

### 3.7.2 Isolamento dos compostos

A partir do fracionamento as frações hidroalcoólicas obtidas (FHF, FCF, FAEF, FHC, FCC e FAEC) e as frações cetônicas obtidas (FHFC, FCFC, FAEFC, FHCC, FCCC e FAECC) foram passadas em coluna cromatográfica uma a uma separadamente com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm. Foram preparadas as pastilhas conforme o rendimento de cada fração e levada à evaporação até secura (pastilha: fração + sílica). Foram utilizados 100 mL de cada fase móvel. A eluição iniciou-se com solvente hexano (100%) e o gradiente crescente de polaridade

de 5% com solvente acetato de etila (100 - 0 a 0 -100) respectivamente. Com 100% de acetato de etila, iniciou-se a eluição de acetato de etila / metanol com gradiente de 5% em 5% até 100% de MeOH (acetato de etila:100 – metanol:0 a Acetato de etila:0 – Metanol:100) (FIGURA 17). Ao final, água destilada 100% foram acrescida para limpeza das colunas. O mesmo processo foi realizado com os extratos brutos etanólicos de folhas e caule.

FIGURA 17 - COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral



FONTE: A Autora (2021).

As amostras foram coletadas em frascos de 10 mL (FIGURA 18) e levadas à secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Após a secura, foi avaliada a presença de substâncias isoladas e/ou misturas. Os frascos com eluato foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas Merck\_60 F254 utilizando as fases móveis e reveladores conforme QUADRO 3. As frações em que se observou a cristalização após a secura foram direcionados para a identificação dos compostos. A FCF (agora denominado FCF02B) e a FCFC e FAEFC (agora denominados 1EBCCL e 2EBCAE respectivamente).

FIGURA 18 – ELUATO OBTIDO A PARTIR DA COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE *Monteverdia evonymoides*



FONTE: A Autora (2021).

### 3.7.2.1 Identificação de substâncias isoladas das frações FCF, FCFC e FAEFC

As frações em que se observou a cristalização após a secura foram direcionadas para a identificação dos compostos. A FCF (agora denominada FCF02B) e a FCFC e FAEFC (agora denominadas 1EBCCL e 2EBCAE respectivamente) foram enviadas para identificação do constituinte químico por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Para RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foi utilizado espectrofotômetro Brucker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente, realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Parana. O solvente utilizado no preparo das amostras foi o clorofórmio deuterado. A referência interna utilizada foi o TMS.

A FIGURA 19 traz o precipitado isolado do composto FCF02B.

FIGURA 19 - COMPOSTO ISOLADO DA FCF DE *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral.



FONTE: A Autora (2021).

Após a obtenção dos espectros de RMN a identificação de todas as substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos com dados disponíveis na literatura.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.8.1 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*

O experimento foi realizado em quadruplicata para extrato bruto hidroalcoólico e frações semipurificadas de folhas e caules de *Monteverdia evonymoides*. Este método tem por base que, devido à presença dos ânions heteopoli-fosfotungstato-molibdatos, em meio básico ocorre a reação com compostos fenólicos formando o ânion fenolato. Este ânion tem a capacidade de reduzir o reagente de molibdato em óxido de molibdênio formando um complexo de cor azul intensa chamado complexo molibdênio-tungstênio. O doseamento de compostos fenólicos totais foram quantificados conforme a metodologia descrita originalmente por Singleton e Rossi (1965) com adaptações para microplaca por Hornung *et al.* (2020), no qual extratos e frações foram analisados na concentração de 1000 µg/mL. Uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi adicionada a 240 µL de água destilada e 15 µL do *Folin-Ciocalteu*

recém preparado em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 15 µL de solução de carbonato de sódio (NA<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20%) foi adicionado, e as amostras foram mantidas no escuro por 60 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2) °C. A absorvância foi medida a 725 nm em um espectrofotômetro de microplaca Epoch (Synergy-BIOTEK, EUA). Como padrão foi utilizado ácido gálico ( $y=0,4949x-0,0316$ ;  $R^2=0,9900$ ) (Apêndice 1) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / 100mg de extrato seco (mg eq GAE/100mg amostra). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p<0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

### 3.8.2 Teor de Flavonoides

O doseamento de flavonoides foi realizado em quadruplicata para extrato bruto hidroalcoólico e frações semipurificadas de folhas e caules de *Monteverdia evonymoides*. O teor de flavonoides totais (TFC) foi quantificado de acordo com Zhishen; Mengcheng; Jianming, (1999) com adaptações para microplaca por Hornung *et al.* (2020). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra (1000 µg/mL) foi misturado com 90 µL de nitrito de sódio a 5% em microplaca de 96 poços. A solução foi misturada e incubada por 5 minutos. Em seguida, 10 µL de solução de cloreto de alumínio a 10% (AlCl<sub>3</sub>) foi adicionada em cada poço e a reação foi incubada por mais 5 minutos. Na sequência foram adicionados 90 µL de solução de NaOH 1 mol/L. A placa foi mantida por 60 minutos em repouso no escuro. A absorvância foi medida em 540 nm em um espectrofotômetro UV1601 Shimadzu®. Como padrão foi utilizada catequina ( $y=2,0869x- 0,0758$ ;  $R^2=0,9945$ ), conforme Apêndice 1. O experimento foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina (CE) por 100 mg das amostras (peso seco base) (mg CE/100mg amostra) .Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p<0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

### 3.8.3 Potencial antioxidante *in vitro*

As propriedades antioxidantes foram avaliadas com extrato bruto e frações das folhas e caules de *M. evonymoides* provenientes da extração hidroalcoólica. Foram

testadas por três métodos baseados na transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio (Sirivibulkovit; Nouanthavong; Sameenoi, 2018). Os ensaios conduzidos foram redução do radical ABTS•+, redução do radical DPPH• e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, em quadruplicata, Foram realizados no laboratório da Pós-graduação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná.

O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado e tem por finalidade medir o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas, e quanto mais o r se aproxima de 1, mais a correlação será perfeita entre as duas variáveis (Rowntree, 1981; Figueiredo Filho; Silva Júnior, 2009).

#### 3.8.3.1 Captura do cátion radical ABTS•+

O potencial antioxidante pelo método de captura do ABTS•+ [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] foi realizado conforme a metodologia descrita por Re *et al.*, (1999), com modificações e adaptado para microplacas por Hornung *et al.*, (2020). Para confecção de curva analítica e obtenção da equação da reta, a solução de ABTS•+ foi previamente preparada previamente (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  $0,70 \pm 0,05$  a 690 nm.

Em microplacas de 96 poços 10 µL das amostras (1000 µg/mL) ou solução padrão (Trolox – 0,00008 a 0,0016 mmol/L) foram adicionados a 300 µL de solução diluída ABTS•+ e após 30 min de incubação no escuro, a absorbância foi lida em 690nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Como controle negativo foi utilizado metanol 80% no lugar da amostra e ABTS•+. Como padrão foi utilizado Trolox ( $y=-1,2291x + 0,25546$ ;  $R^2=0,9926$ ) (Apêndice 2).

Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox por 100mg de amostra (µmol eq Trolox/100mg) (RUFINO *et al.*, 2007b). O teste foi feito em triplicata. O teste ANOVA foi empregado para a verificação das diferenças entre as médias, seguido de Tukey  $p<0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

### 3.8.3.2 Redução do Radical DPPH•

Para avaliação do potencial antioxidante por DPPH•, foi utilizada a técnica descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), sendo adaptado para microplacas de 96 poços (Hornung *et al.*, 2020). Esta técnica avalia a capacidade dos extratos de reduzirem o radical livre 2,2 -difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), o resultado da reação é a mudança de cor que pode ser medida por diferença de absorbância por espectrofotometria.

A solução de DPPH• na concentração de 0,24 mmol/L foi preparada minutos antes de sua utilização. As soluções estoque (SE) do extrato e frações foram preparadas em uma concentração de 1000 µg/mL e solubilizadas em metanol 80%. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 10µL da amostra ou solução padrão (Trolox -0,00008 a 0,0016 mmol/L) e 190µL da solução de DPPH•, sob abrigo da luz. Como branco utilizou-se a amostra e metanol no lugar do DPPH•. Como controle negativo, metanol 80% no lugar da amostra e DPPH•. Posteriormente, as microplacas foram incubadas por 30 minutos no escuro e as absorbâncias obtidas a 518nm em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Como padrão foi utilizado Trolox ( $y = -1,9879x + 2,0643$ ;  $R^2 = 0,9917$ ) (Apêndice 2)

Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox por 100mg de amostra (µmol eq Trolox/100mg) (RUFINO *et al.*, 2007a). O teste foi realizado em triplicata. Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

### 3.8.3.3 Poder de redução do ferro (FRAP)

O método de poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizado com o extrato e frações partindo-se da concentração de 1000 µg/mL, seguindo a metodologia proposta por Pulido, Bravo, Saura-Calixto (2000), sendo adaptado para microplacas de 96 poços (Hornung *et al.*, 2020). Em meio ácido (pH 3,6), o antioxidante reduz o complexo  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina), de intensa cor azul e absorção máxima a 595 nm.

A solução FRAP foi preparada combinando tampão de acetato 300mM pH 3,6 e solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 10mM com HCl 40mM e solução de cloreto férrico 20mM. Em microplaca de 96 poços foi adicionado 10µL da amostra ou solução padrão (Trolox – 0,00008 a 0,0016 mmol/L), diluída para 300µL do reagente FRAP. As microplacas foram incubadas por 30min a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ$  C) ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 593 nm em espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®. Como padrão foi utilizado Trolox ( $y = 1,0173x - 0,089$ ;  $R^2 = 0,9918$ ) (Apêndice 2).

Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox por 100mg de amostra (µmol eq Trolox/100mg). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

### 3.9 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.9.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia franciscana*

A avaliação da toxicidade preliminar *in vitro* foi realizada com o extrato bruto etanólico e frações de folhas e caules de *M. evonymoides* frente ao microcrustáceo *Artemia franciscana*. O método executado foi baseado no método descrito por Meyer *et al.* (1982) com modificações e é considerado de baixo custo e de rápida execução. O ensaio foi realizado no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Inicialmente, foi preparada uma solução salina pH 9,0 a 10,0 com sal marinho Instant Ocean Sea Salt e água purificada (concentração de 35 g/L). Uma parte desta solução foi aerada por um período de 30 min. Em seguida foi utilizada para eclosão dos cistos do micro crustáceo *Artemia franciscana* Leach e outra parte da solução foi reservada para o preparo das amostras.

Os cistos foram mantidos em solução salina por 48h sob agitação constante e aquecimento com lâmpada de 20 W, para favorecer a eclosão. Após eclosão dos cistos, os náuplios foram atraídos com auxílio de luz e coletados com auxílio de pipeta Pasteur.

A partir do preparo da solução mãe na concentração de 1000 µg/mL em solução salina com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) foram realizadas as diluições nas concentrações de 750, 500, 250, 100, 50 e 10 µg/mL. O mesmo processo foi realizado com o controle positivo do experimento (sulfato de quinidina). Para controle negativo, foi empregada solução salina com 1% de DMSO.

Para realização do ensaio, 5 mL das diferentes concentrações de amostra ou controles foram adicionados a frascos de vidro juntamente com 10 náuplios de *Artemia franciscana* Leach. Os frascos foram mantidos abertos em local limpo e a temperatura ambiente pelo período de 24 horas. Após o período, foi realizado a contagem dos náuplios vivos e mortos. O ensaio foi realizado em quintuplicata. Os dados obtidos foram analisados com auxílio da análise estatística pelo método probitos (FINNEY, 1956) no software SPSS versão 23.0 (Armonk, NY, USA). Valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 1000 µg/mL indicam toxicidade da amostra (Meyer *et al.*, 1982).

### 3.9.2 Avaliação da atividade hemolítica *in vitro*

O teste de atividade hemolítica foi conduzido com o extrato bruto etanólico e frações de folhas e caules de *M. evonymoides* no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Esta avaliação foi realizada seguindo protocolo estabelecido por Aslam *et al.* (2011) com modificações, no qual a hemólise é verificada por espectrometria. Foi utilizado o sangue de carneiro desfibrinado da marca Laborclin® lote: 210805031.

As amostras testadas foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 ±0,1 (Laborclin®, lote: 210525065) conforme instrução do fabricante, armazenado na geladeira. Em seguida o sangue de carneiro foi retirado da refrigeração e levemente homogeneizado, foram transferidos 5mL ao tubo Falcon e levado a centrifugação durante 5min a 3000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com o tampão PBS gelado. Foram realizadas mais 3 lavagens até que o sobrenadante ficou completamente incolor. Em seguida a papa de eritrócitos foi diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2,5%.

A solução estoque (SE) das amostras e controles foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL, solubilizadas em solução de PBS contendo 10% de metanol. As diluições foram realizadas a partir das SEs, diluindo-as em PBS. Para a

realização da prova de hemólise foram utilizados extratos brutos, frações nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 75 µg/mL. Como controle negativo utilizou-se soluções de PBS e metanol 10%. Para fins de comparação dos resultados, utilizou-se saponina como padrão hemolítico e a rutina como padrão não hemolítico, nas mesmas concentrações que as amostras.

Esta análise foi realizada em tubos tipo Eppendorfs® onde foram colocados 20 µL das amostras ou controles, e 180 µL de solução de eritrócitos a 2,5%. Os tubos de Eppendorfs® foram homogeneizados manualmente sob leve agitação e incubados durante 30 min em estufa a temperatura de 37°C, em seguida foram retirados da estufa e colocados em banho de gelo por 5 min, a fim de cessar a reação. Na sequência os tubos foram levados a centrifuga (Minispin Plus da empresa Eppendorf®) e centrifugados por 5 min a 3000 rpm. Retirou-se 100 µL do sobrenadante e diluiu-se em 900 µL de PBS. Posteriormente, transferiu-se 200 µL da diluição para placa de Elisa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na faixa de 576 nm (Espectrofotômetro Multiskan FC, Thermo Scientific®). Para a quantificação da hemólise, o valor foi calculado em porcentagem, considerando-se o valor de 100% a absorbância lida no tubo de triton. O teste foi realizado em quintuplicata, os resultados expressos em % hemólise e calculados conforme a fórmula (3) (RASOOL et al., 2015). Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p < 0,05$  utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

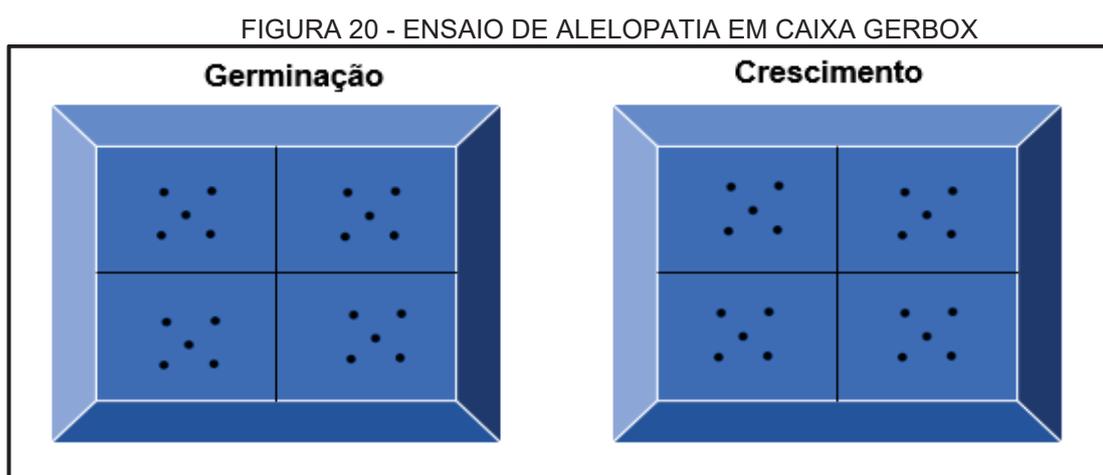
$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{branco}}{\text{Absorbância do triton} - \text{branco}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.9.3 Avaliação da atividade alelopática

A atividade alelopática foi realizada com extrato bruto etanólico e frações de folhas e caules de *M. evonymoides*, executados no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e seguiu a metodologia descrita por Macías, Castellano, Molinillo (2000). Os extratos e frações

foram solubilizados em metanol nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. popularmente conhecida como alface, da variedade Babá de verão (Topseed®, lote 144211-002-S2, 100% de pureza e 95% de germinação) e sementes de *Allium cepa* L. popularmente conhecida como cebola, da variedade Baia periforme (Isla®, lote 129787-001-S2, 99,8% de pureza e 96% de germinação). O teste foi realizado em caixas tipo gerbox® previamente higienizadas em hipoclorito 10% v/v por 24 horas. Após 24 horas foram enxaguadas com água purificada e passadas em uma solução de álcool 70% (v/v) e deixadas em temperatura ambiente para secar. Posteriormente foram acondicionados 2 papéis de filtro (Whatman® n°6), previamente esterilizados, acomodados no fundo de cada caixa. Adicionou-se 6 mL das amostras nas caixas contendo o papel filtro, e estas foram deixadas sob fluxo laminar para evaporação do solvente, por um período de 24 horas. Como controle negativo, utilizou-se água purificada e metanol nas mesmas condições que as amostras. Para cada amostra, foram utilizadas duas gerbox uma para avaliação do crescimento e outra para avaliação da germinação. Cada caixa gerbox foi dividida em 4 quadrantes, representando a quadruplicata, contendo 5 sementes em cada caixa conforme demonstrado na FIGURA 20.



FONTE: A Autora (2021).

NOTA: Esquematização da caixa gerbox, dividida em quatro quadrantes, contendo cinco sementes cada exemplificadas em círculos pretos.

Após a completa evaporação do solvente, foram adicionados 6 mL de água purificada em cada caixa. Posteriormente, adicionou-se as sementes (20 sementes) e

em seguida as caixas gerbox foram acondicionadas em capela de fluxo laminar por um período de 7 dias a *Lactuca sativa* ( $20 \pm 0,5$ ) °C e 12 dias a *Allium cepa* ( $25 \pm 0,5$ ) °C. A temperatura e umidade foram controlados com termo-higrômetro digital. Durante este período, diariamente as sementes foram avaliadas quanto à sua germinação para cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme descrito por Maguire (1962) (fórmula 4). As sementes foram consideradas germinadas, após o aparecimento de 3mm de protusão da radícula através do tegumento (De Feo; Simone; Senatore, 2002; Adegas; Voll; Prete, 2003).

$$\frac{n^{\circ} \text{ Sementes}}{\text{Dia}} + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes}}{\text{Dia 1}} + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes}}{\text{Dia 2}} + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes}}{\text{Dia 3}} + \dots + \frac{n^{\circ} \text{ Sementes}}{\text{Dia 7}} \rightarrow \text{Soma total} = \text{IVG} \quad (4)$$

No sétimo dia foram avaliados o comprimento (mm) do hipocótilo e radícula das plântulas de *L. sativa* e no décimo segundo dia foram avaliados o comprimento (mm) do coleótilo e radícula da *A. cepa* com auxílio de papel milimetrado e pinça. Para a verificação das diferenças entre as médias foi empregado o teste ANOVA, seguido de Tukey  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa estatístico Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2018).

#### 3.9.4 Avaliação da capacidade larvívora em *Aedes aegypti*

A atividade larvívora foi realizada com extrato etanólico e frações de folhas e caules de *M. evonymoides* foi avaliada conforme metodologia descrita originalmente pela OMS (Organização Mundial da Saúde, 2005). No teste de capacidade larvívora, utilizou-se a linhagem “Rockefeller” de *Aedes aegypti* Linneaus 1762 (Diptera: Culicidae), cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz (Estado do Rio de Janeiro, Brasil) da coleção original no CDC (Centro de Controle de Doenças, Porto Rico, EUA). O teste foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de Ciências Biológicas, sob o número 719 (ANEXO B).

As colônias do mosquito foram mantidas no Laboratório de Medicina e Entomologia Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR, a 25 °C e 80% de umidade relativa. Para ocorrer o estímulo da oviposição de ovos, as fêmeas adultas dos mosquitos foram alimentadas com sangue de ratos Wistar; em seguida foram depositados em papel de filtro e posteriormente colocados em copo plástico de 300

mL contendo água mineral (Ouro fino®). Os ovos coletados foram depositados em bandeja com água mineral (desclorada) e ração para peixe triturada (Tetramin®). A bandeja foi incubada a  $(28 \pm 0,2)$  °C com fotoperíodo de 12 h, em estufa BOD (*Biochemical oxygen demand*) para estímulo da eclosão do 1º instar de larvas e permaneceram sob estas condições até sua evolução para o terceiro instar.

O teste larvicida com *A. aegypti*, foi realizado em triplicata, em 4 concentrações diferentes da amostra (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) solubilizadas em água mineral e 5% de metanol. O número de larvas por repetição foi de  $n = 10$ , sendo que no experimento foi utilizado um total de 30 larvas. Para cada repetição, as larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos de 300 mL, contendo 200 mL de solução da amostra. O grupo de larvas expostas apenas à água mineral foi o controle negativo e como controle do solvente, foi utilizada solução aquosa com 5% de metanol. Em seguida, os recipientes com as larvas foram mantidos em BOD  $(26 \pm 0,2)$  °C com fotoperíodo de 12 horas, por 24 horas. Após esse período foi realizada a contagem das larvas vivas e mortas para a determinação dos valores de  $CL_{50}$  e intervalos de confiança (95%), por meio do método de probitos no programa SPSS versão 6.0 (SPSS, 1993).

### 3.9.5 Avaliação da atividade antibacteriana de *M. evonymoides*

O extrato etanólico e frações de folhas e caules de *M. evonymoides* foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana. A técnica utilizada foi a micro diluição em caldo que determina a concentração inibitória mínima (CIM) ou em inglês *minimum inhibitory concentration* (MIC) conforme descrito por Veiga *et al.* (2019). Os testes foram conduzidos no Laboratório de Controle de Qualidade II do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Os microrganismos utilizados na pesquisa foram: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25913, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Candida albicans* ATCC® 14053. Trata-se de cepas de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização. As linhagens de referência foram armazenadas a -80°C em TSB com glicerol a 15%, até o momento do uso. As cepas foram reativadas, após conservadas em condições de congelamento foram subcultivadas em ágar TSA (*trypticase soy agar*), marca Difco, a temperatura de 37 °C por 20-24 horas. Para o preparo dos

inóculos as linhagens referência foram submetidas a suspensão em tubo contendo salina estéril (NaCl a 0,85%) na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

#### 3.9.5.1 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações

O ensaio de micro diluição em caldo (CLSI, 2012) foi realizado para obtenção dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os extratos e frações foram preparados por meio da diluição seriada em 100  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha) em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”, nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81  $\mu$ g/mL. Solução Salina fisiológica na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL foi utilizada para o preparo das suspensões bacterianas, equivalente ao padrão de McFarland 0,5. Em seguida 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana foram inoculadas nos orifícios da microplaca, para obtenção da concentração final de  $10^4$  UFC/mL. Para o controle de esterilidade, utilizou-se 100  $\mu$ L de MHB, 100  $\mu$ L do extrato e frações e 10  $\mu$ L de solução salina. A viabilidade bacteriana (controle positivo), foi preparada com 100  $\mu$ L de MHB e 10  $\mu$ L dos inóculos bacterianos. Como controle negativo, utilizou-se a atividade inibitória do diluente DMSO, no qual adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de DMSO 1% em 100  $\mu$ L de MHB e 10  $\mu$ L dos inóculos bacterianos. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (35°C) por um período de 20 horas. Posteriormente, adicionou-se 20  $\mu$ L de solução aquosa de TTC (Cloreto Trifenil Tetrazolio – Merck, Darmstadt, Germany) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por 3 horas (35 °C). Na sequência realizou-se a leitura visual dos resultados, no qual a visualização da coloração vermelha nos poços, é indicativo da ausência da atividade antimicrobiana, para a substância testada.

#### 3.9.5.2 Atividade antifúngica do extrato e frações

Para avaliação da atividade antifúngica, foram preparadas diluições seriadas dos extratos e frações, em meio líquido RPMI 1640 (*Instituto Roswell Park Memorial* -

*Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA*), em um intervalo de concentração de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL (CLSI, 2012) e depositados em microplacas de 96 poços com fundo em “U”. A partir da concentração inicial de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, as diferentes suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica. Estas foram diluídas em meio líquido para uma concentração final de  $1,0$  a  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL. Em seguida, inoculou-se 100 µL deste preparado nos orifícios das microplacas, as quais foram incubadas (35 °C) por um período de 48 horas. Após este período, adicionou-se 20 µL de TTC 0,5% e as microplacas foram novamente incubadas por 3 horas (35 °C). Após 48h de incubação as placas foram avaliadas visualmente. A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada a partir do poço em que não há crescimento do fungo.

### 3.9.5.3 Interpretação dos resultados

Resultados com ausência de crescimento microbiano até a concentração de 100 µg/mL, é indicativo de bom potencial inibitório. Ausência de atividade microbiana entre 100-500 µg/mL, é indicativo de atividade inibitória moderada. Ausência de atividade microbiana entre 500-1000 µg/mL, é indicativo de atividade inibitória fraca. Acima de 1000 µg/mL a amostra é considerada com ausência de atividade inibitória (Ayres *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2014).

## 3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

### 3.10.1 Caracterização e local da pesquisa

A atividade farmacológica foi avaliada, utilizando os extratos brutos de folhas e caules de *M. evonymoides*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos seguindo a normatização atual do CONCEA, do CEUA/UFSC e do ARRIVE (do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). Os experimentos com animais foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Biológicas da UFSC. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de

laboratório com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de registro 3328200323 (ANEXO C).

### 3.10.2 Animais experimentais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos heterogêneos machos e fêmeas Swiss (25 a 30 g) com aproximadamente 60 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os camundongos foram mantidos em sala de aclimação do Laboratório de Neurociência da Dor e Inflamação (LANDI). No Biotério os animais permaneceram em estante ventilada (ALESCO®), com três sistemas de estantes de mini isoladores (ALESCO®), a qual fornece melhor qualidade de vida e proteção aos animais, uma vez que o sistema de circulação do ar vinculado a este tipo de sistema injeta o ar diretamente no mini-isolador, em fluxo contínuo e de baixa velocidade, garantindo uma troca de ar ideal e bem-estar dos animais.

Os animais foram mantidos em microisoladores (marca BioBase) de circulação de ar, em gaiolas medindo 30x20x13 cm (4 a 5 animais por gaiola) em temperatura constante ( $22 \pm 2$  °C), com umidade relativa do ar entre 30% e 70%, ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água filtrada (Jojaco filtros) e ração (marca BioBase) *ad libitum*. Todas as caixas foram limpas e trocadas três vezes por semana, avaliando-se a necessidade de repor a ração industrial, cuidando para manter o local limpo e livre de contaminação. Os animais foram retirados da sala de aclimação e mantidos no laboratório de experimentação para adaptação por um período de pelo menos 1h antes do início dos experimentos e foram utilizados somente uma vez em cada teste, os quais foram realizados entre as 8:00 e 17:00 horas. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Os camundongos foram utilizados em experimentos de avaliação da atividade antinociceptiva utilizando os modelos de formalina e injeção intraplantar de carragenina. O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos do extrato, seguindo o princípio dos 3 Rs (*replace, reduction, refinement*) de Russel e Burch (1992).

### 3.10.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%)

No modelo de nocicepção induzido por formalina, dois tipos distintos de resposta nociceptiva podem ser avaliadas: a de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e a de origem neurogênica, decorrente da estimulação direta das fibras nociceptivas (Hunnskaar; Fasmer; Hole, 1985).

O teste foi realizado com EBF, seguindo a metodologia descrita por Hunnskaar; Fasmer; Hole (1985), no qual injetou-se 20 µL de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita uma hora após o tratamento com os extratos. O tempo que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a pata onde ocorreu a injeção de formalina é indicativo de nocicepção.

Para tal procedimento os camundongos foram separados em seis grupos denominados grupo 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Cinco grupos foram tratados com o extrato (3-300 mg/kg. v.o.) e um grupo com o veículo (10 mL/kg, v.o.). Os animais foram colocados individualmente sob funil de vidro invertido com espelho ao fundo para ambientação após 60 min foi feita a injeção de formalina. O tempo que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a pata injetada foi contado no período de 30 minutos e agrupado em duas fases, sendo a 1ª fase (fase neurogênica) contada no intervalo de 0 - 5 minutos e a 2ª fase (fase inflamatória) contabilizada no intervalo de 15 - 30 minutos. É um modelo bifásico, pois avalia duas fases de sensibilidade dolorosa, sendo a analgesia observada na primeira fase relacionada a dor de origem neurogênica e na segunda relacionada a dor de origem inflamatória (Hunnskaar; Fasmer; Hole, 1985).

### 3.10.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6 animais por grupo) e pré-tratados com veículo (água destilada), dexametasona (1 mg/kg, i.g.) e extrato etanólico de folhas e caule de *M. evonymoides* (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.). Após 30 min, foi realizada a injeção intraplantar de carragenina (CAR: 300ug/20ul, i.pl.) na pata posterior direita (Chaplan *et al.*, 1994). Em seguida os animais foram colocados em caixas de acrílico (9 × 7 × 11 cm) sobre plataforma elevada de malha, e a alodínia

mecânica foi avaliada nos tempos de 30 min, 2 horas e 4 horas após a injeção seguindo o protocolo descrito por Chaplan *et al.* (1994).

Filamentos de Von Frey (0,02, 0,07, 0,16, 0,4, 1,4, 4,0 e 8,0 g) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar da pata traseira direita até que uma sutil curvatura fosse observada. O primeiro filamento utilizado foi de 0,4 g, e o seguinte foi aumentado ou diminuído de acordo com a resposta de retirada da pata. A frequência de resposta é considerada após até seis aplicações dos filamentos de Von Frey e a mediana do limiar de retirada da pata foi determinado usando uma adaptação do método *up-and-down* de Dixon (Dixon, 1991). Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e as patas dos animais foram retiradas e congeladas para posterior avaliação de atividade enzimática da mieloperoxidase e citocinas inflamatórias.

#### 3.10.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) no teste de formalina e análise de variância de duas vias (ANOVA) para o teste da nocicepção pela injeção intraplantar de carragenina. As análises foram realizadas usando *GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e caule da espécie *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral foram coletados, separados, secos a sombra e temperatura ambiente por período de trinta dias e, posteriormente, triturados separadamente. Com a finalidade de manter a estabilidade da planta, bem como evitar um meio reacional propício a reações químicas, fenômenos químicos e proliferação de microrganismos, a retirada da água se faz necessária (Oliveira; Petrovick, 2010). As quantidades de droga vegetal seca e triturada foram de 1757 g para folhas e 2067 g para galhos na primeira coleta, os quais foram utilizados para análises físico-químicas (perda por dessecação e cinzas totais), ensaio sistemático em análise fitoquímica, obtenção de extrato bruto etanólico, frações etanólico e atividades biológicas. Na segunda coleta foram triturados 843,90 g de folhas e 760 g de caule direcionados para obtenção de extrato bruto cetônico e frações cetônicas com o objetivo de isolar compostos químicos.

### 4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO E HISTOQUÍMICO

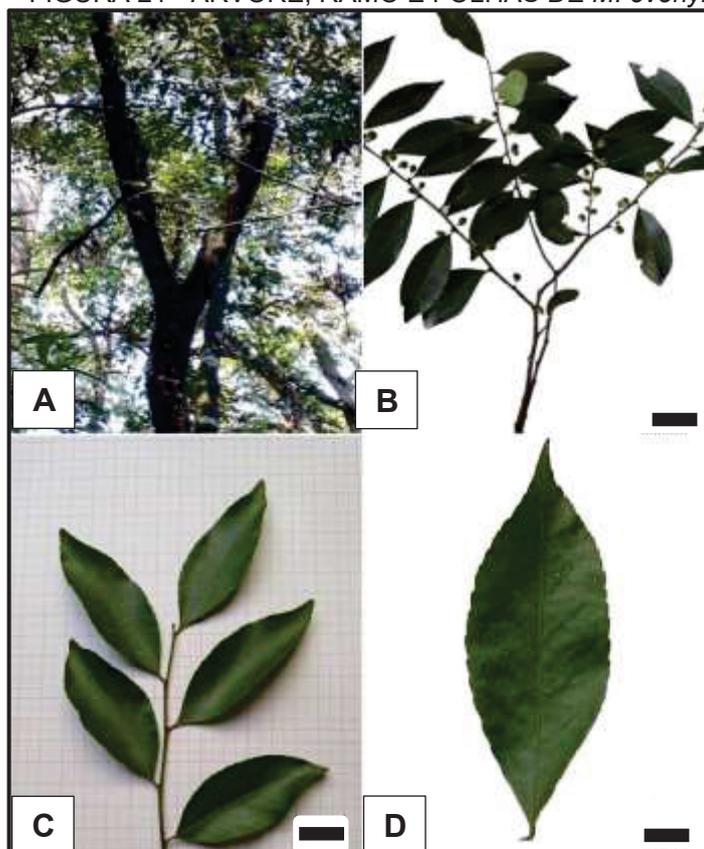
O estudo morfoanatômico tem como objetivo principal identificar, descrever os aspectos morfológicos, estruturas de caracterização e anatomia foliar de determinada espécie. Utiliza marcadores morfoanatômicos, que são aqueles relacionados ao padrão fenotípico de uma dada característica. Alguns exemplos de marcadores que podem ser observados no estudo são o formato da nervura central, formato do caule, aspecto geral do pecíolo, tipo de estômato (Cortez *et al.*, 2016).

#### 4.2.1 Morfoanatomia da folha

Em relação aos aspectos morfológicos, a espécie é uma árvore que pode chegar a 18 metros de altura (FIGURA 21A). Os ramos jovens são carenados, pubescentes, com coloração marrom, comumente lenticelados (FIGURA 21B). Os ramos maduros são cilíndricos de coloração acinzentada (Flora e Funga do Brasil,

2024). A epiderme foliar (FIGURA 21C e 21D), em vista de superfície, é dística e inteira, com estípulas, são do tipo caducas, com 0,76 cm de comprimento e 0,32 cm de largura em média, raramente persistente e triangulares, parede anticlinal reta e espessa, confirmando os relatos da literatura (Biral *et al.*, 2017; Flora e Funga do Brasil, 2024). Embora haja na literatura relatos de indumento do tipo pubescente, com tricomas espaçados (Flora e Funga do Brasil, 2024) a presença de tricomas nas folhas não foi observada.

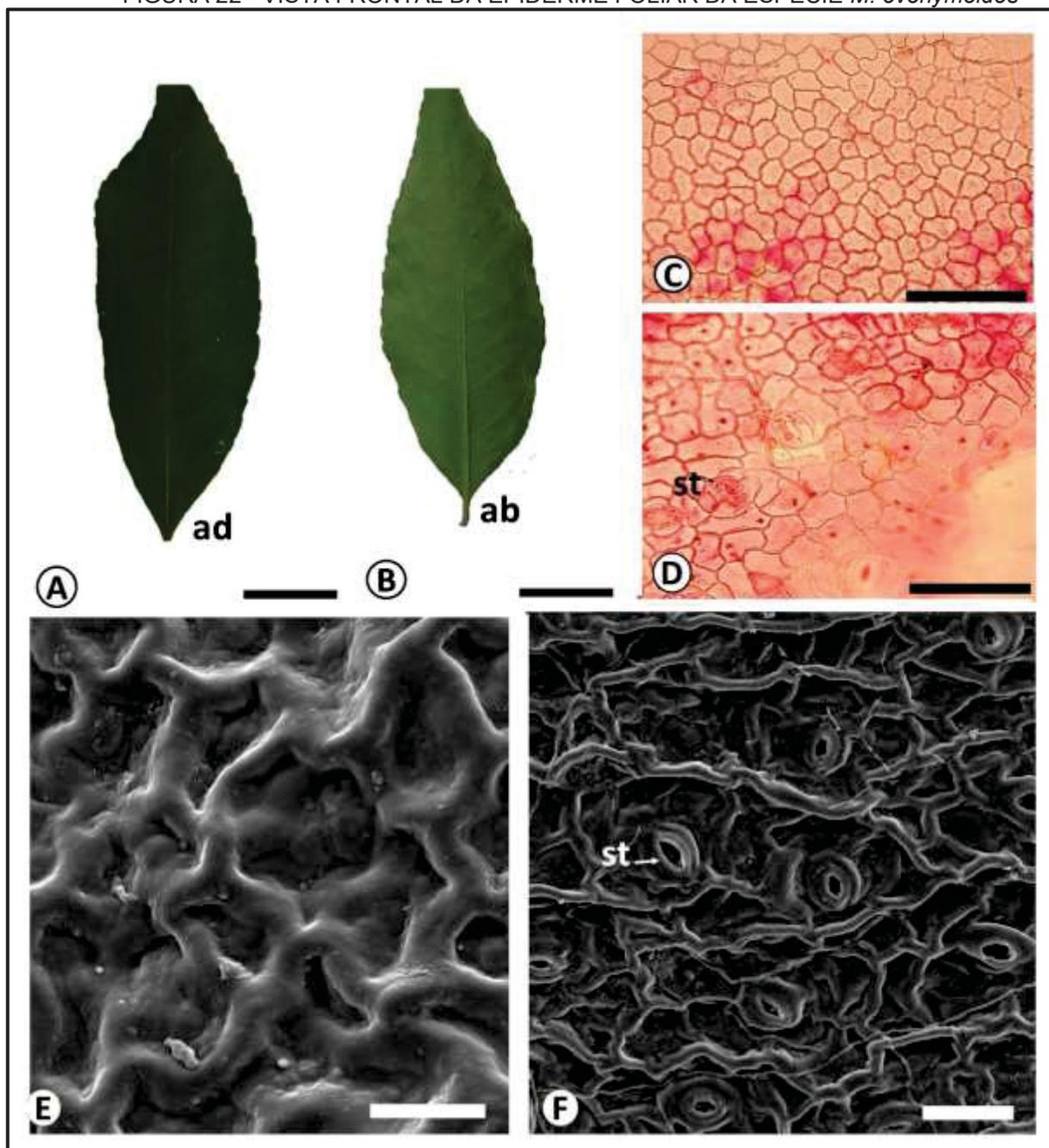
FIGURA 21 - ÁRVORE, RAMO E FOLHAS DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. A: Árvore em seu habitat natural; B: Galho com frutos. C: folhas em um ramo; D: folha em vista de superfície. Barras de escala: A = tamanho real, B, C e D = 1 cm.

Apresentaram ainda folhas estreitamente elípticas a ovado-elípticas, com a base aguda, as margens crenadas, planas e o ápice agudo a obtuso, não mucronado, membranáceas, glabras e concolores sendo verde escuro na face adaxial e verde mais claro na face abaxial (FIGURA 22A e 22B). Os achados no presente estudo corroboram com os estudos conduzidos por Biral *et al.* (2017) com a espécie *M. ilicifolia*.

FIGURA 22 - VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPECIE *M. evonymoides*

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Morfoanatomia de folhas de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral [C e D: microscopia óptica, coloração: safranina; E e F: MEV]. A e B: folhas. C, D, E e F: epiderme da folha em vista frontal (A, C e E: face adaxial; D e F: face abaxial). [st: estômatos]. Barras de escala: A e B = 1 cm, C e D = 100 µm, E=20 µm, F = 50 µm.

A nervura primária é plana na face adaxial (FIGURA 22A) e promínua na face abaxial (FIGURA 22B), apresenta ainda seis a sete pares de nervuras secundárias, inconspícuas na face adaxial (FIGURA 22A) planas na face abaxial (FIGURA 22B). Não foram observados flanges, diferenciando-se da espécie *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (Jacomassi; Machado, 2003; Rocha *et al.*, 2004; Brasil, 2019)

que apresenta folhas ovalado-oblongas a elípticas ou elípticolanceoladas, coriáceas, com ápice mucronado agudo a acuminado e espinho apical e flanges ao longo da margem epinescente (Brasil, 2019; Pereira, 2022; Antunes *et al.*, 2023); *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral que apresenta folhas obovada, orbicular, a oblongo-lanceolada, com ápice obtuso (Joffily; Vieira, 2005); *Monteverdia robusta* (Reissek) Biral no qual a folha é elíptica e coriácea; *Monteverdia salicifolia* Reissek in Mart., que possui folhas membranosas e ovaladas-lanceoladas (Duarte; Debur, 2005); e *Monteverdia aquifolia* (Mart) Biral, que apresenta folha elíptica a oblongo-elíptica, coriácea, base aguda a obtusa, ápice agudo a acuminado com espinho apical, margens apinescente (Carvalho-Okano, 2005; Antunes *et al.*, 2023).

Por apresentar folhas elípticas crenadas, inflorescência fasciculada e flores pequenas, *M. evonymoides* foi confundida com o gênero *Casearia* (Salicaceae), tanto que em 1861, Reissek propôs a espécie *Maytenus pseudocasearia* Reissek, pois ambas são parecidas, porém *M. evonymoides* apresenta menor pubescência e menor número de flores (Santos, 2016; Flora e Funga do Brasil, 2024). Por conta da variedade morfológica, principalmente em relação às folhas, Carvalho-Okano (2005) propôs a sinonímia entre *M. evonymoides* e *M. pseudocasearia* (Carvalho-Okano, 2005).

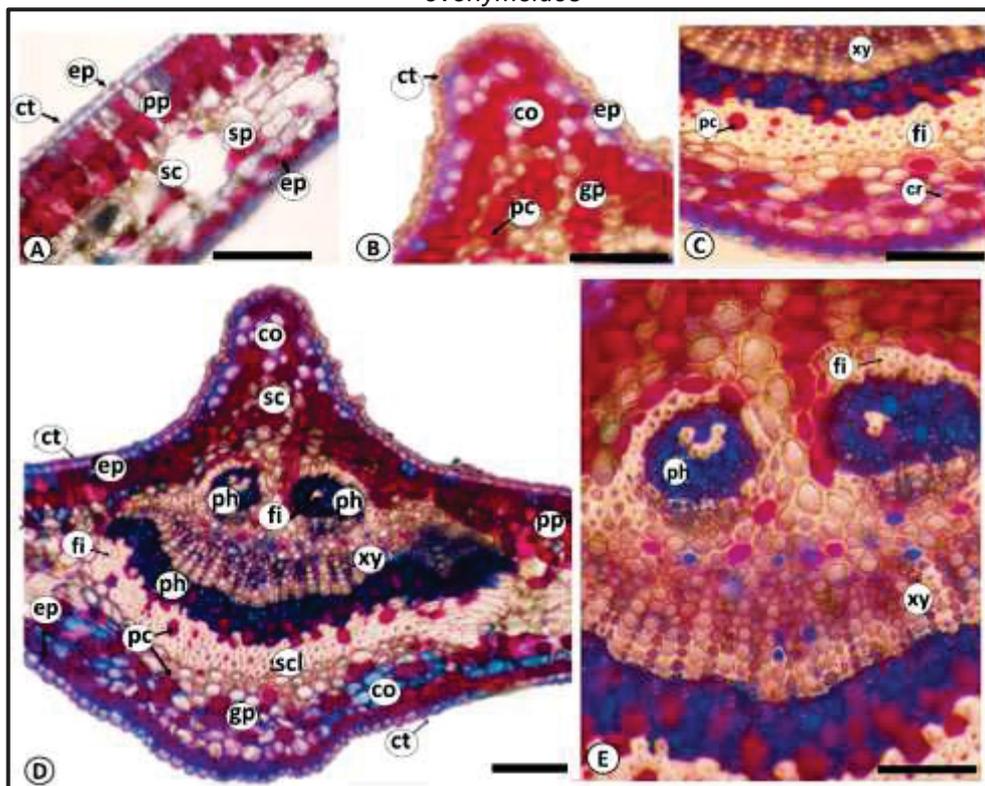
A espécie *M. evonymoides* apresenta imensa variedade foliar, desde espécimes com folhas ovaladas a indivíduos com folhas lanceoladas, bem como diferentes graus de crenação na margem (Santos, 2016; Flora e Funga do Brasil, 2024), diferindo-se assim da *M. ilicifolia* que apresenta dentes espinhosos ao longo da margem da folha e *M. Robustos*, que apesar de apresentar folhas elípticas, são coriáceas (Duarte; Debur, 2005). Guimarães *et al.* (2020) em seus estudos afirma que a sistemática de diferenciação das espécies inicialmente eram os achados morfológicos, seguidos da identificação dos metabólitos secundários, porém a incidência desses metabólitos ou ausência deles poderiam ser indicativo de uma origem comum, fato que pode explicar a confusão ocorrida entre os gêneros *Monteverdia* e *Casearia* (Guimarães *et al.*, 2020).

As características morfológicas semelhantes das folhas, flores e frutos no gênero *Monteverdia* foram evidenciados na literatura (Simmons *et al.*, 2008; Groppo *et al.*, 2014; Meirelles *et al.*, 2022). A lâmina, em vista frontal, apresenta células epidérmicas poligonais a levemente ondeadas (FIGURA 22C). A epiderme é uniseriada e uniestratificada, possuindo cutícula espessa (FIGURA 22D), corroborando

com relatos encontrados na família Celastraceae e no gênero *Monteverdia*, particularmente confirmados nas espécies *M. ilicifolia* e *Monteverdia boaria* Molina (Carvalho-Okano, 2005; Duarte; Debur, 2005), *Monteverdia rígida* (Mart.) Biral (Rocha *et al.*, 2004) e se diferencia de *Maytenus brasiliensis* (Mart.) Biral, *Maytenus cestrifolia* (Reissek) Biral, *Maytenus communis* (Reissek) Biral e *Maytenus obtusifolia* (Mart.) Biral, que embora a epiderme seja unisseriada, possuem cutícula delgada e lisa (Joffily; Vieira, 2005).

As semelhanças se confirmam, tanto que, quando houve a nova reclassificação de gêneros, 123 espécies que pertenciam ao gênero *Maytenus* passaram a pertencer ao gênero *Monteverdia*, a espécie *M. boaria* continuou no gênero *Maytenus* e as espécies *M. ilicifolia*, *M. rígida*, *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* passaram a pertencer ao gênero *Monteverdia* (Biral *et al.*, 2017). As células epidérmicas de contornos evidentes estão niveladas abaixo dos estômatos anomocíticos, anisocíticos e tetracíticos, na face abaxial, com característica hipoestomática (FIGURA 22D e 22F), apresentam saliências e sulcos de cutículas, os quais foram mencionados no complexo estomático encontrado em *M. ilicifolia* (Duarte; Debur, 2005; Amaral *et al.*, 2021). Da mesma forma, foi evidenciado em *M. aquifolia* (Jacomassi; Machado, 2003; Antunes *et al.*, 2023).

FIGURA 23 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Visão geral da secção transversal de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. A-E: Microscopia óptica, cortes corados com fucsina básica e azul astra. [co: colênquima; cr: cristais; ct: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; gp: parênquima fundamental; pc: compostos fenólicos; ph: floema; pp: parênquima paliçado, sc: esclerênquima, sc: cavidade secretora; sp: parênquima esponjoso; xy: xilema; vb: feixe vascular]. Barras de escala: A e C = 100 µm, B e D = 50 µm.

O mesofilo é do tipo dorsiventral, com cerca de duas camadas de parênquima paliçádico na face adaxial e a presença de parênquima esponjoso (FIGURA 23A). No mesofilo foram observadas raras cavidades secretoras, além de feixes colaterais de pequeno porte, com fibras lignificadas justapostas ao floema, assemelhando-se com relatos encontrados em *M. aquifolia*, *M. ilicifolia* (Duarte; Debur, 2005; Antunes *et al.*, 2023), *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* lisa (Joffily; Vieira, 2005).

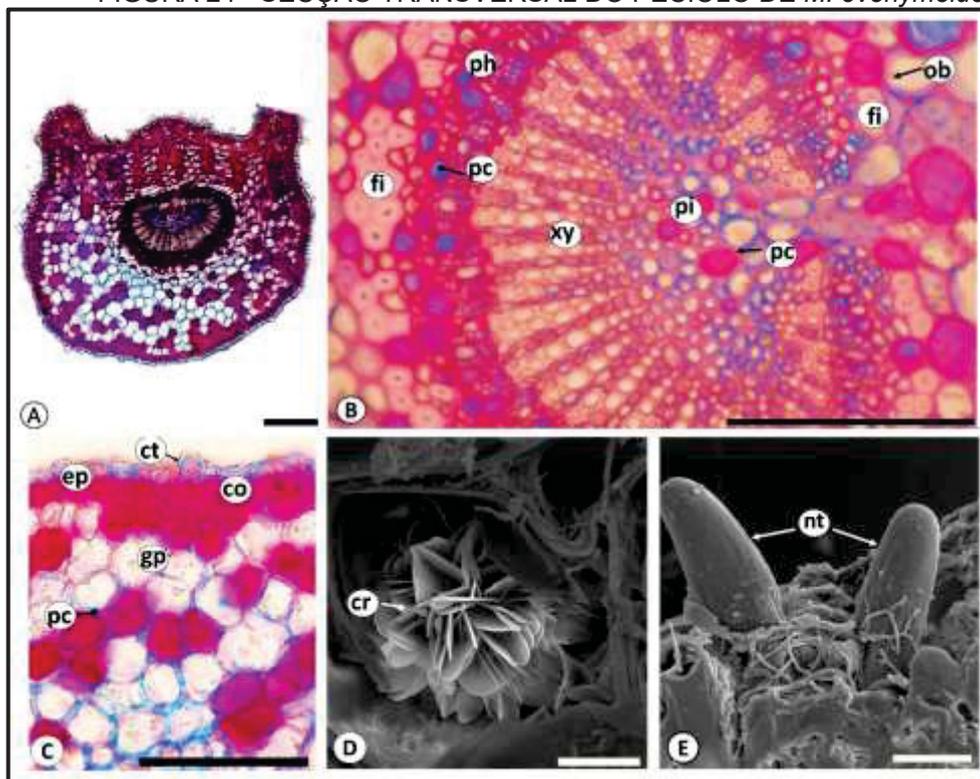
A nervura central, em secção transversal, é biconvexa (FIGURA 23B-23E) assim como *M. aquifolia*, *M. ilicifolia* (Duarte; Debur, 2005; Antunes *et al.*, 2023) *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* (Joffily; Vieira, 2005). Logo abaixo da epiderme pode ser observado colênquima angular, o parênquima fundamental possui um feixe colateral em arco aberto e dois feixes dorsais, calotas de fibras perivasculares são observadas contornando o floema, sendo mais evidentes na face abaxial (FIGURA 23C - 23E) igualmente relatado em *M. ilicifolia* (Duarte; Debur,

2005; Antunes *et al.*, 2023) *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* (Joffily; Vieira, 2005) e diferenciando-se de *M. aquifolia* que apresenta apenas um feixe dorsal. Geralmente o formato da nervura central possui valor diagnóstico, pois auxilia na diferenciação das espécies (Amaral *et al.*, 2021; Antunes *et al.*, 2023).

#### 4.2.2 Morfoanatomia do pecíolo

O pecíolo, em secção transversal, apresenta-se biconvexo (FIGURA 24A), com duas projeções na face adaxial e formato circular mais acentuado na face abaxial, padrão semelhante ao descrito nas espécies *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* (Duarte; Debur, 2005; Amaral *et al.*, 2021; Antunes *et al.*, 2023), assim como em *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* (Joffily; Vieira, 2005). Embora possa ocorrer diferenciação do tamanho, *M. evonymoides* pode apresentar pecíolo subnulo a 0,3 cm enquanto *M. aquifolia* 0,3 a 0,8 cm e *M. ilicifolia* 0,2 a 0,5 cm (Antunes *et al.*, 2023; Flora e Funga do Brasil, 2024).

FIGURA 24 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Anatomia do pecíolo de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. Corte transversal. [A - C: microscopia óptica, cortes corados com fucsina básica e azul de astra; D - E: MEV]. [co: colênquima;

cr: cristal; ct: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; gp: parênquima fundamental; ob: gotícula de óleo; pc: composto fenólico; ph: floema; pi: medula; nt: tricoma glandular não tector; xy: xilema]. Barras de escala: A = 100 µm; B-C = 50 µm; D = 10 µm; E = 20 µm.

A epiderme é semelhante à lâmina, uniseriada, recoberta por cutícula espessa (FIGURA 24A e 24C). O feixe vascular é anficrival na região central, formando uma região medular. Uma bainha esclerenquimática incompleta envolve o feixe vascular (FIGURA 24C). Os achados corroboram com Joffily e Vieira (2005) que encontrou padrão semelhante em *M. brasiliensis*, *M. cestrifolia*, *M. communis* e *M. obtusifolia* e Antunes *et al.* (2023), exceto pela presença de tricomas não tectores que no presente estudo estão evidenciados (FIGURA 24E).

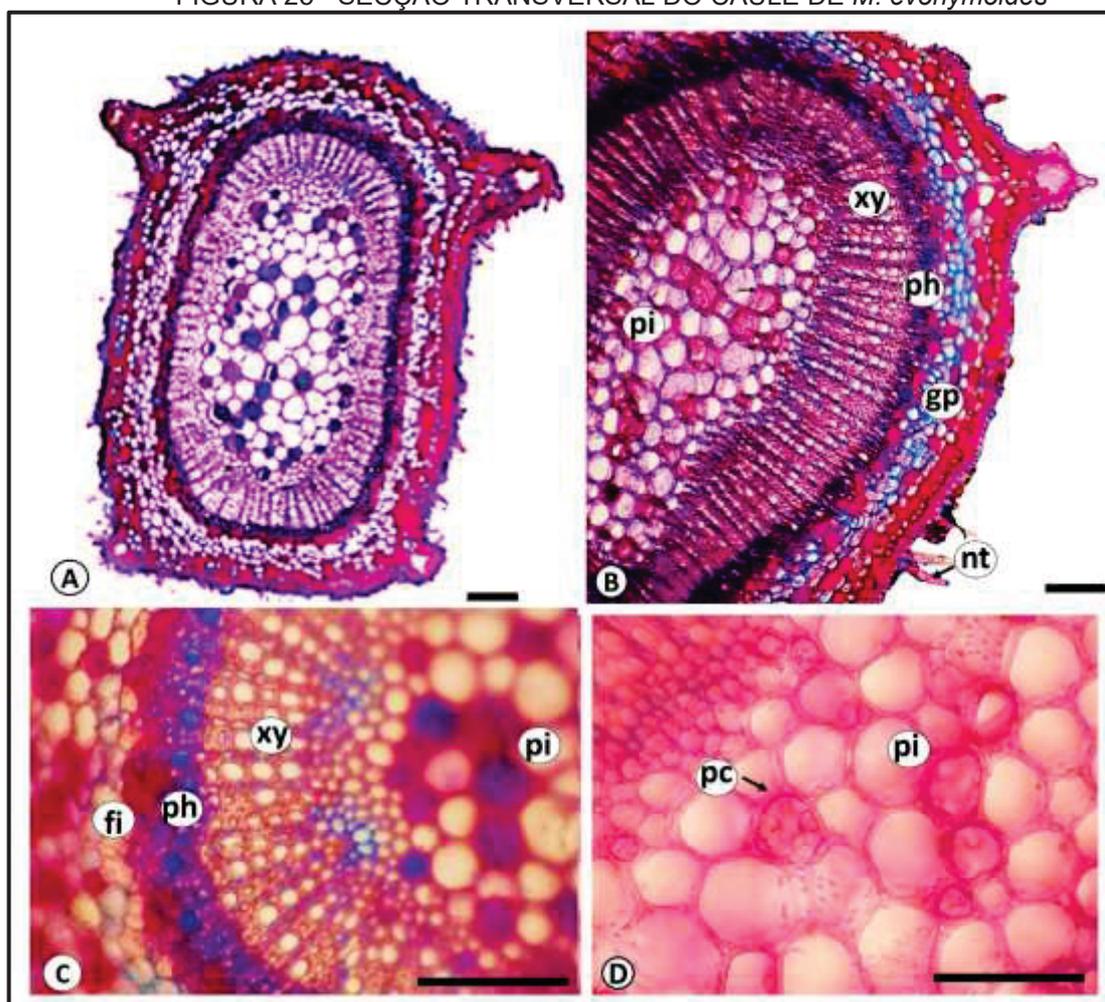
Os tricomas são anexos epidérmicos, sendo considerados importantes marcadores por apresentarem uma imensa variedade de formas e são de fácil detecção (Machado *et al.*, 2021), somados as características microscópicas peculiares contribuem com a identificação e diferenciação das espécies (Duarte; Debur, 2005; Amaral *et al.*, 2021; Antunes *et al.*, 2023).

Cristais formando agregados de placas foram observados (FIGURA 24D). Joffily e Vieira (2005) relataram a presença de cristais em *M. brasiliensis*, *M. communis* e *M. obtusifolia*. Duarte e Debur (2005), assim como Prata e Mendonça (2009), afirmam que os cristais dentro de células epidérmicas são comuns em Celastraceae, tem a função de armazenar o íon cálcio, evitando dessa forma o acúmulo tóxico do oxalato, contribuindo assim com o suporte mecânico, ademais protegem contra o forrageamento animal (Duarte; Debur, 2005; Prata; Mendonça, 2009). No presente estudo os cristais foram evidenciados fora das células epidérmicas, o que pode ser considerado um diferencial da espécie. A presença ou ausência de substâncias ergásticas como os cristais, bem como o tipo de composição são úteis na identificação vegetal (Joffily; Vieira, 2005). As principais formas de cristais encontradas nas plantas são areia cristalina, drusas, estiloides, prismas e ráfides (Brito *et al.*, 2021). O cálcio retirado do meio ambiente somados ao ácido oxálico sintetizado de forma endógena pelas plantas dão origem ao oxalato de cálcio, um cristal muito comum, embora possam ser encontrados sulfato de cálcio, oxalato de magnésio, entre outros (Machado *et al.*, 2019).

#### 4.2.3 Morfoanatomia do caule

Em crescimento primário, a morfoanatomia do caule em secção transversal apresenta formato ovalado, com quatro projeções laterais e fibras (FIGURA 25A e 25B). A epiderme é unisseriada, coberta por uma cutícula espessa, seguida de uma camada de colênquima angular e parênquima fundamental, constituído por cerca de oito camadas de células arredondadas de diferentes tamanhos. Tricomas tectores não glandulares foram encontrados (FIGURA 25B e 25B), assim como a presença compostos fenólicos (FIGURA 25B, 25C e 25D). Machado et al., (2021) afirma que a presença de tricomas é um achado importante para identificação da espécie.

FIGURA 25 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Morfoanatomia de caule de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral [A-D: microscopia óptica, cortes corados com fucsina básica e azul astra]. Secção transversal. [fi: fibras; gp: parênquima fundamental; pc: compostos fenólicos; ph: floema; pi: medula; tr: tricoma glandular não tector; xy: xilema]. Barras de escala: A e B = 100 µm; C e D = 50 µm.

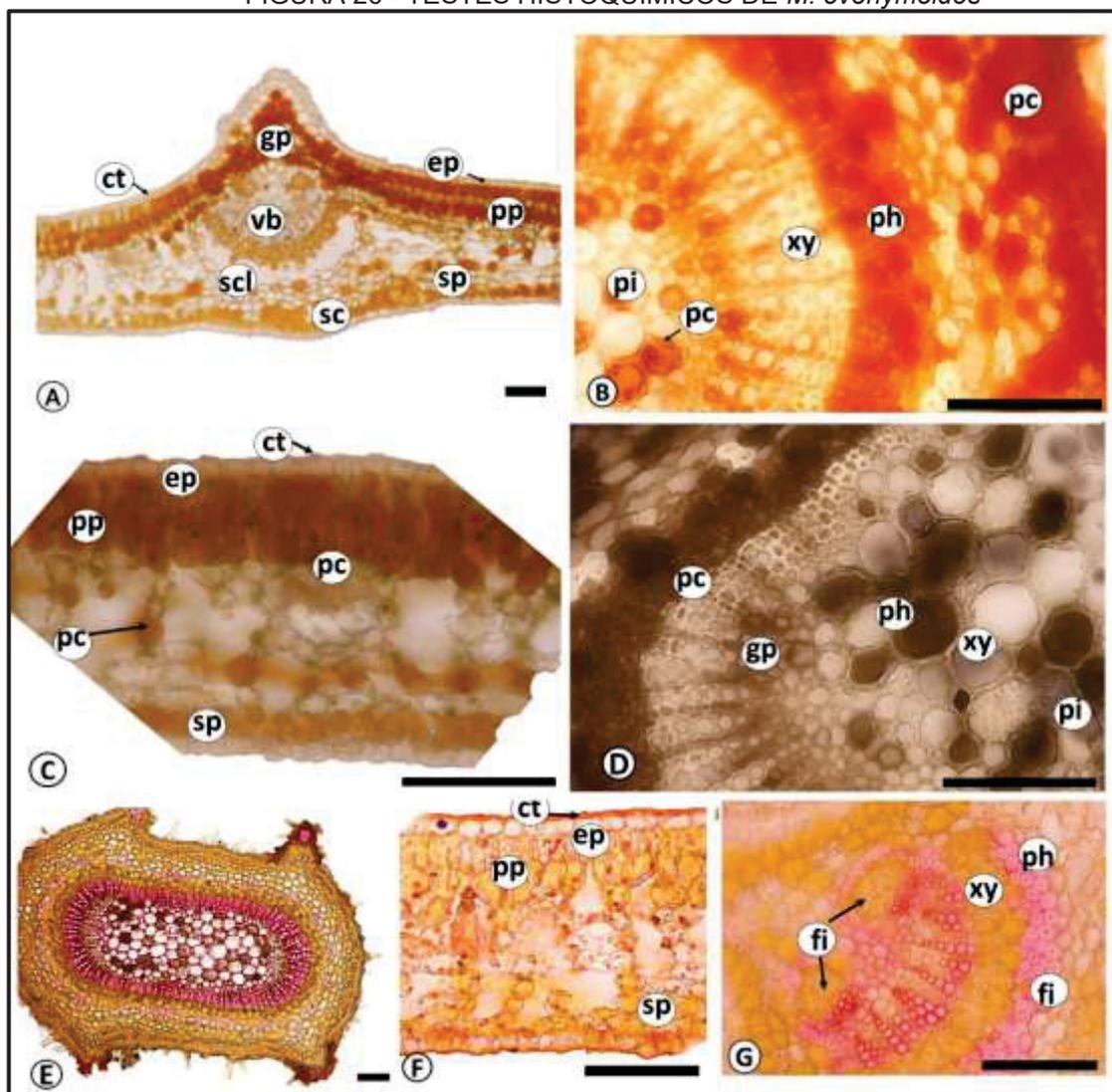
O sistema vascular é composto por floema na periferia e xilema voltado para a medula (FIGURA 25), sendo encontrado também nas espécies *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* (Jacomassi; Machado, 2003; Antunes *et al.*, 2023) e *Maytenus guianensis* Klotzsch ex, Reissek (Prata; Mendonça, 2009). Os elementos de vasos que estão distribuídos em fileiras ordenadas e grupos de fibras se encontram logo abaixo do floema. A medula, formada por células parenquimáticas (FIGURA 25C e 25D) está presente no centro do caule, bem delimitada e contém compostos fenólicos. O padrão encontrado corrobora com achados encontrados na família Celastraceae e no gênero *Monteverdia* (Duarte; Debur, 2005; Prata; Mendonça, 2009). O mesmo formato é observado em *M. ilicifolia*, assim como a projeção, epiderme e diferencia-se de *M. aquifolia* no que se refere ao formato: arredondado e além da epiderme, camadas subepidérmicas (Jacomassi; Machado, 2003; Antunes *et al.*, 2023). Da mesma forma, compostos fenólicos foram evidenciados em grande quantidade no córtex e no floema em *M. aquifolia*, *M. ilicifolia* (Antunes *et al.*, 2023), *M. guianensis* (Prata; Mendonça, 2009).

#### 4.2.4 Análises histoquímicas

Para identificação de compostos lipofílicos, o teste com Sudam III foi utilizado. Os compostos podem ser encontrados na cutícula, na epiderme, em tricomas glandulares, na suberina, em depósitos de óleo, cavidades, ductos, entre outros (Brito *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). No presente estudo os compostos lipofílicos foram encontrados na cutícula, em gotículas de óleo dispersas pelo mesofilo (FIGURA 26F). Da mesma forma células oleosas foram encontradas em *M. ilicifolia* (Santos *et al.*, 2021) e *M. aquifolia* (Antunes *et al.*, 2023). Os óleos têm papel fundamental na defesa das plantas, protegendo-as das condições ambientais adversas (Camargo *et al.*, 2020). Por meio dos testes cloreto férrico e dicromato de potássio foi possível identificar a presença de compostos fenólicos. A solução de cloreto férrico a 10% ao se precipitar com ferro produz coloração marrom escuro ou preta e o dicromato de potássio a 20% quando em contato com compostos fenólicos produz coloração que varia de marrom a marrom-avermelhada (Badria; Aboelmaaty, 2019). Estes foram evidenciados no mesofilo (FIGURA 26A e 26C) e na nervura central distribuídos em maior quantidade no parênquima paliçádico (FIGURA 26A). No pecíolo e no caule, estão dispersos por todas as estruturas, desde a epiderme, camadas subepidérmicas,

feixe vascular e medula (FIGURA 26B, 26D). Santos et al, (2021) também observou a presença de compostos fenólicos no floema ou próximo a este no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo em *M. ilicifolia* assim como Antunes et al. (2023) em *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*.

FIGURA 26 - TESTES HISTOQUÍMICOS DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Testes histoquímicos de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. [A-C: Dicromato de potássio; D: cloreto férrico (2%); E e G: floroglucinol/HCL; F: sudam III]. Seções transversais. A, G: nervura central; C, F: mesofilo; B, D, E: caule; [ct: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; pc: compostos fenólicos; ph: floema; pi: medula; pp: parênquima paliçádico; sc: célula esclerenquimática; sp: parênquima esponjoso; xy: xilema]. Barras de escala: A e E = 50μm, B, C, D, F e G = 100μm.

Da mesma forma, Duarte e Debur (2005) evidenciaram a presença de compostos fenólicos no mesofilo e no pecíolo em seus estudos com *M. ilicifolia*. De acordo com os autores as células armazenadoras desses compostos estão distribuídas na maioria dos tecidos, os sintetizam e armazenam nos vacúolos durante o processo de diferenciação celular com a finalidade de proteção contra lesões e/ou

infecções. Somados a proteção, os compostos fenólicos, principalmente os taninos, apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, entre outros (Duarte; Debur, 2005; Monteiro *et al.*, 2005). Corroborando com Duarte e Debur (2005), Santos *et al.* (2021) afirma que a presença de compostos fenólicos não está associada com células especializadas na secreção e sim com estruturas não especializadas de secreção (Santos *et al.*, 2021).

O floroglucinol/HCl é um reagente utilizado para identificar a presença de lignina, uma substância que confere rigidez e resistência mecânica aos vasos, responsável ainda pela adaptação de plantas superiores, além de ter um papel fundamental na proteção dos tecidos contra microorganismos e promover transporte de água e nutrientes, portanto, é facilmente encontrada nas camadas das paredes secundárias (Farago *et al.*, 2005; Betim *et al.*, 2020).

A presença de lignina foi evidenciada na nervura central reagindo com as fibras e com xilema da folha, pecíolo e caule (FIGURA 26E e 26G). Antunes *et al.*, (2023) também observou a presença de lignina nas fibras, elementos de vasos do xilema nas folhas e caules de *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*. Da mesma forma, Duarte e Debur (2005) observaram a presença de lignina em *M. ilicifolia* (Duarte; Debur, 2005; Antunes *et al.*, 2023). Os elementos lignificados têm a função de promover hidrofobicidade e sustentação mecânica à planta, pois estão presentes nas paredes celulares do xilema e nas fibras esclerenquimatosas (Boerjan; Ralph; Baucher, 2003),

Foram ainda realizados os testes de lugol, no qual a solução de iodo é usada para destacar a presença de amido, que pode ser identificado pela coloração azul ou preta (Badria; Aboelmaaty, 2019). No presente estudo a presença de amido não foi evidenciada, diferindo-se do resultado encontrado por Duarte e Debur (2005) e Antunes *et al.* (2023), que evidenciou reação positiva em *M. ilicifolia* no parênquima fundamental do pecíolo, próximo as fibras e em *M. aquifolia* no córtex do caule próximos as células pétreas (Duarte; Debur, 2005; Antunes *et al.*, 2023).

#### 4.3 PARÂMETROS FARMACOPEICOS

Os parâmetros farmacopeicos contribuem com a identificação morfoanatômica permite a identificação do material botânico, atestam a pureza e denunciam desvios

de qualidade e possíveis adulterações. Na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, 2019 não foram encontrados dados para estabelecer os limites máximos destas análises, portanto foi utilizada como parâmetro de comparação a espécie *Monteverdia ilicifolia* Mart. ex Reissek, na qual a determinação de cinzas totais não deve exceder 8,0% e a determinação de umidade não deve exceder a 12,0% (Brasil, 2019).

#### 4.3.1 Perda por dessecação

Parâmetro perda por dessecação quantifica qualquer substância volátil eliminada da droga vegetal estudada, fornecendo um parâmetro de avaliação para o seu controle de qualidade e garantindo a estabilização e eficiência no processo de secagem (Brasil, 2019). Cada espécie apresenta parâmetros farmacopeicos exclusivos. Após a análise verificou-se que folhas e caules provenientes da primeira coleta apresentaram um teor de água de 8,39% e 8,58% respectivamente. Os resultados estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 - RESULTADOS DO PARÂMETRO PERDA POR DESSECAÇÃO DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides*.

Parte aérea	Umidade (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
Caule	8,58	0,4417	5,15
Folhas	8,39	1,0000	11,91

FONTE: A autora (2021).

Trata-se de um importante parâmetro uma vez que a presença de água no material vegetal pode acarretar na degradação de constituintes químicos, por meio da ação de enzimas e também facilitar o desenvolvimento de bactérias e fungos (Vasconcelos; Silva; Lima, 2012). De acordo com os resultados, o material de estudo está dentro da faixa recomendada, indicando baixa probabilidade de ocorrer ação enzimática bem como desenvolvimento de bactérias e fungos (Farias, 2007).

#### 4.3.2 Determinação de cinzas

É comum a presença de compostos inorgânicos nas plantas. A quantificação desses compostos é avaliada por meio da determinação de cinzas. Como parâmetro de comparação utilizou-se a espécie *Monteverdia ilicifolia* Mart. ex Reissek, descrita

na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, 2019, a qual determina que esse teste não deve exceder 8,0%. Ao exceder esse limite, a análise pode detectar possíveis adulterações, bem como contaminações presentes no material vegetal (Brasil, 2019). Os resultados encontrados estão dispostos na TABELA 5, assim como realizado no teste perda por dessecação o material utilizado nesta análise foi proveniente da primeira coleta.

TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides*

Parte Aérea	Cinzas totais (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
Caule	3,65	0,0067	5,78
Folhas	3,05	0,0804	144,56

FONTE: A autora (2021).

Da mesma forma que a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), Farias (2007) também enfatiza a importância do teste na identificação de possíveis contaminantes que podem estar presentes no material vegetal.

#### 4.4 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E RENDIMENTO

Para obtenção do extrato bruto etanólico e cetônico de folhas e caules de *M. evonymoides* a metodologia adotada foi extração contínua até o completo esgotamento por meio de Soxhlet modificado. A escolha se baseia em alguns fatores, a exemplo de: permitir completa extração dos constituintes químicos; apresentar estabilidade térmica; menor quantidade de solventes empregados na extração (Carvalho *et al.*, 2009; Gil-Martín *et al.*, 2022).

A partir do extrato bruto foi realizada a análise de teor de sólidos e os resultados estão apresentados na TABELA 6. O teor de sólidos é obtido pela pesagem do resíduo da evaporação de uma determinada amostra, correspondendo dessa forma, ao resíduo da desidratação dessa amostra e permite calcular o rendimento do extrato hidroalcólico e cetônico, já que sua fase líquida é eliminada. Para o extrato etanólico e cetônico a partir das folhas o rendimento encontrado foi de 14,74% e 9,46% respectivamente e para o extrato etanólico e cetônico a partir do caule foi de 10,28% e 6,43% respectivamente.

TABELA 6 - RENDIMENTO\* DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO E CETÔNICO DE *M. evonymoides*

Parte aérea	Teor de sólidos (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
Extrato Etanólico Caule	10,28	0,0021	6,08
Extrato Etanólico Folhas	14,74	0,0005	2,14
Extrato Cetônico Caule	6,43	0,0021	3,26
Extrato Cetônico Folhas	9,46	0,023	17,67

FONTE: A autora (2021).

NOTA: \*% calculado em relação ao total de planta seca (g).

Após esta etapa, uma pequena parte de extrato bruto etanólico de folhas (EBF) e caule (EBC) foi separada, e posteriormente evaporada, para a realização das atividades biológicas resultando em 3,632 g e 3,074 g de extrato bruto etanólico seco de folhas e caule respectivamente (TABELA 7).

TABELA 7 - EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO DAS FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides* RESERVADOS PARA AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Fração	Caule		Folhas	
	(g)	(%)	(g)	(%)
Extrato Bruto Etanólico	3,074	0,149	3,632	0,207

FONTE: A autora (2021).

NOTA: % calculado em relação ao total de planta seca (g).

#### 4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A análise fitoquímica preliminar tem por objetivo identificar os componentes químicos presentes na planta, por meio de reações químicas, que podem ser de precipitação ou alteração na coloração. É possível caracterizar os metabólitos secundários, contribuir com o estudo de plantas que não possuem relatos na literatura (Da Silva; Miranda; Conceição, 2010), além de auxiliar no direcionamento da pesquisa (Luiz *et al.*, 2014).

A TABELA 8 traz os resultados obtidos na análise fitoquímica preliminar do extrato aquoso (20%) e a TABELA 9 do extrato hidroalcolico (20%) para o material vegetal constituído de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. A análise fitoquímica preliminar foi conduzida com as folhas e caule originários da primeira coleta.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides*.

Análises fitoquímica	Caules	Folhas
Heterosídeos antocianicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	-	-
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Taninos hidrolisáveis	+	+
Taninos condensados	+	+
Pesquisa de amino grupos	-	-
Ácidos fixos	+	+
Ácidos voláteis	-	-

FONTE: A autora (2021).

NOTA: Símbolo + é indicativo de reação positiva, símbolo - é indicativo de reação negativa.

De acordo com o observado na TABELA 8, os resultados foram negativo para a presença de heterosídeos antociânicos, pois não houve a formação da coloração avermelhada em meio ácido; azulada para o meio alcalino e violácea para meio neutro, tanto para folhas quanto para o caule. O mesmo resultado foi observado na pesquisa de heterosídeos saponínicos, tendo em vista a ausência de formação de espuma igual ou maior que um centímetro, resultado divergente ao observado na espécie *Monteverdia ilicifolia* (Vargas *et al.*, 2020). Também não foi observado o aparecimento de cor vermelha na tira de papel indicando a presença de heterosídeos cianogênicos.

Foram observados valores de pH acima de 7 indicando resultado negativo para a presença de ácidos voláteis. Igualmente foi observado resultado negativo na pesquisa de aminogrupos, pois não houve o aparecimento de coloração azul-violeta.

Por outro lado, foi possível identificar a presença de taninos condensados, hidrolisáveis e a presença de polifenóis, tendo em vista a observação de coloração verde, azul e marrom respectivamente tanto para folhas quanto para caules. Da mesma forma, foi observado resultado positivo para a presença de taninos na espécie *Monteverdia ilicifolia* (Vargas *et al.*, 2020). Tal como ocorreu na pesquisa de ácidos fixos, em que foi constatado a presença de coloração marrom.

A TABELA 9 apresenta os resultados obtidos na pesquisa do extrato e frações hidroalcóolicos das folhas e caule de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral.

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS E CAULES DE *M. evonymoides*

Análises Fitoquímicas	Reagentes utilizados	EB		FH		FC		FAE	
		F	C	F	C	F	C	F	C
Alcaloides	Reativo de Mayer	-	-	-	-	+	+	-	-
	Reativo de Dragendorff	-	-	+	+	-	-	-	-
	Reativo de Bouchardat	-	-	+	+	-	-	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	+	+	-	-	+	+	+	+
	Heterosídeos Flavônicos	+	+	-	-	-	-	+	+
	Oxálico Bórico	+	+	-	-	+	+	+	+
	Pacheco	-	-	-	-	-	-	-	-
	Zinco em HCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	Fluorescência em UV	-	-	-	-	-	-	-	-
Compostos Iridoides	Floroglucinol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido Sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cristais de vanila e ácido sulfúrico	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	Bornträger	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides/ Triterpenos	Libermann Bouchard	+	+	-	-	+	+	+	+
	Keller Kelliani	+	+	-	-	+	+	+	+

FONTE: A autora (2021).

NOTA: Símbolo + é indicativo de reação positiva, símbolo - é indicativo de reação negativa. Folhas (F), Caule (C). Extrato Bruto (EB); Fração Hexânica (FH); Fração Clorofórmica (FC); Fração Acetato de Etila (FAE).

Na pesquisa de alcaloides foram utilizados três reagentes: Reativo de Bouchardat (solução de iodo 1%, iodeto de potássio 2% e água purificada); Reativo de Dragendorff (solução de iodo bismutado de potássio K(BiI<sub>4</sub>) em meio ácido); Reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio) (Miguel, 2003). A reação é considerada positiva quando a amostra em contato com o Reativo de Mayer apresenta precipitado ou leve turvação branca, o mesmo ocorre com o Reativo de Dragendorff quando ocorre a formação de precipitado cor vermelho-tijolo, da mesma forma, se confirma o resultado na reação com o Reativo de Bouchardat quando observa-se precipitado alaranjado. Os resultados indicando a presença de alcaloides foram observados tanto para caule quanto para folhas na fração hexano para os três reativos. Resultado igual foi observado em estudos conduzidos com a espécie *Monteverdia ilicifolia* (Vargas *et al.*, 2020). Porém, resultados falso positivos para alcaloides são comuns uma vez que o composto químico pode conter uma base nitrogenada e não ser propriamente um alcaloide (Henriques, *et al.*, 2007).

Na triagem fitoquímica do extrato bruto de folhas da espécie *Monteverdia ilicifolia*, Colacite (2015) constatou resultado positivo para os reativos Mayer, Dragendorff e Bouchardat. Assim como Colacite (2015) Mariño *et al.* (2019) também constatou a presença de alcaloides na triagem fitoquímica, este por sua vez, realizou o ensaio com extrato bruto de *Monteverdia ilicifolia* (Mart) de três amostras diferentes (Mariño *et al.*, 2019). Por outro lado, na triagem fitoquímica realizada com a entrecasca da espécie *Maytenus rígida* Mart. a pesquisa apresentou resultado negativo para alcaloides (Estevam *et al.*, 2009).

Quanto a pesquisa de leucoantocianidinas a reação caracteriza-se como positiva pelo aparecimento de coloração vermelha, esse resultado foi observado no extrato bruto, na fração clorofórmio e na fração acetato de etila para folhas e caule. Foi observado resultado positivo para reação de oxálico bórico que em luz fluorescente apresenta coloração amarela fluorescente sob a luz ultravioleta, sugerindo assim a presença de flavonóis. E resultado positivo na pesquisa de heterosídeos flavônicos no extrato bruto e na fração acetato de etila confirmando a presença de flavonóis, uma vez que a coloração vermelha foi observada. Há relatos na literatura da presença de flavonoides em várias espécies do gênero, a exemplo da quercetina, canferol e rutina isolado em *Monteverdia aquifolia* (Yarimake *et al.*, 2005; Sahyun *et al.*, 2021), quercetina e canferol isolados *Maytenus dasyclada* Mart., *Maytenus cassineformis* Reissek (Schwanz, 2012) e *Maytenus truncata* Reissek (Fonseca *et al.*, 2007).

Os resultados foram negativos tanto para folhas quanto para caule na pesquisa de cumarinas (formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada, torna a reação positiva), heterosídeos antraquinônicos (coloração vermelha em caso de positividade), compostos iridoides (coloração verde escura indica resultado positivo).

Na pesquisa de esteroides/triterpenos foi observada a formação de coloração rosa. Miguel (2003) sugere que essa coloração se refere a presença de um composto que apresenta na sua fórmula estrutural dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 e função carbonila na posição 3. O mesmo resultado foi observado nos extratos brutos, fração clorofórmio e fração acetado de etila de folhas e caule. Não foi observado coloração rosa na fração hexano, indicando resultado negativo para esta fração. Miguel (2003) sugere ainda que quando observado coloração verde trata-se da presença de um composto que apresenta na sua fórmula estrutural dupla ligação entre os carbonos 5

e 6 e função carbonila na posição 3. Quando observada a formação de coloração amarela indica a possível presença de um composto que apresenta um grupamento metila no carbono 14 em sua fórmula estrutural (Miguel, 2003).

Os esteroides e triterpenos estão amplamente distribuídos no gênero *Monteverdia*, haja vista em *Monteverdia ilicifolia* (Colacite, 2015), *Maytenus rígida* (Estevam *et al.*, 2009; Conceição, 2010) e *Maytenus Robusta* (Souza, 2016).

Na triagem fitoquímica realizada por Colacite (2015) com folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Reissek) Biral os resultados foram positivo para alcaloides, flavonoides e taninos e negativos para a presença de saponinas corroborando com os achados nesse estudo (Colacite, 2015). Vargas *et al.* (2020) também realizou a triagem fitoquímica com folhas de *Monteverdia ilicifolia* e além de observar resultado positivo para a presença de alcaloides, flavonoides, taninos também obteve resultado positivo para saponinas e resultado negativo para a presença de antraquinonas (Vargas *et al.*, 2020). Lima *et al.* (2010) conduziu os estudos com casca de *M. rígida* e identificou a presença de fenóis totais, taninos, flavonas, flavanonóis, xantonas, heterosídeos flavonoides, esteroides, triterpenoides e heterosídeos saponínicos (Lima *et al.*, 2010). Corroborando com Lima *et al.*, (2010), Estevam *et al.*, (2009) também evidenciou a presença de triterpenos, esteroides nos estudos conduzidos com entrecascas de *M. rígida*, e ainda outras classes de substâncias: catequinas, quinonas, saponinas (Estevam *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos coincidem com os compostos químicos relatados no gênero *Monteverdia*, em relação aos alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos e triterpenos. A partir destes achados foi possível estabelecer estratégias para direcionar a pesquisa, de modo a buscar a obtenção de compostos isolados pertencentes a determinados grupamentos químicos.

#### 4.6 PERFIL FITOQUIMICO POR CCD

Extratos brutos e frações hidroalcoólica de folhas e caules de *M. evonymoides* foram submetidos a análise por cromatografia de camada delgada (CCD). Na CCD é possível avaliar as características qualitativas dos principais compostos metabólicos presentes nas amostras através de reações colorimétricas e fluorescência, assim como na triagem fitoquímica. Porém, esta metodologia oferece algumas vantagens,

pois é um método de rápida execução, fácil reprodutibilidade, simples, eficiente e de baixo custo (Alberton; Falkenberg; Falkenberg, 2002; Valente *et al.*, 2006).

Na pesquisa de alcaloides bandas marrons foram observadas na placa cromatográfica indicando resultado positivo nos extratos brutos, fração clorofórmio e fração remanescente (TABELA 10), contrariando os resultados obtidos na triagem fitoquímica que evidenciou resultado positivo apenas na fração hexano.

Quando pesquisados triterpenos e esteroides observou-se coloração violeta após aquecimento da placa cromatográfica indicando resultado positivo para todos os extratos e frações com exceção da fração clorofórmio que apresentou resultado negativo. O mesmo resultado positivo foi observado na triagem fitoquímica para o extrato bruto e fração acetato de etila de folhas e caule.

TABELA 10 - PRESENÇA DE GRUPOS QUÍMICOS NO EXTRATO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides* POR CCD

Grupo químico	Fase móvel	Revelador	EB		FH		FC		FAE		FR	
			F	C	F	C	F	C	F	C	F	C
Alcaloides	Clorofórmio: metanol (95:5) + universo amônia	Dragendorff	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Cumarinas	Tolueno: acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N (UV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides/ triterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 1%	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: Água destilada (95:3:2)	Reativo de NEU (UV)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Taninos	Acetato de etila: ácido fórmico: Água destilada (95:3:2)	Cloreto férrico	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Antraquinonas	Acetato de Etila: Metanol: Água (100:17:13)	Hidróxido de Potássio 5% em etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2021).

NOTA: Símbolo + é indicativo de reação positiva, símbolo - é indicativo de reação negativa. Extrato bruto (EB); Fração hexânica (FH); Fração clorofórmica (FC); Fração acetato de etila (FAE); Fração residual (FR); Caules (C); folhas (F); UV: luz ultravioleta.

Assim como na pesquisa de triterpenos e esteroides, os resultados foram positivos para todas as amostras com exceção da fração clorofórmio nos ensaios conduzidos para identificação de flavonoides que apresentou coloração amarela fluorescente sob luz UV. Na triagem fitoquímica os resultados indicando presença de flavonoides foram observados nos extratos brutos, fração clorofórmio e fração acetato de etila. Confirmando os achados na triagem fitoquímica quanto a pesquisa de taninos

realizada com extrato aquoso, observou-se a banda verde no extrato bruto e na fração clorofórmio de folhas e caule.

Os resultados obtidos na CCD corroboram com aqueles obtidos na triagem fitoquímica, no que tange a pesquisa de cumarinas e antraquinonas que apresentaram resultados negativos em todas as frações analisadas tanto de folhas quanto de caule.

As semelhanças e diferenças observadas na pesquisa por CCD quando comparadas com os resultados obtidos na triagem fitoquímica podem ser explicadas possivelmente pelo método de extração, a utilização de solventes de marcas e lotes diferentes e o tempo de extração. Na triagem fitoquímica o método de extração utilizado foi extração a 20% obtido por maceração a quente enquanto na CCD, os testes foram realizados com os extratos obtidos pela extração em equipamento de Soxhlet. Quando observadas as vantagens e desvantagens inerentes aos dois métodos, as diferenças são explícitas. Na maceração, apesar de ser um método simples, de fácil execução, desempenha baixa eficiência na extração, ao passo que no método por Soxhlet, por ser um processo contínuo, desempenha alta eficiência na extração de compostos. Outro fator impactante é o tempo de extração, na maceração realizada na triagem fitoquímica o tempo foi consideravelmente menor em relação ao tempo de extração em Soxhlet. A eficiência do processo extrativo está diretamente relacionada ao tempo de extração, quanto maior for o período, maior será a eficiência da extração, uma vez que, o tempo é considerado ponto crítico no método (Zhang; Lin; Ye, 2018).

Zhang; Lin; Ye (2018) afirmam ainda que para separar compostos bioativos o processo de extração é o primeiro passo a ser determinado e, portanto, de suma importância. Dentre os diversos métodos de extração conhecidos, a exemplo: destilação, prensagem, sublimação, a separação com o uso de solventes é o mais utilizado não só porque é o mais eficiente quando se utiliza solventes de polaridade próximo à polaridade do soluto, como também pode-se dimensionar segurança, custo e seletividade (Zhang; Lin; Ye, 2018). Corroborando com Zhang, Lin, Ye (2018), Hayouni *et al.* (2007) afirmam que tanto os métodos de extração quanto os solventes utilizados podem interferir no rendimento dos extratos a partir do método escolhido, na seletividade da extração das moléculas de interesse e conseqüentemente nas propriedades biológicas que podem ser encontradas no extrato obtido (Hayouni *et al.*, 2007). Nos estudos conduzidos por Chisté; Benassi; Mercadante (2014), os autores

afirmam que dependendo do solvente utilizado a pesquisa de compostos bioativos pode ser direcionada.

Os resultados observados no screening por CCD coincidem com relatos de compostos fitoquímicos evidenciados em outras espécies do gênero *Monteverdia*, a exemplo, *M. ilicifolia* (Alberton; Falkenberg; 2002, Rocha, 2003; Vargas *et al.*, 2020), *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Facundo *et al.*, 2015); *Maytenus rígida* (Rocha, 2003; Estevam *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010), *Maytenus robusta* (Krogh, 1996), *Maytenus truncata* (Fonseca *et al.*, 2007).

Rocha (2003) evidenciou a presença de flavonoides, triterpenos, esteroides proantocianidinas, leucocianidinas nas folhas de *M. ilicifolia* e *M. rígida*, e obteve resultado negativo na pesquisa de taninos hidrolisáveis, saponinas e alcaloides, iridoides (Rocha, 2003). Os resultados vêm de encontro com os achados na CCD de folhas e caule de *M. evonymoides* quanto a pesquisa de flavonoides, triterpenos, esteroides cumarinas e taninos. Apenas em relação a pesquisa de alcaloides o resultado foi divergente.

Na investigação preliminar de *Maytenus robusta* foi observada a presença de alcaloides, esteroides e flavonoides e resultado negativo na pesquisa de compostos cumarínicos (Krogh, 1996). Os resultados corroboram com os achados do presente estudo embora sejam espécies diferentes.

Os compostos bioativos são os responsáveis pelas atividades biológicas (Yang *et al.*, 2018). A presença desses bioativos bem como a quantidade está relacionada com a variação em relação ao tipo de solo, sazonalidade, condições de cultivo, clima, veículo extrator (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

No gênero *Monteverdia* a presença de compostos fenólicos, particularmente flavonoides, glicosídeos, terpenos, esteroides e alcaloides são descritos como os possíveis responsáveis pelas atividades biológicas (Niero; Andrade; Cechinel Filho, 2011). Na literatura há relatos de diversas atividades biológicas atribuídas aos alcaloides, dentre tantas, destacam-se atividade antibacteriana (Ettfagh *et al.*, 2011; Yohannes *et al.*, 2018), atividade antifúngica (Cretton *et al.*, 2016; Yohannes *et al.*, 2018), atividade antiviral (Bhambhani; Kondhare; Giri, 2021).

Os terpenos por sua vez, possuem relatos na literatura de atividade antimicobacteriana (Kaemchantuek *et al.*, 2017), anti-inflamatória (Zhao *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2021), atividade contra Alzheimer (Yilmaz; Boga; Topçu, 2016), ação antiproliferativa (Xu *et al.*, 2015). Assim como os terpenos, os flavonoides também

apresentam diversas atividades biológicas, a exemplo de: atividade antifúngica (Souza-Moreira *et al.*, 2019), antioxidante (Benteldjoune *et al.*, 2021), capacidade antimutagênica (Okuno; Marumoto; Miyazawa, 2019), ação hepatoprotetora (He *et al.*, 2019) e leishmanicida (Rocha *et al.*, 2019).

Antunes *et al.*, (2020) em seus estudos, comparou a composição química das espécies *M. ilicifolia* Mart ex Reiss e *M. aquifolium* Mart em diferentes períodos ao longo do ano e evidenciou a presença de derivados da catequina, derivados de kaempferol e quercetina (Antunes *et al.*, 2020). Estes metabólitos pertencem a classe de flavonoides (grupo químico que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticarcinogênicas (Panche; Diwan; Chamdra, 2016).

Da mesma forma, os grupos químicos que dão origem aos taninos também apresentam atividades biológicas, como anti-inflamatória (Ebrahim *et al.*, 2022), antioxidante (Karamac, 2010), anti-hiperalgésico (Moreira *et al.*, 2013) hepatoprotetora (Sobeh *et al.*, 2018), imuno-modulatória (Kumari; Jain, 2012).

## 4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

### 4.7.1 Fracionamento

A partir do fracionamento dos extratos bruto etanólico de folhas e caules foram obtidas as frações FHF, FCF, FAEF, FRF, FHC, FCC, FAEC e FRC. Os rendimentos em gramas e em porcentagem são demonstrados na TABELA 11.

Do mesmo modo foram obtidas as frações provenientes do extrato bruto cetônico de folhas e caule de *M. evonymoides* denominadas: FHFC, FCFC, FAEFC, FRFC, FHCC, FCCC, FAECC e FRCC. Os rendimentos em gramas e em porcentagem também são demonstrados na TABELA 11.

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar na identificação das classes de metabólitos secundários que podem apresentar atividades nos testes biológicos. Além de facilitar a identificação, a possibilidade de isolamento destes metabólitos é muito maior desta forma, se comparada às tentativas baseadas apenas no extrato bruto.

TABELA 11 - RENDIMENTO\* DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICO E CETÔNICO DAS FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides*

Fração	Caule		Folhas	
	(g)	(%)	(g)	(%)
Fração Hexano Etanólico	1,273	0,062	16,448	0,948
Fração Clorofórmio etanólico	5,569	0,273	72,674	4,188
Fração Acetato Etila Etanólico	7,322	0,359	12,315	0,709
Fração Remanescente Etanólico	82,216	4,034	299,472	17,256
Fração Hexano Cetônico	4,679	0,616	21,065	2,496
Fração Clorofórmio Cetônico	6,605	0,869	2,215	0,262
Fração Acetato Etila Cetônico	1,034	0,136	2,467	0,292
Fração Remanescente Cetônico	6,117	0,805	1,739	0,206

FONTE: A autora (2021).

NOTA: \*Rendimento calculado em relação ao total de planta seca (g).

Os resultados dos rendimentos das frações hidroalcólicas (TABELA 11) foram calculados baseados no total de material vegetal seco descontando a quantidade de material seco reservado para as análises biológicas. Desta forma, calculou-se o rendimento das frações hidroalcólicas a partir de 1735,41 g de folhas e 2037,80 g de caule. Para os cálculos do rendimento do extrato cetônico foram consideradas os pesos totais inicial de folhas e caules (843,90 g e 760 g respectivamente), uma vez que não foi necessário separar material para análises biológicas.

De acordo com as observações em relação ao extrato hidroalcólico a fração com maior rendimento foi a fração remanescente de folhas (FRF) com 17,256%, seguida da fração remanescente de caule (FRC) com 4,034%, e a de menor rendimento foi a fração hexano de caule (FHC) com 0,062%, seguida da fração clorofórmio caule (FCC) com 0,273%. Em relação ao extrato cetônico a fração que apresentou melhor rendimento foi a fração hexano cetônico (FHCF) com 2,496%, seguida da fração clorofórmio de caule (FCCC) com 0,869%.

#### 4.7.2 Isolamento dos compostos de folhas de *M. evonymoides*

A partir da coluna cromatográfica da Fração Clorofórmio de Folhas (FCF) oriundos do extrato hidroalcólico, foram recolhidos 226 frascos com eluato com aproximadamente 12 mL que foram levados a secar em temperatura ambiente para evaporação do solvente e cristalização dos compostos. Foi observado cristalização

nos frascos de número 06, 07 e 09, referente a fase móvel hexano e acetato de etila. Após cristalização os frascos foram reunidos tendo em vista o mesmo perfil cromatográfico identificados por análise em CCD. Após a revelação com Vanilina Sulfúrica 1% observou-se presença de coloração rósea após aquecimento, sugerindo a presença de esteroides e triterpenos. Esta amostra foi denominada FCF02B. Em seguida a amostra foi submetida ao teste de solubilidade, preparada e enviada para análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificação da estrutura química.

Durante o processo de fracionamento da fração clorofórmio folhas cetônico (FCFC), formou-se um precipitado no fundo do balão do Soxhlet, que foi chamado de 1EBCCL. Após a finalização do fracionamento e resfriamento do aparelho o precipitado formado foi retirado com espátula e lavado com metanol, após sucessivas lavagens o recipiente contendo a amostra foi levado ao banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  para evaporação do solvente. Após a evaporação formou-se na parede do vidro um precipitado de coloração clara. Este foi submetido à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para determinação de grupos químicos. Após a revelação com Vanilina Sulfúrica 1% observou-se presença de duas manchas de coloração rósea após aquecimento, sugerindo a presença de triterpenos. A partir disso, os precipitados foram submetidos ao teste de solubilidade e em seguida enviado ao espectrômetro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificação das estruturas químicas. O mesmo ocorreu durante o processo de fracionamento da fração acetato de etila de folhas do extrato cetônico (FAEFC), nesta etapa o precipitado foi chamado de 2EBCAE, assim como a amostra 1EBCCL, o precipitado foi enviado ao espectrômetro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificação da estrutura química.

#### 4.7.3 Identificação estrutural da substância FCF02B

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) é um método analítico usado para determinar a estrutura molecular e a composição química de uma amostra. Dentre os núcleos que podem ser estudados por meio desta técnica, os mais comuns são os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein; Webster, 2000). Atua de forma a analisar a interação dos núcleos em rotação em um forte campo magnético. A energia absorvida induz uma transição nas rotações (spins) nucleares, o que é observado em um espectro de RMN (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein; Webster,

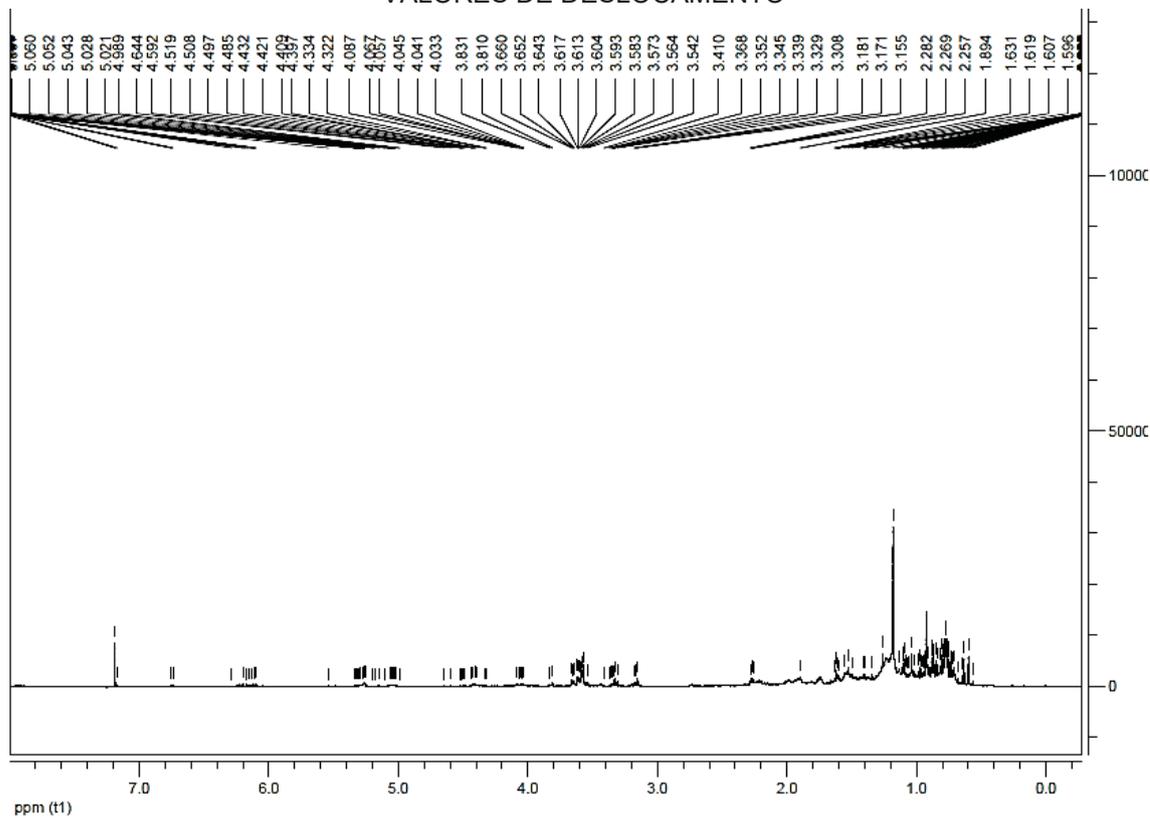
2000). A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, tanto de  $^1\text{H}$  quanto de  $^{13}\text{C}$  tem por finalidade indicar a disposição do esqueleto hidrocarbônico, ou seja, as diferentes situações de ambientes químicos dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein; Webster, 2000). Para auxiliar na identificação dos compostos químicos o espectro de RMN fornece informações que quando analisadas em conjunto favorece a identificação estrutural, são eles: deslocamento químico, acoplamento ou desdobramento. O deslocamento químico é uma medida (Hz) da distância entre o sinal medido e o sinal de referência, no deslocamento é possível identificar os grupos funcionais; o acoplamento, também chamado de desdobramento refere-se a um sinal de RMN  $^1\text{H}$  no qual ele desdobra-se em  $N+1$ , onde  $N$  é o número de prótons equivalentes ligados aos carbonos adjacentes, ou seja, ocorre quando diferentes tipos de prótons estão próximos entre si, gerando picos em um mesmo sinal, dessa forma, são nomeados conforme a quantidade de picos (singlete, dublete, triplete e podem ser identificados por meio da análise da constante de acoplamento ( $J$ )) (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein; Webster, 2000).

Associado ao RMN pode ser utilizado o DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfer*). Nesta técnica a amostra é irradiada com uma sequência complexa de pulsos nos canais  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . O resultado dessas sequências de pulsos permite a visualização de fases diferentes, de acordo com o número de hidrogênios ligados a cada carbono. Podem-se detectar essas diferenças, e é possível esquematizar os espectros produzidos em cada experimento (Pavia *et al.*, 2010). Existe o DEPT  $45^\circ$ , DEPT  $90^\circ$  e o mais utilizado DEPT  $135^\circ$ . No DEPT  $45^\circ$  é possível identificar os carbonos protonados; no DEPT  $90^\circ$  é possível identificar o CH; No DEPT  $135^\circ$  é possível identificar os CH e  $\text{CH}_3$  acima do plano e  $\text{CH}_2$  abaixo do plano (Pavia *et al.*, 2010).

Devido a regularidade nos deslocamentos químicos das metilas angulares C18 e C19, particular dos esteroides, a técnica RMN permite a elucidação estrutural. É possível observar o hidrogênio carbinólico ligado ao C3, que apresenta um multiplete nos esteroides, mais um duplo duplete em triterpenos devido à presença das duas metilas ligadas ao C4, além disso, identificar os diferentes hidrogênios e carbonos que participam de duplas ligações com diferentes graus de substituição em distintas posições da molécula através da determinação de constantes de acoplamento (Queiroz, 2009).

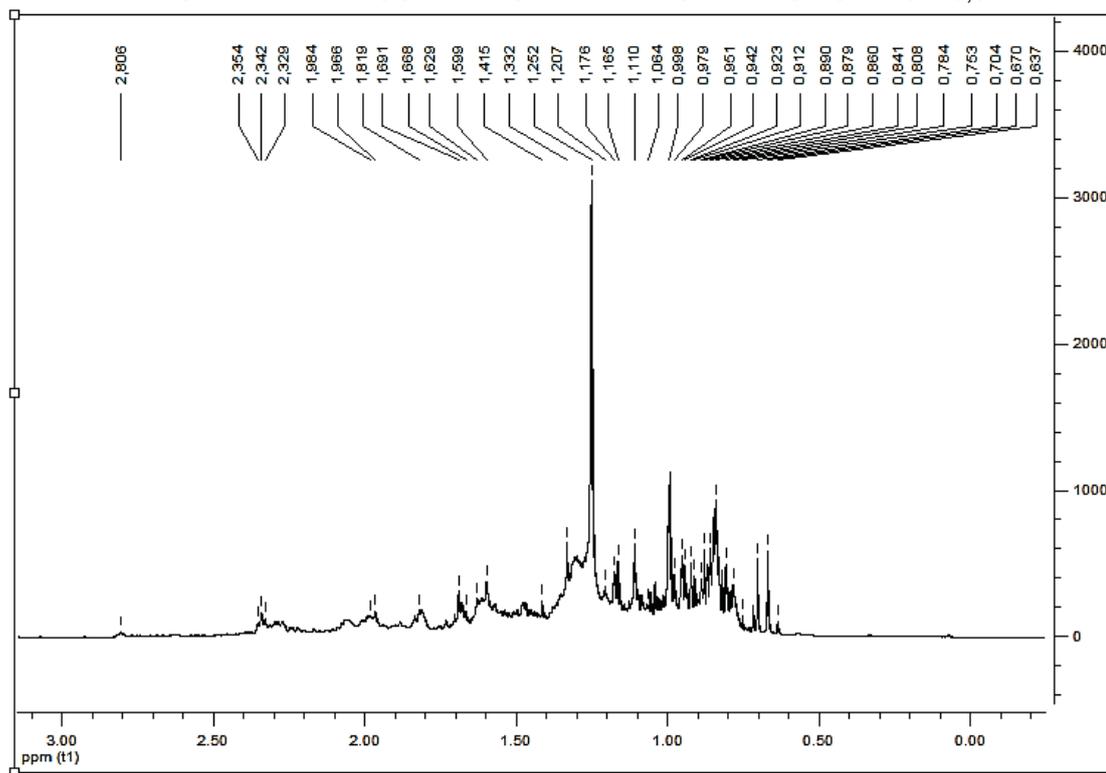
A identificação da substância FCF02B foi realizada através do espectro obtido por RMN (ressonância magnética nuclear) de  $^1\text{H}$  (200,13MHz) representados nas FIGURAS 27, 28 e 29.

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200,13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM OS VALORES DE DESLOCAMENTO



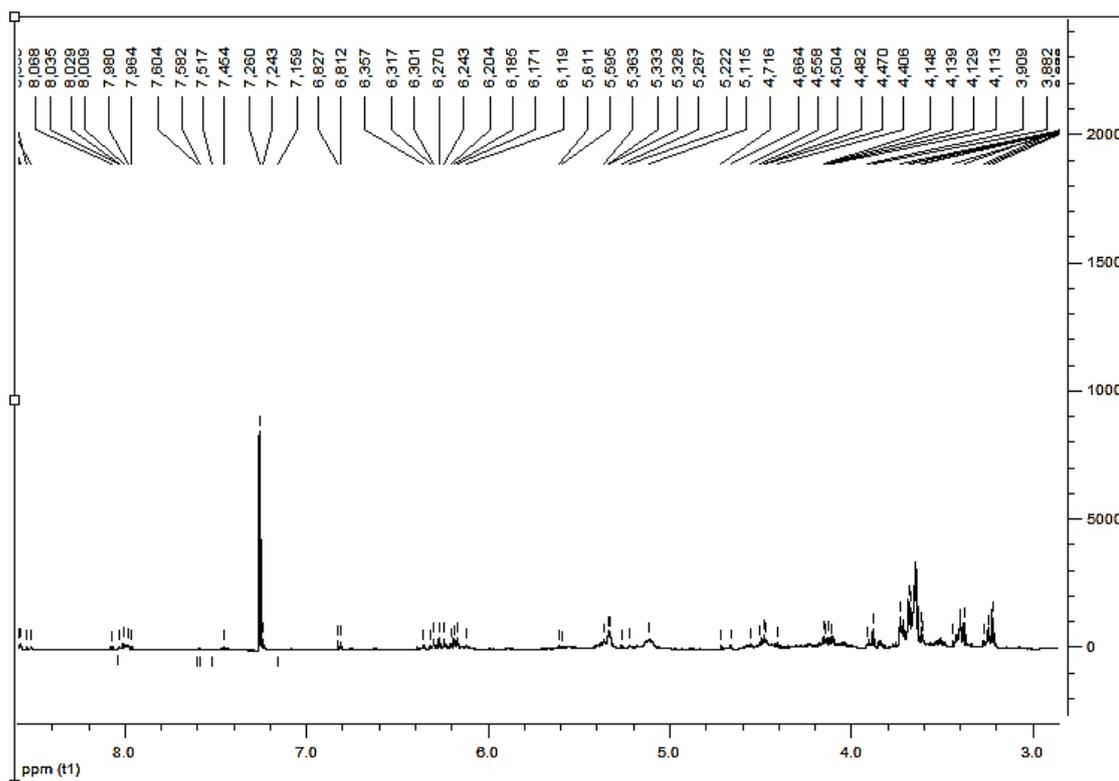
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200, 13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM VALORES DE DESLOCAMENTO EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0 A 3,0  $\delta$



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200, 13MHz) DA SUBTÂNCIA FCF02B COM VALORES DE DESLOCAMENTO EXPANDIDO NA REGIÃO DE 3,0 A 8,0  $\delta$

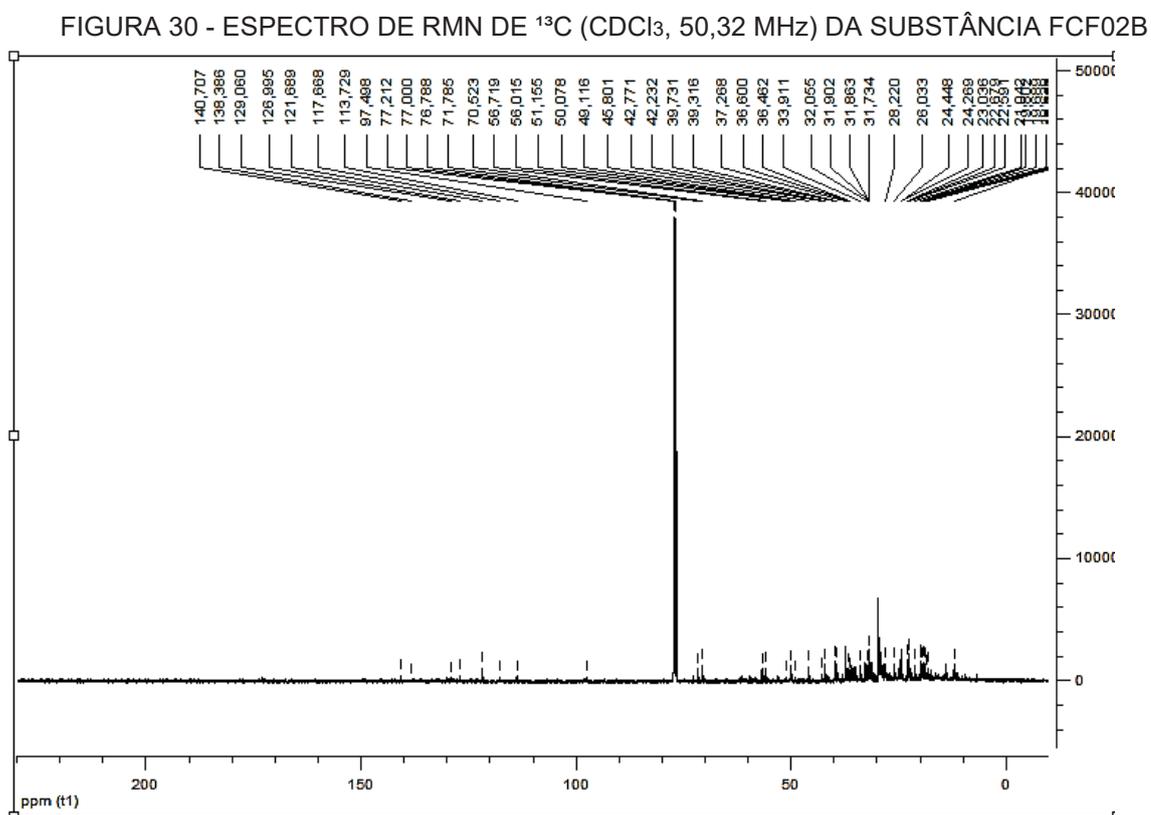


FONTE: A autora (2022).

Uma característica intrínseca dos principais esteroides é apresentar o mesmo núcleo básico proveniente da biossíntese. O espectro de RMN tanto de  $^1\text{H}$  quanto de  $^{13}\text{C}$  apresenta sinais característicos atribuídos ao carbono carbinólico (C3), às metilas angulares e aos carbonos da dupla ligação em C5–C6 (Queiroz, 2009). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é observado um multiplete próximo a  $\delta$  3,5 (este refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico 3). Os sinais entre  $\delta$  5,1 e  $\delta$  5,3 são referentes as ligações duplas e uma grande quantidade de sinais em campo alto devido à sua cadeia hidrocarbonada. Estes sinais indicam a presença do  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -ethylcholesterol) (Abdelnur, 2006).

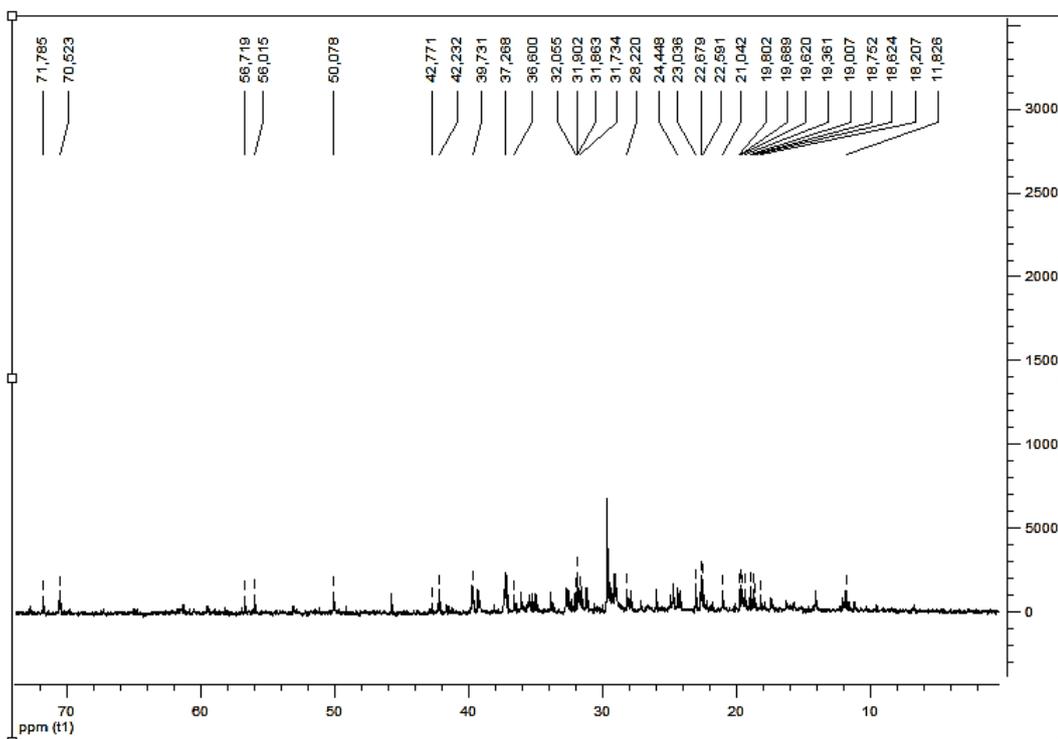
No espectro de  $^1\text{H}$  foi possível observar ainda dois duplo dubletos, em  $\delta$  5,05, com  $J = 15,1$  Hz e  $J = 8,1$  Hz, referente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 23; e em  $\delta$  5,11, com  $J = 15,4$  Hz e  $J = 8,0$  Hz, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 22 apontando a presença do estigmasterol ( $\Delta$ 22, 24 $\alpha$ -ethylcholesterol).

Além dos espectros de  $^1\text{H}$ , foram obtidos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz) representados nas FIGURAS 30 e 31 e DEPT 135 $^\circ$  (FIGURA 32).



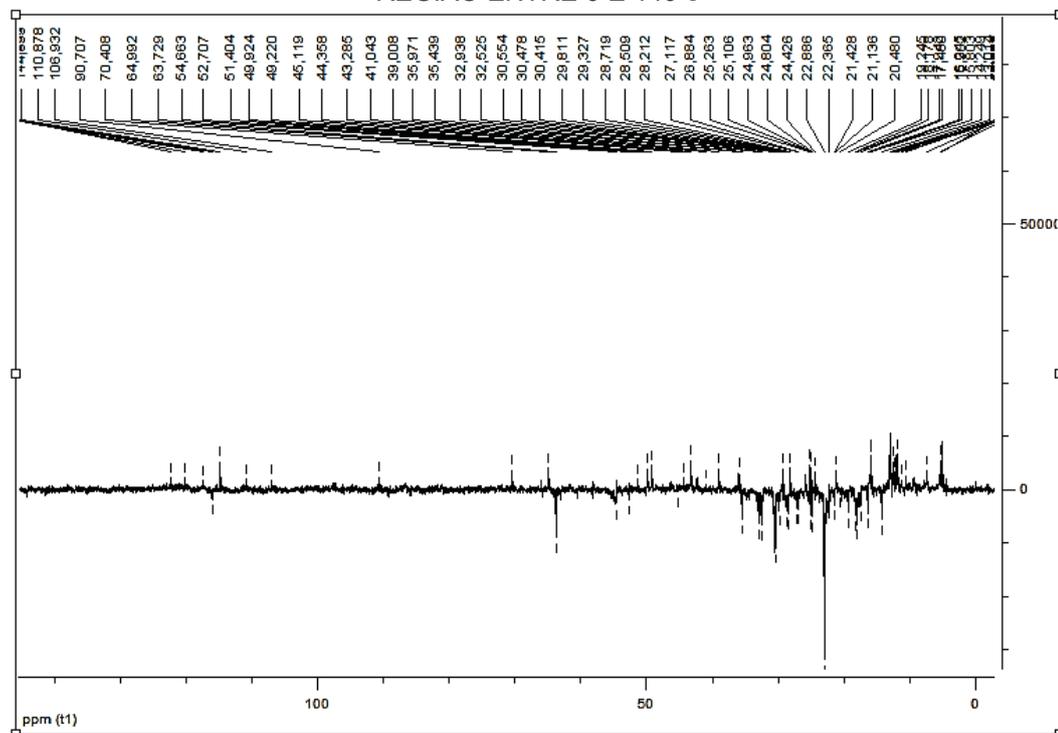
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA FCF02B EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0 A 70  $\delta$



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DEPT  $^{135}\alpha$  SUBSTÂNCIA FCF02B EXPANDIDO NA REGIÃO ENTRE 0 E 140  $\delta$



FONTE: A autora (2022).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 30 e 31) foi possível observar um sinal em  $\delta$ 71,79 referentes ao carbono carbinólico da posição 3; dois sinais em  $\delta$  140,73 e  $\delta$  121,7 correspondentes aos carbonos 5 e 6, respectivamente; e dois sinais em  $\delta$  129,2 e  $\delta$  138,3 referentes aos carbonos 23 e 22, respectivamente. Estes sinais revelam a presença do Estigmasterol. Foi evidenciado os sinais  $\delta$  29,7 e  $\delta$  39,7 referentes aos carbonos 23 e 22 respectivamente, referentes ao composto  $\beta$ -sitosterol. Da mesma forma, foi observado os sinais  $\delta$  26,2 e  $\delta$  34,0 correspondentes aos carbonos 23 e 22 respectivamente, este sugerindo a presença do Campesterol (24 $\alpha$ -methylcholesterol) (Abdelnur, 2006).

Os fitoesteroides apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, o que dificulta a sua separação, por esse motivo são encontrados em mistura. Os mais comuns são  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Pinto *et al.*, 1994). Na TABELA 12 estão apresentados os deslocamentos químicos da mistura de esteroides identificados na amostra FCF02B, os quais possuem valores muito próximos da literatura, tornando possível a identificação.

TABELA 12 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $^{\circ}$ ) DE RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DOS ESTEROIDES CAMPESTEROL, ESTIGMASTEROL E  $\beta$ -SITOSTEROL

(Continua)

C	CAMPESTEROL		ESTIGMASTEROL		$\beta$ -SITOSTEROL	
	FCF02B	Literatura	FCF02B	literatura	FCF02B	literatura
1	37,3 (CH <sub>2</sub> )	37,1	37,3 (CH <sub>2</sub> )	37,6	37,3 (CH <sub>2</sub> )	37,3
2	31,7 (CH <sub>2</sub> )	31,57	31,7 (CH <sub>2</sub> )	31,9	31,7 (CH <sub>2</sub> )	31,6
3	71,8 (CH)	71,69	71,8 (CH)	72,0	71,8 (CH)	71,8
4	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,25	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,5	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3
5	<b>140,8 (C)</b>	<b>140,76</b>	<b>140,8 (C)</b>	<b>140,8</b>	<b>140,8 (C)</b>	140,8
6	<b>121,7 (CH)</b>	<b>121,59</b>	<b>121,7 (CH)</b>	<b>121,8</b>	<b>121,7 (CH)</b>	121,7
7	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,92	31,9 (CH <sub>2</sub> )	32,1	31,9 (CH <sub>2</sub> )	32,1
8	31,9 (CH)	31,92	31,9 (CH)	32,2	31,9 (CH)	32,1
9	50,2 (CH)	50,17	50,2 (CH)	50,5	50,2 (CH)	50,2
10	36,5 (C)	36,51	36,5 (C)	36,5	36,5 (C)	36,5
11	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,11	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,2	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,1
12	39,8 (CH <sub>2</sub> )	39,81	39,8 (CH <sub>2</sub> )	40,0	39,8 (CH <sub>2</sub> )	39,8
13	42,3 (C)	42,33	42,3 (C)	42,2	42,3 (C)	42,3
14	56,8 (CH)	56,79	56,8 (CH)	57,1	56,8 (CH)	56,8

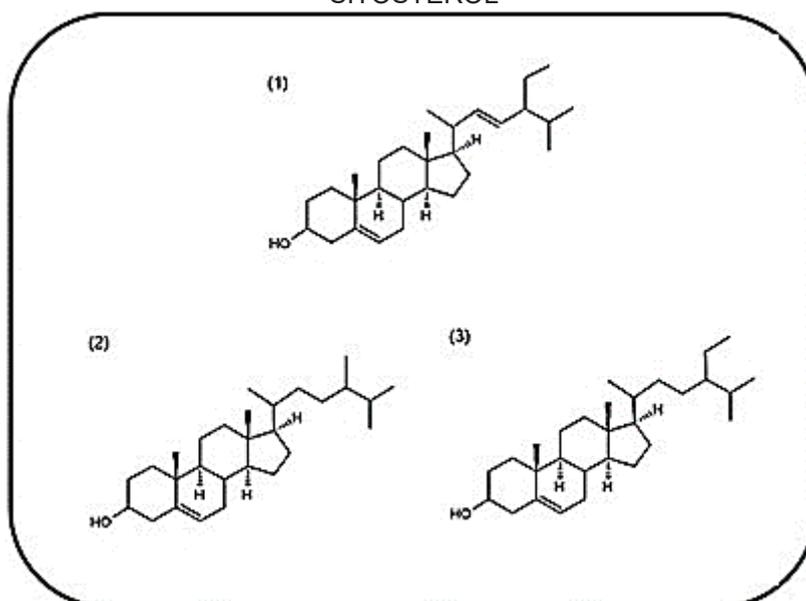
15	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,32	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,5	24,3 (CH <sub>2</sub> )	(Conclusão) 24,3
16	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,26	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,9	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,3
17	56,1 (CH)	56,11	56,1 (CH)	56,3	56,1 (CH)	56,1
18	11,9 (CH <sub>3</sub> )	11,87	11,9 (CH <sub>3</sub> )	12,2	11,9 (CH <sub>3</sub> )	12,0
19	19,4 (CH <sub>3</sub> )	19,40	19,4 (CH <sub>3</sub> )	19,5	19,4 (CH <sub>3</sub> )	19,1
20	36,2 (CH)	36,17	39,8 (CH)	40,4	36,2 (CH)	36,2
21	19,1 (CH <sub>3</sub> )	18,82	21,1 (CH <sub>3</sub> )	21,4	18,8 (CH <sub>3</sub> )	18,8
<b>22</b>	<b>34,0 (CH<sub>2</sub>)</b>	<b>33,95</b>	<b>138,3 (CH)</b>	<b>138,3</b>	<b>31,9 (CH<sub>2</sub>)</b>	34,0
<b>23</b>	<b>26,2 (CH<sub>2</sub>)</b>	<b>26,13</b>	<b>129,3 (CH)</b>	<b>129,7</b>	<b>29,7 (CH<sub>2</sub>)</b>	26,2
<b>24</b>	<b>45,9 (CH)</b>	<b>45,85</b>	<b>51,2 (CH)</b>	<b>51,5</b>	<b>39,7 (CH)</b>	45,2
25	29,2 (CH)	29,18	31,9 (CH)	32,2	31,7 (CH)	29,2
26	18,8 (CH <sub>2</sub> )	19,84	19,0 (CH <sub>3</sub> )	21,2	21,1 (CH <sub>3</sub> )	18,9
27	19,1 (CH <sub>3</sub> )	19,07	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,2	19,8 (CH <sub>3</sub> )	19,1
28	23,1 (CH <sub>3</sub> )	23,09	26,2 (CH <sub>2</sub> )	25,4	18,8 (CH <sub>2</sub> )	23,1
29			12,0 (CH <sub>3</sub> )	12,2	12,2 (CH <sub>3</sub> )	11,9

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Queiroz (2009). CDCl<sub>3</sub> (clorofórmio deuterado). Valores são dados em ppm relativos ao sinal do TMS como padrão interno.

A FIGURA 33 ilustra a estrutura química dos esteroides campesterol, estigmasterol e  $\beta$ - sitosterol.

FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DE CAMPESTEROL, ESTIGMASTEROL E  $\beta$ -SITOSTEROL

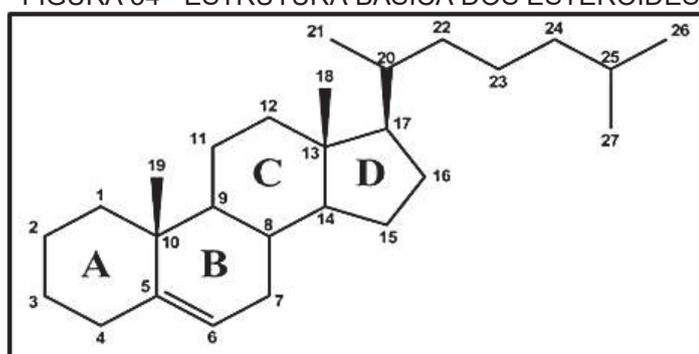


FONTE: A autora (2022).

NOTA: (1) Estigmasterol; (2) Campesterol; (3)  $\beta$ - Sitosterol.

Os fitoestereóides campesterol (24 $\alpha$ -methylcholesterol), estigmasterol ( $\Delta$ 22, 24 $\alpha$ -ethylcholesterol) e  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -ethylcholesterol) são comumente encontrados em plantas superiores (Kongduang; Wungsintaweekul; De-Eknamkul, 2008). São triterpenoides modificados contendo o sistema tetracíclico do ciclopentanoperidrofenantreno (anéis A, B, C e D apresentados na FIGURA 34) e seguem a orientação *trans*, sendo A-B, B-C e C-D. Na maior parte das vezes apresenta insaturação em C5. O núcleo esteroidal ostenta sete centros estereogênicos, dos quais muitos estereoisômeros não são possíveis por conta das limitações estéricas. Geralmente a hidroxila C3 é  $\beta$  orientada (Queiroz, 2009).

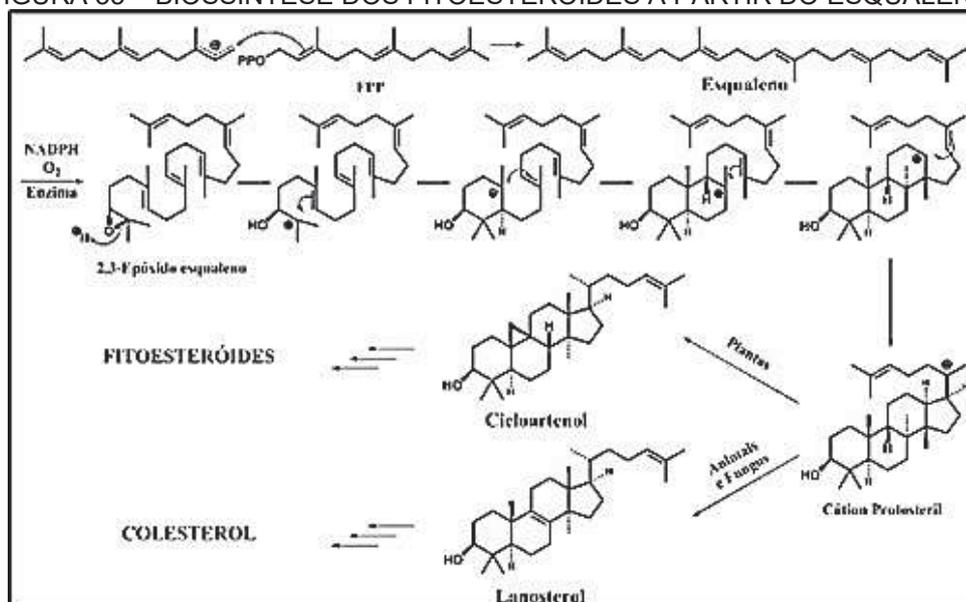
FIGURA 34 - ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES



FONTE: Adaptado de Queiroz (2009)

Sua formação se dá em decorrência da derivação do cicloartenol sem as metilas no carbono 4 e carbono 14 (FIGURA 35).

FIGURA 35 – BIOSÍNTESE DOS FITOESTEROIDES A PARTIR DO ESQUALENO



FONTE: Adaptado de Queiroz (2009)

A cadeia lateral e o padrão de ligação do anel esteroide é o que diferencia os fitosteroides. A hidrogenação dos fitosteróis forma fitosteróis saturados, tais como o campestanol e o sitostanol, denominados estanóis (Martins *et al.*, 2004). Os fitosteróis. Tem um importante papel, no organismo humano, pois são responsáveis pela diminuição da absorção de colesterol no intestino delgado. A semelhança na estrutura química com o colesterol, através de um mecanismo de competição permite o aumento na excreção fecal do colesterol (Wu *et al.*, 2014). Os fitosteróis saturados atuam com maior eficiência na absorção do colesterol do que os fitosteróis insaturados como o  $\beta$ -sitosterol (Martins *et al.*, 2004).

Estes fitosteróides foram isolados em outras espécies do gênero a exemplo de  $\beta$ -sitosterol que foi isolado pela primeira vez na espécie *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Facundo *et al.*, 2015). O sitosterol também foi encontrado em *M. distichophylla* assim como seu derivado glicosilado  $\beta$ -glucosil- $\beta$ -sitosterol (Ferreira *et al.*, 2017). Valladão *et al.* (2009) em seus estudos também identificou a substância  $\beta$ -sitosterol na espécie *M. salicifolia*, entre outras substâncias.

Ma *et al.* (2010), em seus estudos com microrganismos endófitos residentes em *Maytenus hookeri* buscou novos metabólitos secundários biologicamente ativos. Dentre os nove compostos isolados os compostos ergosta-7,24(28)-dien-3-ol e ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-ol foram identificados pela primeira vez. Os microrganismos endófitos são bactérias ou fungos que vivem nos espaços intercelulares dos tecidos das plantas hospedeiras sem causar manifestação discernível de doença e são reconhecidos como importantes fontes de uma variedade de metabólitos secundários estruturalmente novos e biologicamente ativos, incluindo terpenoides, esteroides, alcaloides e derivados de isocumarina (Ma *et al.*, 2010).

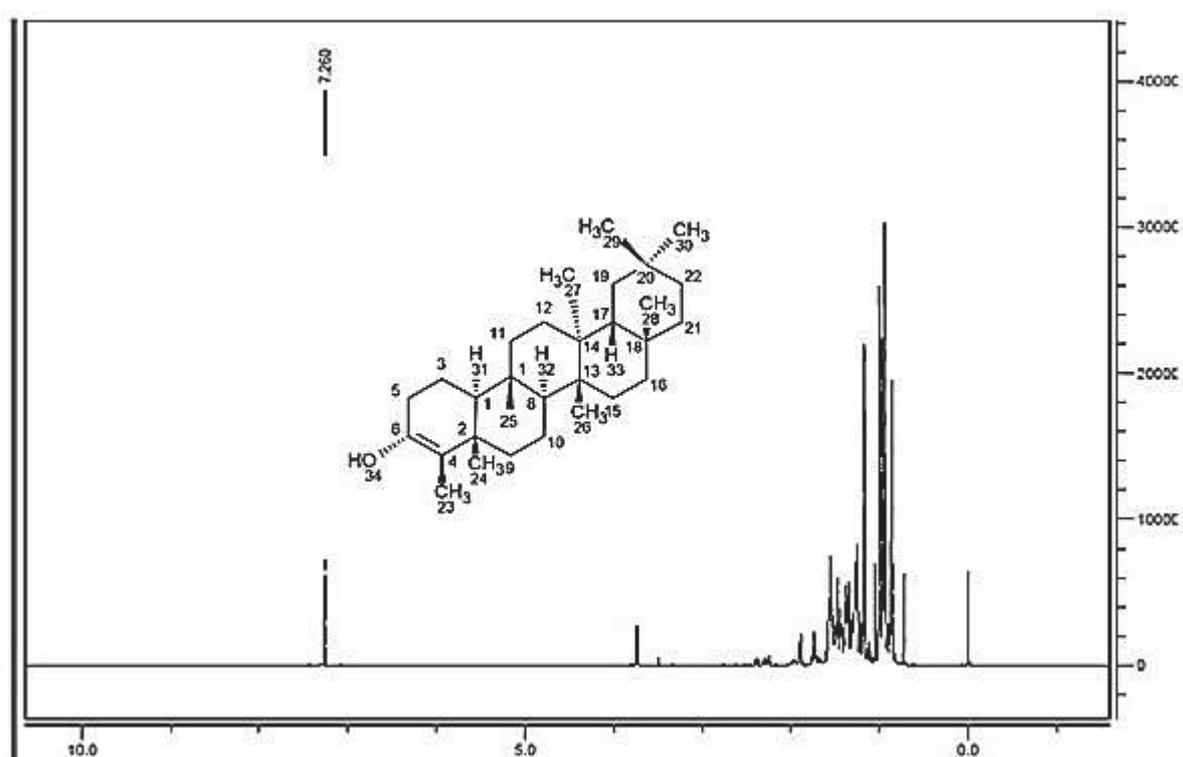
#### 4.7.4 Identificação estrutural da substância 1EBCCL e 2EBCAE

A identificação da substância 1EBCCL foi realizada através do espectro obtido por RMN (ressonância magnética nuclear) de  $^1\text{H}$  (200,13MHz) representados nas FIGURAS 36 e 37.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou sinais referentes a grupos metílicos, metilênicos e metínicos. Foi observado multipletto em  $\delta$  2,32 atribuído ao hidrogênio  $\alpha$

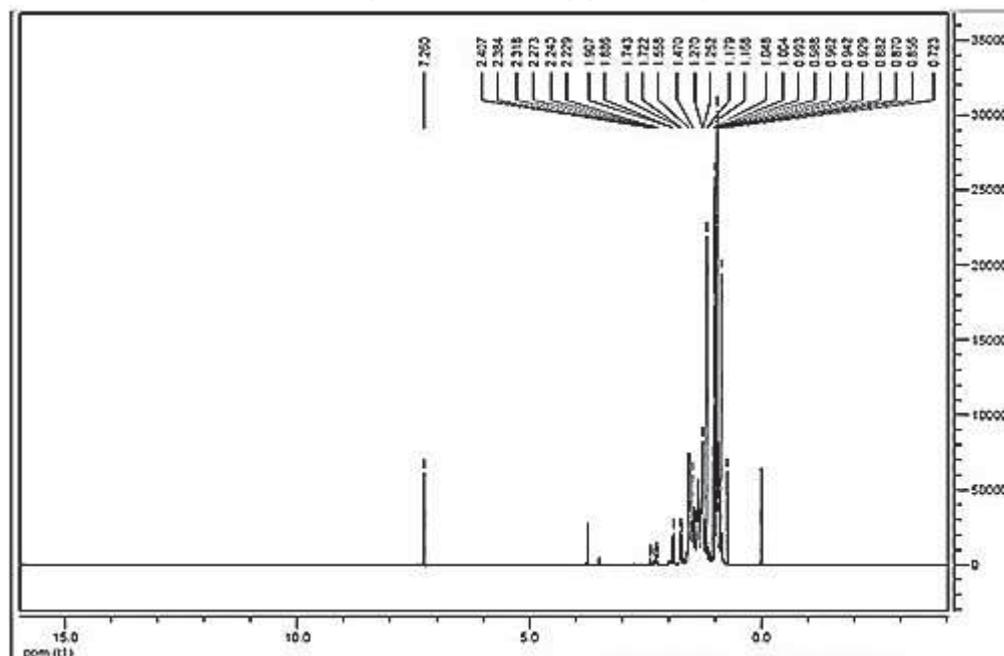
carbonílico H-2, sete simpletos em  $\delta$  0,72; 0,87; 0,95; 1,00; 1,05; 1,16; 1,25 atribuídos aos hidrogênios metílicos dos carbonos C-24, C-25, C-29, C-30, C-26, C-27, C-28, respectivamente, e um duplete em  $\delta$  1,00 ( $J=6,6$  Hz) atribuído aos hidrogênios da Me-23 (metila secundária). O espectro ainda apresentou sinais entre 1,25 a 1,76, indicando a presença exclusiva de hidrogênio ligado a carbono  $sp^3$  na molécula, além de um multiplete entre 2,20 a 2,45 indicando a presença de três hidrogênios  $\alpha$ -carbonílicos.

FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200,13MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCCCL



FONTE: A autora (2022).

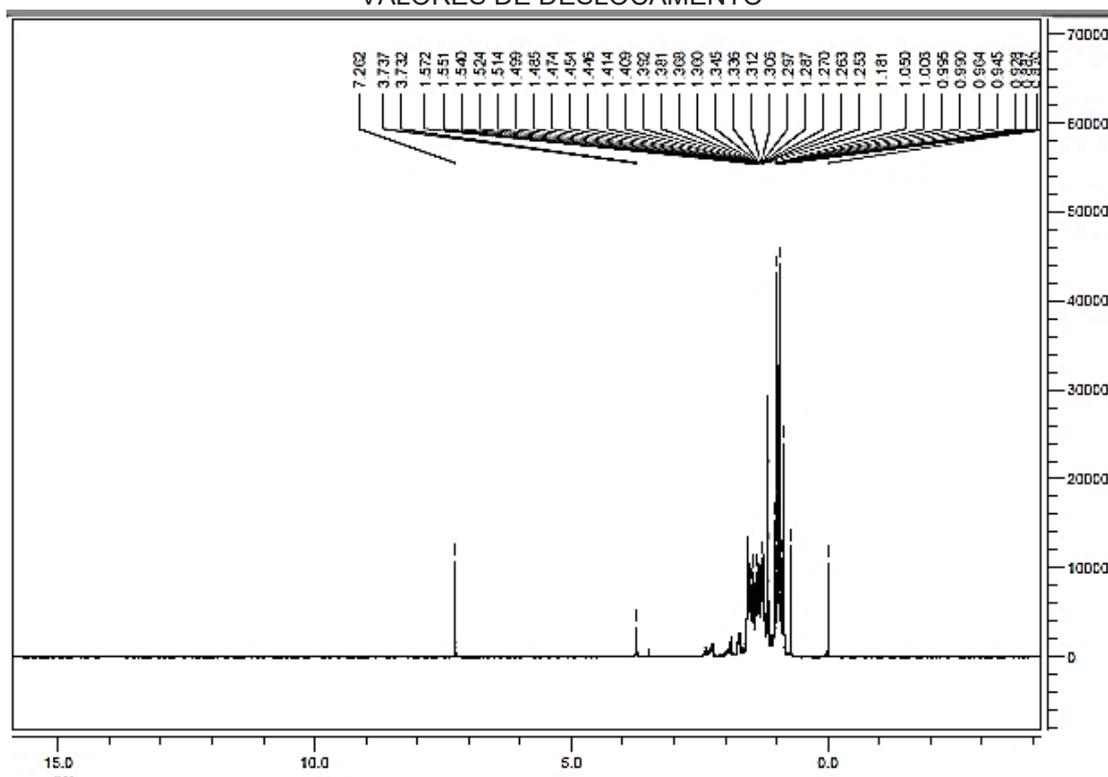
FIGURA 37 – ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200, 13MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCL COM VALORES DE DESLOCAMENTO



FONTE: A autora (2022).

A identificação da substância 2EBCAE foi realizada através do espectro obtido por RMN (ressonância magnética nuclear) de  $^1\text{H}$  (200,13MHz) representados nas FIGURA 38.

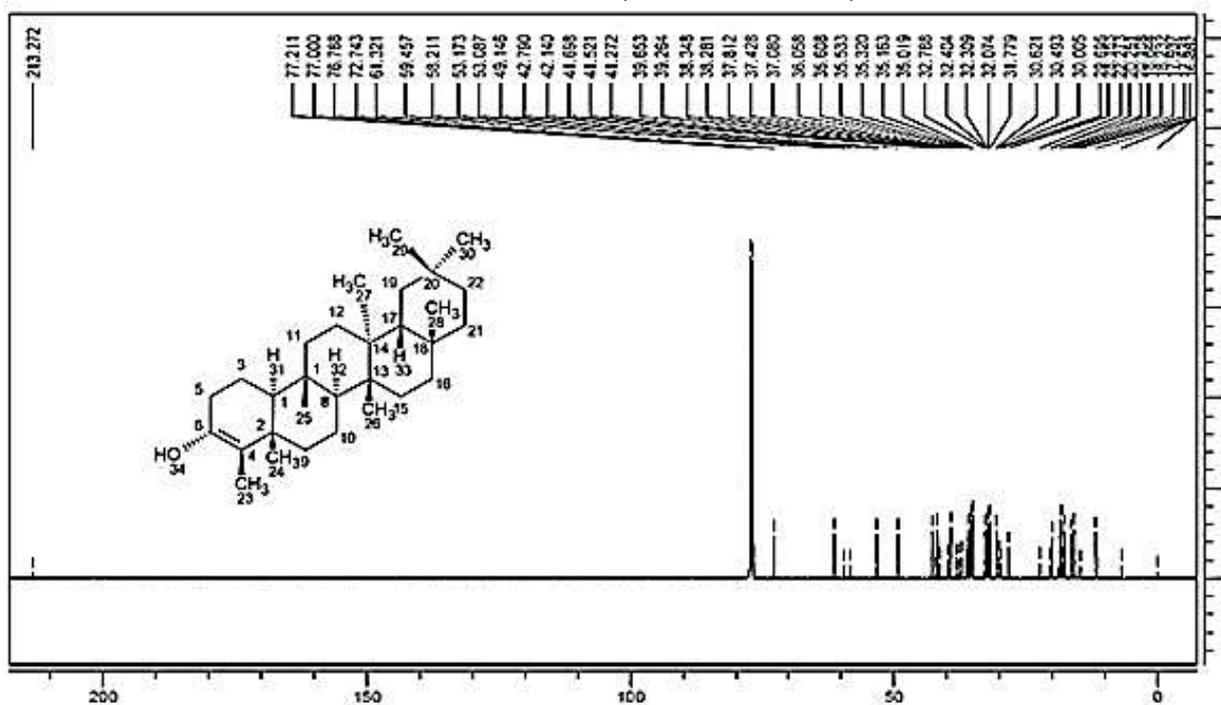
FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200, 13MHz) DA SUBTÂNCIA 2EBCAE COM VALORES DE DESLOCAMENTO



FONTE: A autora (2022).

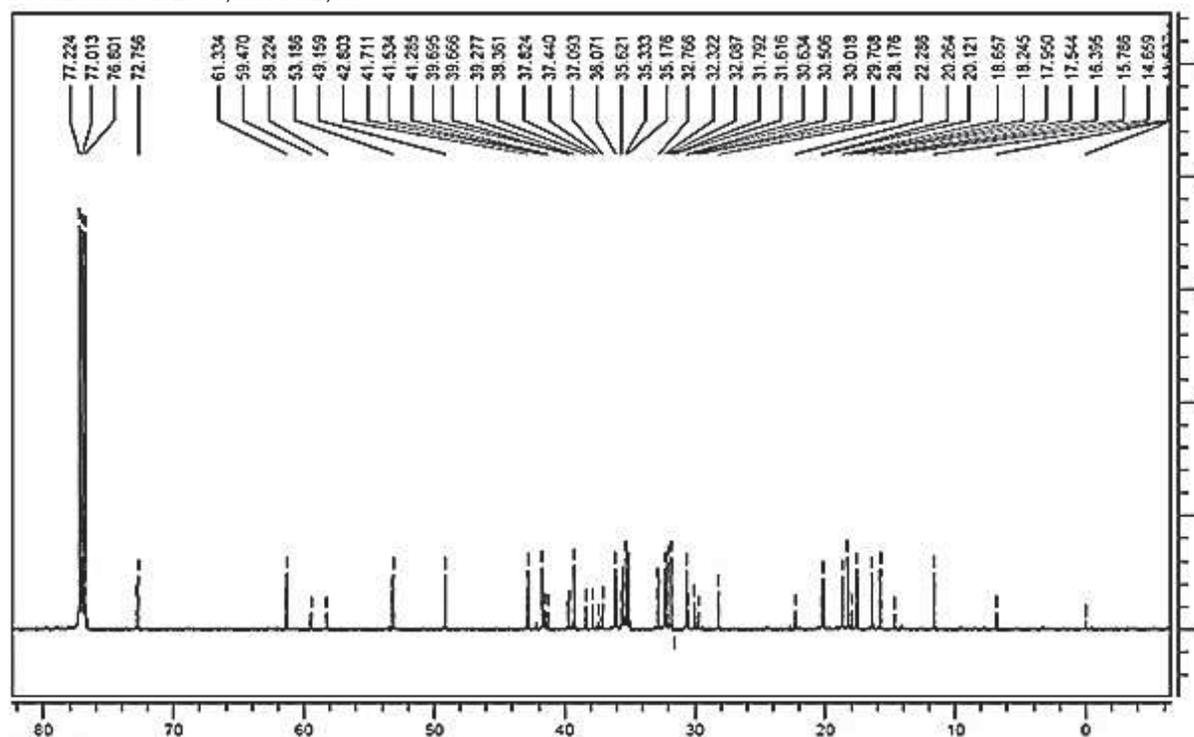
Além dos espectros de  $^1\text{H}$ , foram obtidos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz) representados nas FIGURAS 39 e 40.

FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50,32 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL



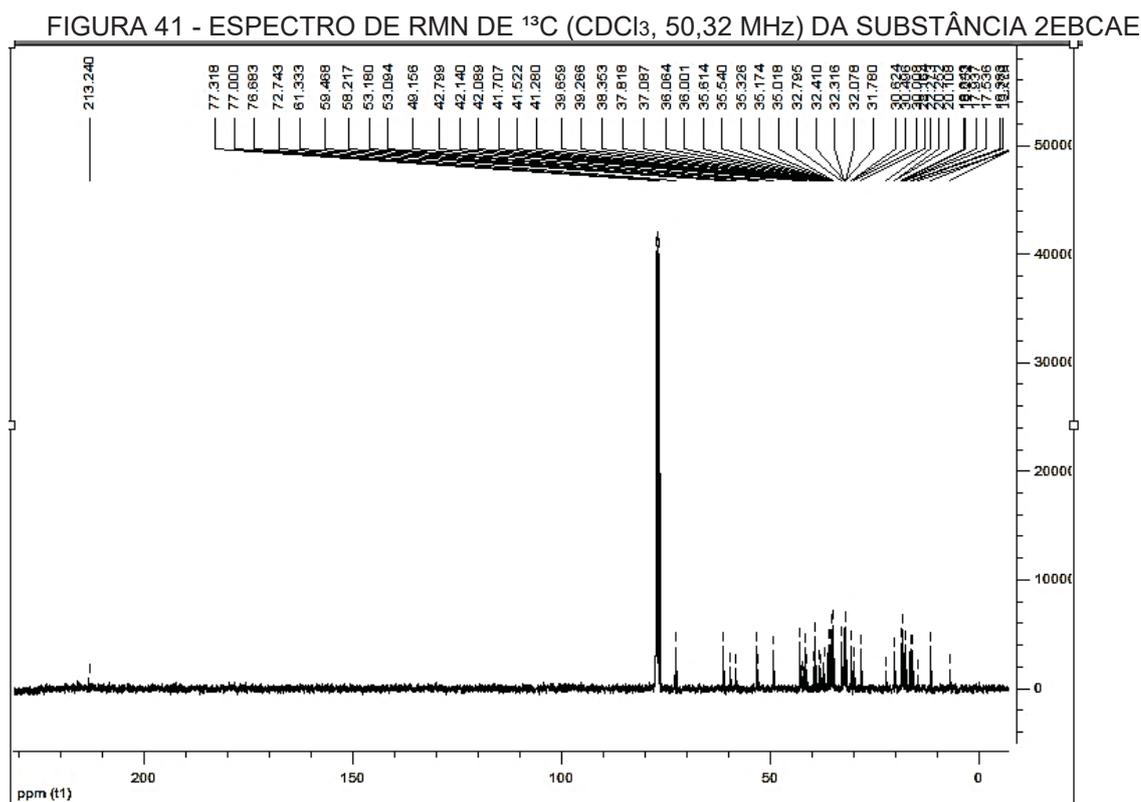
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL EXPANDIDO NA REGIÃO DE 14,65 A 72,75



FONTE: A autora (2022).

A FIGURA 41 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50,32 MHz) com os respectivos deslocamentos da amostra 2EBCAE. Ao se comparar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , bem como os deslocamentos de 1EBCCCL e 2EBCAE é possível observar que se trata do mesmo composto químico.



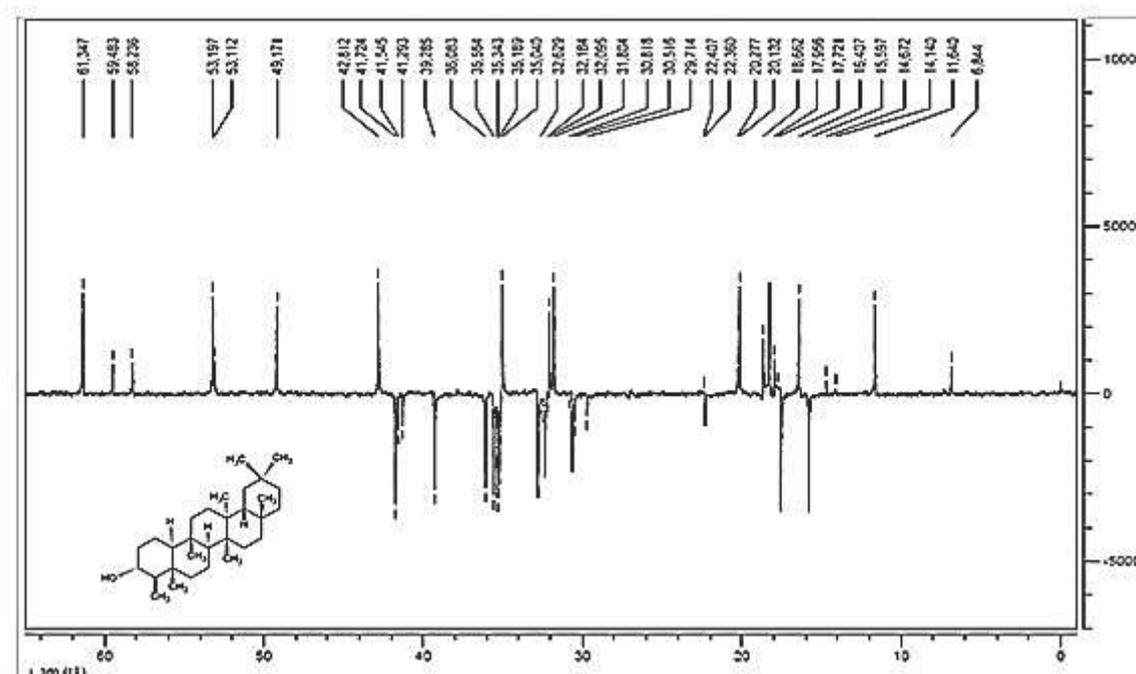
FONTE: A autora (2022).

A partir do RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (FIGURA 42) foi possível identificar na região inferior a  $\delta$  70 concentrada presença de carbonos  $\text{sp}^3$ , dentre eles identificou-se oito carbonos primários ( $\text{CH}_3$ ), onze carbonos secundários ( $\text{CH}_2$ ), quatro carbonos terciários ( $\text{CH}$ ), e sete carbonos quaternários. Destaca-se ainda a presença de sinal em  $\delta$  213,28 referente ao carbono carbonílico. A presença de sinal em  $\delta$  6,84 atribuído a um grupo metílico bastante protegido pelo efeito gama da carbonila em C-2, somados aos 28 carbonos restantes por comparação com a literatura corroboram a atribuição da estrutura química da friedelina (Mahato; Jundi, 1994; Carvalho *et al.*, 1998).

A presença do sinal  $\delta$  72,75 indica um carbono carbonílico e a presença de sinal em  $\delta$  11,6 é atribuído a um grupo metílico bastante protegido pelo efeito gama da carbonila em C-2, somados aos 28 carbonos restantes por comparação com a

literatura indicam o esqueleto do friedelinol (Mahato; Jundi, 1994; Carvalho *et al.*, 1998).

FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN DEPT DA SUBSTÂNCIA 1EBCCL EXPANDIDO NA REGIÃO ENTRE 6,8 A 61,34



FONTE: A autora (2022).

A amostra encontra-se em mistura e a identificação dos compostos associados com dados da literatura (Aragão *et al.*, 1990) apresentados na TABELA 13, corroboram com as substâncias químicas friedelina e friedelinol, estruturas químicas pertencentes aos triterpenos pentacíclicos da série friedelano.

TABELA 13 – VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DE RMN  $^{13}\text{C}$  /DEPT PARA 1EBCCL E DADOS DA LITERATURA PARA FRIDELINA E FRIDELINOL

(Continua)

CARBONO	FRIDELINA		FRIDELINOL	
	1EBCCL	literatura	1EBCCL	literatura
1	22,4	21,9	15,5	15,5
2	39,6	41,0	32,0	32,0
3	213,28	214,5	72,75	72,1
4	58,22	57,7	49,15	48,9
5	41,5	41,7	37,8	37,6
6	39,6	40,8	41,2	41,5

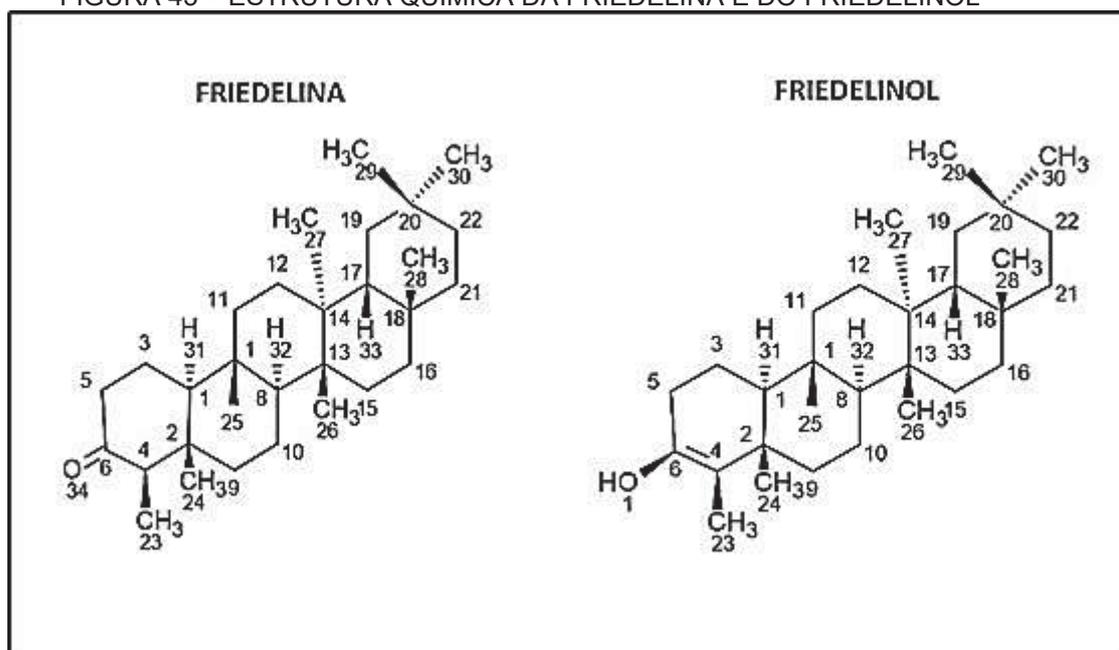
				(conclusão)
7	18,6	18,2	17,7	17,8
8	53,18	52,9	53,18	52,9
9	37,0	37,0	32,7	33,4
10	59,47	59,1	61,33	61,1
11	36,0	35,6	35,6	35,2
12	30,0	30,1	29,7	29,8
13	37,4	37,4	37,4	38,0
14	39,2	39,3	39,2	39,3
15	32,3	32,4	32,3	30,5
16	35,3	35,2	35,6	35,7
17	29,5	29,6	29,8	30,1
18	42,8	42,4	41,7	42,5
19	35,1	34,9	35,1	35,0
20	28,7	27,7	30,6	30,3
21	32,0	32,0	32,0	32,5
22	38,3	38,8	37,8	38,9
23	6,84	6,0	11,6	11,3
24	14,1	14,20	16,4	16,1
25	17,9	17,50	17,9	17,9
26	18,6	18,20	18,6	18,3
27	20,2	19,8	20,1	19,7
28	31,6	31,60	31,7	31,7
29	35,0	34,50	35,0	34,7
30	30,5	31,30	30,5	31,4

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Dados da literatura (Aragão *et al.*, 1990).

A FIGURA 43 ilustra a estrutura química da friedelina e friedelinol. A friedelina já foi isolada anteriormente em algumas espécies do Gênero *Monteverdia*, a exemplo de *M. salicifolia* (VALLADÃO *et al.*, 2009), *Maytenus erythroxylon* (Figueiredo, 2019), *Maytenus distichophylla* (Duarte, 2013; Ferreira *et al.*, 2017), *Maytenus gonoclada* (Silva *et al.*, 2011, 2013), *M. guianensis* (Facundo *et al.*, 2015).

FIGURA 43 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FRIEDELINA E DO FRIEDELINOL



FONTE: A autora (2022).

*Monteverdia* é conhecida pela grande diversidade de triterpenos do tipo friedelano e lupano presentes tanto nas folhas como nas raízes deste gênero. Os triterpenos friedelanos apresentam uma grande variedade de estruturas, seu esqueleto básico é derivado do ácido oleanólico no qual ocorre deslocamento das metilas para as posições C-4, C-5, C-9, C-14 e duas metilas geminadas em C-17 (Huang *et al.*, 2021). A literatura relata que os triterpenos friedelanos friedelan-3-ona, 1 $\alpha$ ,29-dihidroxifriedelan-3-ona apresentam atividade antimicrobiana e o friedelano 3,15-dioxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano isolado de *M. robusta* combateu úlceras induzidas em camundongos (Sousa *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2017).

Figueiredo (2019) isolou as substâncias 3 $\beta$ -hidroxi-friedelano; ácido-3,4 seco-friedelano-3-óico, entre outras e ainda isolou uma nova estrutura química: 29-norlupan-3,20-diona da espécie *Maytenus erythroxylon* (Figueiredo, 2019). Duarte (2013), assim como Figueiredo (2019) também isolou a estrutura 3 $\beta$ -hidroxi-friedelano (3 $\beta$ -friedelinol) e ainda isolou constituinte químico novo: a maytensifolona, porém estes, da espécie *Maytenus distichophylla* (Duarte, 2013). Da mesma forma, Ferreira *et al.* (2017) em seus estudos isolou e identificou compostos pertencentes a classe friedelano de folhas de *M. distichophylla*: 3-oxofriedelane, 3-hydroxyfriedelane, 3,24-dihydroxyfriedelane e 3-oxo-28,29-diidroxifriedelano (Ferreira *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2011) isolou 5 compostos conhecidos: 3-oxofriedelano, 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, 3-oxo-12 $\alpha$ -hidroxifriedelano, 3,11-dioxofriedelano, 3,16-

dioxofriedelano; e uma estrutura química nova: a 3-oxo-12 $\alpha$ ,29-di-hidroxifriedelano, da espécie *Maytenus gonoclada* (Silva *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2013) a partir das partes aéreas de *M. gonoclada*, em seus estudos identificou sete compostos da série friedelana: 3-oxofriedelana, 3c-hidroxifriedelana, 3,11-dioxofriedelana, 3,16-dioxofriedelana, 3-oxo-12b-hidroxifriedelana, 3-oxo-28-hidroxifriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (Silva *et al.*, 2013).

Valladão *et al.* (2009) em seus estudos com *M. salicifolia* também identificou a presença de friedelin, 3 $\beta$ -friedelanol, 3 $\alpha$ -friedelanol, além de outros compostos, em quatro coletas distintas, em períodos diferentes do ano, sugerindo dessa forma que a presença desses constituintes são semelhantes nas populações (Valladão *et al.*, 2009).

Duarte (2013) por sua vez, isolou sete triterpenos pertencentes a série friedelanica a partir das folhas de *Maytenus distichophylla*, sendo seis conhecidos na literatura, 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, 3-oxo-friedelano, 3-oxo-12 $\alpha$ -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-30 $\beta$ -hidroxifriedelano, 3, 12-oxo-friedelano e um relatado pela primeira vez, o 6 $\beta$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-friedelan-1en-3,16,2,1-triona (Duarte, 2013).

A investigação fitoquímica realizada com as cascas do caule de *M. guianensis* levou ao isolamento e identificação de nove triterpenos, dentre os quais quatro pertencem a classe dos friedelanos: friedelina, friedelinol, 16 $\beta$ -hidroxyfriedelina e 29-hidroxifriedelina (Facundo *et al.*, 2015). No estudo conduzido por Sousa (2016), com folhas e galhos de *M. Robusta*, o composto friedelina também estava presente (Souza, 2016). Amostras de *M. ilicifolia* coletadas em diferentes localidades e períodos do ano no estudo conduzido Mossi *et al.* (2010) evidenciou a presença de friedelina e friedelinol, além de outros compostos (Mossi *et al.*, 2010) corroborando com os achados do presente estudo.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A quantificação de fenólicos totais e flavonoides foram calculadas por meio de equações de regressão linear e expressos em mg equivalente de ácido gálico (mg.EAG/100mg) e mg equivalente de catequina (mg.CE/100mg) respectivamente e estão representados na TABELA 14.

TABELA 14 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides* A PARTIR DA CURVA DE EAG E CE.

Amostras	TPC (mg.EAG/100mg)	TFC (mg. CE/100mg)
EBF	653,40±13,09 <sup>a4</sup>	65,29±0,52 <sup>a4</sup>
FHF	301,84±7,25 <sup>a1</sup>	60,21±0,74 <sup>a1 a2</sup>
FCF	400,32±5,57 <sup>a2</sup>	60,58±0,64 <sup>a1 a2 a3</sup>
FAEF	601,20±11,44 <sup>a4</sup>	61,62±0,16 <sup>a2 a3</sup>
FRF	387,48±8,66 <sup>a2</sup>	58,79±0,21 <sup>a1</sup>
<b>EBC</b>	<b>935,58±9,74<sup>a5</sup></b>	<b>67,98±0,75<sup>a5</sup></b>
FHC	506,72±11,27 <sup>a3</sup>	60,67±0,67 <sup>a1 a2 a3</sup>
<b>FCC</b>	<b>933,87±11,28<sup>a5</sup></b>	62,46±0,62 <sup>a3</sup>
<b>FAEC</b>	<b>1553,16±8,28<sup>a6</sup></b>	<b>68,00±1,22<sup>a5</sup></b>
FRC	645,25±27,84 <sup>a4</sup>	61,51±0,53 <sup>a2 a3</sup>

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Resultados de teor de compostos fenólicos, teor de flavonoides expressos em: TPC: Teor de compostos fenólicos (mg.EAG/100mg); TFC: Teor de flavonoides (mg.CE/100mg); EBF: Extrato Bruto Folhas; FHF: Fração Hexano Folhas; FCF: Fração Clorofórmico Folhas; FAEF: Fração Acetato de Etila Folhas; FRF: Fração Residual Folhas; EBC: Extrato Bruto Caule; FHC: Fração Hexano Caule; FCC: Fração Clorofórmico Caule; FAEC: Fração Acetato de Etila Caule; FRC: Fração Residual Caule; GAE: ácido gálico equivalente; CE: catequina equivalente; Resultados expressos em média aritmética e ± Desvio padrão. Letras e números iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si à nível de 5% de significância pelo teste ANOVA post-hoc de Tukey.

Chew *et al.* (2011) realizou um estudo com extrato fresco de diversas espécies de plantas medicinais e propôs uma classificação para quantificação de fenóis totais. Consideram-se altas as concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG/g e média-alta de 50-30 mg.EAG/g, média-baixa 30-10 mg.EAG/g e baixo <10 mg.EAG/g (Chew *et al.*, 2011). De acordo com a classificação proposta por Chew *et al.* (2011) e realizando as devidas conversões de unidades, pode-se constatar que dentre todas as amostras testadas a FAEC apresentou a maior concentração de fenólicos totais (1553,16 ± 8,28 mg EAG/100mg), seguida da EBC e FCC (935,58 ± 9,74 e 933,87 ± 11,28 mg EAG/100mg), respectivamente. Na quantificação de flavonoides, a FAEC também apresentou a maior quantidade de flavonoides (68,00 ± 1,22 mg.CE/100mg), seguida do EBC (67,98 ± 0,75 mg.CE/100mg). Os resultados observados de compostos fenólicos e flavonoides apresentaram atividade alta, quando comparados aos padrões ácido gálico e catequina respectivamente seguindo a classificação proposta por Chew *et al.* (2011). Apresentou quantidade superior aos resultados encontrados por Soto-Maldonado *et al.* (2022) que na quantificação de compostos fenólicos e flavonoides

conduzida com extrato etanólico de folhas de *M. boaria*, os autores relataram 0,021 mg.EAG/g e 0,024 mg.EQ/g respectivamente (Soto-Maldonado *et al.*, 2022).

Yariwake *et al.* (2005) comparou o teor de fenólicos e flavonoides totais de *M. ilicifolia* de acordo com a variabilidade sazonal da espécie e observou que as amostras variaram entre  $21,96 \pm 0,28$  e  $45,92 \pm 3,14$  mg equivalente de ácido tânico/g para fenólicos totais e variaram entre  $1,35 \pm 0,04$  e  $3,86 \pm 0,03$  em  $\mu\text{mol}$  de flavonoides por g de folha seca pelo método de CLAE, indicando que o período de coleta da amostra influencia na quantidade de compostos fenólicos (Yariwake *et al.*, 2005).

Nos estudos conduzidos com folhas de *M. aquifolium*, *M. ilicifolia*, *M. dasyclada* no qual os resultados foram  $24 \pm 0,96$ ,  $50 \pm 1,42$  e  $22 \pm 1,03$  mg EAG/g, respectivamente (Cansian *et al.*, 2015), observa-se que a concentração encontrada no presente estudo foi superior. Embora essas espécies façam parte do mesmo gênero, vale ressaltar que o confronto dos resultados encontrados no presente estudo se torna difícil, em virtude dos diferentes métodos de extração, parte da planta doseada, além de diferentes formas de expressão dos resultados. Apesar dessas diferenças, verifica-se que folhas e caules de *M. evonymoides* apresenta potencial antioxidante e são capazes de interagir e inibir ou retardar o início ou propagação de reações provocadas pelos radicais livres uma vez que as plantas são fonte natural de compostos antioxidantes.

Dentre os compostos que fazem parte do metabolismo secundário, os compostos fenólicos são os que mais ocorrem no reino vegetal. Fazem parte deste grupo ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, estilbenos, fenóis simples, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Quanto as suas funções, destacam-se: atração de polinizadores, contribuição na pigmentação, proteção contra raios UV, ação antioxidante, entre outros (Blainski; Lopes; Mello, 2013). A ação antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada ao poder de oxidorredução, atuam, dessa forma, como agentes redutores, doadores de hidrogênio, inibidores de enzimas e ainda podem eliminar radicais livres (Gawlik-Dziki *et al.*, 2013).

Com relação às metodologias para quantificação desses compostos em material vegetal destacam-se o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Souza; Vieira; Putti, 2018). Este reagente é composto por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico que, quando em contato com agentes redutores (a exemplo dos compostos fenólicos) em meio básico, se oxidam formando complexos

de molibdênio e tungstênio, estes resultam em coloração azul, logo, a concentração das substâncias redutoras pode ser determinada em espectrofotômetro UV/VIS. Quanto mais intensa a coloração, maior o conteúdo de fenólicos nos extratos e/ou fração testada (Singleton; Rossi Jr., 1965).

Assim como os compostos fenólicos, os flavonoides são amplamente difundidos no reino vegetal, predominantemente nas angiospermas, sendo encontrados em frutas, flores, alimentos, folhas (Simões *et al.*, 2017). Se originam a partir de aminoácidos aromáticos fenilamina, tirosina e unidades de acetato. Por meio de reações químicas a fenilalanina e a tirosina sucedem ao ácido cinâmico e o ácido parahidroxicinâmico que se condensa com a unidade de acetato originando assim a estrutura cinamol dos flavonoides. Em seguida são formados os derivados glicosilados e sulfatados (Simões *et al.*, 2017).

A quantificação de flavonoides totais embasa-se na formação de um anel estável contendo seis membros do átomo de alumínio, oriundo do reagente  $AlCl_3$  com o flavonoide. Sua identificação no UV/VIS é possível porque a formação do complexo entre o flavonoide e o alumínio se dá em comprimento de onda maior. Dessa forma, é possível identificar os flavonoides totais sem a interferência de outras substâncias fenólicas presentes na amostra (Woisky; Salatino, 1998).

A composição total de compostos fenólicos e flavonoides está relacionada a capacidade da amostra de doar elétrons ou capturar os radicais livres, portanto, pode-se dizer que quanto maior for a quantidade de fenólicos e flavonoides na amostra, maior será a sua capacidade antioxidante (Silva *et al.*, 2016; Pires; Torres; Santos, 2017). A estrutura química dos compostos fenólicos e dos flavonoides favorecem essa troca, uma vez que, são compostos por um ou mais anéis aromáticos, geralmente possuem vários grupos hidroxilas, formando radicais fenoxila que são estabilizados por ressonância (Dudonné *et al.*, 2009).

A avaliação da capacidade antioxidante de extratos e frações de *M. evonymoides* foi determinada por meio dos testes ABTS $\cdot+$ , DPPH $\cdot$  e FRAP. Os resultados estão apresentados na TABELA 15. Na avaliação do poder antioxidante presentes nas amostras em todos os testes realizados os resultados estão expressos em  $\mu$ mol equivalentes de trolox ( $\mu$ mol.TE/100mg). Vale ressaltar que se faz necessário mais de uma metodologia para apontar a atividade antioxidante de um composto (Oliveira, 2015; Silva *et al.*, 2018).

TABELA 15 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides* A PARTIR DA CURVA DE TE.

Amostras	ABTS ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ )	DPPH• ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ )
<b>EBF</b>	<b>4065,08±9,08<sup>a5</sup></b>	<b>1886,18±6,57<sup>a5</sup></b>	<b>6250,41±61,90<sup>a6</sup></b>
<b>FHF</b>	1573,19±7,00 <sup>a1</sup>	1043,40±0,68 <sup>a1</sup>	1264,01±65,31 <sup>a1</sup>
<b>FCF</b>	2515,13±14,38 <sup>a2</sup>	1146,05±11,31 <sup>a2</sup>	2682,54±43,08 <sup>a3</sup>
<b>FAEF</b>	2492,22±8,96 <sup>a2</sup>	1119,99±15,91 <sup>a2</sup>	<b>5983,52±36,64<sup>a6</sup></b>
<b>FRF</b>	<b>3384,85±36,19<sup>a4</sup></b>	1216,04±17,43 <sup>a4</sup>	3099,22±32,64 <sup>a4</sup>
<b>EBC</b>	<b>3220,65±50,32<sup>a3 a4</sup></b>	1521,26±11,21 <sup>a4</sup>	<b>8033,00±24,00<sup>a7</sup></b>
<b>FHC</b>	2285,31±45,47 <sup>a2</sup>	1193,97±3,38 <sup>a3</sup>	1813,39±30,63 <sup>a2</sup>
<b>FCC</b>	<b>3181,64±37,33<sup>a3 a4</sup></b>	<b>2433,55±31,84<sup>a6</sup></b>	4041,23±66,74 <sup>a5</sup>
<b>FAEC</b>	<b>6372,03±57,13<sup>a6</sup></b>	<b>2859,08±24,63<sup>a7</sup></b>	<b>6097,87±34,63<sup>a6</sup></b>
<b>FRC</b>	3112,32±51,58 <sup>a3</sup>	1496,34±6,46 <sup>a4</sup>	1495,66±36,35 <sup>a1 a2</sup>

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Capacidade antioxidante expressos em: ABTS ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ); DPPH• ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ); FRAP ( $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ). EBF: Extrato Bruto Folhas; FHF: Fração Hexano Folhas; FCF: Fração Clorofórmico Folhas; FAEF: Fração Acetato de Etila Folhas; FRF: Fração Residual Folhas; EBC: Extrato Bruto Caule; FHC: Fração Hexano Caule; FCC: Fração Clorofórmico Caule; FAEC: Fração Acetato de Etila Caule; FRC: Fração Residual Caule; TE: trolox equivalente. Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Letras e números iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si à nível de 5% de significância pelo teste ANOVA post-hoc de Tukey.

Os resultados da atividade antioxidante conforme a metodologia aplicada pode ser expressa em quantidade equivalente do padrão testado na amostra, a exemplo,  $\mu\text{mol.TE}/\text{g}$ , em termos de  $\text{IC}_{50}$  (que expressa a quantidade necessária de amostra para reduzir em 50% a concentração inicial do agente doador/redutor) e ainda ser expresso em percentagem de inibição (Velloso *et al.*, 2006; Pessuto *et al.*, 2009; Negri; Possamai; Nakashima, 2009; Silva *et al.*, 2009; Lima; Vargas; Pohlit, 2010; Magalhães *et al.*, 2011; Cansian *et al.*, 2015). Quando o resultado é expresso em quantidade equivalente do padrão testado na amostra, quanto maior for o resultado encontrado, maior será o potencial antioxidante observado. Quando o resultado é expresso em  $\text{IC}_{50}$ , quanto menor for o resultado encontrado, significa que maior capacidade antioxidante tem a amostra. Quando o resultado é expresso em percentagem de inibição, quanto mais próximo de 100% maior será a capacidade antioxidante da amostra.

No ensaio de captura do ABTS<sup>+</sup>, a FAEC (6372,03  $\pm$  57,13  $\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ) apresentou o melhor resultado entre as frações, seguido da EBF (4065,08  $\pm$  9,08

$\mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ). A FRF, EBC e FCC ( $3384,85 \pm 36,19$ ,  $3220,65 \pm 50,32$  e  $3181,65 \pm 37,33 \mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ) foram estatisticamente equivalentes. Outras espécies do gênero *Monteverdia* também foram avaliadas quanto ao potencial antioxidante pelo método ABTS $\cdot+$ , dentre elas, destacam-se *M. dasyclada*. e *M. cassineformis* (Schwanz, 2012), *M. ilicifolia* (Velloso *et al.*, 2006), *M. guyanensis* (Lima; Vargas; Pohlit, 2010), *Maytenus pedunculari*, *Maytenus procumbens*, *Maytenus senegalensis*, *Maytenus undata* (Ahmed; McGaw; Eloff, 2013), *Maytenus royleanus* (Shabbir; Khan; Saeed, 2013).

No ensaio ABTS $\cdot+$ , conduzido com extrato etanólico bruto das raízes de *M. ilicifolia*, os autores observaram  $\text{IC}_{50}$  de  $2,0 \pm 0,07$ , valor superior ao controle utilizado Trolox que apresentou  $\text{IC}_{50}$   $0,7 \pm 0,04$ , evidenciando importante capacidade antioxidante, atribuída aos constituintes polifenóis e flavonoides presentes na espécie (Velloso *et al.*, 2006). Lima; Vargas; Pohlit, (2010) conduziram o estudo com extrato etanólico da casca de *M. guyanensis* e observou  $\text{IC}_{50}$   $28,4 \pm 0,7$ , além de outros testes antioxidantes, sugerindo que o extrato pode ter aplicações potenciais em disfunções oxidativas.

No ensaio DPPH $\cdot$  o resultado mais expressivo foi observado no FAEC ( $2859,55 \pm 24,63 \mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ), demonstrando potencial antioxidante significativo, seguido da FCC e EBF ( $2433,55 \pm 31,84$ ;  $1886,18 \pm 6,57 \mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ). O EBC, FRC e FRF ( $1521,26 \pm 11,21$ ;  $1496,34 \pm 6,46$ ;  $1216,04 \pm 17,43 \mu\text{mol.TE}/100\text{mg}$ ) foram estatisticamente equivalentes. Os resultados corroboram com o resultado encontrado na quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides.

Pessuto *et al.* (2009) em seus estudos quantificou fenólicos totais em folhas de *M. ilicifolia*, comparando extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila, correlacionando os resultados de fenóis totais com a atividade antioxidante. Para tanto, os autores calcularam o  $\text{IC}_{50}$  pelo método DPPH $\cdot$  e observaram que a capacidade antioxidante foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais (Pessuto *et al.*, 2009). Nos estudos conduzidos por Negri; Possamai; Nakashima, (2009), com a mesma espécie, os autores realizaram a secagem das amostras em diferentes temperaturas e posteriormente quantificaram o  $\text{IC}_{50}$  pelo método DPPH $\cdot$ . Os resultados observados foram  $4,02 \mu\text{g}/\text{mL}$  à temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $7,07 \mu\text{g}/\text{mL}$  à  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  (Negri; Possamai; Nakashima, 2009). No estudo conduzido por De Paula *et al.*, (2023), os autores observaram  $\text{IC}_{50}$   $14,51 \mu\text{g}/\text{mL}$  na fração acetato de etila pelo método DPPH $\cdot$  (De Paula *et al.*, 2023).

Cansian *et al.* (2015) comparou a atividade antioxidante de três espécies, *M. dasyclata*, *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* calculando o IC<sub>50</sub> pelo método DPPH· no qual observou resultados inversamente proporcionais da atividade sequestrante do radical com a quantificação de compostos fenólicos. Quando aplicado o método de Pearson, os autores observaram boa regressão linear (correlação de Pearson de -0,932), sugerindo a importância dos compostos fenólicos presentes no gênero, corroborando com Pessuto *et al.* (2009).

*M. imbricata* é outra representante do gênero que apresenta atividade antioxidante. Os autores particionaram o extrato com diferentes solventes e observaram que a fração acetato de etila na concentração de 0,3 mg/mL inibiu 68,15% do radical livre DPPH· (Silva *et al.*, 2009). Da mesma forma, Magalhães *et al.* (2011) realizou o teste DPPH· com extratos obtidos de folhas de *M. salicifolia* utilizando diferentes solventes (hexano, acetato de etila, butanol e metanol) e observou a inibição de 90% do DPPH· quando utilizado 0,1mg/mL de extrato em acetato de etila (Magalhães *et al.*, 2011). No estudo conduzido com extrato etanólico de cascas de *M. guyanensis*, os autores relataram IC<sub>50</sub> 8,2 ± 0,2 no teste DPPH·, indicando potencial antioxidante significativo (Lima; Vargas; Pohlit, 2010).

No ensaio FRAP o EBC apresentou atividade antioxidante significativa (8033,00 ± 24,00) seguida dos EBF, FAEC e FAEF que apresentaram capacidade antioxidante promissora (6250,41 ± 61,90; 6097,87 ± 34,63; 5983,52 ± 36,64 µmol.TE/100mg). Dentre as amostras que apresentaram resultados inferiores estão FHF, seguida de FRC (1264,01 ± 65,31 e 1495,66 ± 36,35 µmol.TE/100mg).

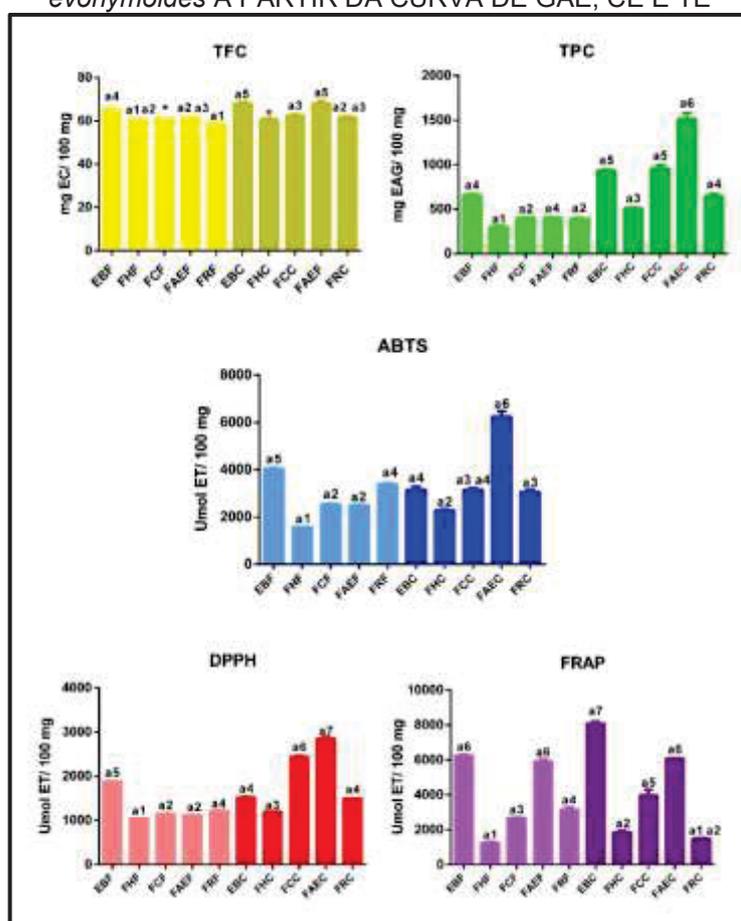
De Paula *et al.* (2023) verificou a capacidade antioxidante de *M. ilicifolia* por meio dos ensaios DPPH· e FRAP. No ensaio FRAP, os autores expressaram os resultados em mM Equivalente de extrato Trolox/g. Neste ensaio, a variância de absorbância encontrada foi linearmente proporcional à concentração de antioxidante. O ensaio FRAP apresentou resultados variando de 0,77 a 5,40 mM Trolox/g de extrato, no qual a fração acetato de etila (EAF2 e EAF4) apresentaram resultado promissor (5,40 e 5,15 mM Trolox/g) (De Paula *et al.*, 2023).

Outro estudo conduzido com diferentes espécies da família Celastraceae foram testadas para determinar a capacidade antioxidante usando o ensaio FRAP, dentre elas, *Maytenus pyria* que apresentou 190 ± 0,87 µM trolox/g no extrato (Soobrattee *et al.*, 2008). Este resultado corrobora com o resultado encontrado no presente estudo.

Soto-Maldonado *et al.* (2022) realizou os testes antioxidantes DPPH• com *M. boaria* por meio do cálculo IC<sub>50</sub> e observou que a solução metanólica acidificada apresentou o melhor resultado, enquanto no teste FRAP o melhor resultado foi observado no extrato aquoso e no teste ORAC não identificou diferença significativa entre extrato aquoso e extrato etanólico. Os autores atribuíram as diferenças nos resultados observados aos métodos de extração realizados, além das metodologias de quantificação.

A FIGURA 44 traz a representação gráfica dos resultados testemunhados no presente estudo.

FIGURA 44 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Monteverdia evonymoides* A PARTIR DA CURVA DE GAE, CE E TE



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Resultados de teor de compostos fenólicos, teor de flavonoides e capacidade antioxidante expressos em: TPC: Teor de compostos fenólicos (mg.EAG/100mg); TFC: Teor de flavonoides (mg.CE/100mg); ABTS (µmol.TE/100mg); DPPH• (µmol.TE/100mg); FRAP (µmol.TE/100mg). EBF: Extrato Bruto Folhas; FHF: Fração Hexano Folhas; FCF: Fração Clorofórmico Folhas; FAEF: Fração Acetato de Etila Folhas; FRF: Fração Residual Folhas; EBC: Extrato Bruto Caule; FHC: Fração Hexano Caule; FCC: Fração Clorofórmico Caule; FAEC: Fração Acetato de Etila Caule; FRC: Fração Residual Caule; GAE: ácido gálico equivalente; CE: catequina equivalente; TE: trolox equivalente. Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si a nível de 5% de significância pelo teste ANOVA post-hoc de Tukey. \*: a1 a2 a3.

Os ensaios de captura do ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-Azino-bis (3-Etilbenzotiazolin) 6-Ácido Sulfônico) e DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila) são amplamente utilizados para avaliação do potencial antioxidante de produtos naturais. São métodos baseados no sequestro de radicais livres por uma substância doadora de próton, sua quantificação se dá de forma indireta (Lins Neto *et al.*, 2016). Requerem equipamentos relativamente padronizados e fornecem resultados rápidos e reprodutíveis. Além disso, o ensaio ABTS<sup>•+</sup> é particularmente interessante em extratos vegetais porque a absorção do comprimento de onda em 734 nm elimina a interferência de cor (Dudonné *et al.*, 2009). O FRAP (*Ferric Reducing Anti-oxidant Power*;) por sua vez, mede a capacidade antioxidante de forma direta, neste teste é possível determinar quanto o ferro foi reduzido pela amostra (Halvorsen *et al.*, 2002). Logo, os três testes são empregados no screening de compostos químicos sintéticos e produtos naturais, tornando-se importante como teste preliminar para a determinação do potencial antioxidante de um extrato e/ou fração, ou ainda substância pura.

Os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson, cujo os dados são apresentados na TABELA 16.

TABELA 16 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ABTS, DPPH<sup>•</sup> E FRAP PELO MÉTODO DE PEARSON

TESTE	TPC	TFC	ABTS	DPPH <sup>•</sup>	FRAP
TPC		0,83	0,84	0,90	0,61
TFC	0,83		0,69	0,67	0,82
ABTS	0,84	0,61		0,84	0,53
DPPH <sup>•</sup>	0,90	0,80	0,84		0,43
FRAP	0,61	0,79	0,53	0,43	

FONTE: A autora (2022).

NOTA: TPC: Teor de compostos fenólicos; TFC: Teor de flavonoides, Testes antioxidante: ABTS, DPPH<sup>•</sup> e FRAP. Coeficientes (r) em: muito fraco (0,0 – 0,2), fraco (0,2 – 0,4), moderado (0,4 – 0,7), forte (0,7 – 0,9) e muito forte (0,9 – 1,0).

De acordo com a classificação observou-se correlação forte entre o ensaio ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonoides. Da mesma forma entre FRAP e flavonoides totais. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada a sua estrutura. Além de apresentar um ou mais anéis aromáticos, o número de hidroxilas nos compostos e a estereoquímica: compostos com 2R, 3R exibem uma maior atividade do que aqueles com 2R, 3S, portanto tem facilidade de eliminar radicais livres, formando radicais fenoxila estabilizados por ressonância (Dudonné *et al.*, 2009; Pessuto *et al.*, 2009). Percebe-se com esses

resultados a relação entre a quantidade de compostos fenólicos e sua capacidade de oxirredução férrica e eliminação de radicais livres. Isto posto, a presença de compostos fenólicos nos extratos vegetais contribui significativamente para o seu potencial antioxidante (Dudonné *et al.*, 2009).

Os três métodos revelaram que a FAEC, apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais e flavonoides, bem como capacidade antioxidante significativamente melhor quando comparada com as outras amostras analisadas, seguida dos extratos brutos de caule e folhas. Os flavonoides são amplamente encontrados na fração acetato de etila (Falkenberg, 2004). A presença de ligações duplas e grupamento hidroxila na estrutura química dos compostos fenólicos e flavonoides são responsáveis pela neutralização de radicais livres por meio da doação de hidrogênio ou prótons (Pateiro *et al.*, 2018).

Os resultados evidenciados tanto na quantificação de fenólicos e flavonoides, quanto na avaliação de antioxidantes estão de acordo com o encontrado na prospecção fitoquímica. Dessa forma, a capacidade antioxidante observada nos ensaios realizados pode estar relacionada a esta classe de substâncias. Além do mais, sabe-se que diversas doenças de origem inflamatória e degenerativas são atribuídas ao estresse oxidativo, portanto, conhecer a capacidade de inibir ou prevenir danos oxidativos pode auxiliar na escolha de testes *in vivo* e direcionar a pesquisa.

## 4.9 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.9.1 Avaliação da Toxicidade Frente a *Artemia franciscana*

O bioensaio para avaliação da toxicidade foi realizado com *Artemia franciscana*. Este microcrustáceo vive em água salgada, serve de alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, além de ser considerado um indicador da qualidade ambiental (Meyer *et al.*, 1982; Lima *et al.*, 2009). A toxicidade de extratos vegetais pode ser estimada através da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) capaz de matar 50% dos náuplios (Meyer *et al.*, 1982; Cavalcante *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos referentes à avaliação da toxicidade sobre a *A. salina* são apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 - MORTALIDADE DE *A. franciscana* E CL<sub>50</sub> UTILIZANDO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULE DE *M. evonymoides*

Amostras	Concentração (µg/mL) / Mortalidade														CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC de 95% (µg/mL)
	10		50		100		250		500		750		1000			
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C		
EB	0	0	0	1	1	1	1	0	3	2	1	0	1	3	> 1000	-
FH	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	10	4	15	4	> 1000	-
FC	0	0	1	1	1	1	2	0	13	1	12	2	12	1	> 1000	-
FAE	0	0	0	1	1	1	1	0	1	7	4	7	10	7	> 1000	-
FR	0	0	0	1	0	1	2	1	0	1	0	1	1	1	> 1000	-
Metanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 1000	-
Sulfato de Quinidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	511,04	298,5 - 1214,5

FONTE: A autora (2021).

NOTA: Folhas (F), Caule (C), Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR). IC= Intervalo de Confiança. CL<sub>50</sub>= concentração letal

Meyer *et al.* (1982) afirma que as amostras são consideradas ativas quando a CL<sub>50</sub> for menor que 1000 µg/mL, portanto, de acordo com os valores observados na TABELA 17 nenhuma das amostras e suas respectivas concentrações testadas apresentaram letalidade sobre os náuplios de *A. salina*. Apesar de algumas mortes terem sido observadas, o número total não foi estatisticamente significativo quando comparados ao controle positivo (sulfato de quinidina) e ao controle negativo (metanol / solvente utilizado para solubilização das amostras (Meyer *et al.*, 1982).

Ademais a metodologia executada apresenta vantagens, a exemplo de baixo custo (Meyer *et al.*, 1982), fácil acessibilidade, rapidez e simplicidade na execução do ensaio (Nascimento *et al.*, 2008).

Estudos conduzidos com outras espécies do gênero *Monteverdia* foram submetidos ao teste de toxicidade frente *A. salina* utilizando a mesma metodologia e apresentaram resultados divergentes ao presente estudo, a exemplo de *M. truncata* que apresentou CL<sub>50</sub> 527 µg/mL, *M. acanthophylla* CL<sub>50</sub> 372 µg/mL (Pereira *et al.*, 2020), *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek com CL<sub>50</sub> 384,93 µg/mL, indicando dessa forma potencial toxicidade frente a *A. salina* (Rodrigues, 2011).

Por outro lado, nos estudos conduzidos com extrato etanólico de folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart os resultados observados de CL<sub>50</sub> foram maiores que 1000 µg/mL, resultado semelhantes ao presente estudo indicando a baixa toxicidade dos extratos testados (Mota *et al.*, 2008).

A pesquisa com *Artemia franciscana* é um teste preliminar aplicado na detecção de toxicidade de compostos bioativos, dessa forma, auxilia no direcionamento da pesquisa, pois é um teste amplamente utilizado que antecede a pesquisa de atividade farmacológica, antitumoral, antibacteriana e de ecotoxicidade (Amarante *et al.*, 2011). Para afirmar que folhas de *M. evonymoides* apresentam toxicidade, seriam necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* de toxicidade aguda, crônica e hepatotoxicidade.

#### 4.9.2 Avaliação da Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada com extrato e frações a partir das folhas e caules de *M. evonymoides* (Reissek) Biral, sendo que não foi observada formação de hemólise total *in vitro* para nenhuma das amostras testadas em nenhuma das concentrações, conforme demonstrado na TABELA 18.

TABELA 18 - AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE *M. evonymoides*

Amostras	Concentração µg/mL – Resultados em %						Controles
	75	100	250	500	750	1000	
EBF	4,15 ± 0,11 a <sup>1</sup>	0,80 ± 0,05 a <sup>1</sup>	1,74 ± 0,25 a <sup>1</sup>	1,44 ± 0,27 a <sup>1</sup>	3,69 ± 0,83 a <sup>1</sup>	1,92 ± 0,11 a <sup>1</sup>	
FHF	2,82 ± 0,27 a <sup>1</sup>	1,63 ± 0,25 a <sup>1</sup>	1,01 ± 0,05 a <sup>1</sup>	1,27 ± 0,11 a <sup>1</sup>	2,45 ± 0,46 a <sup>1</sup>	2,02 ± 0,11 a <sup>1</sup>	
FCF	4,01 ± 0,44 a <sup>1</sup>	3,44 ± 0,12 a <sup>1</sup>	5,18 ± 0,68 a <sup>1</sup>	1,53 ± 0,27 a <sup>1</sup>	3,41 ± 0,37 a <sup>1</sup>	3,03 ± 0,16 a <sup>1</sup>	
FAEF	1,70 ± 0,21 a <sup>1</sup>	0,37 ± 0,05 a <sup>1</sup>	0,85 ± 0,11 a <sup>1</sup>	0,85 ± 0,11 a <sup>1</sup>	1,38 ± 0,11 a <sup>1</sup>	2,13 ± 0,14 a <sup>1</sup>	
FRF	7,49 ± 1,17 a <sup>1</sup>	5,11 ± 0,49 a <sup>1</sup>	6,88 ± 0,53 a <sup>1</sup>	6,53 ± 0,33 a <sup>1</sup>	17,56 ± 1,50 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	10,32 ± 0,59 a <sup>1</sup>	
EBC	6,07 ± 0,16 a <sup>1</sup>	5,70 ± 0,60 a <sup>1</sup>	2,79 ± 0,40 a <sup>1</sup>	7,72 ± 0,40 a <sup>1</sup>	5,22 ± 1,55 a <sup>1</sup>	5,91 ± 0,80 a <sup>1</sup>	
FHC	2,24 ± 0,16 a <sup>1</sup>	9,53 ± 1,13 a <sup>1</sup>	5,27 ± 0,16 a <sup>1</sup>	12,62 ± 1,39 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	10,91 ± 1,75 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	6,79 ± 0,88 a <sup>1</sup>	
FCC	11,82 ± 0,70 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	6,39 ± 0,32 a <sup>1</sup>	3,27 ± 0,24 a <sup>1</sup>	3,83 ± 0,64 a <sup>1</sup>	7,11 ± 0,56 a <sup>1</sup>	14,45 ± 2,18 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	
FAEC	3,99 ± 0,16 a <sup>1</sup>	8,09 ± 0,88 a <sup>1</sup>	7,03 ± 1,46 a <sup>1</sup>	11,90 ± 0,56 a <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	8,14 ± 1,21 a <sup>1</sup>	7,51 ± 0,32 a <sup>1</sup>	

<b>FRC</b>	5,99 ± 0,88 <sup>a1</sup>	3,91 ± 0,40 <sup>a1</sup>	4,55 ± 0,08 <sup>a1</sup>	2,71 ± 0,16 <sup>a1</sup>	7,83 ± 0,89 <sup>a1</sup>	3,51 ± 0,70 <sup>a1</sup>	(conclusão)
<b>RUTINA</b>	5,56 ± 0,20 <sup>a1</sup>	10,42 ± 0,05 <sup>a1</sup>	3,41 ± 0,49 <sup>a1</sup>	5,00 ± 1,12 <sup>a1</sup>	6,35 ± 1,41 <sup>a1</sup>	3,67 ± 0,10 <sup>a1</sup>	
<b>SAPONINA</b>	112,58 ± 21,91 <sup>a5</sup>	146,38 ± 27,32 <sup>a6</sup>	157,61 ± 57,28 <sup>a6</sup>	216,22 ± 4,89 <sup>a7</sup>	149,68 ± 21,68 <sup>a6</sup>	242,52 ± 21,56 <sup>a7</sup>	
<b>METANOL</b>							51,73 ± 7,13 <sup>a4</sup>
<b>PBS</b>							43,85 ± 7,82 <sup>a4</sup>

FONTE A autora (2021).

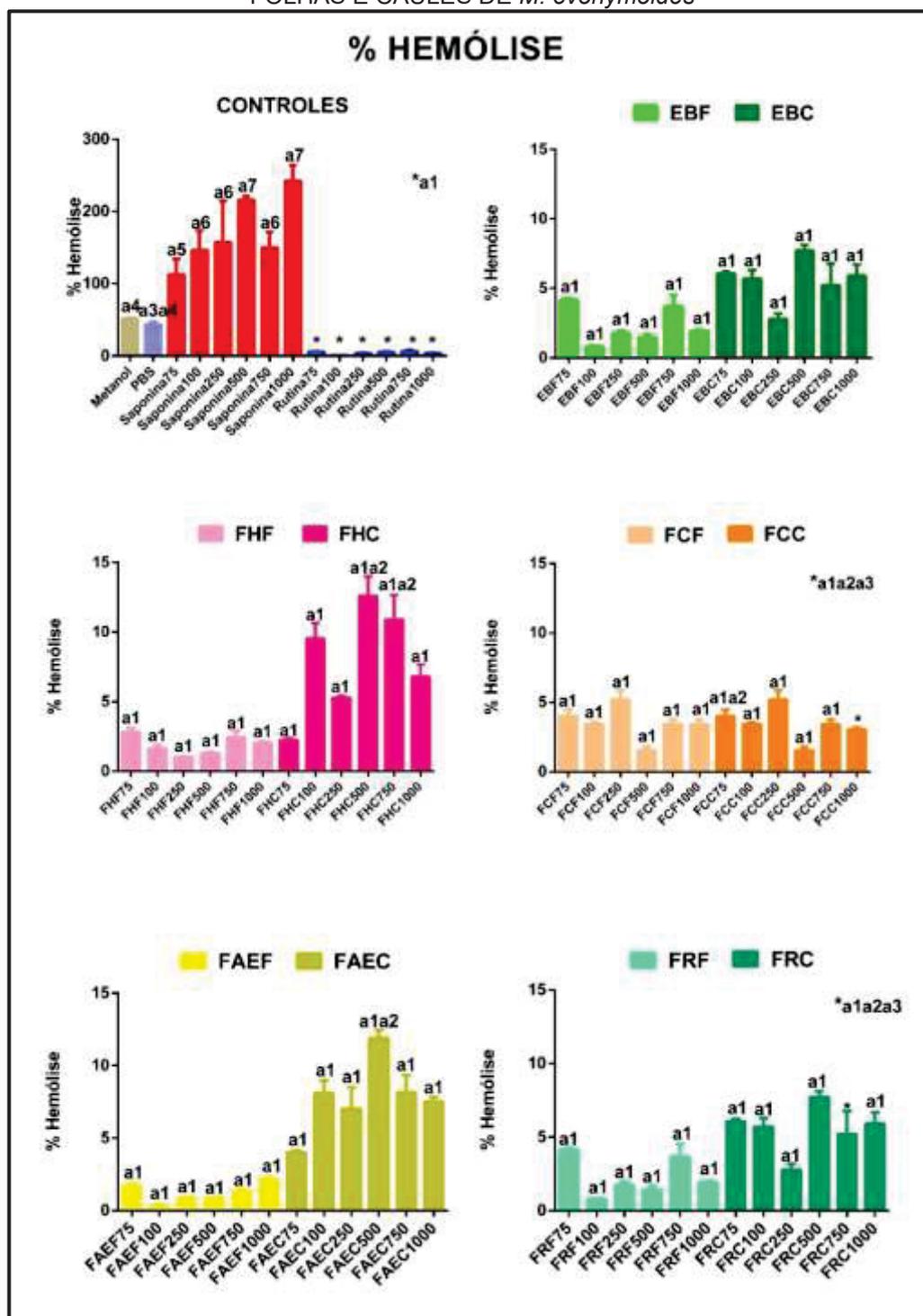
NOTA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC); Controle Tampão (PBS). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Letras minúsculas e números iguais não diferem estatisticamente entre si.

O teste hemolítico, assim como o teste realizado com *Artemia franciscana*, é indicativo de toxicidade e bioatividade, sendo dessa forma uma importante ferramenta na triagem fitotóxica de plantas e compostos bioativos (Kublik *et al.*, 1996; Gandhi; Cherian, 2000; Kalegari *et al.*, 2011; Colacite, 2015). Quando a amostra é capaz de causar rompimento da hemácia em pelo menos 50% dos eritrócitos, esta concentração é considerada hemolítica em comparação ao controle positivo (Dos Santos Júnior *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2020). O rompimento da hemácia está relacionado aos danos ocasionados a membrana celular dos eritrócitos, os quais podem envolver modificação da estrutura da bicamada lipídica, o transporte de íons específicos ou efeitos tóxicos que impedem o controle do volume celular (De Souza Lima; Soto-Blanco, 2010).

Como padrão não hemolítico foi utilizado rotina e como padrão hemolítico foi utilizado a saponina nas concentrações entre 75  $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. A rutina é um flavonoide com reconhecida capacidade antioxidante, pela sua capacidade de sequestrar radicais livres ela consegue proteger o eritrócito evitando dessa forma a hemólise (Abe *et al.*, 2014). A saponina, por sua vez, tem a capacidade de causar hemólise, rompendo a membrana eritrocitária, mesmo quando muito diluída (Karabaliev; Kochev, 2003).

A FIGURA 45 demonstra que extrato e frações de folhas e caules apresentaram resultados semelhantes ao padrão não hemolítico (Rotina).

FIGURA 45 – AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULES DE *M. evonymoides*



FONTE A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC); Controle Tampão (PBS). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Diferença estatística a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Letras minúsculas e números iguais não diferem estatisticamente entre si.

Destaque para o EBF, FHF e FAEF que apresentaram atividade hemolítica inferior ao padrão rotina em todas as concentrações testadas. Todas as amostras apresentaram % de hemólise inferior em relação aos controles metanol e PBS, demonstrando a capacidade de proteção das células. Os resultados obtidos corroboram com os achados na marcha fitoquímica, no qual o resultado foi negativo na pesquisa de saponinas e positivo quanto a presença de taninos e flavonoides, indicando não toxicidade das amostras nestes modelos. Estas classes são amplamente reconhecidas por sua atividade antioxidante (Zuanazzi; Montanha, 2007). Todavia, se faz necessários outros testes de toxicidade *in vivo* e *in vitro*.

Os testes microquímicos realizados no estudo morfoanatômico corroboram com os resultados alcançados que confirmam a presença de compostos antioxidantes tanto em folhas quanto em caule de *M. evonymoides*. A presença de taninos pode estar relacionada a ação antioxidante, assim como a presença de flavonoides e polifenóis, acredita-se que estes estabilizam a membrana eritrocítica, capturam os radicais livres, dessa forma previnem a hemólise (Ahmed *et al.*, 2019).

Há relatos na literatura de ensaios hemolíticos conduzidos com espécies do gênero *Monteverdia*, a exemplo de *M. ilicifolia* que apresentou baixa toxicidade (Colacite, 2015). Testes de toxicidade, incluindo a avaliação da atividade hemolítica *in vitro*, se revela útil para identificar o potencial risco de uso de diversas plantas medicinais (Kundishora; Sithole; Mukanganyama, 2020).

#### 4.9.3 Avaliação da Atividade Alelopática

Citado pela primeira vez em 1937 por Hans Molish (Souza-Filho; Alves, 2002; Dias *et al.*, 2005), o termo alelopatia se refere ao efeito inibitório ou estimulatório direto e indireto que uma planta pode exercer sobre outra, por meio da produção de metabólitos secundários (Souza-Filho; Alves, 2002; Dias *et al.*, 2005; Da Silva, 2014). 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; Lima *et al.*, 2011). No presente estudo foi verificado a influência alelopática de extrato etanólico e frações de *M. evonymoides* sobre as espécies *Lactuca sativa* L. e *Alium cepa* L. nas concentrações 100, 250, 500, 750 e 1000 mg/mL. Estas espécies foram escolhidas porque

apresentam uma série de vantagens descritas na literatura (Ma *et al.* 2015; Barbosa *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016) a exemplo de: facilidade de obtenção e manuseio; germinação rápida e uniforme; tolerância em ampla faixa de pH; pequena sensibilidade aos potenciais osmóticos; elevado grau de sensibilidade aos agentes proponentes (Dias *et al.*, 2005; Grippa *et al.*, 2010; Cuchiara; Borges; Bobrowki, 2012; Simões *et al.*, 2013).

#### 4.9.3.1 Teste de Germinação e de Crescimento de *Lactuca sativa*

A TABELA 19 mostra os efeitos alelopático observados de extrato etanólico e frações de *M. evonymoides* em relação ao IVG e média de germinação das sementes de *L. sativa*.

TABELA 19 - INFLUÊNCIA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *M. evonymoides* (Reissek) Biral NO IVG E NA GERMINAÇÃO DE *L. sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(Continua)

Média IVG <i>Lactuca sativa</i>						
Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
EBF	3,19 ± 0,52 a <sup>2</sup>	2,93 ± 0,36 a <sup>2</sup>	3,06 ± 0,66 a <sup>2</sup>	2,67 ± 0,71 a <sup>2</sup>	2,90 ± 0,27 a <sup>2</sup>	
FHF	2,35 ± 0,28 a <sup>1</sup>	2,57 ± 0,58 a <sup>2</sup>	2,00 ± 0,26 a <sup>1</sup>	2,38 ± 1,10 a <sup>1</sup>	2,16 ± 0,78 a <sup>1</sup>	
FCF	2,46 ± 1,01 a <sup>1</sup>	2,25 ± 0,57 a <sup>1</sup>	2,13 ± 0,46 a <sup>1</sup>	2,63 ± 0,69 a <sup>2</sup>	2,21 ± 0,43 a <sup>1</sup>	
FAEF	2,92 ± 0,65 a <sup>2</sup>	2,96 ± 0,50 a <sup>2</sup>	2,21 ± 0,32 a <sup>1</sup>	2,38 ± 0,44 a <sup>1</sup>	2,67 ± 0,30 a <sup>2</sup>	
FRF	3,08 ± 0,65 a <sup>2</sup>	2,54 ± 0,34 a <sup>2</sup>	2,43 ± 0,73 a <sup>1</sup>	2,73 ± 0,28 a <sup>2</sup>	2,02 ± 0,59 a <sup>1</sup>	
EBC	2,85 ± 0,42 a <sup>2</sup>	2,79 ± 0,53 a <sup>2</sup>	2,96 ± 0,60 a <sup>2</sup>	3,29 ± 0,34 a <sup>2</sup>	2,38 ± 0,69 a <sup>1</sup>	
FHC	2,42 ± 0,10 a <sup>1</sup>	1,36 ± 0,29 a <sup>1</sup>	1,84 ± 0,17 a <sup>1</sup>	1,20 ± 0,34 a <sup>1</sup>	1,65 ± 0,29 a <sup>1</sup>	
FCC	1,94 ± 0,79 a <sup>1</sup>	2,31 ± 0,24 a <sup>1</sup>	2,29 ± 0,25 a <sup>1</sup>	1,98 ± 0,32 a <sup>1</sup>	1,77 ± 0,52 a <sup>1</sup>	
FAEC	2,13 ± 0,42 a <sup>1</sup>	2,75 ± 0,57 a <sup>2</sup>	2,90 ± 0,66 a <sup>2</sup>	2,94 ± 0,66 a <sup>2</sup>	2,33 ± 0,47 a <sup>1</sup>	
FRC	2,67 ± 0,56 a <sup>2</sup>	3,04 ± 0,50 a <sup>2</sup>	2,98 ± 0,45 a <sup>2</sup>	2,71 ± 0,25 a <sup>2</sup>	2,73 ± 0,60 a <sup>2</sup>	
Água						3,60 ± 1,11 a <sup>2</sup>
Metanol						3,89 ± 0,77 a <sup>2</sup>

Média Germinação <i>Lactuca sativa</i> (%)						(conclusão)
Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
EBF	100 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	
FHF	98,75 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	
FCF	97,50 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	
FAEF	100 <sup>a2</sup>					
FRF	100 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	
EBC	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	
FHC	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	
FCC	95 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	96,25 <sup>a2</sup>	
FAEC	97,50 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	
FRC	97,50 <sup>a2</sup>	98,75 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	97,50 <sup>a2</sup>	100 <sup>a2</sup>	
Água						98,75 <sup>a2</sup>
Metanol						100 <sup>a2</sup>

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: IVG= Índice de velocidade de germinação; Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC).  
 NOTA: Resultados IVG expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Resultados da média de germinação expressos em %. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Estatisticamente houve influência inibitória no IVG nas concentrações testadas na FHF (exceto 250 µg/mL), FCF (exceto 750 µg/mL) e FCC. Houve ainda influência nas amostras FAEF (500 e 750 µg/mL), FRF (500 e 1000 µg/mL), EBC e FHC (1000 µg/mL), FAEC (100 e 1000 µg/mL). O restante das amostras apresentou resultados semelhantes ao controle água. No que diz respeito a média de germinação não houve diferença estatística, o mesmo foi observado em relação aos controles água e metanol, indicando que o solvente utilizado não influenciou os resultados.

Há relatos de que o efeito inibitório ou estimulatório de extratos e frações sobre o IVG está relacionada aos aleloquímicos que podem estar presentes nas plantas (Souza Filho; Alves, 2002), em todas as partes, predominantemente nas folhas (FRANCO *et al.*, 2015). Estas substâncias podem causar efeito benéfico ou maléfico, são sintetizadas a partir do metabolismo secundário (Mushtaq; Siddiqui; Hakteen, 2020), estão relacionados a mecanismo de defesa das plantas e são amplamente estudadas como alternativa na produção de inseticidas, herbicidas e nematicidas (Souza Filho; Alves, 2002; Maciel *et al.*, 2017).

De acordo com Maguire (1962), o IVG serve para atestar o vigor das sementes, seu enfraquecimento gera a perda na capacidade reprodutiva e desta forma dificulta a uniformidade de germinação. Todavia, extratos e frações podem revelar estímulo ou inibição do IVG influenciados pela presença de aleloquímicos que tem a capacidade de afetar a permeabilidade das membranas, a transcrição e tradução do DNA, desempenho de mensageiros secundários, a conformação de enzimas e receptores, sendo dessa forma, os responsáveis pela alteração (Weir; Park; Vivanco, 2004; Maraschin-Silva; Aquila, 2006).

Sausen *et al.* (2009) afirma que o efeito de extratos sobre a germinação, quando comparado ao desenvolvimento da plântula pode ser menor, uma vez que o processo germinativo utiliza reservas da própria semente. Novo *et al.* (2009) afirma que a inibição da germinação pode ocorrer por bloqueio da hidrólização dos nutrientes que estão nos tecidos de reserva, afetando, dessa forma, a divisão celular. Santos *et al.* (2008) relatou que a influência alelopática está relacionada em função do pH do meio.

A TABELA 20 demonstra os resultados observados em relação ao crescimento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa* frente aos extratos e frações testadas.

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *L. sativa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DE *M. evonymoides*

(Continua)

Média Crescimento Radícula (mm) <i>Lactuca sativa</i>						
Amostras	Concentração µg/mL					Controles
	100	250	500	750	1000	
EBF	15,89 ± /10,28 <sup>a2</sup>	16,47 ± 6,07 <sup>a2</sup>	14,37 ± 5,69 <sup>a2</sup>	12,50 ± 7,56 <sup>a2</sup>	9,22 ± 6,19 <sup>a1</sup>	
FHF	11,63 ± 4,36 <sup>a2</sup>	14,58 ± 7,55 <sup>a2</sup>	12,79 ± 4,83 <sup>a2</sup>	10,26 ± 3,80 <sup>a1</sup>	5,27 ± 3,84 <sup>a1</sup>	
FCF	14,53 ± 8,30 <sup>a2</sup>	8,94 ± 5,79 <sup>a1</sup>	11,17 ± 6,35 <sup>a2</sup>	11,16 ± 4,95 <sup>a2</sup>	7,17 ± 5,34 <sup>a1</sup>	
FAEF	10,55 ± 4,78 <sup>a1</sup>	12,65 ± 7,41 <sup>a2</sup>	12,32 ± 6,40 <sup>a2</sup>	11,35 ± 5,09 <sup>a2</sup>	9,35 ± 4,85 <sup>a1</sup>	
FRF	14,05 ± 8,14 <sup>a2</sup>	9,61 ± 6,38 <sup>a1</sup>	12,42 ± 7,30 <sup>a2</sup>	11,69 ± 11,00 <sup>a2</sup>	10,28 ± 5,83 <sup>a1</sup>	
EBC	16,71 ± 10,30 <sup>a2</sup>	9,20 ± 5,75 <sup>a1</sup>	12,60 ± 7,13 <sup>a2</sup>	7,63 ± 3,96 <sup>a1</sup>	8,88 ± 6,80 <sup>a1</sup>	
FHC	14,05 ± 6,04 <sup>a2</sup>	11,26 ± 7,87 <sup>a2</sup>	7,42 ± 3,49 <sup>a1</sup>	8,19 ± 7,19 <sup>a1</sup>	5,95 ± 2,27 <sup>a1</sup>	

						(conclusão)
<b>FCC</b>	13,35 ± 8,89 <sup>a2</sup>	10,53 ± 8,08 <sup>a1</sup>	8,59 ± 6,34 <sup>a1</sup>	6,35 ± 4,18 <sup>a1</sup>	6,64 ± 3,83 <sup>a1</sup>	
<b>FAEC</b>	13,12 ± 8,73 <sup>a2</sup>	14,88 ± 5,58 <sup>a2</sup>	13,00 ± 5,73 <sup>a2</sup>	13,85 ± 7,34 <sup>a2</sup>	14,75 ± 7,60 <sup>a2</sup>	
<b>FRC</b>	12,37 ± 6,06 <sup>a2</sup>	18,06 ± 8,58 <sup>a2</sup>	14,67 ± 7,80 <sup>a2</sup>	14,64 ± 6,26 <sup>a2</sup>	13,06 ± 5,87 <sup>a2</sup>	
<b>Água</b>						12,55 ± 6,09 <sup>a2</sup>
<b>Metanol</b>						15,76 ± 8,42 <sup>a2</sup>

Média Crescimento Hipocótilo (mm) *Lactuca sativa*

Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
<b>EBF</b>	18,21 ± 11,10 <sup>a2</sup>	18,74 ± 10,95 <sup>a2</sup>	21,74 ± 11,55 <sup>a2</sup>	21,06 ± 12,18 <sup>a2</sup>	21,44 ± 16,91 <sup>a2</sup>	
<b>FHF</b>	11,74 ± 7,52 <sup>a1</sup>	17,68 ± 8,11 <sup>a2</sup>	12,74 ± 7,99 <sup>a1</sup>	8,47 ± 5,00 <sup>a1</sup>	8,33 ± 7,06 <sup>a1</sup>	
<b>FCF</b>	16,26 ± 12,20 ± <sup>a2</sup>	12,56 ± 9,28 ± <sup>a1</sup>	18,50 ± 10,62 <sup>a2</sup>	16,05 ± 9,54 <sup>a2</sup>	9,39 ± 9,64 <sup>a1</sup>	
<b>FAEF</b>	11,20 ± 8,53 <sup>a1</sup>	19,60 ± 12,44 <sup>a2</sup>	16,26 ± 12,63 <sup>a2</sup>	16,10 ± 10,96 <sup>a2</sup>	15,90 ± 10,43 <sup>a2</sup>	
<b>FRF</b>	14,79 ± 10,35 <sup>a1</sup>	14,39 ± 9,71 <sup>a1</sup>	19,11 ± 13,03 <sup>a2</sup>	20,38 ± 15,53 <sup>a2</sup>	13,67 ± 7,56 <sup>a1</sup>	
<b>EBC</b>	19,14 ± 14,02 <sup>a2</sup>	13,93 ± 11,44 <sup>a1</sup>	19,20 ± 11,02 <sup>a2</sup>	10,81 ± 9,42 <sup>a1</sup>	11,13 ± 8,33 <sup>a1</sup>	
<b>FHC</b>	17,95 ± 9,73 <sup>a2</sup>	11,26 ± 6,98 <sup>a1</sup>	7,58 ± 6,19 <sup>a1</sup>	7,94 ± 6,71 <sup>a1</sup>	6,16 ± 4,80 <sup>a1</sup>	
<b>FCC</b>	14,47 ± 11,46 <sup>a1</sup>	16,82 ± 9,42 <sup>a2</sup>	14,82 ± 7,46 <sup>a1</sup>	11,71 ± 7,48 <sup>a1</sup>	12,36 ± 7,74 <sup>a1</sup>	
<b>FAEC</b>	16,82 ± 14,01 <sup>a2</sup>	13,88 ± 7,32 <sup>a1</sup>	16,67 ± 10,39 <sup>a2</sup>	18,30 ± 11,59 <sup>a2</sup>	19,75 ± 11,18 <sup>a2</sup>	
<b>FRC</b>	12,53 ± 12,55 <sup>a1</sup>	21,76 ± 13,04 <sup>a2</sup>	22,00 ± 14,18 <sup>a2</sup>	25,47 ± 12,09 <sup>a2</sup>	22,82 ± 13,43 <sup>a2</sup>	
<b>Água</b>						15,20 ± 12,57 <sup>a1</sup>
<b>Metanol</b>						14,06 ± 9,38 <sup>a1</sup>

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e ± Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Em relação ao crescimento da radícula foi possível observar a inibição do crescimento em todas as amostras na concentração de 1000 µg/mL, exceto na FAEC e FRC. O mesmo ocorreu com a FHF, EBC, FHC e FCC na concentração de 750

µg/mL, FHC e FCC na concentração de 500 µg/mL, com destaque na FCC que apresentou inibição em quase todas as concentrações, excluindo-se apenas a concentração de 100 µg/mL quando comparadas ao controle. Por outro lado, foi observada influência positiva no crescimento do hipocótilo do EBF em todas as concentrações testadas, FAEF e FRC (exceto 100 µg/mL), FAEC (exceto 250 µg/mL). Ainda foi possível observar comportamento não dose-dependente para as amostras FHF, FCF e FRF. Estes resultados podem estar relacionados a alguns fatores, a exemplo: provável sinergismo entre as substâncias presentes nas amostras, independente da concentração; a distribuição bem como a quantidade de aleloquímicos pode variar dentro da mesma espécie e ainda ter influência da parte coletada e idade da planta (Souza Filho; Alves; Figueiredo, 2003).

Quanto aos aleloquímicos, sabe-se que alcaloides, taninos, glicosídeos (Nandi; Hafsah, 2020), esteroides, triterpenos, compostos fenólicos, flavonoides tem ação alelopática (Areco *et al.*, 2014; Sausen *et al.*, 2009). No ensaio de CCD foi confirmada a presença de taninos, triterpenos, compostos fenólicos e flavonoides. Ainda que ocorra a presença desses compostos, é de conhecimento que pode ocorrer sinergismo entre as substâncias e esse sinergismo ser o responsável pelo efeito estimulatório ou inibitório (Souza Filho; Alves, 2002; Paula *et al.*, 2014).

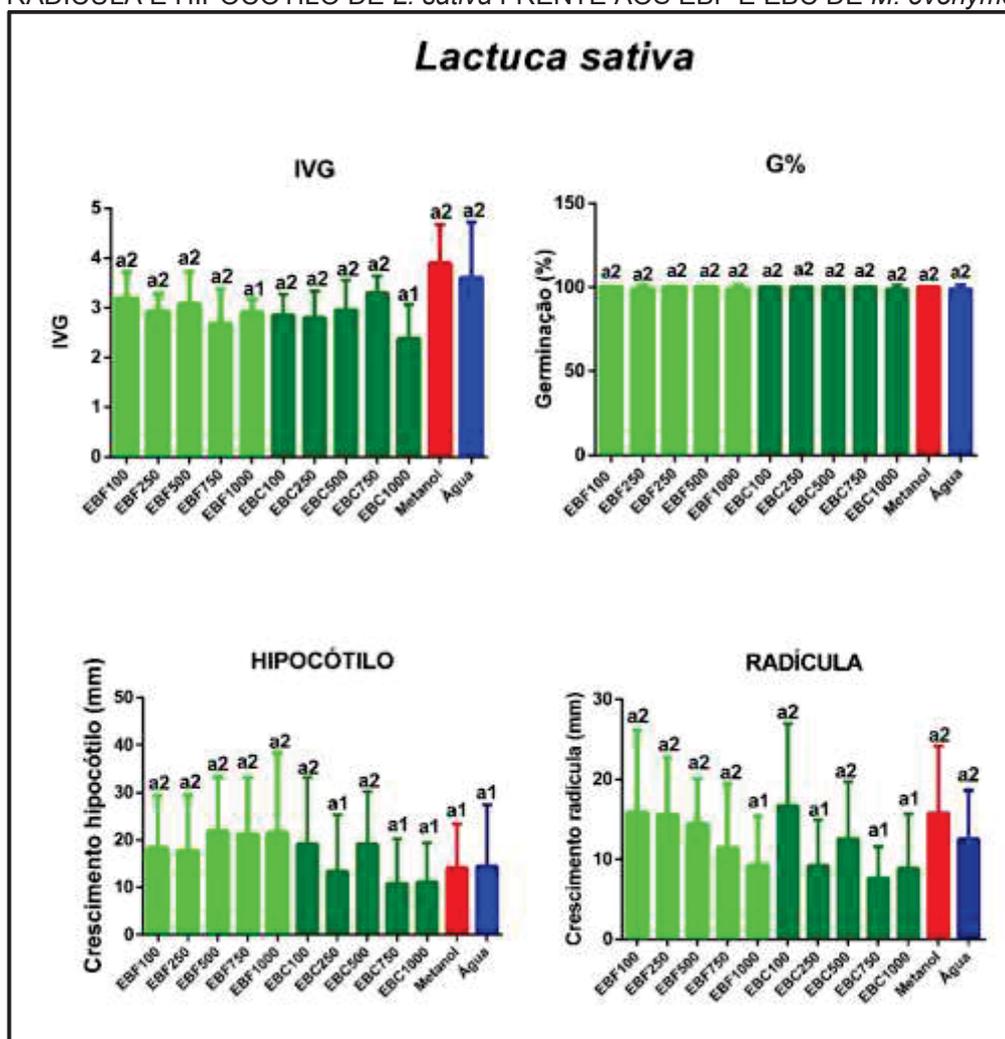
No estudo conduzido por Dias *et al.* (2005) com *M. ilicifolia* verificou-se ausência de influência dos extratos na germinação, influência inibitória no crescimento do hipocótilo e radícula de *Lactuca sativa* (Dias *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi observado nos estudos conduzidos por MoreL e Gayozo (2018) com a mesma espécie. No estudo conduzido por Meinerz *et al.*, (2015) com três diferentes espécies, dentre elas, *M. ilicifolia*, os resultados encontrados foram semelhantes quanto ao efeito inibitório do IVG e do crescimento de radícula de *L. sativa* (Meinerz *et al.*, 2015). Os autores afirmam que os resultados encontrados podem ser explicados pela presença de saponinas, taninos e flavonas ocorrentes na espécie *M. ilicifolia* (Souza *et al.*, 2005; Mariot; Barbieri, 2008).

No estudo alelopático conduzido com substâncias isoladas, a friedelina e o epifriedelinol, os autores relataram ação com baixo potencial inibitório na germinação de plantas daninhas quando comparadas aos controles. No mesmo estudo, os autores realizaram os ensaios em diferentes faixas de pH e nesse contexto acredita-se que a ação alelopática observada se refere a alguma especificidade do pH do meio (Santos *et al.*, 2008). Os resultados corroboram com os achados do presente estudo em

relação a atividade alelopática observada na FAEC que não apresentou inibição da germinação e no crescimento do hipocótilo, porém apresentou inibição no crescimento da radícula.

A FIGURA 46 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula dos extratos brutos de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 46 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE AOS EBF E EBC DE *M. evonymoides*

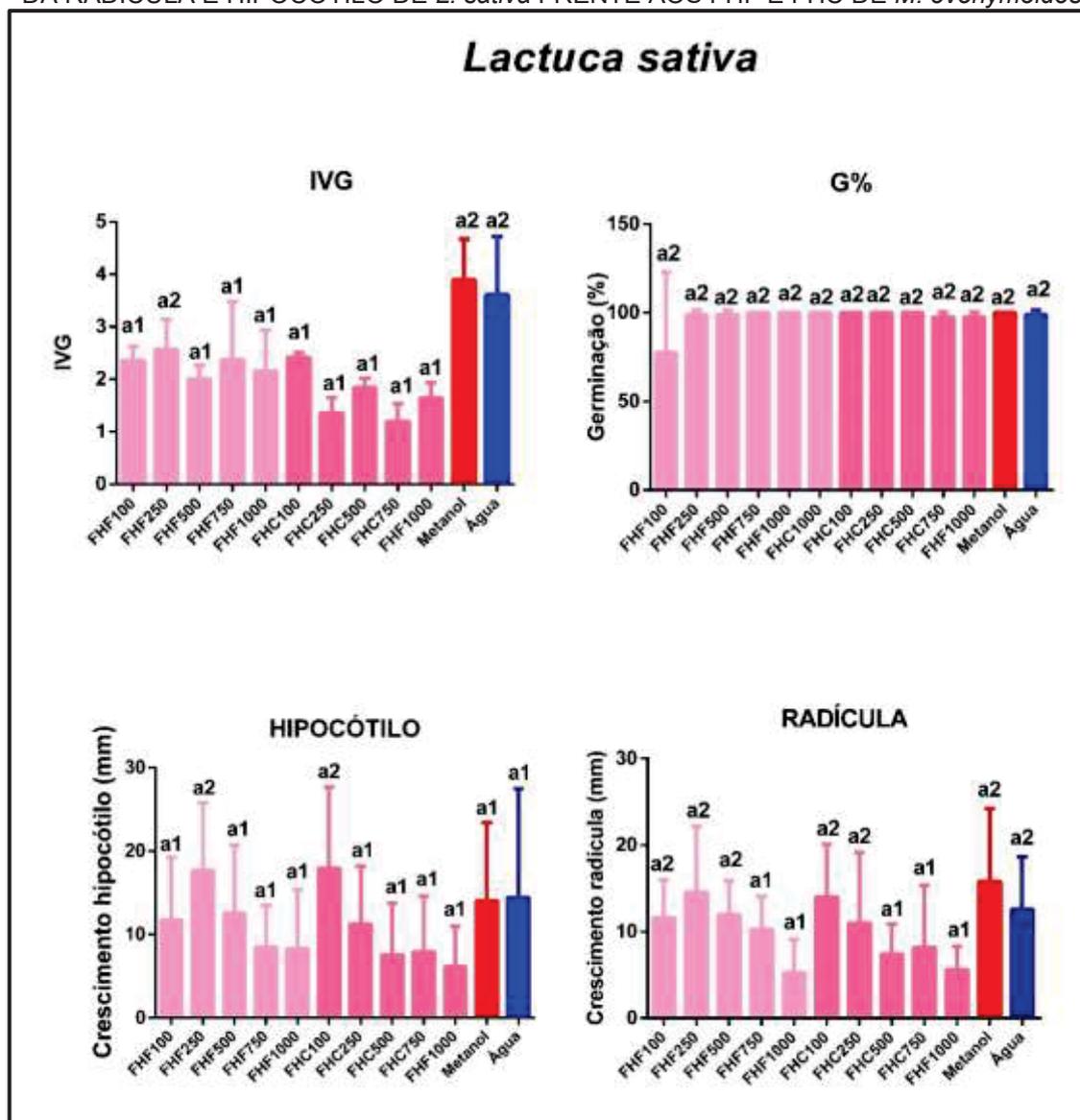


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Extrato Bruto Caule (EBC), Índice de velocidade de germinação (IVG), percentagem de germinação (G%). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 47 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração hexano de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 47 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE AOS FHF E FHC DE *M. evonymoides*

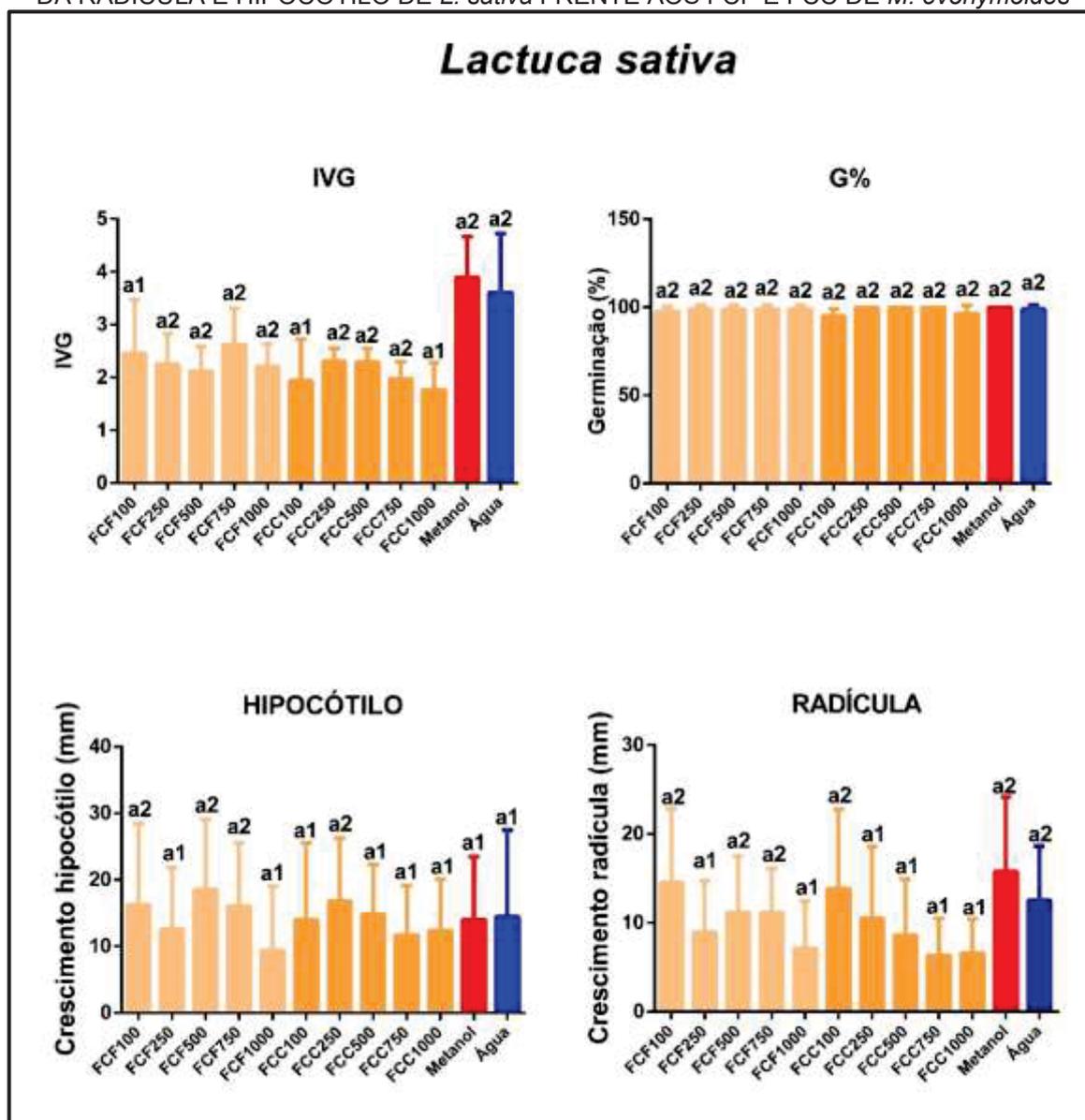


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Hexânica Caule (FHC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 48 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração clorofórmio de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 48 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE AOS FCF E FCC DE *M. evonymoides*

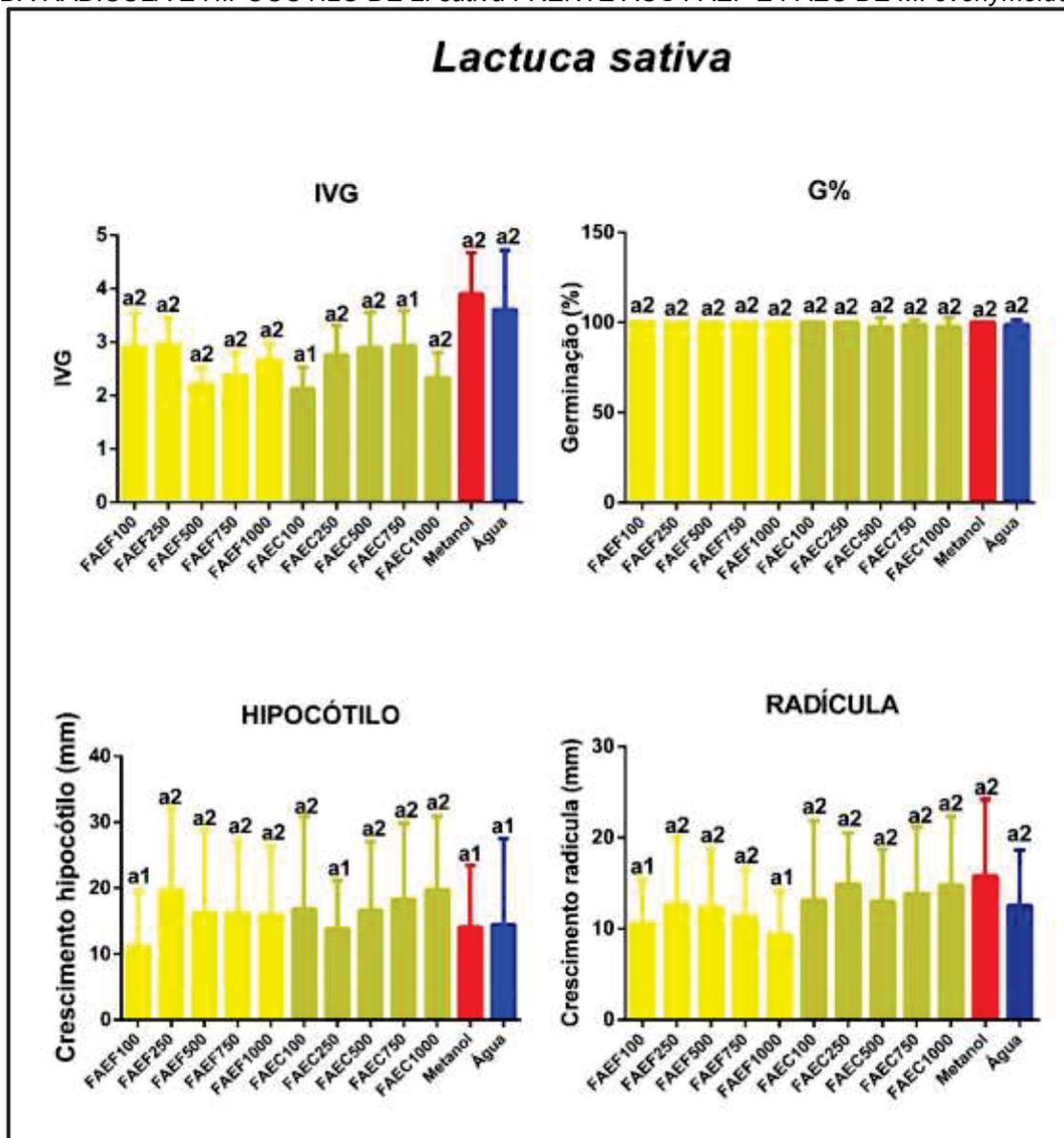


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 49 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração acetato de etila de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 49 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE AOS FAEF E FAEC DE *M. evonymoides*

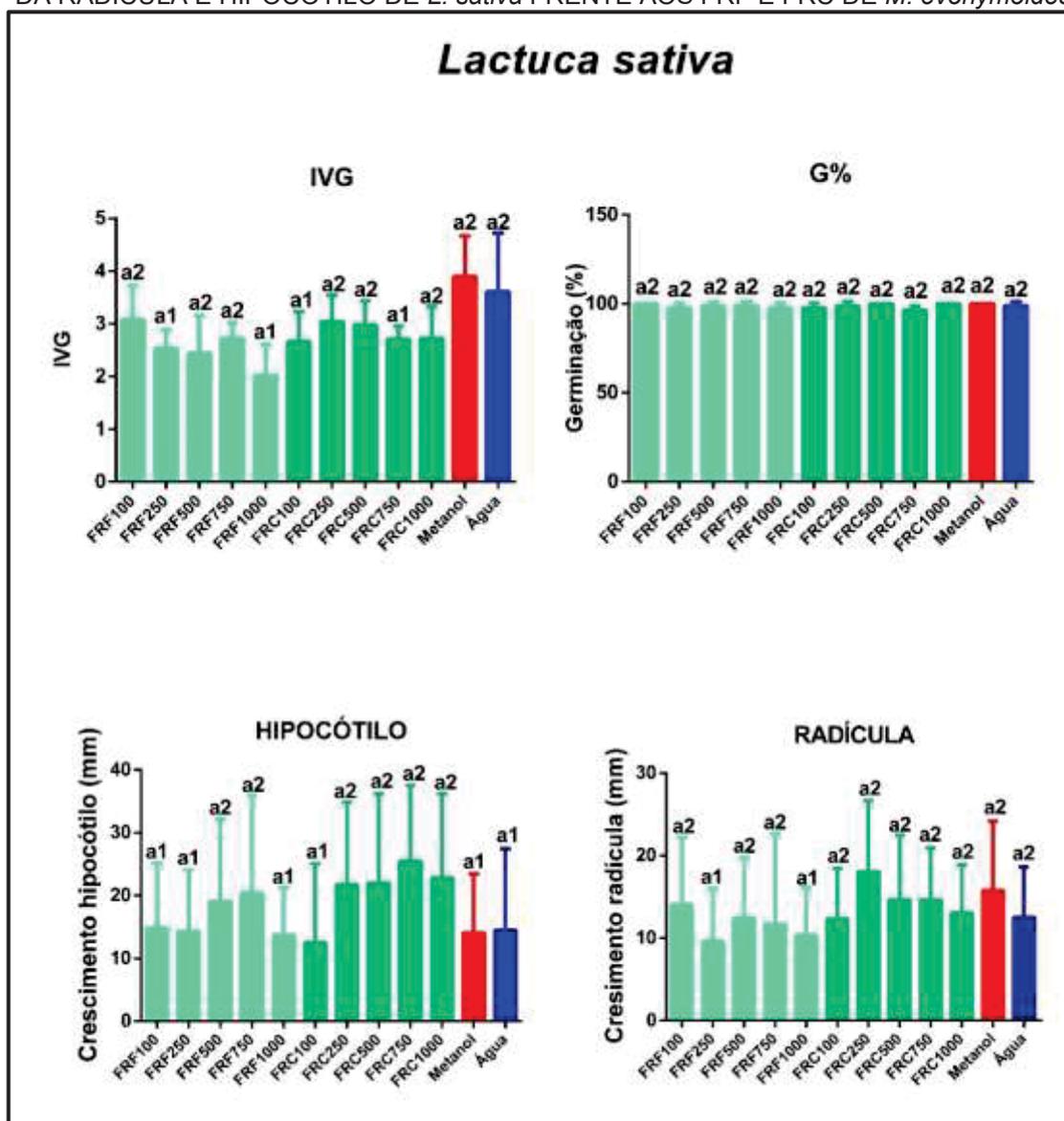


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 50 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração remanescente de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 50 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* FRENTE AOS FRF E FRC DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Remanescente Folhas (FRF), Fração Remanescente Caule (FRC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Extratos que apresentam potencial alelopático devem ser encaminhadas para ensaios em casa de vegetação e podem vir a ser alternativa no controle de plantas daninhas, diminuindo assim o uso de herbicidas e inseticidas, podem ser utilizados no controle de sementes e plântulas diminuindo, dessa forma, as perdas na produção agrícola. Ademais, há relatos na literatura que compostos com atividade alelopática podem ser biodegradáveis, seletivos e menos poluentes que os herbicidas tradicionais (Macías; Castellano; Molinillo, 2000).

4.9.3.2 Teste de Germinação e Crescimento de *Allium cepa*

A TABELA 21 demonstra os efeitos alelopático observados de extrato etanólico e frações de *M. evonymoides* em relação ao IVG e média de germinação das sementes de *A. cepa*. Estatisticamente houve influência estimulatória no IVG em todas as concentrações testadas na FRF, FAEF e FRC (exceto 750 µg/mL), EBC (exceto 500 µg/mL), FAEC (exceto 250 µg/mL). Houve ainda influência nas amostras EBF (exceto 250 e 1000 µg/mL), FHF 750 µg/mL, FCF 250 e 500 µg/mL, FCC 100, 250 e 500 µg/mL. O restante das amostras apresentou resultados semelhantes ao controle água. No que diz respeito a média de germinação não houve diferença estatística. O mesmo foi observado em relação aos controles água e metanol, indicando que o solvente utilizado não influenciou os resultados.

TABELA 21 - INFLUÊNCIA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *M. evonymoides* NO IVG E NA GERMINAÇÃO DE *A. cepa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(continua)

Média IVG <i>Allium cepa</i>						
Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
EBF	1,39 ± 0,23 a <sup>2</sup>	1,21 ± 0,18 a <sup>1</sup>	1,31 ± 0,45 a <sup>2</sup>	1,48 ± 0,32 a <sup>2</sup>	1,16 ± 0,17 a <sup>1</sup>	
FHF	1,18 ± 0,19 a <sup>1</sup>	1,19 ± 0,17 a <sup>1</sup>	1,20 ± 0,13 a <sup>1</sup>	1,23 ± 0,10 a <sup>2</sup>	1,18 ± 0,18 a <sup>1</sup>	
FCF	1,20 ± 0,21 a <sup>1</sup>	1,36 ± 0,13 a <sup>2</sup>	1,31 ± 0,18 a <sup>2</sup>	1,03 ± 0,12 a <sup>1</sup>	1,16 ± 0,25 a <sup>1</sup>	
FAEF	1,26 ± 0,12 a <sup>2</sup>	1,31 ± 0,20 a <sup>2</sup>	1,38 ± 0,17 a <sup>2</sup>	0,99 ± 0,13 a <sup>1</sup>	1,49 ± 0,16 a <sup>2</sup>	
FRF	1,33 ± 0,06 a <sup>2</sup>	1,38 ± 0,14 a <sup>2</sup>	1,34 ± 0,19 a <sup>2</sup>	1,49 ± 0,33 a <sup>2</sup>	1,30 ± 0,49 a <sup>2</sup>	
EBC	1,28 ± 0,21 a <sup>2</sup>	1,25 ± 0,21 a <sup>2</sup>	1,11 ± 0,16 a <sup>1</sup>	1,27 ± 0,14 a <sup>2</sup>	1,26 ± 0,18 a <sup>2</sup>	
FHC	1,18 ± 0,16 a <sup>1</sup>	1,08 ± 0,14 a <sup>1</sup>	0,88 ± 0,19 a <sup>1</sup>	0,93 ± 0,16 a <sup>1</sup>	0,69 ± 0,16 a <sup>1</sup>	
FCC	1,17 ± 0,15 a <sup>2</sup>	1,39 ± 0,44 a <sup>2</sup>	1,37 ± 0,15 a <sup>2</sup>	1,12 ± 0,14 a <sup>1</sup>	1,07 ± 0,13 a <sup>1</sup>	
FAEC	1,36 ± 0,11 a <sup>2</sup>	1,15 ± 0,09 a <sup>1</sup>	1,34 ± 0,28 a <sup>2</sup>	1,33 ± 0,29 a <sup>2</sup>	1,33 ± 0,15 a <sup>2</sup>	
FRC	1,35 ± 0,17 a <sup>2</sup>	1,30 ± 0,30 a <sup>2</sup>	1,38 ± 0,08 a <sup>2</sup>	1,20 ± 0,11 a <sup>1</sup>	1,38 ± 0,16 a <sup>2</sup>	
Água						0,97 ± 0,16 a <sup>1</sup>
Metanol						1,10 ± 0,11 a <sup>1</sup>

Média germinação <i>Allium cepa</i> (%)						(conclusão)
Amostras	Concentração µg/mL					Controles
	100	250	500	750	1000	
EBF	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	
FHF	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	
FCF	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	97,50 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	
FAEF	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	
FRF	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	
EBC	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	97,50 <sup>a1</sup>	
FHC	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	97,50 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	97,50 <sup>a1</sup>	
FCC	98,75 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	
FAEC	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	
FRC	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	100 <sup>a1</sup>	98,75 <sup>a1</sup>	
Água						100 <sup>a1</sup>
Metanol						100 <sup>a1</sup>

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: IVG= Índice de velocidade de germinação. Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC).  
 NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Resultados da média de germinação expressos em %. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

De acordo com os resultados observados na TABELA 20, extratos e frações apresentaram efeito estimulante predominante no IVG, com destaque para FRF que apresentou estímulo em todas as concentrações testadas. Os resultados de inibição ou estímulo de um aleloquímicos está relacionado a concentração e o limite resposta da espécie alvo (Souza Filho *et al.*, 2009), da mesma forma, Rice (1984) revela que o efeito alelopático pode ser inibitório ou estimulatório para espécie receptora em baixo tratamento. Fato que pode explicar a diversidade de resultados encontrados no presente estudo, a exemplo, da EBC que apresentou estímulo nas menores concentrações, EBF que apresentou resultados independentes das concentrações testadas e FHC que não apresentou estímulo em nenhuma das concentrações.

Os resultados são contrários aos resultados observados no estudo conduzido com extrato aquoso de *M. ilicifolia* no qual os autores não observaram efeito significativo sobre a germinação e IVG (Souza *et al.*, 2005).

A TABELA 22 demonstra os resultados observados em relação ao crescimento da radícula e do hipocótilo de *A cepa* frente aos extratos e frações testadas.

TABELA 22 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E COLEÓPTILO DE SEMENTES DE *A. cepa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CAULES DA *M. Evonymoides*

(continua)

Média Crescimento Radícula (mm) <i>Allium cepa</i>						
Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
EBF	19,00 ± 8,99 a <sup>3</sup>	11,90 ± 6,32 a <sup>2</sup>	9,75 ± 4,70 a <sup>2</sup>	9,94 ± 4,61 a <sup>2</sup>	11,22 ± 6,43 a <sup>2</sup>	
FHF	15,68 ± 8,26 a <sup>3</sup>	15,56 ± 9,56 a <sup>3</sup>	8,00 ± 4,83 a <sup>1</sup>	7,79 ± 6,29 a <sup>1</sup>	11,78 ± 6,95 a <sup>2</sup>	
FCF	11,81 ± 4,58 a <sup>2</sup>	12,33 ± 6,74 a <sup>2</sup>	8,28 ± 3,54 a <sup>1</sup>	8,10 ± 1,94 a <sup>1</sup>	10,05 ± 4,77 a <sup>2</sup>	
FAEF	15,35 ± 10,05 a <sup>3</sup>	16,85 ± 8,84 a <sup>3</sup>	14,80 ± 7,53 a <sup>3</sup>	11,60 ± 6,30 a <sup>2</sup>	9,50 ± 2,61 a <sup>2</sup>	
FRF	9,75 ± 5,22 a <sup>2</sup>	7,00 ± 3,40 a <sup>1</sup>	12,68 ± 6,46 a <sup>2</sup>	8,21 ± 3,39 a <sup>1</sup>	11,95 ± 6,12 a <sup>2</sup>	
EBC	16,61 ± 9,19 a <sup>3</sup>	5,50 ± 3,89 a <sup>1</sup>	9,00 ± 4,94 a <sup>1</sup>	14,97 ± 5,17 a <sup>3</sup>	10,17 ± 3,55 a <sup>2</sup>	
FHC	7,89 ± 4,33 a <sup>1</sup>	11,00 ± 4,90 a <sup>2</sup>	12,06 ± 5,76 a <sup>2</sup>	8,36 ± 3,71 a <sup>1</sup>	5,11 ± 2,05 a <sup>1</sup>	
FCC	12,68 ± 4,46 a <sup>2</sup>	9,95 ± 5,56 a <sup>2</sup>	11,25 ± 4,66 a <sup>2</sup>	8,30 ± 3,18 a <sup>1</sup>	9,90 ± 5,58 a <sup>2</sup>	
FAEC	9,22 ± 4,68 a <sup>1</sup>	10,65 ± 5,12 a <sup>2</sup>	11,35 ± 4,75 a <sup>2</sup>	11,55 ± 4,81 a <sup>2</sup>	9,95 ± 3,39 a <sup>2</sup>	
FRC	10,65 ± 6,67 a <sup>2</sup>	14,42 ± 8,84 a <sup>3</sup>	11,95 ± 7,56 a <sup>2</sup>	12,25 ± 6,52 a <sup>2</sup>	13,05 ± 4,67 a <sup>3</sup>	
Água						16,76 ± 9,86 a <sup>3</sup>
Metanol						16,16 ± 7,36 a <sup>3</sup>

Média Crescimento Coleóptilo (mm) <i>Allium cepa</i>						
Concentração µg/mL						
Amostras	100	250	500	750	1000	Controles
EBF	69,61 ± 16,61 a <sup>4</sup>	46,00 ± 21,47 a <sup>3</sup>	25,70 ± 8,49 a <sup>1</sup>	38,06 ± 11,10 a <sup>2</sup>	48,78 ± 19,22 a <sup>3</sup>	
FHF	64,58 ± 15,81 a <sup>4</sup>	51,83 ± 17,91 a <sup>3</sup>	32,89 ± 12,64 a <sup>2</sup>	21,63 ± 8,06 a <sup>1</sup>	52,17 ± 18,90 a <sup>3</sup>	
FCF	27,25 ± 6,94 a <sup>1</sup>	50,87 ± 23,06 a <sup>3</sup>	25,78 ± 16,53 a <sup>1</sup>	29,35 ± 11,38 a <sup>2</sup>	51,30 ± 26,41 a <sup>3</sup>	
FAEF	56,90 ± 23,90 a <sup>4</sup>	62,90 ± 18,25 a <sup>4</sup>	57,50 ± 23,54 a <sup>4</sup>	42,00 ± 16,89 a <sup>3</sup>	27,35 ± 7,25 a <sup>1</sup>	
FRF	23,15 ± 10,09 a <sup>1</sup>	14,95 ± 4,85 a <sup>1</sup>	43,37 ± 13,70 a <sup>3</sup>	30,00 ± 12,47 a <sup>2</sup>	49,00 ± 14,12 a <sup>3</sup>	
EBC	44,17 ± 15,12 a <sup>3</sup>	15,50 ± 5,78 a <sup>1</sup>	48,68 ± 17,80 a <sup>3</sup>	58,95 ± 18,23 a <sup>4</sup>	26,22 ± 8,80 a <sup>1</sup>	
FHC	16,05 ± 7,02 a <sup>1</sup>	46,85 ± 17,66 a <sup>3</sup>	39,35 ± 15,52 a <sup>2</sup>	23,07 ± 4,05 a <sup>1</sup>	22,39 ± 11,14 a <sup>1</sup>	

Média Crescimento Coleóptilo (mm) <i>Allium cepa</i> (conclusão)					
Concentração µg/mL					
<b>FCC</b>	40,58 ± 12,00 a <sup>3</sup>	60,70 ± 12,84 a <sup>4</sup>	36,85 ± 8,04 a <sup>2</sup>	50,30 ± 18,03 a <sup>3</sup>	36,15 ± 11,80 a <sup>2</sup>
<b>FAEC</b>	59,28 ± 27,84 a <sup>4</sup>	53,80 ± 18,70 a <sup>3</sup>	21,45 ± 15,07 a <sup>1</sup>	62,15 ± 18,01 a <sup>4</sup>	54,40 ± 19,98 a <sup>3</sup>
<b>FRC</b>	48,15 ± 13,84 a <sup>3</sup>	62,47 ± 21,60 a <sup>4</sup>	53,40 ± 19,95 a <sup>3</sup>	59,10 ± 18,10 a <sup>4</sup>	19,90 ± 7,60 a <sup>1</sup>
<b>Água</b>					62,71 ± 19,48 a <sup>4</sup>
<b>Metanol</b>					64,17 ± 14,37 a <sup>4</sup>

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e ± Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

No que se refere ao crescimento da radícula de *A. cepa*, houve inibição sutil do crescimento no EBF e FRC (exceto 250 e 1000 µg/mL), FAEF (750 e 1000 µg/mL) e inibição mais acentuadas na FHF e FCF (500 e 750 µg/mL), FRF (250 E 750 µg/mL), EBC (250 e 500 µg/mL), FHC (exceto 250 e 500 µg/mL), FCC (750 µg/mL), FAEC (100 µg/mL). Destaque para as frações FCF, FRF e FAEC que apresentaram inibição no crescimento da radícula em todas as concentrações testadas em relação ao controle.

No que tange o crescimento do coleóptilo de *A. cepa*, foi observado comportamento similar ao controle água apenas nas amostras: EBF e FHF (100 µg/mL), EBC (750 µg/mL), FCC (250 µg/mL), FAEC (100 e 750 µg/mL), FRC (250 e 750 µg/mL). A FAEF foi a única que apresentou comportamento similar ao controle em três das cinco concentrações testadas (100, 250 e 500 µg/mL).

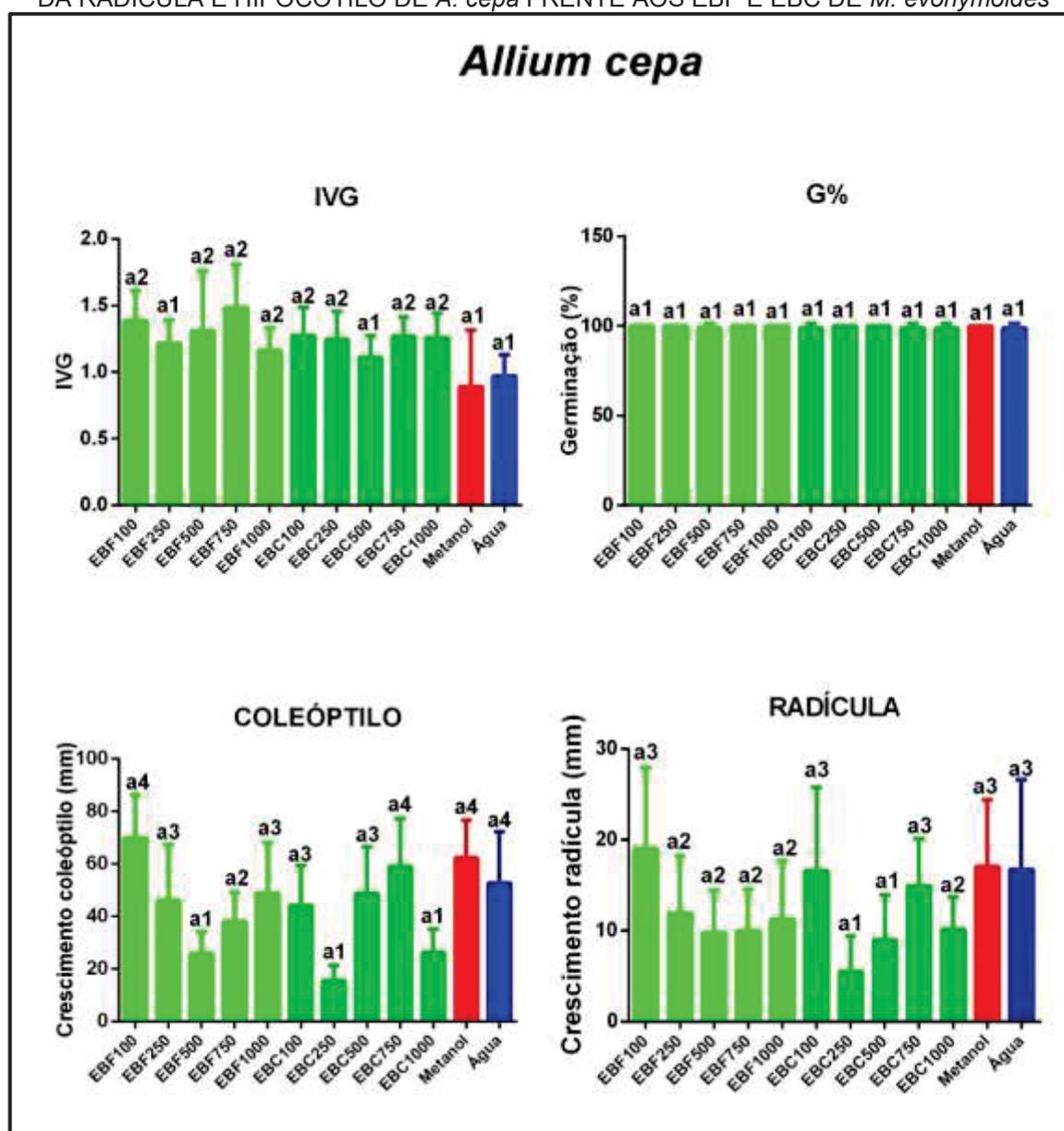
As outras amostras todas apresentaram inibição do crescimento do coleóptilo ora mais acentuada ora menos acentuada conforme demonstrado na TABELA 22, com destaque para FCF, FRF e FHC que apresentaram inibição em todas as concentrações avaliadas.

A avaliação do crescimento do coleóptilo e radícula são importantes ferramentas na alelopatia a fim de determinar as mudanças possíveis nas plântulas pelas substâncias testes (Piña-Rodríguez; Figliolia; Peixoto, 2004). A redução das

partes aéreas das plantas pode diminuir a sua capacidade de competição por luz e a diminuição da raiz pode diminuir a competitividade com outras plantas e afetar de forma prejudicial a reprodutibilidade (Plaza; Castillo; Naulin, 2022; Ninkovic, 2003).

A FIGURA 51 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula dos extratos brutos de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 51 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE AOS EBF E EBC DE *M. evonymoides*

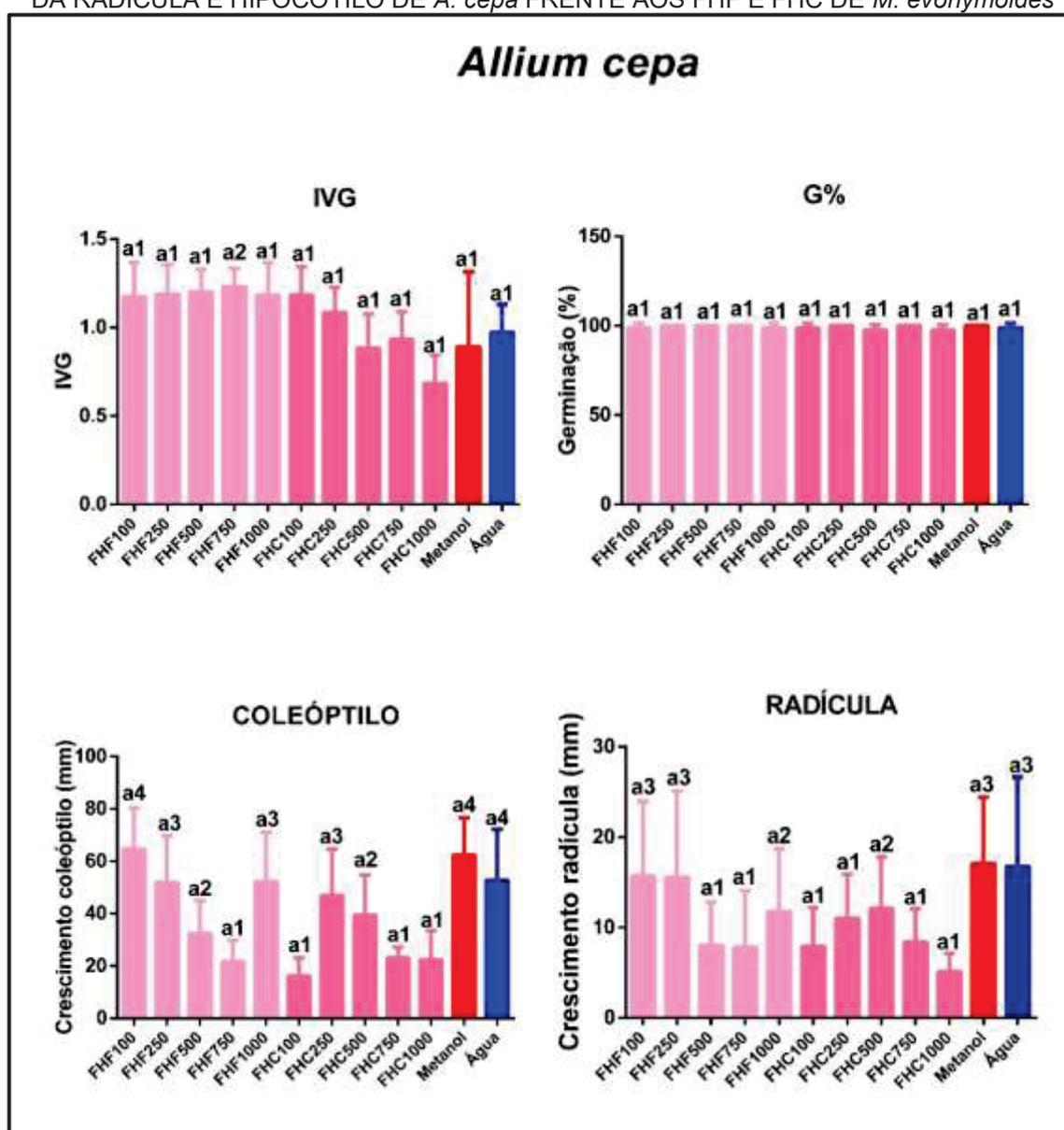


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Extrato Bruto Caule (EBC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 52 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração hexano de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 52 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE AOS FHF E FHC DE *M. evonymoides*

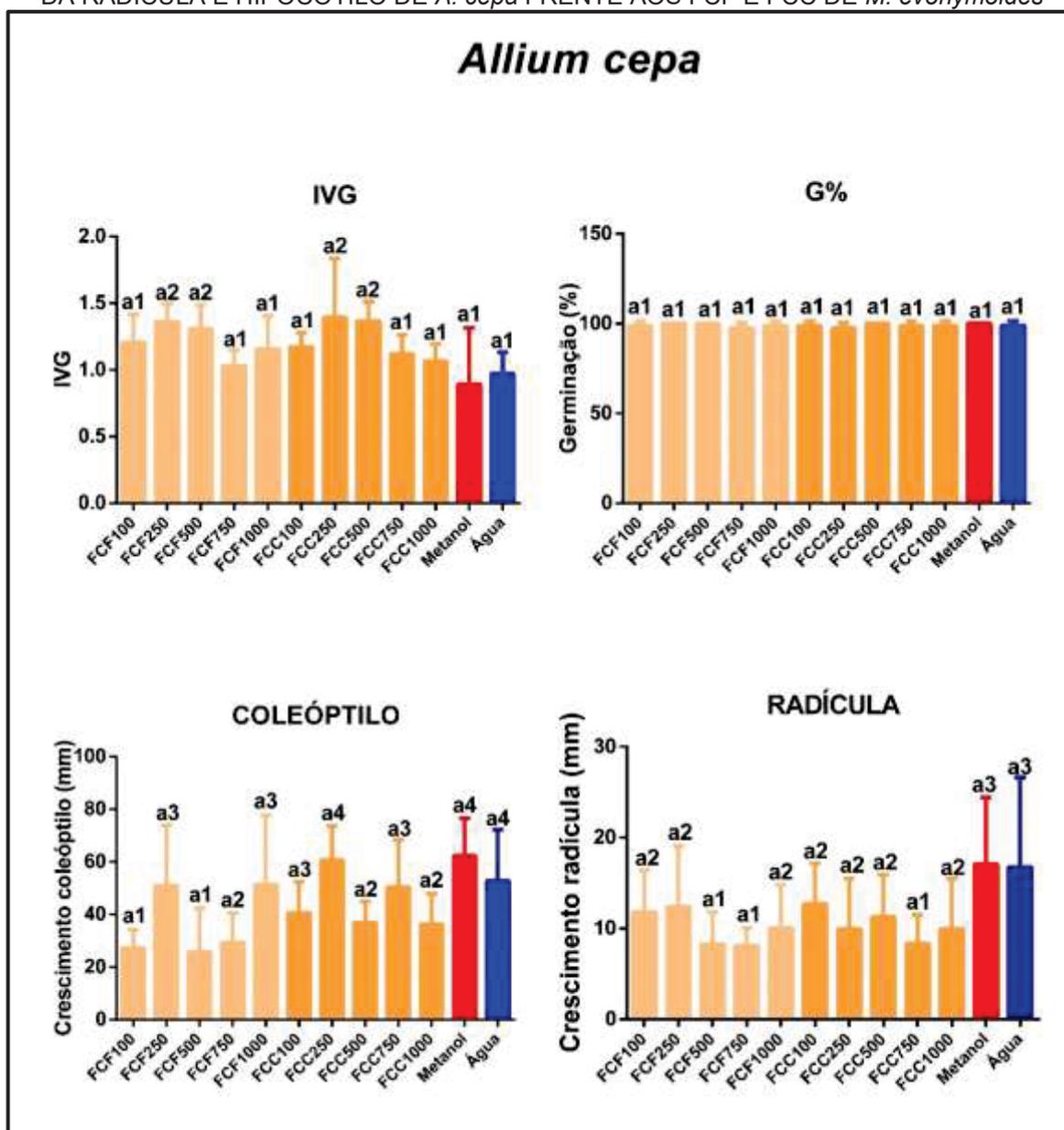


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Hexânica Caule (FHC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 53 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração clorofórmio de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 53 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE AOS FCF E FCC DE *M. evonymoides*

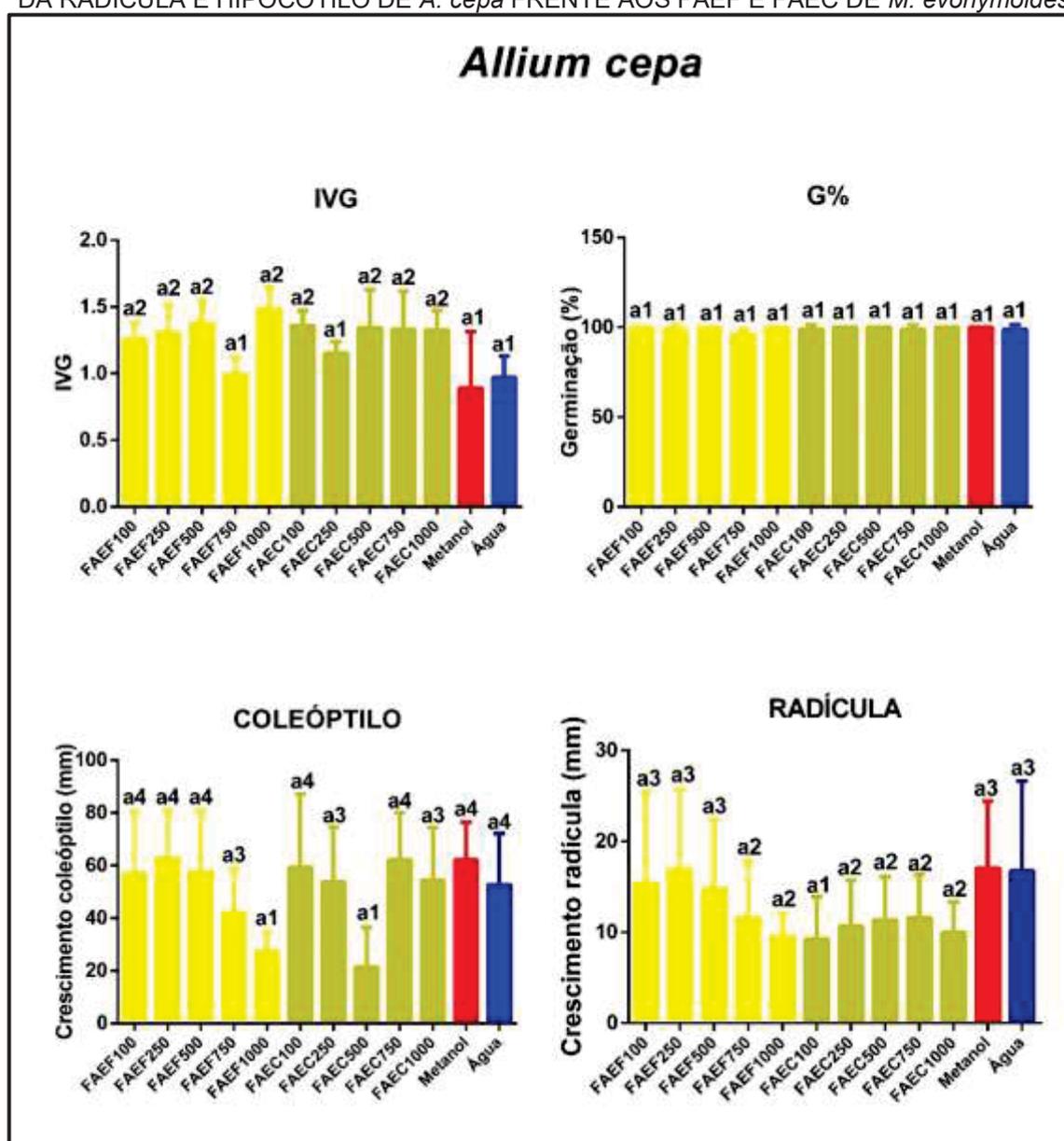


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Índice de velocidade de germinação (IVG), percentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 54 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração acetato de etila de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 54 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE AOS FAEF E FAEC DE *M. evonymoides*

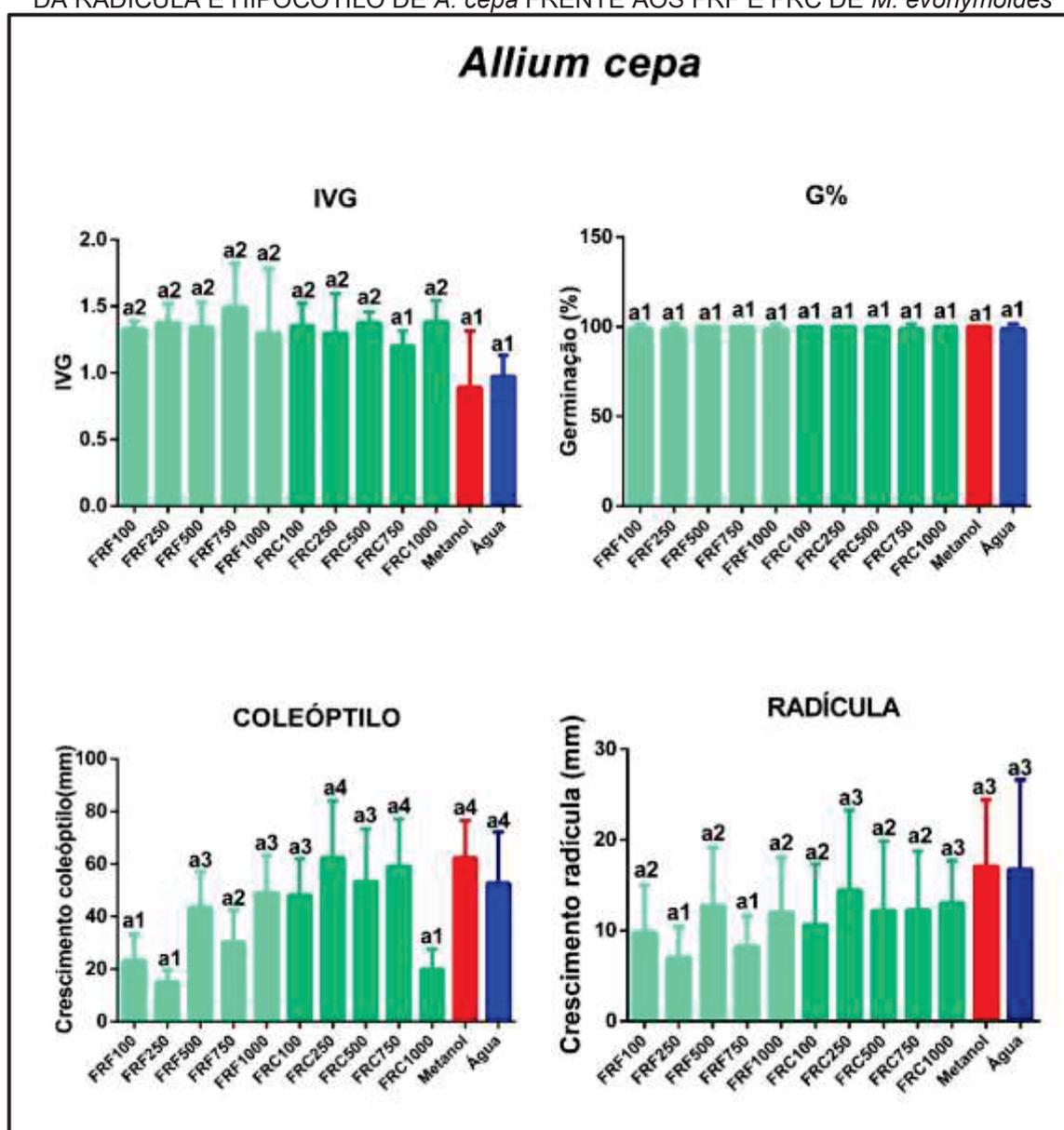


FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Índice de velocidade de germinação (IVG), percentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

A FIGURA 55 ilustra a inibição do IVG, a % de germinação, o crescimento de hipocótilo e radícula da fração remanescente de folhas e caule de *M. evonymoides* separadamente. Os controles são os mesmos para todas as amostras.

FIGURA 55 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO, % DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *A. cepa* FRENTE AOS FRF E FRC DE *M. evonymoides*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Fração Remanescente Folhas (FRF), Fração Remanescente Caule (FRC), Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (G%), mm: comprimento em milímetros. NOTA: Resultados expressos em média aritmética e  $\pm$  Desvio padrão. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Morel e Gayoso (2018), realizaram o estudo alelopático com extrato etanólico de *M. ilicifolia* no qual os resultados mostraram um efeito negativo na germinação de *Allium fistulosum* L. nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL. e no crescimento radicular no tratamento de 10 mg/mL em relação ao controle. Embora a semente alvo tenha sido *A. fistulosum* pode-se observar a variabilidade nos resultados. Da mesma forma, ocorreu no presente estudo, que evidenciou tanto bioestimulação quanto bioinibição no crescimento radicular de extratos e frações analisadas (Morel; Gayoso, 2018). Quanto a germinação não foi observado diferença estatística quando comparados aos controles.

O ensaio da atividade alelopática é um estudo preliminar que tem por objetivo avaliar a divisão celular vegetal e serve de base para direcionamento de possíveis atividades, a exemplo, da atividade farmacológica, entre outros. Desta forma, baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que a *M. evonymoides* seja fonte de aleloquímicos, portanto, ser utilizada em ensaios alelopático de novos modelos de herbicidas e em pesquisas com espécies invasoras.

#### 4.9.4 Avaliação da capacidade larvicida em *Aedes aegypti*

A atividade larvicida de extrato etanólico e frações de *M. evonymoides* foi avaliada contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Foi possível identificar que extratos e frações de *M. evonymoides* induzem a mortalidade de larva de *Aedes aegypti* (TABELA 23). Com exceção da FRF e FHF todas as amostras testadas apresentaram  $CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ , revelando potencial no controle de larvas de terceiro estágio. Destaque para a FAEF que apresentou  $CL_{50} = 132,91 \mu\text{g/mL}$ . A FHF apresentou  $CL_{50} = 235,81 \mu\text{g/mL}$ , indicando significativo potencial larvicida. Em relação ao perfil de mortalidade é possível verificar acentuada mortalidade na concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Todas as frações de caule apresentaram mortalidade acima de  $90\% \pm 0,5$ . Em relação as amostras das folhas, a FAEF apresentou a taxa de mortalidade de  $95\% \pm 0,5$  e o EBF, FCF e FHF apresentaram  $(87,5\% \pm 0,95)$ ,  $(85\% \pm 0,5)$  e  $(82\% \pm 0,5)$  respectivamente.

TABELA 23 - INDUÇÃO DE MORTALIDADE EM LARVAS DE *A. aegypti* POR EXTRATOS E FRAÇÕES DE *M. evonymoides*

Amostras	Concentração (µg/mL)	Mortalidade (%) ± SD	LC <sub>50</sub> (µg/mL) (LCL - UCL)	LC <sub>90</sub> (µg/mL) (LCL - UCL)	x <sup>2</sup>	(df)
EBF	10	7,5 ± 0,5	183,54 (132,51-257,02)	>1000	7,1	4
	100	35 ± 0,57				
	500	70 ± 0,81				
	1000	87,5 ± 0,95				
FHF	10	0,25 ± 0,5	235,81 (175,22-324,09)	>1000	5,86	4
	100	32,5 ± 0,5				
	500	65 ± 0,57				
	1000	82,5 ± 0,5				
FCF	10	10 ± 0	194,021 (135,9-286,42)	>1000	2,9	4
	100	42,5 ± 0,5				
	500	67,5 ± 0,5				
	1000	85 ± 0,57				
<b>FAEF</b>	<b>10</b>	<b>5 ± 0,57</b>	<b>132,91</b> <b>(98,19-177,1)</b>	<b>960,53</b> <b>(624,6-1811,10)</b>	<b>7,54</b>	<b>4</b>
	<b>100</b>	<b>47,5 ± 0,5</b>				
	<b>500</b>	<b>75 ± 0,57</b>				
	<b>1000</b>	<b>95 ± 0,57</b>				
FRF	10	0 ± 0	>1000	>1000	4,97	4
	100	5 ± 0,57				
	500	32,5 ± 0,5				
	1000	42,5 ± 0,5				
EBC	10	7,5 ± 0,5	169,22 (124,18-231,34)	>1000	7,22	4
	100	35 ± 0,57				
	500	72,5 ± 0,5				
	1000	92,5 ± 0,5				
FHC	10	7,5 ± 0,5	169,22 (124,18-231,34)	>1000	7,22	4
	100	35 ± 0,57				
	500	72,5 ± 0,5				
	1000	92,5 ± 0,5				
<b>FCC</b>	<b>10</b>	<b>7,5 ± 0,5</b>	<b>143,7</b> <b>(102,72-199,14)</b>	<b>&gt;1000</b>	<b>5,07</b>	<b>4</b>
	<b>100</b>	<b>42,5 ± 0,5</b>				
	<b>500</b>	<b>70 ± 0,0</b>				
	<b>1000</b>	<b>90 ± 0,8</b>				
FAEC	10	5 ± 0,57	161,4 (120,69-216,97)	960,53 (624,6-1811,09)	7,5	4
	100	47,5 ± 0,5				
	500	70 ± 0,57				
	1000	95 ± 0,57				
FRC	10	5 ± 0,57	161,4 (120,69-216,97)	960,53 (624,6-1811,09)	7,5	4
	100	47,5 ± 0,5				
	500	75 ± 0,57				
	1000	95 ± 0,57				

FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC). NOTA: Resultados expressos em média aritmética e ± Desvio padrão. Controle positivo matou 100% das larvas de *A. aegypti*; (LC<sub>50</sub>) concentração letal capaz de matar 50% das larvas expostas; (LC<sub>90</sub>) concentração letal capaz de matar 90% das larvas expostas; (SD) desvio padrão (UCL) limite superior de confiança de 95%; (LCL) limite de confiança 95% inferior; x<sup>2</sup>= qui-quadrado, df= graus de liberdade; (n.d) não definido; (n.s) não significativo (p<0,05).

Nos estudos conduzidos com extrato de caule da espécie *Monteverdia oblongata*, Touré *et al.* (2017) observou a taxa de mortalidade de  $(95 \pm 0,2)$  % para as larvas de *Aedes aegypti* da estirpe Paea (susceptível a todos os inseticidas) e  $(83 \pm 0,2)$  % da estirpe de campo Cayenne (resistente a piretróides e organofosforados) respectivamente, após exposição de 24 horas na dose de 100 µg/mL (Touré *et al.*, 2017).

Martins *et al.* (2021) conduziu o teste larvicida com a espécie *Maytenus guianensis*, no qual, observou CL<sub>50</sub> 113 µg/mL para o extrato bruto etanólico, além de observar a ejeção do intestino das larvas de *Aedes aegypti*. O composto isolado tingenona B (triterpeno) da espécie apresentou CL<sub>50</sub> de 148 µg/mL (Martins *et al.*, 2021), sugerindo que ativos com ação sinérgica podem estar presentes no extrato bruto, além do triterpeno isolado (tingenona B). As substâncias foram capazes de causar alterações morfológicas e a morte das larvas do mosquito (Martins *et al.*, 2021). Meneguetti *et al.* (2016), observaram que o extrato bruto de *Maytenus guianensis* inibiu em 90-100% o crescimento de promastigostas de *Leishmania amazonensis*, indicando que a espécie tem potencial antiparasitário (Meneguetti *et al.*, 2016).

O uso de inseticidas sintéticos (piretróides e organofosforados) previnem ou minimizam a proliferação do *Aedes aegypti* (Lima *et al.*, 2006), são amplamente utilizados no seu controle (Braga, 2007), e estão listados nas estratégias adotadas por parte da gestão pública. Em contrapartida, o uso frequente dessas classes de inseticidas pode favorecer o surgimento de insetos resistentes, o que aumenta ainda mais o desafio do controle do inseto e conseqüentemente, controle de diversas doenças que são transmitidas pelo *Aedes aegypti* e ainda propiciar o surgimento de novas doenças, por apresentarem certa toxicidade ao ser humano, além de prejudicar o meio ambiente (Betim *et al.*, 2021; Braga, 2007).

Além dos inconvenientes apontados com o uso de inseticidas sintéticos, a alteração climática, relacionada ao aumento da temperatura e quantidade de chuvas, é um fator importante para o aumento do número de casos de dengue (Kimura; Fontes, 2022). Um levantamento realizado entre os anos de 2016 e 2021 apontaram que os casos da doença, no estado do Paraná, vêm aumentando gradativamente ao longo dos anos. Outro achado relevante do estudo foi a falta de disponibilidade de inseticidas sintéticos pelo Ministério da Saúde, fato que pode estar relacionado ao aumento de casos nesse período (Kimura; Fontes, 2022).

Os metabólitos secundários têm sido relatados como componentes ativos de extratos vegetais que apresentam atividade inseticida e tem despertado cada vez mais interesse (Dalarmi, *et al.*, 2015; Dos Anjos *et al.*, 2023). Destaque para os terpenoides que são amplamente identificados em óleos essenciais, extratos e frações purificadas. Esta classe, principalmente os monoterpenos são considerados os mais ativos, portanto com maior possibilidade de aplicação em bioinseticidas, além de apresentarem baixa toxicidade contra mamíferos (Isman, 2000; Silvério *et al.*, 2020).

#### 4.9.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A capacidade antimicrobiana e antifúngica de extrato etanólico e frações de *M. evonymoides* foram testadas frente aos microrganismos *S. aureus* (ATCC 25913), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 14053) respectivamente. A maior concentração testada foi 1000 µg/mL. Os resultados da atividade antimicrobiana e antifúngica (TABELA 24) demonstraram que o extrato bruto e frações não foram efetivos nas condições testadas.

TABELA 24 - RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE EXTRATOS E FRAÇÕES *M. evonymoides*.

<b>Amostras CIM µg/mL</b>	<b><i>S. aureus</i> ATCC 25913</b>	<b><i>E. Coli</i> ATCC 25922</b>	<b><i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	<b><i>C. albicans</i> ATCC 14053</b>
EBF	>1000	>1000	>1000	>1000
FHF	>1000	>1000	>1000	>1000
FCF	>1000	>1000	>1000	>1000
FAEF	>1000	>1000	>1000	>1000
FRF	>1000	>1000	>1000	>1000
EBC	>1000	>1000	>1000	>1000
FHC	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>FCC</b>	>1000	>1000	>1000	>1000
FAEC	>1000	>1000	>1000	>1000
FRC	>1000	>1000	>1000	>1000

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Extrato Bruto Folhas (EBF), Fração Hexânica Folhas (FHF), Fração Clorofórmio Folhas (FCF), Fração Acetato de Etila Folhas (FAEF), Fração Remanescente Folhas (FRF), Extrato Bruto Caule (EBC), Fração Hexânica Caule (FHC), Fração Clorofórmio Caule (FCC), Fração Acetato de Etila Caule (FAEC), Fração Remanescente Caule (FRC). Resultados expresso em µg.mL.

Santos *et al.*, (2008) classifica a atividade antimicrobiana e antifúngica quanto a concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Quando a atividade é observada em até 100 µg/mL, a amostra apresenta bom potencial inibitório, potencial inibitório entre 100-500 µg/mL indica atividade moderada, potencial inibitório entre 500-1000 µg/mL indica atividade fraca e quando os resultados são superiores a 1000 µg/mL são considerados inativos.

A FIGURA 56 ilustra o resultado negativo de atividade antimicrobiana frente as cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*. De acordo com os resultados apresentados é possível constatar visualmente que nenhuma das amostras nas condições avaliadas apresentaram atividade antimicrobiana. A coloração vermelha ocorre pela redução de TTC indicando a presença de células ativas, ao passo que a ausência de coloração vermelha indica a inibição de crescimento do microrganismo testado. Na avaliação da *C. albicans* é possível visualizar o crescimento fúngico em todas os poços (FIGURA 56D) a exceção do controle positivo, indicando ausência de atividade antifúngica de extratos e frações.

FIGURA 56 – RESULTADO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Monteverdia evonymoides*



FONTE: A autora (2021).

NOTA: A: *E. coli*, B: *P. aeruginosa*, C: *S. aureus*, D: *C. albicans*.

Vários estudos relacionados a atividade antimicrobiana e antifúngica foram conduzidos com espécies do gênero *Monteverdia*, dentre eles, *M. ilicifolia* (Rocha, 2003; Colacite, 2015; Vargas *et al.*, 2020) *Maytenus distichophylla* (Ferreira, 2014), *Maytenus guianensis* (Da Silva *et al.*, 2018), *Maytenus imbricata* (Rodrigues, 2011), *Maytenus rígida* (Santos *et al.*, 2011).

Vargas *et al.* (2020) comparou a atividade antimicrobiana de extrato aquoso e extrato hidroalcólico de *M. ilicifolia* nas concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL. O extrato aquoso apresentou atividade antimicrobiana apenas na concentração de 120 µg/mL contra *S. aureus*, ao passo que o extrato hidroalcólico apresentou atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*.

Colacite (2015), em seus estudos apontou atividade inibitória mínima de extrato bruto hidroalcólico de *M. ilicifolia* contra *S. aureus* e *E. coli* de 500 µg/mL e 4000 µg/mL. No mesmo estudo, o autor verificou a concentração bactericida mínima, no qual ele observou resultado positivo na concentração de 1000 µg/mL contra *S. aureus*.

Rocha (2003) fez um estudo comparativo com extratos bruto metanólico e frações entre duas espécies, *M. ilicifolia* e *M. rígida*, frente as cepas *S. aureus*, *Proteus mirabilis*, *Micrococcus flavus*, *E. coli* pela técnica de difusão em discos, no qual avaliou a resistência ou sensibilidade. Apenas o extrato bruto metanólico de *M. ilicifolia* e *M. rígida* apresentou sensibilidade frente *S. aureus*. Quando avaliado a atividade antifúngica frente *C. albicans* e *C. krusei*, nenhuma das amostras apresentou efetividade.

No estudo conduzido com *Maytenus distichophylla*, os autores realizaram o teste de atividade antimicrobiana por meio da metodologia CIM de extrato hexânico (EHE), extrato clorofórmio (ECL), além de outras frações, frente as cepas *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e a levedura *C. albicans*. Dentre todas as amostras testadas apenas o EHE foi ativo frente ao *B. cereus* e ECL foi ativo frente a *S. aureus* apenas (Ferreira, 2014). Da Silva *et al.* (2018) conduziu os testes antimicrobianos com extrato hexânico de *Maytenus guianensis* e relatou atividade antimicrobiana frente *S. aureus* e *S. pneumoniae* (0,37 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente). Ambos os autores atribuem a atividade na fração hexânica devido a fatores sinérgicos que podem estar presentes na planta, além dos triterpenos, amplamente encontrados no gênero *Monteverdia* e geralmente concentrados na fração mais apolar (Ferreira, 2014; Da Silva *et al.*, 2018).

Rodrigues (2011) observou atividade antimicrobiana promissora em extrato, frações e isolados da espécie *Maytenus imbricata* sobre a *S. aureus*, *S. typhimurium* e sobre *C. albicans*. O autor atribui os resultados aos componentes fitoquímicos presentes no caule de *Maytenus imbricata*, predominantemente os terpenos; em contrapartida, no ensaio realizado frente *A. salina* para verificação de toxicidade, o autor observou toxicidade em todas as amostras testadas, com CL<sub>50</sub> variando entre 0,15 µg/mL e 384,93 µg/mL.

Santos *et al.* (2011) realizou o estudo da atividade antimicrobiana com extrato etanólico e fração acetato de etila de *M. rígida* contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*; cepas de *Salmonella* sp. seguindo a metodologia de difusão em meio sólido e observou resultado positivo somente contra *S. aureus*. Bruni *et al.* (2006) seguiu a mesma metodologia com extrato etanólico de *Maytenus krukovii* bark contra *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e observou resultado negativo em todas as cepas testadas, com exceção, da atividade antifúngica fraca contra fungo fitopatogénico *P. ultimum* (Bruni *et al.*, 2006).

Todos os autores relatam em seus estudos que os resultados variam de acordo com alguns fatores, a exemplo de: local da coleta, época da colheita, preparo da amostra, método de extração, composição fitoquímica dos extratos, além do sinergismo presente na planta (Rocha, 2003; Rodrigues, 2011; Santos *et al.*, 2011, Ferreira, 2014; Colacite, 2015; Da Silva *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2020), fato que pode explicar o resultado negativo observado no presente estudo.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A atividade farmacológica de *M. evonymoides* foi avaliada por meio de modelos de nocicepção mecânica (teste da formalina e carragenina). Os testes foram conduzidos com EBF e EBC.

O teste da formalina é um modelo de nocicepção química, sensível para várias classes de drogas analgésicas. Este teste consiste em duas fases diferentes que são separadas por tempo, a primeira fase (fase neurogênica) é o período de 0 a 5 min e a segunda fase (fase inflamatória) medida entre 15 a 30 min; a avaliação consiste no período de tempo (em segundos) que cada animal despendeu lambendo a pata injetada com formalina (Assini; Fabrício; Lang, 2013). A fase inicial, resultante da

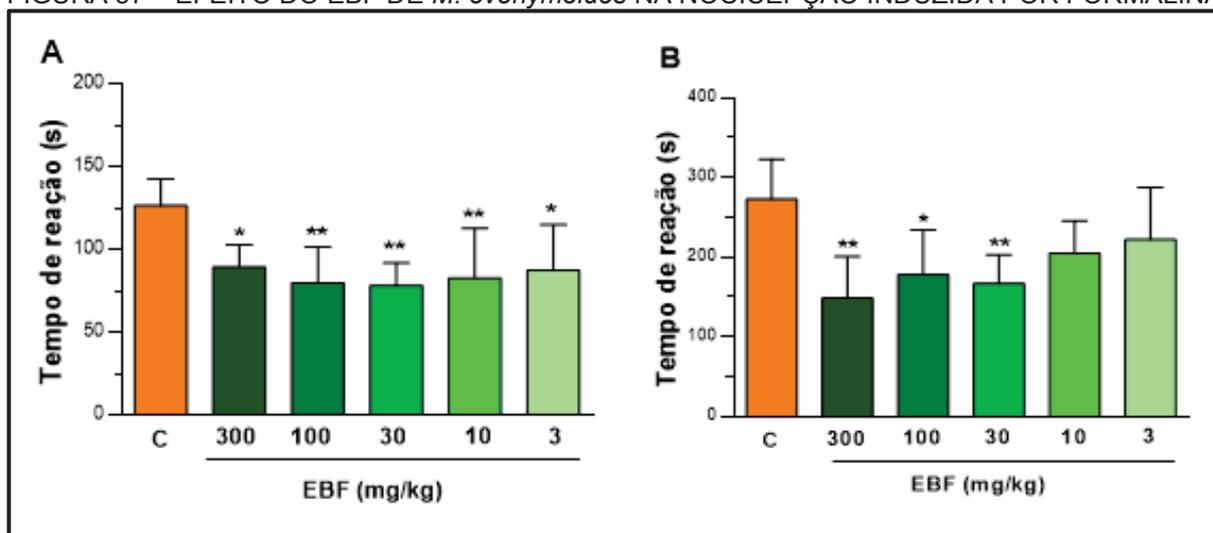
estimulação química direta dos nociceptores é de curta duração e se caracteriza pela ativação das fibras C devido a estímulos periféricos e se inicia imediatamente após a injeção da formalina; a segunda fase (nocicepção inflamatória) é um período mais longo e persistente causado por inflamação tecidual local e também por alterações funcionais no corno dorsal da medula espinhal (Gorzalczany *et al.*, 2011; Da Silva Almeida *et al.*, 2021).

O modelo da carragenina foi utilizado para verificar a atividade antinociceptiva a estímulo mecânico. Trata-se de um polissacarídeo sulfatado extraído das algas marinhas, que ao ser injetado na pele provoca reação inflamatória tecidual, por isso é amplamente utilizado para elucidação dos efeitos entiedematogênico de produtos naturais (Da Silva Almeida *et al.*, 2021). Apresenta duas fases inflamatórias: na primeira hora, logo após injeção da carragenina, há aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina; na segunda hora, o aumento da permeabilidade é resultado da liberação de cininas. Na terceira hora, o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido à ação das prostaglandinas (Favre-Guilmard; Chabrier; Kalinichev, 2017). O processo inflamatório gerado por drogas produz alodínia e hiperalgesia, que podem ser mensuradas por testes mecânicos. O teste de *Von Frey* é um ensaio comum em roedores para medir nocicepção além de ser muito útil para simular condições clínicas com sensibilidade cutânea aumentada (Souza; Casais-e-Silva; Aguiar, 2020).

#### 4.10.1 Nocicepção induzida por formalina

Os resultados apresentados na FIGURA 57 mostram que no teste da formalina o EBF da *M. evonymoides* administrado aos animais produziu uma inibição na primeira fase (fase neurogênica) em todas as doses. Na segunda fase (inflamatória) as doses de 30, 100 e 300 mg/kg produziram efeito antinociceptivo quando comparado ao grupo controle.

Em relação a inibição média foi possível observar que na primeira fase todas as doses apresentaram porcentagem de inibição similar, sendo de  $29 \pm 4\%$  em 300,  $37 \pm 7\%$  em 100,  $38 \pm 4\%$  em 30,  $34 \pm 9\%$  em 10 e  $31 \pm 8\%$  em 3 mg/kg. Na segunda fase a porcentagem de inibição foi mais pronunciada na concentração de 300mg/kg com  $46 \pm 8\%$ , seguida de  $39 \pm 5\%$  na concentração de 30mg/kg.

FIGURA 57 – EFEITO DO EBF DE *M. evonymoides* NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

FONTE: A autora (2024).

NOTA: Efeito do EBF (3-300mg/kg v.o.) na fase neurogênica (painel A) e na fase inflamatória (painel B) da nocicepção induzida por formalina. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 8 animais. C: controle formalina; EBF: extrato bruto de folhas; s: segundos. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste Newman-Keuls).

A formalina é um estímulo químico que produz uma nocicepção bifásica distinta. Em camundongos, a primeira fase inicia-se logo após a injeção e se estende até 5 min, seguida pelo período quiescente, no qual ocorre a diminuição da sensibilidade. Na sequência inicia-se a segunda fase de nocicepção em torno dos 15 min até 30 min (Araújo *et al.*, 2008). Estas fases têm propriedades diferentes e são ferramentas muito úteis, pois além de avaliar a potência de analgésicos, também auxiliam na elucidação dos mecanismos de dor e analgesia. Os analgésicos apresentam ação diferente na primeira e segunda fase. A morfina, um fármaco opioide de ação central que atua na via cininérgica, inibe a primeira e a segunda fase, por esse motivo é amplamente utilizada como controle (Hunskar *et al.*, 1985). Fármacos como a dexametasona, hidrocortisona e indometacina inibem somente a segunda fase que está relacionada a uma ação periférica (Araújo *et al.*, 2008).

No estudo conduzido por Veloso *et al.* (2014) com raízes de *M. imbricata* os autores observaram um efeito antinociceptivo do extrato bruto, extrato metanólico e extrato acetato de etila significativo em comparação com o grupo controle. Quando o experimento foi realizado com o componente isolado tingenona a inibição observada foi na segunda fase do teste da formalina em comparação ao grupo controle demonstrando, dessa forma, ação na primeira e segunda fase (Veloso *et al.*, 2014).

Extratos obtidos por decocção das folhas da espécie *M. truncata* exibiram considerável atividade antinociceptiva e antiedematogênica no teste de edema de pata induzido por formaldeído, mostrando que a dose de 120 mg/kg do decocto apresentou melhor efeito antinociceptivo que as demais doses estudadas (Fonseca *et al.*, 2007).

A atividade antinociceptiva de extrato etanólico e fração acetato de etila de *Maytenus rigida* Mart., bem como o componente isolado (-)-4'-metilepigalocatequina (MEGC), foi demonstrada *in vivo*. Os autores observaram inibição significativa da fase inicial e da fase secundária da dor induzida por formalina (50 e 26,5%, respectivamente) com a administração oral de MEGC, enquanto a indometacina (controle) inibiu apenas a segunda fase do ensaio (41,2%) (Martins *et al.*, 2012).

Da mesma forma, Conceição (2010) observou que o extrato etanólico da entrecasca da *M. rigida* quando administrado por via oral foi capaz de inibir tanto a primeira fase quanto a segunda-fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. O autor sugere que a ação antinociceptiva se deu através de participação de receptores opióides e/ou inibição da COX e, conseqüentemente, da síntese de PGs (Conceição, 2010).

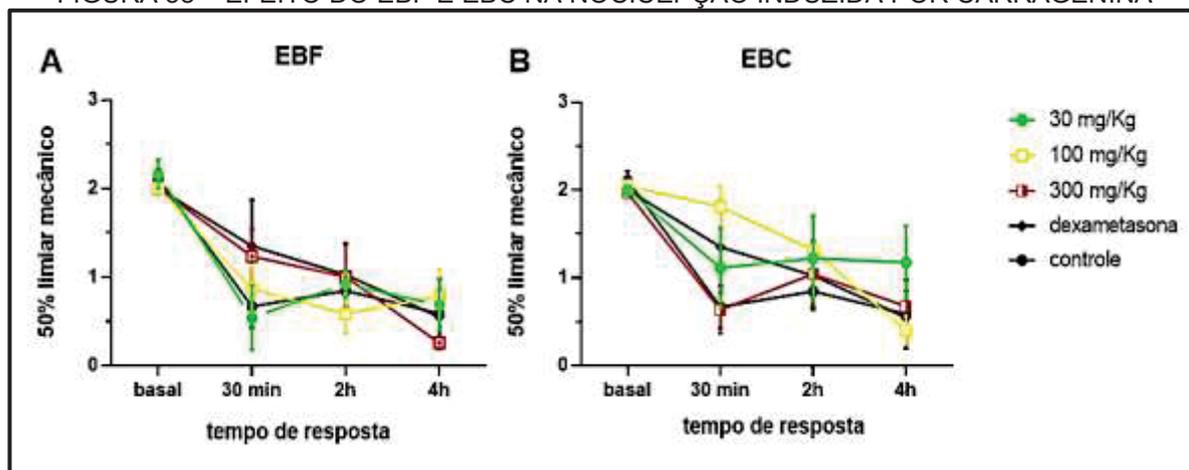
Diante do exposto e considerando o potencial farmacológico descrito no gênero *Monteverdia*, pode-se afirmar que o extrato de folhas *M. evonymoides* apresenta potencial farmacológico promissor, porém, mais estudos se fazem necessários para comprovar o efeito antinociceptivo e elucidar o mecanismo de ação envolvido.

#### 4.10.2 Nocicepção induzida por carragenina

Os resultados relacionados a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina são ilustrados na FIGURA 58. Os dados demonstram que o limiar mecânico dos animais tratados com o EBF (Painel A) nas concentrações 30 e 100 mg/kg não diferiu do controle, indicando que o extrato das folhas não apresenta efeito antinociceptivo nessas concentrações. Por outro lado, na concentração de 300 mg/kg, os animais apresentaram um limiar mais elevado, semelhante ao controle dexametasona, o que poderia indicar um efeito antinociceptivo e/ou antiinflamatório do extrato nessa concentração. Por sua vez, o EBC (Painel B) apresentou um limiar

mais elevado na concentração de 100 mg/kg, indicando um possível efeito antinociceptivo e/ou antiinflamatório nessa concentração. Tais efeitos foram observados no tempo de 30 minutos, mas não se estenderam nos demais tempos avaliados (2 e 4 horas), indicando uma resposta de curta duração

FIGURA 58 – EFEITO DO EBF E EBC NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CARRAGENINA



FONTE: A autora (2024)

NOTA: Painel A: efeito no EBF (extrato bruto de folhas); Painel B: efeito no EBC (extrato bruto do caule)

O edema da pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda caracterizada por uma fase inicial na qual ocorre o aumento da permeabilidade vascular que envolve uma resposta gradual e complexa (Winter *et al.*, 1962). Estão relacionados a essa resposta a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, histamina, prostaglandinas e serotonina (Di Rosa *et al.*, 1971). A presença de flavonoides, triterpenos e esteroides confirmados no perfil fitoquímico de *M. evonymoides* pode estar relacionado a esse efeito antinociceptivo.

A investigação fitoquímica realizada com espécies de *Monteverdia* mostrou que os triterpenoides isolados exibem potentes efeitos inibitórios na produção de prostaglandina E2 (PGE2) em macrófagos de camundongos estimulados com uma endotoxina bacteriana (Reyes *et al.*, 2006). Os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação, inibindo a produção de citocinas pró- inflamatórias, modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), portanto, estão relacionados a vários processos biológicos, como atividades anti-hepatotóxica,

antialérgica, anti-inflamatória, antiosteoporótica e antitumoral (Coutinho; Muzitano; Costa, 2009).

A atividade anti-inflamatória de extratos etanólicos das folhas, caules e raízes de *M. heterophylla* e folhas e caules de *M. senegalensis* foram testados *in vivo* em ratos Wistar albinos, pelo método de edema de pata induzido pela carragenina. Os autores observaram um efeito antiedematogênico significativo das folhas de ambas as espécies na inflamação local aguda e ainda, com ausência de sinais de toxicidade aguda e subaguda dos mesmos extratos (Silva *et al.*, 2010).

Extratos hexano e acetato de etila de folhas de *M. ilicifolia* foram testados no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*, na dose de 320 mg / kg, resultando em diminuição do edema de forma significativa e semelhante ao efeito da indometacina (controle) (Jorge *et al.*, 2004).

A atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico e fração acetato de etila de *Maytenus rigida* Mart., bem como o componente isolado (-)-4'-metilepigalocatequina (MEGC), foi testada por Martins *et al* (2021). Os autores relatam efeitos dos extratos sobre a dor inflamatória, enquanto a supressão da dor neurogênica e inflamatória de MEGC sugere uma forte indicação da presença de efeitos central e periférico e seu potencial analgésico e anti-inflamatório (Martins *et al.*, 2012).

Há relatos na literatura que a friedelina apresenta ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Os autores acreditam que o mecanismo de ação está relacionado com a inibição da síntese ou liberação de mediadores inflamatórios (Antonisamy; Duraipandiyam; Ignacimuthu, 2011). Ressalta-se que uma mistura de friedelina e friedelinol foi isolada e identificada no presente estudo e podem estar associados a atividade antinociceptiva observada.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que os extratos brutos etanólicos de folhas e caules de *M. evonymoides* podem apresentar efeito antinociceptivo no modelo da injeção intraplantar de carragenina, uma vez que as doses de 100 mg/kg (EBC) e 300 mg/kg (EBF) aumentaram o limiar de sensibilidade mecânica dos animais. Porém, embora essa diferença apareça visualmente nos gráficos, estatisticamente o resultado não é conclusivo, pois a alta variabilidade intragrupos característica desse tipo de avaliação conduziu a um valor elevado no desvio padrão.

## 5 CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas observadas neste estudo quanto à identificação dos tipos de estômatos hipostomáticos e a classificação do formato e proeminência da nervura central, presença de tricomas glandulares não tectores evidenciados na lamina foliar, somados a incidência de agregados de placas de cristais presentes no pecíolo auxiliam na identificação de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral e colaboram com sua caracterização morfoanatômica, auxiliando na diferenciação entre as espécies deste gênero, além de ser a primeira referência em microscopia para a espécie. Outro achado relevante do estudo fora evidenciado nos testes histoquímicos, o estudo apontou a presença de compostos lipofílicos, compostos fenólicos e lignina. A presença de compostos lipofílicos está relacionada à capacidade da espécie de evitar a dessecação, além de auxiliar no impedimento de entrada de patógenos. Os compostos fenólicos por sua vez, além de auxiliar na defesa da planta contra patógenos e herbívoros, possuem papel importante na polinização, na proteção contra os raios ultravioletas, no suporte mecânico e na redução do crescimento de plantas competidoras adjacentes. Estudos com espécies do gênero *Monteverdia* apontam que as atividades farmacológicas estão relacionadas a presença de compostos fenólicos, dentre as quais destacam-se atividade anti-inflamatória, atividade antinoceptiva, atividade antiulcerogênica, entre outras. A lignina por sua vez desempenha papel fundamental no fortalecimento do caule e tecido vascular, é responsável pelo transporte de água e nutrientes, permitindo dessa forma o crescimento ascendente, ademais, participa ativamente na proteção contra herbívoros, bloqueia o crescimento de patógenos, sendo uma resposta frequente contra lesões e infecções.

Em relação as análises físico-químicas, teor de água e cinzas totais, extratos e frações de *M. evonymoides* apresentaram resultados dentro dos limites preconizados na Farmacopeia Brasileira 6ª edição.

O extrato bruto etanólico obtido a partir das folhas e caule de *M. evonymoides* foi fracionado com solventes de polaridade crescente originando as frações hexano (FHF e FHC), clorofórmio (FCF e FCC), acetato de etila (FAEF e FAEC) e hidroalcólico residual (FRF e FRC).

O extrato bruto cetônico obtido a partir das folhas e caule de *M. evonymoides* foi fracionado com solventes de polaridade crescente originando as frações hexano (FHFC e FHCC), clorofórmio (FCFC e FCCC), acetato de etila (FAEFC e FAECC) e cetônico residual (FRFC e FRCC).

Na triagem fitoquímica realizada a partir de reações de caracterização foram identificados no extrato aquoso a presença de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e ácidos fixos. No extrato hidroalcolólico foi identificado a presença de alcaloides na FH e FC, flavonoides no EB, FC e FAE, esteroides e triterpenos foram observados no EB, FC e FAE.

A FCF foi submetida à cromatografia em coluna e resultou em um precipitado denominado FCF02B, sendo identificado por uma mistura de esteroides: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

A FCFC foi submetida à cromatografia em coluna e resultou em um precipitado denominado 1BCCL. O mesmo processo ocorreu com a FAEFC e este resultou em um precipitado denominado 2EBCAE. Após análise por RMN foi constatado que os dois precipitados obtidos se tratavam dos mesmos compostos, sendo identificados como uma mistura de friedelina e friedelinol.

Em relação a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides foi possível observar teor significativo na FAEC seguida do EBC. Na avaliação de atividade antioxidantes, três ensaios foram aplicados, a exemplo de captura do cátion radical  $ABTS^{\cdot+}$ , capacidade sequestrante do DPPH $\cdot$  e poder de redução do ferro (FRAP), os resultados revelaram que *M. evonymoides* pode ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Foi possível observar a correlação entre a quantificação de fenólicos totais e flavonoides com a atividade antioxidante por meio da correlação de Pearson.

Com relação ao ensaio de toxicidade preliminar sobre *Artemia franciscana*, as amostras testadas apresentaram  $CL_{50}$  maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentando toxicidade. Sobre o ensaio de atividade hemolítica, todas as amostras testadas apresentaram resultados semelhantes ao padrão Rutina, não causando hemólise das hemácias e, portanto, não apresentaram toxicidade.

No teste alelopático foi possível observar inibição no IVG, influência inibitória no crescimento de radícula e hipocótilo de *L. sativa*, os mesmos resultados foram observados quando a semente alvo foi *A. cepa* tanto no IVG, radícula e coleóptilo, caracterizando potencial alelopático em monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Na verificação da atividade larvicida com exceção da FRF e FHF todas as amostras testadas apresentaram  $CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ , revelando potencial no controle de larvas de terceiro estágio. Em relação ao perfil de mortalidade é possível verificar acentuada mortalidade na concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Todas as frações de caule apresentaram mortalidade acima de  $90\% \pm 0,5$ . Em relação as amostras das folhas, a FAEF apresentou a taxa de mortalidade de  $95\% \pm 0,5$  e o EBF, FCF e FHF apresentaram  $(87,5\% \pm 0,95)$ ,  $(85\% \pm 0,5)$  e  $(82\% \pm 0,5)$  respectivamente.

Quanto a avaliação da atividade antimicrobiana extrato e frações não foram efetivos nas condições testadas.

Em relação a nocicepção induzida por formalina o extrato bruto etanólico de folhas e caules de *M. evonymoides* se mostraram promissores. Na avaliação da nocicepção induzida por carragenina se faz necessário mais estudos para comprovar a sua efetividade, uma vez que o número de animais testados não representou um n satisfatório.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das características morfoanatômicas, fitoquímicas, potencial antioxidante e atividades biológicas de folhas e caule de *M. evonymoides* contribui para ampliação do conhecimento científico a respeito dessa espécie da biodiversidade brasileira.

O estudo morfoanatômico promoveu a identificação de *M. evonymoides* (Reissek) Biral e diferenciação entre as espécies deste gênero, além de ser a primeira referência em microscopia para a espécie.

As substâncias isoladas de FCF02B e 2EBCAE oriundas das folhas e caules de *M. evonymoides* não são inéditas no gênero, porém o isolamento destas nesta espécie até o presente momento não havia sido relatado.

Diante do exposto neste trabalho pelas amostras obtidas das folhas e caules de *M. evonymoides* é possível inferir a ela propriedades capazes de influenciar sistemas biológicos, sendo considerada espécie interessante para investigação de atividades farmacológicas e o desenvolvimento de futuros medicamentos.

## REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P. V. **Estudo Fitoquímico de Citrus: Resistência a *Xylella fastidiosa* e Interação com *Oncometopia facialis***. 2006. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos, Setor Concentração Química Orgânica. Programa de Pós-graduação em Química. São Carlos. SP, 2006.

ABE, S. Y. *et al.* Phytochemical screening, total flavonoids content and antioxidant capacity of *Campomanesia xanthocarpa* mart. Ex o. Berg (myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2014.

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

AHMED, A. S.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Evaluation of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus* species used in southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 100, 2013. DOI: 10.1186/1472-6882-13-100

AHMED, D. *et al.* Hepatoprotective, anti-hemolytic, and anti-radical properties of cold-pressed, no-solvent, extract of bottle gourd fruit. **International Journal of Vegetable Science**, London, v. 25, n. 4, p. 330-339, 2019. DOI: 10.1080/19315260.2018.1513963

AKISUE, G.; OLIVEIRA, F. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2000.

ALBERTON, M. D. **Investigação fitoquímica de *Zollernia ilicifolia* (brongniart) vogel (fabaceae): contribuição ao controle de qualidade de espinheira-santa (*Maytenus spp.*)**. 2001. 7 f. Dissertação (Farmácia). Programa de Pós Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2001.

ALBERTON, M. D.; FALKENBERG, D. B.; FALKENBERG, M. B. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 11-13, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300006>

AMARAL, F. M. *et al.* Pharmacobotanical characterization of *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex reiss.) biral leaves and its adulterants sold as medicinal tea in Brazil: A contribution to quality control. **Boletim Latino Americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 20, n. 4, p. 386–93, 2021. DOI: <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.4.28>

AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p.431-434, 2011.

ANDRADE, S. F. *et al.* Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of**

**Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 252–257, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.002>

ANTUNES K.A. *et al.* Authentication and Quality Control of the Brazilian Traditional Herb “Espineira-Santa” (*Monteverdia ilicifolia*) by Morpho-Anatomy and Microscopy, **Microscopy and Microanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1809-1821, DOI: 2023. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad098>

ANTUNES, E. R. M. *et al.* Differentiation of two *Maytenus* species and their hybrid via untargeted metabolomics. **Industrial Crops and Products**, v. 158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113014>

ARAGÃO, P. C. de A. *et al.* Substâncias Naturais Isolados de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 254–259, 1990.

ARAÚJO, A. A. S. *et al.* Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 707-715, 2008.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(73\)80065-x](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(73)80065-x)

ARECO, V. A. *et al.* Effect of pinene isomers on germination and growth of maize. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 27-33, 2014. DOI: [10.1016/j.bse.2014.02.013](https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.02.013)

ARRUDA, E. C. P. **Guia teórico prático de anatomia vegetal identificando células e tecidos**. Recife: Editora UFPE. 2021. 14 p.

ASLAM, F. *et al.* Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS Profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 567–578, 2011.

ASSINI, F. L.; FABRÍCIO, E. J.; LANG, K. L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 130–134, 2013.

AWARE, C. B. *et al.* Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 512–528, 2022. DOI: [10.1016/j.sajb.2022.05.028](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.028)

AYRES, M. C. C. *et al.* Antibacterial activity of useful plants and chemical constituents of the roots of *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90–97, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100017>

BADRIA, F. A.; ABOELMAATY, W. S. Plant Histochemistry: A versatile and indispensable tool in localization of gene expression, enzymes, cytokines, secondary metabolites and detection of plants infection and pollution”. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 7, p. 88-100, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31080/asps.2019.03.0318>

BABENKO, L. M. *et al.* Phenolic compounds *in* Plants: biogenesis and functions.

- Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.15407/ubj91.03.005.
- BARBOSA, S. *et al.* Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 13, n. 2, 2015. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/114805>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JR. J. X. O uso de produtos vegetais como matéria-prima vegetais para síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC, 2007.
- BAZZOCCHI, I. L.; NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P. Bioactive diterpenoids from Celastraceae species. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 861–881, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9494-4>
- BENTELEDJOUNE, M. *et al.* Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP–UHPLC–ESI–QTOF–MSn. **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, p. 1639–1643, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2019.1619722
- BERLINK, R. G. S. *et al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20170070
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical Microtechnique and Cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1ª ed. 1976.
- BETIM F. C. M. *et al.* Preliminary evaluation of the larvicidal activity of extracts and fractions from *ocotea nutans* (Nees) mez against *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 2–5, 2021. DOI: 10.1590/0037-8682-0576-2020
- BETIM, F. C. M. *et al.* “Microscopy and histochemistry of *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae)”. **Flora**, v. 273, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151708>
- BHAMBHANI, S.; KONDHARE, K. R.; GIRI, A. P. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. **Molecules**, v. 26, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/molecules26113374
- BIRAL, L. Novidades taxonômicas em *Maytenus* (Celastraceae) para a flora da Argentina. **Bonplandia**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 43–49, 2014. DOI: 10.30972/bon.2311236.
- BIRAL, L. *et al.* Systematics of New world *Maytenus* (Celastraceae) and a New Delimitation of the Genus”. **Systematic Botany**, v. 42, n. 4, p. 680–93, 2017. DOI: 10.1600/036364417X696456.
- BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. Celastraceae *in* **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB604564>>. Acesso em: 18 nov. 2020.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, n. 18, p. 6852-6865, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519–546, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

BRAGA IA, VALLE D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil\*. **Epidemiologia e Serviços Saúde**, v. 1, n. 2, p. 113–8, 2007.

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: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. **Formulário Fitoterápico Nacional**. 2ª edição. 2021. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf). Acesso em 21/04/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de medicamentos (**RENAME**). 2022. Disponível em: [http://crfsc.org.br/nv/images/stories/principal/pdf/anexos\\_rename\\_2012\\_pt\\_533\\_30\\_03\\_12.pdf](http://crfsc.org.br/nv/images/stories/principal/pdf/anexos_rename_2012_pt_533_30_03_12.pdf). Acesso em: 21/04/2024.

BRASIL Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. Departamento de Extrativismo. **Espinheira-Santa: boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico** / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. Departamento de Extrativismo. – Brasília, DF: MMA, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 02 DE 13 DE MAIO DE 2014. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 mai. de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª edição, v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019.

BRASIL. *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral in **Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB604564%3E>>. Acesso em: 20 ago. 2020

BRASIL. *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral in **Flora e Funga do Brasil**.

Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB604564%3E.>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>

BRITO, P. S. *et al.* Light and Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, and Histochemistry of *Eucalyptus tereticornis*". **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1295–1303, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1431927621012514>

BRUNI, R. *et al.* Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 538-45, 2006. DOI:10.1016/j.fitote.2006.06.009

BUKHARI, S. N.; JANTAN, I.; SEYED, M. A. Effects of Plants and Isolates of Celastraceae Family on Cancer Pathways. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 681–693, 2015. DOI: 10.2174/1871520615666150318101149

CALLIES, O. *et al.* Distinct sesquiterpene pyridine alkaloids from in Salvadoran and Peruvian Celastraceae species. **Phytochemistry**, v. 142, p. 21–29, 2017. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.06.013

CALOU, I. *et al.* A Atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 2, p. 33–42, 2014.

CAMARGO, K. C.; *et al.* Chemodiversity of essential oils from nine species of Celastraceae Karen. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 5, 2020. DOI: 10.1002/cbdv.202000107

CANSIAN, R. *et al.* Antioxidant and genotoxic properties of *Maytenus dasyclada*: a comparative study in relation to *Maytenus* reference species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 471–476, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.18113

CARVALHO, J. L. S. *et al.* 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, M. G. *et al.* Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, p. 740-743, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000600014.

CARVALHO-OKANO, R. M. Celastraceae. *in*: WANDERLEY, M. G. L., *et al.* (Eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 4, p: 185-194. 2005.

CAVALCANTE, M. F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 20-22, 2000.

*Celastraceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82>>. Acesso em: 07 Abr. 2020.

CHACÓN, I. D. L. C.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, v. 17, n. 2, p. 189, 2012.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Avaliação quantitativa da alodinia tátil na pata de rato. *Journal of Neuroscience. Methods*, n.53, p. 55-63, 1994.

CHEW, Y. L. *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11, p. 12, 2011. DOI: 10.1186/1472-6882-11-12

CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Efficiency of different solvents on the extraction of bioactive compounds from the amazonian fruit *Caryocar villosum* and the effect on its antioxidant and colour properties. *Phytochemical Analysis*, v. 25, n. 4, p. 364–372, 2014.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard**, 9. ed, v. 32, n. 2, CLSI document M07 A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLACITE, J. Triagem Fitoquímica, Análise Antimicrobiana e Citotóxica e dos Extratos das Plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanedae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 3, p. 509, 2015. DOI:10.17765/1983-1870.2015v8n3p509-516

CONCEIÇÃO, A. M. **Efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante da entrecasca da *Maytenus rigida* mart. (Celastraceae)**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós graduação em Medicina. Aracaju. 2010.

CORTEZ, P. A. *et al.* **Manual Prático de Anatomia Vegetal Morfologia e Anatomia Vegetal**. Organizado por Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus. BA: Editus. 2016. 92 p.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 49, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavanoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista virtual de química*, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009. DOI: 10.5935/1984-6835.20090024

CRETTON, S. *et al.* Antifungal quinoline alkaloids from *Waltheria indica*. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 300–307. 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00896

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciências Agropecuarias**, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

CUSHNIE, T.; CUSHNIE, B. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, nov. 2014

DA SILVA, C. B. *Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Polygalaceae) E *Microlobius foetidus* (Subsp. *Paraguensis* (Benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): Contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida). 2014. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Curitiba. 2014.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1–17, 2010. Disponível em: <https://scientiaplena.emnuvens.com.br/sp/article/view/22>. Acesso em: 16 jan. 2024.

DA SILVA, T. M. *et al.* Antibacterial activity of fractions and isolates of *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Chichuá Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 533–536, 2018. DOI:10.1590/0037-8682-0055-2017

DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. *et al.* Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos do Derivado N-acilidrazona LASSBio-1587. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1467-1472, 2021.

DALARMI, L. *et al.* Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881–885, 2015.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 573-578, 2002. DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00284-4

DE PAULA, M. N. *et al.* An *In Vitro* and *In Silico* Investigation about *Monteverdia ilicifolia* activity against *Helicobacter pylori*. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010046>

DE SOUZA LIMA, M. C., & SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: biological and cytotoxic effects. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, n. 55, v. 2-3, p. 320–324. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.004>

DE YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989. DOI: 10.1007/BF01967298

DIAS, J. F. G. *et al.* Contribution to the allelopathic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DOS ANJOS, C. A. *et al.* Atividade lavicida contra *Aedes aegypti* e toxicidade preliminar contra *Artemia salina* L. de extratos e frações de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 27, n. 9, p. 4962-4974, 2023. DOI: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/10562/5090>

DOS SANTOS JÚNIOR, H. M. *et al.* Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231–238, 2010. DOI: 10.1007/s11418-010-0390-0

DUARTE, M. C. **Constituintes químicos de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek**. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Área de Concentração Farmacoquímica. Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa/PB. 2013.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 41-49. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.10.003>

DUDONNÉ, S. *et al.* Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH•, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009. DOI: 10.1021/jf803011r

EBRAHIM, H. Y. *et al.* *Melaleuca rugulosa* (Link) Craven Tannins: Appraisal of anti-inflammatory, radical scavenging activities, and molecular modeling studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 298, n. August, p. 115596, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115596

ESTEVAM, C. S. *et al.* Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 B, p. 299–303, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200020>

ETTEFAGH, K. A. *et al.* Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. **Planta Medica**, v. 77, n. 8, p. 835–840, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1250606

FACUNDO, V. A. *et al.* Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, n. February, p. 270–273, 2015. DOI:10.1016/j.bse.2014.11.010

FALKENBERG, M. B. Quinonas. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

FANG, Z. *et al.* Review: The Triterpenoid Saponins and Biological Activities of *Lonicera* Linn. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 1–16, 2020. DOI. 10.3390/molecules25173773.

FARAGO, P.V. *et al.* “Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 250–55, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2005000300016>.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. *In*: SIMÕES, C. M. O.; *et al.* (Org.). . **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed UFRGS/Ed UFSC, 2007.

FAVRE-GUILMARD, C.; CHABRIER, P. E.; KALINICHEV, M. Bilateral analgesic effects of botulinum toxin A (Dysport®) following unilateral administration *in* the rat. **European Journal of Pain**, London, v.21, n.5, p. 927-937, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejp.995>

FENG, W.; HAO, Z.; LI, M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. *In*: JUSTINO, G. C. (eds) **Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health**, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/67810.

FERREIRA, F. L. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química – Química Orgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Programa de Pós Graduação em Química. Belo Horizonte, MG. 2014.

FERREIRA, F. L. *et al.* *Maytenus distichophylla* and *Salacia crassifolia*: Source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 471–474, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.006>

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.7, Build 91. Lavras, MG: UFLA, 2018.

FIGUEIREDO, A.C.S. *et al.* **Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos**. Universidade de Lisboa. 1ª Edição,. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal. 2007. 80 p.

FIGUEIREDO, P. T. R. de. **Isolamento, identificação e análise quimioinformática de triterpenos da espécie *Maytenus erythroxylon* Reissek**. 2019. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração Farmacoquímica) - Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, PB. 2019.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, p.115-146, 2009.

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

FONSECA, A. P. N. D. D. *et al.* Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 842–847, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400016>

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

FRANCO, D. M. *et al.* Effects of leaf extracts of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.: on growth and gene expression during root development of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 237–248, 2015.

FRANKLIN, G. Preparation of Thin Sections of Synthetic Resins and Wood-Resin Composites, and a New Macerating Method for Wood. **Nature**, v. 155, p. 51, 1945. DOI: <https://doi.org/10.1038/155051a0>

FUCHS, C. H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, p. 141-144, 1963. DOI: 10.3109/10520296309067156.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of *karanja* oil. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 513-516, 2000. DOI: 10.1016/s0887-2333(00)00046-1

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119–145, 2009.

GAWLIK-DZIKI, U. *et al.* Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – *In vitro* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154-160, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2013.03.023

GIL-MARTÍN, E. *et al.* 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.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GONZA´LEZ A. G. *et al.* Ethnobotanical uses of Celastraceae. Bioactive metabo- lites. In: Atta-ur-Rahman (ed) **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, Amsterdam, v. 23. Elsevier, pp 649–738, 2000.

GORZALCZANY S, LÓPEZ P, ACEVEDO C, FERRARO G. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. 133: 994-998, 2011.

GRIPPA, G.A. *et al.* Estudo geneotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**. 23 (1-2): 11-16. 2010.

GROPPO, M. *et al.* A New Species of *Maytenus* (Celastraceae) with Fleshy Fruits from Eastern Brazil, with Notes on the Delimitation of *Maytenus*. **Systematic Botany**, v. 39, n. 2, p. 478–84. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364414x680726>.

GROSS, E.; PIRES, M.; FERNANDES, V. **Curso teórico prático de técnicas em microscopia eletrônica**. Centro de Microscopia Eletrônica. Universidade Estadual de Santa Cruz. CME. Ihéus. Bahia, 2014. 17 p.

GUIMARÃES, L. D. *et al.* Pharmacognosy A chemophenetic study of the genus *Maytenus* s. l. ( Celastraceae ): contribution to the rational search of its bioactive metabolites. **Rodriguesia**, v. 71, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202071055>

GUTIÉRREZ-NICOLÁS, F. *et al.*  $\beta$ -Agarofurans and sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus spinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 8, p. 1853–1863, 2014. DOI: 10.1021/np500317t

HALVORSEN, B. L. *et al.* A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 132, n. 3, p. 461-471, 2002. DOI: 10.1093/jn/132.3.461

HAYOUNI, E. A. *et al.* The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1126–1134, 2007. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.02.010

HE, Y. *et al.* Hepatoprotective effects and structure-activity relationship of five flavonoids Against lipopolysaccharide/d-galactosamine induced acute liver failure in mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 68, p. 171-178, 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.12.059

HENRIQUES, A. T. *et al.* Alcaloides In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2007.

HORNUNG, P. S. *et al.* 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, n. 6, p. 1696–1709, 2020. DOI:10.1007/s10924-020-01723-w

HOU, Y. *et al.* Antiproliferative cardenolide glycosides of *Elaeodendron alluaudi*- anum from the Madagascar Rainforest. **Bioorganic & medicinal chemistry**, n. 17, p. 2215–2218, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.092>

HUANG, Y. Y. *et al.* A review on phytochemicals of the genus *Maytenus* and their bioactive studies. **Molecules**, v. 26, n.15, p. 4563, 2021.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of neuroscience methods**, v.14, p. 69-76, 1985. DOI: 10.1016/0165-0270(85)90116-5

HWANG, B. Y. *et al.* Antioxidant benzoylated flavan-3-ol glycoside from *Celastrus orbiculatus*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 1; p. 82-84, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/np000251l>

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**. v. 19, p. 608. 2000.

JACOMASSI, E.; MACHADO, S. R. "Características Anatômicas de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *Maytenus aquifolia* Mart.) e mata-olho (*Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg. Lanj. & Boer.) para o controle de qualidade da matéria prima". **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 84–96, 2003.

JESUS, W. M. D. M.; CUNHA, T. N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 21–46, 2012

JOFFILY, A., VIEIRA, C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 549–53. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000300016>

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. McGRAW-HIL. New York: NY, Kraus. 1940.

JORGE, R. M. *et al.* Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KAEMCHANTUEK, P. *et al.* Terpenoids with potent antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* from *Trigonostemon reidioides* roots. **Tetrahedron**, v. 73, n. 12, p. 1594-1601, 2017.

KALEGARI, M. *et al.* Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch (Connaraceae). **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KARABALIEV, M.; KOICHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v. 88, p. 101-105, 2003.

KARAMAĆ, M. Antioxidant activity of tannin fractions isolated from buckwheat seeds and groats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 5, p. 559-566, 2010. DOI: 10.1007/s11746-009-1525-x.

KIMURA, M. Y. O.; FONTES, K. B. Incidência de casos confirmados de Dengue no estado do Paraná Brasil nos anos de 2016 a 2021. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 832-844, set./dez. 2022.

KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 25, p. 4067-4072, 2008.

KRAUS, J. E. *et al.* Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials”. **Biotechnic and Histochemistry**, n. 73, v. 5, p. 235-43, 1998. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520299809141117>

KROGH, R. **Isolamento e identificação de triterpenos friedelanos de maytenus robusta reiss.** 1996. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Curso de Pós Graduação em Química. Florianópolis. 1996.

KUBLIK, H. *et al.* Nasal absorption of 17- $\beta$  estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations *in sheep*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 320-24, 1996.

KUMARI M; JAIN S. Tannins: An Antinutrient with Positive Effect to Manage Diabetes. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 12, p. 70–73, 2012.

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.

LAPA, A. J. *et al.* **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais.** São Paulo: Lagoa Editora Ltda. 2008. 142 p.

LEME, T. D. S. V. *et al.* Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 154–161, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2013.08.032

LEMOS, J. R.; CHAVES, B. E. **Morfologia e anatomia vegetal: uma abordagem prática [recurso eletrônico].** Teresina: EDUFPI, 2022. 129 p.

LIMA E. P. *et al.* Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000300006>

LIMA, A. P. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico da casca da *Maytenus rigida* Mart . (Celastraceae). **Scientia Plena**, v. 6, n. 3, p. 1-7, 2010.

LIMA, C. P. de *et al.* Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 331-336, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000200009>.

LIMA, E. S.; VARGAS, F. de S.; POHLIT, A. M. Antioxidant, Antiinflammatory and Antiplatelet Aggregating Activities of *Maytenus guyanensis* Bark Extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 7, p. 1107-1112, 2010.

LIMA, J. M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000100002>

LINS NETO, J. D. R. *et al.* Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 27, p. 409-416, 2016.

LOESENER, T. **Celastraceae**. in A. ENGLER, H. HARMS & J. MATTFELD (EDS.), Die natürlichen Pflanzenfamilien. 2<sup>a</sup> edição v. 20b, p. 87–197. Duncker & Humblot, Berlin. 1942.

LOMBARDI, J. A.; BIRAL, L. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Celastraceae. **Rodriguesia**, v. 67, n. 5, p. 1285–1290, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667528>

LORRAI R. *et al.* Eye Diseases: When the Solution Comes from Plant Alkaloids. **Planta Médica**. Published online April 2, 2024. DOI:10.1055/a-2283-2350

LUO, D. Q. *et al.* Insecticidal compounds from *Tripterygium wilfordii* active against *Mythimna separata*. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 59, n. 5-6, p. 421–426, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2004-5-624>

LUZ, H. S. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* plumel (Apocynaceae), Da mesorregião leste maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 657–662, 2014. DOI: [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_114](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_114)

MA, Y. T. *et al.* Metabolites produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 3, p. 504–506, 2010. DOI: 10.1007/S10600-010-9662-X

MA, Z. *et al.* Toxic and non-toxic strains of *Microcystis aeruginosa* induce temperature dependente allelopathy toward growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Harmful Algae**, v. 48, p. 21-29, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.002>

MACHADO, C. D. *et al.* *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.10.005>

MACHADO, C. D. *et al.* Contributions of trichome micromorphology to the characterization of species traded as “BOLDO”. **Flora**, v. 279, 151827, 2021. DOI: 10.1016/j.flora.2021.151827.

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.

MACIEL, J. C. *et al.* Interferência de plantas daninhas no crescimento da cultura do trigo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 23–29, 2017.

MAGALHÃES, C. G. *et al.* *Maytenus salicifolia*: Triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Brazilian Journal of**

**Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 415–419, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000039>

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962. DOI: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MAHATO, S. B.; JUNDI, A. P., <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89569-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89569-2)

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100007>

MARINO, P. A. *et al.* Triagem fitoquímica e doseamento de polifenóis totais e flavonóides em diferentes amostras de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Brasilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 1049–1062, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/1300>. Acesso em: 14 jan. 2024.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 89–99, 2007.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O Conhecimento Popular Associado ao Uso da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 5, n. S1, p. pg. 666–668, 2008. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/115841>. Acesso em: 14 jan. 2024.

MARTINS M. M. *et al.* Larvicidal activity of *Maytenus guianensis* (Celastraceae) against *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. March, p. 2-5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0835-2020>

MARTINS, M. V. *et al.* Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 598–603, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000007>

MARTINS, S. L. *et al.* Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 54, n. 3, p. 257-263, 2004. ISSN 0004-0622. Disponível em: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000406222004000300001&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000300001&lng=es&nrm=iso). Acesso em 14 de janeiro de 2024.

MICKENNA, M. J. *et al.* Delimitation of the Segregate Genera of *Maytenus* s. l. (Celastraceae) Based on Morphological and Molecular Characters. **Systematic Botany**, v. 36, n. 4, p. 922–932, 2011. DOI: 10.1600/036364411X604930

MEINERZ, C. C. *et al.* Interferência alelopática na germinação de alface e tomate por derivados de avenca ( *Adiantum capillus-veneris* L.), espinheira-santa ( *Maytenus ilicifolia* R.) e guaco ( *Mikania glomerata* S.). **SaBios**, v. 10, p. 15–22, 2015. ISSN:1980-0002. Disponível em: <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/1637>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MEIRELLES, G. C. *et al.* Phytochemistry and Pharmaceutical Technology Studies on *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*): a Traditionally Used Medicinal Plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 6, p. 859–70, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00311-4>.

MELO, G. D. dos S. *et al.* Alcaloide milonina: atividades biológicas e farmacológicas uma revisão da literatura. **Peer Review**, v. 5, n. 20, p. 160–172, 2023.

MELRO, J. C. L. *et al.* Ethnobotanical study of Medicinal plants used by the population assisted by the “Programa de Saúde da Família” (Family Health Program) in Marechal Deodoro - AL, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 410-423, 2020. DOI: 10.1590/1519- 6984.214039

MENEGUETTI D. U. de O. *et al.* Screening of the *in vitro* antileishmanial activities of compounds and secondary metabolites isolated from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) chichuá Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 579-585, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0156-2016>

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

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

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–96, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>.

*Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral in **Flora e Funga do Brasil 2023** em construção. [Jardim Botânico do Rio de Janeiro]; 2023 [update 2023 Jan 12; citad 2023 Jan 12]. Available from: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB604564%3E>

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREIRA, J. *et al.* Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 318–323, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.052>

MOREL, S.; GAYOZO, E. Efecto alelopático del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek en semillas de *Allium fistulosum* L. y *Lactuca sativa* L. **Steviana**, v.10, n. 2, p. 24-31, 2018.

MOSSI, A. *et al.* Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations

of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 339–345, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000200015>

MOSSI, A. J. *et al.* Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *maytenus ilicifolia*. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1067–1070, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000500011>

MOTA, K. S. D. L. *et al.* Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 441–446, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300019>

MUSHTAQ, W.; SIDDIQUI, M. B.; HAKEEM, K. R. Allelopathy Potential of Weeds Belonging to the Family. *In: Allelopathy*. Cham: Springer, 2020. p. 37-43

NANDI, M. V. P.; HAFSAH, S. Phytochemical test fraction N-hexane allelopathy goat weed extracts (*Ageratum conyzoides* L.) on the growth of thorn spinach (*Amarantus spinosus* L.). *In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, Banda Aceh. **Anais...** Banda Aceh: IOP Publishing, 2020. p. 012039. DOI: 10.1088/1755-1315/425/1/012039

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 553–556, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIERO, R. *et al.* Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. *In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Ed). Ciências Farmacêuticas: contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Editora UNIVALI, 2003. p. 10-56.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F. DE; CECHINEL FILHO, V. A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the *Maytenus* Genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851–1871, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/138161211796391029>

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1931-1939, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg192>

NOVO, M. C. S. S. *et al.* Efeitos de extratos aquosos de estruturas de grama-seda no desenvolvimento inicial de plântulas de arroz, milho e trigo. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 665-672, 2009.

OKUNO, Y.; MARUMOTO, S.; MIYAZAWA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from Sozuku. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 33, n. 6, p. 862-865, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1408104>

OLIVEIRA, C. F. de. *et al.* Quality control parameters of *Psychotria fractistipula* L.B. sm., Klein & Delprete (Rubiaceae): loss on drying, total ash and phytochemical screening. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 4, 2014. DOI: 10.5380/acd.v15i4.40032.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36 - 44, 2015. DOI:[https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_165](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165)

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400026>

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n.3, p. 485-491, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300019>

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae ): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92–99, 2009.

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

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1–15, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

PARRA, A. L. *et al.* Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1078/0944-7113-00044>

PAULA, C. da S. *et al.* Allelopathy of extract and fraction of stem bark of *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Visão Acadêmica**, [S.l.], v. 15, n. 4, dez. 2014. ISSN 1518-8361. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v15i4.39519>

PATEIRO, M. *et al.* Essential oils as naturais aditives 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.

PAVIA, D. L. *et al.* **INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA**. 4a. Edição. Washington: [s.n.]. 2010. 708 p.

PEREIRA, M. A. M. Estudo morfoanatômico de caule e folha de *Monteverdia ilicifolia* ( Mart . ex Reissek ) Biral cultivada em São Luís-MA”. **Revista Conexão Ciência**. V. 17, p. 39–49, 2022.

PEREIRA, R. S. *et al.* Photoprotective property and cytotoxicity of polar extracts of three species of *Maytenus* native to the Southwest of Bahia. **Scientia Plena**, v. 16, p. 11, 2020. DOI: [10.14808/sci.plena.2020.027202](https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.027202)

PESSUTO, M. B. *et al.* Atividade Antioxidante de extratos e taninos condensados dAs folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412–416, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200027>

PIÑA-RODRIGUEZ, F. C. M., FIGLIOLIA, M. B., PEIXOTO, M. C. Testes de Qualidade. In: A. G. FERREIRA & F. BORGHETTI. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed. Artmed. p. 251-262, 2004.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>

PINTO, A. C. *et al.* Misturas Naturais de esteroides, uma alternativa para aplicação de padrões em análises por cromatografia gasosa de alta resolução. Nota Técnica. **Química Nova**, v. 17, n. 4, 1994.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 1 – 5, 2017.

PLAZA, A.; CASTILLO, M.; NAULIN, P. I. Seed and seedling interactions in three tree species from Mediterranean forests as a knowledge base for ecological restoration. **Journal of Environmental Management**, v. 316, n. April, p. 115241, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115241>

PRATA, R. R.; MENDONÇA, M. S. Estudo anatômico do xilema secundário da raiz e do caule de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae)". **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 261–66, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0044-59672009000200003>

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf9913458>

QUEIROZ, G. S. **Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora***. 2009. Relatório. (Estágio supervisionado em química). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemática. Departamento de Química. Florianópolis, 2009.

RASOOL, S. *et al.* Anticonvulsant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Berberis calliobotrys* Aitch ex koehne (Berberidaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 2031–2039, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v14i11.12>

RE R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

RIBEIRO, F. F. *et al.* Autenticidade de amostras de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek comercializadas em mercados de São Mateus. **Fitos**, v. 15, n. 2, p. 144–152, 2021. DOI: DOI 10.32712/2446-4775.2021.966

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. Ed. Press, New York: Academic, p. 422. 1984.

RICHARD, A. Botanique. Plantes Vasculaires. *In*: de la Sagra, R. (ed.) Histoire Physique, **Politique et Naturelle L'île de Cuba**, v 10. Arthus Bertrand, Paris, 184, 663p.

REYES, C. P. *et al.* Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. **Bioorg. Med. Chem.** v.14, p.1573-1579, 2006.

ROBLES-PIZARRO, V. *et al.* Efecto antinociceptivo del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. “chuchuhuasi” mediante la prueba de contorsiones abdominales en ratones. **Horizonte Médico**, v. 14, n. 1, p. 6–10, 2014. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637133002>. Acesso em 14/01/2024.

ROCHA, C. S. da. **Estudo comparativo farmacognóstico e atividade biológica de *Maytenus rigida* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastraceae)**. 2003..98f .Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Recife. 2003.

ROCHA, C. S. *et al.* “Morfoanatomia de Folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae ); uma Espécie Utilizada Como Medicinal no Nordeste do Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, 2004.

ROCHA, V. *et al.* Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>

RODRIGUES, V. G. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek**. 2011. 50f. Dissertação (Mestrado em Química – Química orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas. Belo Horizonte, 2011.

ROWNTREE, D. **Statistics Without Tears**: a primer for non-mathematicians. Michigan: Scribner Book Company, 1981.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH•. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico**, Fortaleza, p. 1-4, 2007a.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS•+. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico**, Fortaleza, p. 1-4, 2007b.

RUSSELL, W. M. S., BURCH, K. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. UFAW, London: UFAW; 1992. Disponível em

<https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>>  
acesso em: 10/04/2023.

SAHYUN, S. A. *et al.* Triagem de flavonoides em banco de germoplasma de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 2019, p. 98–108, 2021.

SALAZAR-GRANARA, A. *et al.* Evaluación de la actividad hipotensora del *Maytenus krukovii* (Chuchuhuasi) en rata conciente. **Horizonte Médico (Impresa)**, v. 8, n. 2, p. 41–47, 2008.

SANTOS, A. O. dos. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. May, p. 277–281, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>

SANTOS, L. B. dos. **Sistemática e Filogenia de *Maytenus Molina* (Celastraceae) na Região Neotropical**. 2016. 352f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal. Rio Claro, 2016.

SANTOS, V. A. F. F. M. *et al.* Mapping biochemical pathways in *Maytenus ilicifolia* (celastraceae) through integrated proteomics and histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 2, p. 237–48, 2021. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200173>.

SANTOS, V. L. dos. *et al.* Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 336–342, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300006>

SANTOS, V. L. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 68–72, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100010>

SASS, J. E. **Botanical Microtechnique**. 2. ed. Iowa State College Press, Ames, IA. 1951.

SAUSEN, T. L. *et al.* Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. E *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotânica**, v. 27, p. 145-158, 2009.

SCHWANZ, M. **Avaliação química e biológica de *Maytenus dasyclada* Mart. e *Maytenus cassineformis* Reissek (Celastraceae)**. 2012. 228f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2012.

SCOTT-KNOTT, M. *et al.* Sasm-Agri - Sistema Para Análise E Separação De Médias Em Experimentos Agrícolas Pelos Sasm-Agri - System for Analysis and Mean Separation in Agricultural Assays Using Scott-Knott , Tukey and Duncan Methods. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18–24, 2001.

SHABBIR, M.; KHAN, M. R.; SAEED, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 143, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-143>

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **Journal of Psychology**, v.21, p.227-236, 1946.

SILVA, A. J. da. *et al.* Pharmacognostic analysis of samples of espinheira santa-*Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) sold in pharmacies and popular banking in Votuporanga-Sao Paulo. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 457–462, 2012.

SILVA, F. C. *et al.* Chemical Constituents from Branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and Evaluation of Antimicrobial Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 943–949, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000500018>

SILVA, F. C. *et al.* Triterpenes from *Maytenus gonoclada* and their attractive effects on *Tenebrio molitor*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 3, p. 571–574, 2013. DOI: 10.1007/s10600-013-0676-z.

SILVA, G. D. F. *et al.* Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2 B, p. 530–536, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400004>

SILVA, J. B. *et al.* Quantificação de fenóis , flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff . flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874–880, 2016. DOI:10.1590/S0100-736X2016000900014

SILVA, L. A. *et al.* Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH•, FRAP, βcaroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 117 – 126, 2018. DOI: 10.5935/2446-4775.20180011

SILVA, L. M. da. *et al.* Evidence of gastric ulcer healing activity of *Maytenus robusta* Reissek: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 75–85, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.006>

SILVA, G. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. **Human and Experimental Toxicology**, 2010.

SILVÉRIO, M. R. S. *et al.* Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6a ed., LTC: Rio de Janeiro, 2000.

SIMMONS, M. P. *et al.* Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the

relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 2, p. 745–757, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.04.039>

SIMÕES, M. S. *et al.* Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**. v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013. DOI <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n3p29>

SIMÕES; C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

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>

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, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>

SOBEH, M. *et al.* Tannin-rich extracts from *Lannea stuhlmannii* and *Lannea humilis* (Anacardiaceae) exhibit hepatoprotective activities *in vivo* via enhancement of the anti-apoptotic protein Bcl-2. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27452-8>

SOBRATTEE, M. A. *et al.* Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 45–56, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.07.012>

SOTO-MALDONADO, C. *et al.* Antioxidant and antimicrobial capacity of *Maytenus boaria* leaves, recovery by infusion and solvent extraction. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 47–53, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.02.002>

SOUSA, D. P. de; ALMEIDA, R. N. de. Neuroleptic-like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. roots. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 224–225, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.28.224>

SOUSA, G. F. *et al.* Anti-inflammatory, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of from *Maytenus robusta* branches and isolation of further triterpenoids. **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 61-65, 2017.

SOUZA FILHO, A. P. da S.; ALVES, S. de M. **Alelopátia Principios Básicos e Aspectos Gerais**. 1a edição ed. Belém, PA: [s.n.]. 2002.

SOUZA FILHO, A. P. da S.; ALVES, S. de M.; FIGUEIREDO, F. J. C. Allelopathic effects of calopo according to its age and to seed density of the receiver plant. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2; p. 211-218, 2003.

SOUZA FILHO, A. P. S. *et al.* Potentially Allelopathic Activity of the Essential Oil of *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 499–505, 2009.

SOUZA, A. M. *et al.* *In vitro* effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014. DOI:10.5897/AJPP2014.4100

SOUZA, A. V. de; VIEIRA, M. R. da S.; PUTTI, F. F. Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2017103, 2018.

SOUZA, G. F. DE. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de constituintes das folhas e galhos de *Maytenus robusta* (Celastraceae)**. 2016. 250f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas). Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas. Belo Horizonte. MG. 2016.

SOUZA, K. B. R. DE; CASAIS-E-SILVA, L. L.; AGUIAR, M. C. O modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina como estratégia para avaliar a ação de drogas sobre a dor miofascial. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 507, 2020.

SOUZA-MOREIRA, T. M. *et al.* Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 33, n. 17, p. 2579-2582, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.017>

SOUZA, S. *et al.* Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* mart. Ex Reiss.). Publicatio UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 3-4, p. 7-14, 2005. DOI: 10.5212/Publ.Biologicas.v.11i3.0001

TANG, X. *et al.* Cadmium uptake in aboveground parts of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 125, p. 102-106, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.033>

**THE PLANT LIST** (2020). Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org>> Acesso em: 08/04/2020.

TOHGE, T.; PEREZ DE SOUZA, L.; FERNIE, A. R. On the natural diversity of phenylacylated-flavonoid and their *in planta* function under conditions of stress. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, V. 17, p. 279–290, 2018. DOI: 10.1007/s11101-017-9531-3.

TORPOCCO, V. *et al.* New dammarane triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 812–814, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.55.812>

TORRES-ROMERO, D. *et al.* Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. **Journal of natural products**, v. 71, n. 8, p. 1331–1335, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/np070647y>

TOURÉ S. *et al.* *Aedes aegypti* Larvicidal Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus oblongata*. **Journal of Natural Productis**, v. 80, n. 2, p. 384–390, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00850>

VALENTE, L. M. M. *et al.* Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216 – 223, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200015>

VALLADÃO, F. N. *et al.* Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Rissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 733–739, 2009.

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural products: Perspectives and challenges for use of brazilian plant species in the bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1–7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190208>

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. DA S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>

VARGAS, J. O. S. de. *et al.* Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antifúngico de *Maytenus Illicifolia* (Mart. Ex Rissek) Oriunda Da Região Do Bioma Pampa. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 66364–66376, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/16316>. Acesso em: 17 jan. 2024.

VASCONCELOS, M. da C. C. de.; SILVA, A. F. A. da; LIMA, R. da S. Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas Interference on Weeds Cultiva Tedplants. **Agropecuaria científica no semiárido**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2012.

VEIGA, A. *et al.* Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC<sub>50</sub>%, and IC<sub>90</sub>% of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50–61, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>

VELLOSA, J. C. R. *et al.* Antioxidant activity of *Maytenus illicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 243–244, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.007>

VELOSO, C. C. *et al.* Antinociceptive effects of *Maytenus imbricata* Mart. Ex. Rissek (Celastraceae) root extract and its tingenone constituent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, p. 68-76, 2014.

VELOSO, C. C. *et al.* Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 533–540, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.006>

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química

medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VIEIRA, A. M. **Eficácia do extrato aquoso de *Maytenus rigida* mart. (Celastraceae) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: análise do envolvimento de óxido nítrico, prostaglandinas, receptores opioides e  $\alpha$ -2-adrenérgicos**, 2013. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará. Campus de Sobral. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Sobral. CE. 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 1996.

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.

WIBOWO, M. *et al.* Bioactive Dihydro- $\beta$ -agarofuran Sesquiterpenoids from the Australian Rainforest Plant *Maytenus bilocularis*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 5, p. 1445–1453, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00190>

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WHITSON, E. L. *et al.* Oppositines A and B, sesquiterpene pyridine alkaloids from a Sri Lankan *Pleurostyliia opposita*. **Journal of natural products**, v. 69, n. 12, p. 1833–1835, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/np060459s>

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os Propolis: Some Parameters ond Prodecore for Chemical Fuality Control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998. DOI: 10.1080/00218839.1998.11100961

WU, A. H. B. *et al.* Biological variation of  $\beta$ -sitosterol, campesterol, and lathosterol as cholesterol absorption and synthesis biomarkers. **Clínica Chimica Acta**, v. 430, p. 43-47, 3/20/ 2014. ISSN 0009-8981. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898113005354>.

XU, W. *et al.* Anti proliferative activities of terpenoids isolated from *Alisma orientalis* and their structure activity relationships. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 15, n. 2, p. 228-235, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871520614666140601213514>

YAN, C. Y. *et al.* Celastrol ameliorates Propionibacterium acnes/LPS-induced liver damage and MSU-induced gouty arthritis via inhibiting K63 deubiquitination of NLRP3. **Phytomedicine**, v. 80, n. July, p. 153398, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153398>

YANG, L. *et al.* Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

YARIWAKE, J. H. *et al.* Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162–168, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200016>

YILMAZ, A.; BOGA, M.; TOPÇU, G. Novel terpenoids with potential anti alzheimer activity from *Nepeta obtusifolia*. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 5, p. 530-541, 2016.

YOHANNES, A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of easily grown *Eritrean black* pepper. **International Journal of Engineering Research**, v. 7, n. 2, 2018. DOI: [10.17577/IJERTV7IS020028](https://doi.org/10.17577/IJERTV7IS020028)

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 20, p. 1–26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

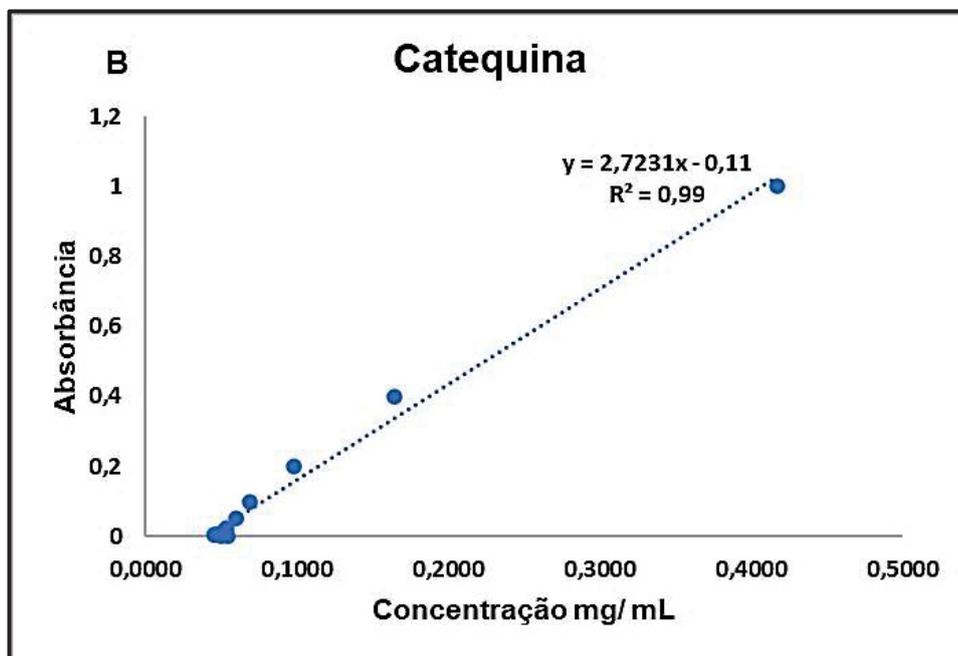
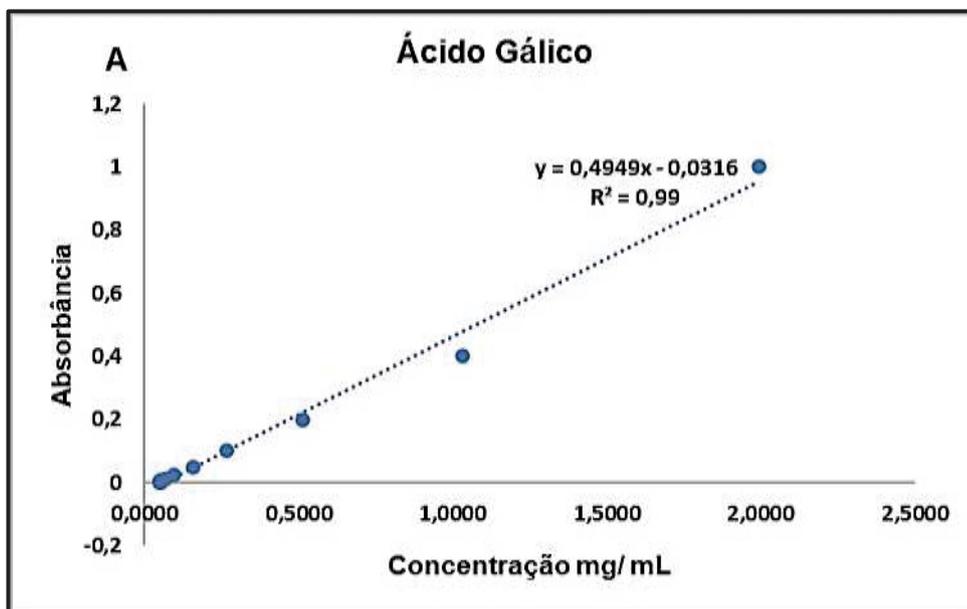
ZHAO, Q. Q. *et al.* Terpenoids with anti inflammatory activity from *Abies chensiensis*. **Fitoterapia**, Milano, v. 111, p. 87-94, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.002>

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](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis.

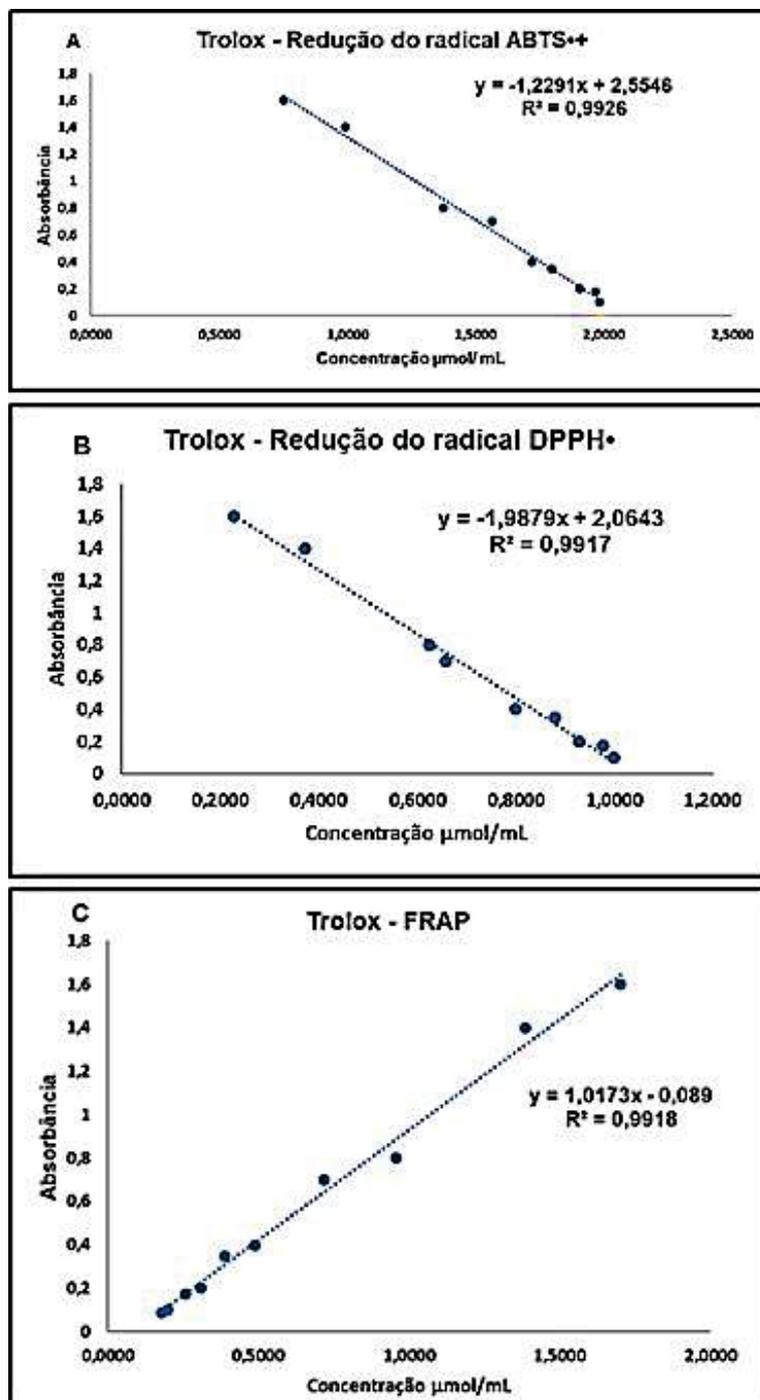
APÊNDICE C - CURVAS ANALÍTICAS PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS



FONTE: A autora (2021).

Nota: A – curva analítica do ácido gálico para doseamento de compostos fenólicos totais;  
B – curva analítica da catequina para doseamento de flavonoides totais.

## APÊNDICE D - CURVAS ANALÍTICAS DO TROLOX PARA AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE



FONTE: A autora (2021).

Nota: Curvas analíticas do padrão Trolox para determinação da propriedade antioxidante de extratos Brutos e frações semipurificadas obtidos das folhas de *M. evonymoides* via 3 metodologias:

A – redução do radical ABTS•+; B – redução do radical DPPH•; C – FRAP.

## ANEXO 1 - APROVAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

 Ministério do Meio Ambiente <b>CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO</b> SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO	
Certidão Cadastro nº A13E001	
<p>Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.</p>	
Número do cadastro:	<b>A13E001</b>
Usuário:	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
CPF/CNPJ:	<b>75.095.679/0001-49</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa</b>
<b>Espécie</b>	
<b>Maytenus evonymoides</b>	
<b>Allophylus semidentatus</b>	
<b>Hypätis althaeifolia</b>	
Título da Atividade:	<b>ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES VEGETAIS DE INTERESSE FARMACEUTICO</b>
<b>Equipe</b>	
<b>Marilis Dallarmi Miguel</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>
<b>CINTIA APARECIDA DOS ANJOS</b>	<b>UFPR</b>
<b>OBDULIO GOMES MIGUEL</b>	<b>UFPR</b>
<b>DEISE PREHS MONTRUCCHIO</b>	<b>UFPR</b>
<b>JOSIANE DE FATIMA GASPARI DIAS</b>	<b>UFPR</b>
<b>YOHANS MARTINEZ MONCADA</b>	<b>UFPR</b>
<b>AMANDA MIGLIORINI URBAN</b>	<b>UFPR</b>

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

	Ministério da Educação <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</b> Setor de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Nº 719</div>
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, <b>CERTIFICA</b> que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
<b>CERTIFICATION</b>		
<p>The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, <b>CERTIFIES</b> that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
<b>PROCESSO:</b> 23075.027346/2013-18	<b>APROVADO:</b> 11/07/2013 – R.O. 05/2013	
<b>TÍTULO:</b> Ecologia e controle de Cuficidae (Diptera) de relevância em saúde pública		
<b>AUTORES:</b> Mario Antonio Navarro da Silva, Anna Julia Pietrobon, Oscar Alexandre Aguirre Obendo		
<b>DEPARTAMENTO:</b> Zoologia		
 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio Coordenador da CEUA		

**ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS**  
**CEUA: 3328200323**

 <p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA</b></p>  <p><b>CEUA</b></p>	<p>Universidade Federal de Santa Catarina</p> <p><b>Comissão de Ética no Uso de Animais</b></p>								
<p><b>CERTIFICADO : EMENDA</b> v: 02/07/2023</p>									
<p>Certificamos que a EMENDA (versão de 18/08/2023) da proposta intitulada "ATIVIDADE ANTINOCEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Monteverdia evonymoides</i> (Reissek) Biral EM CAMUNDONGOS", CEUA nº 3328200323 (0 031621), sob a responsabilidade de Morgana Duarte da Silva e equipe; Amanda Vasconcelos; Elisa Mansur Carmes; Jeane Bachi Ferreira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim <b>APROVADO</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) em 04/09/2023.</p>									
<p>Término previsto: 01/2025</p>									
<p>Origem: Biotério Central</p>									
<p>Espécie: Camundongos heterogênicos      sexo: Machos e fêmeas      idade: 45 a 60 dias      Quantidade mantida: 0</p>									
<p>Linhagem: Swiss      Peso: 25 a 30 g</p>									
<p><b>ANIMAIS UTILIZADOS</b></p> <table border="1"> <tr> <td>Camundongos heterogênicos</td> <td>Machos e fêmeas</td> <td>Total Aprovado</td> <td>Quantidade Utilizada</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>290</td> <td>0</td> </tr> </table>	Camundongos heterogênicos	Machos e fêmeas	Total Aprovado	Quantidade Utilizada			290	0	<p>Florianópolis, 04 de setembro de 2023</p> <p><i>Vanessa Foleto</i></p> <p>Vanessa Rafaela Foleto da Silva Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina</p>
Camundongos heterogênicos	Machos e fêmeas	Total Aprovado	Quantidade Utilizada						
		290	0						
 <p>Luciana Aparecida Honorato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina</p>									

## ANEXO 4 - ARTIGO PUBLICADO 1



**ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti* E  
TOXICIDADE PRELIMINAR CONTRA *Artemia salina* L. DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Monteverdia evonymoides*  
(REISSEK) BIRAL**

Recebido em: 14/08/2023

Acesso em: 13/09/2023

DOI: 10.25110/arqsaudef.v27i9.2023-005

Cintia Aparecida dos Anjos<sup>1</sup>  
Elisiane de Bona Sartor<sup>2</sup>  
Karine Amorim Fladzinski<sup>3</sup>  
Fernando Cesar Martins Betim<sup>4</sup>  
Camila Freitas de Oliveira<sup>5</sup>  
Luciane Dallarmi<sup>6</sup>  
Deise Prehs Montrucchio<sup>7</sup>  
Obdulio Gomes Miguel<sup>8</sup>  
Josiane de Fátima Gaspari Dias<sup>9</sup>  
Marilis Dallarmi Miguel<sup>10</sup>

**RESUMO:** *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é o principal vetor das arboviroses dengue, zika, chikungunya e febre amarela. A busca por inseticidas naturais para combater o mosquito ganha destaque nos países de clima tropical. Considerando a atividade larvicida presente no gênero *Monteverdia* o objetivo do estudo foi avaliar o potencial larvicida dos extratos e frações da espécie *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. O material vegetal (folhas e galhos) foi seco a temperatura ambiente, foi moído e submetido a extração em Soxhlet modificado. A toxicidade foi avaliada por meio do bioensaio com *Artemia salina* L. As larvas de *Aedes aegypti* foram expostas nas concentrações 10, 100, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Após 24H foi realizada a leitura da

## ANEXO 5 - ARTIGO PUBLICADO 2



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

**Flora**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/flora](http://www.elsevier.com/locate/flora)



---

Highlighted Student Research

## Morphoanatomical and histochemical investigation of *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral

Cintia Aparecida dos Anjos<sup>a,1,\*</sup>, Lorene Armstrong<sup>a,b,1</sup>, Karine Amorim Fladzincki<sup>a,1</sup>, Leandro Tabor da Rocha<sup>a,1</sup>, Elisiane de Bona Sartor<sup>a,1</sup>, Luciane Dalarmi<sup>a,1</sup>, Deise Prehs Montrucchio<sup>a,1</sup>, Obdulio Gomes Miguel<sup>a,1</sup>, Josiane de Fátima Gaspari Dias<sup>a,1</sup>, Marilis Dallarmi Miguel<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil



---

**ARTICLE INFO**

Edited by: Alessio Papini

**Keywords:**  
*Monteverdia*  
*Celastraceae*  
*Anisomy*  
*Microscopy*

**ABSTRACT**

*Monteverdia* species are known for their medicinal properties. However, due to similarities between species, the accurate identification of different species can be cumbersome. The study of morphoanatomy can contribute to the authentication of the species by providing additional information and contributing to the species characterization. Therefore, this work presents the morphoanatomy of the leaves and stems of *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral analyzed by optical microscopy, scanning electron microscopy, and histochemical approaches. Through these methods, we were able to determine, morphologically, the analyzed species features large and woody trees; its leaves are simple, distichous, and entire; the leaf margins are fringed; the stipules are caducous, triangular, and rarely persistent; the apex can vary from acute to obtuse, and the leaf blade has no trichomes. The frontal view presents polygonal epidermal cells, anomocytic, anisocytic, and tetracytic stomata that are found on the abaxial surface and are positioned at the same level as the ordinary epidermal cells; the epidermis is uniseriate and covered with a thick cuticle; the mesophyll is dorsiventral; the midrib is biconvex, and below the epidermis is the angular collenchyma, with one collateral bundle in an open arc and two dorsal bundles; in the ground parenchyma, there is a small collateral vascular bundle, with fibers juxtaposed to the phloem. Histochemical reactions were positive for lipophilic, phenolic, and lignified compounds. Among the observed characteristics, the stomatal classification of the leaf and the prominence of the midrib (adaxial surface) in this study help to identify *M. evonymoides* and may contribute to species taxonomy by comparing it with other species of the genus and quality control studies.

---

**1. Introduction**

The genus *Monteverdia*, belonging to the Celastraceae R.Br. family, is native to all regions of Brazil (Biral and Lombardi, 2024). Extracts and substances isolated from species of this genus are known for their anti-inflammatory (Velooso et al., 2017), antinociceptive (Lima et al., 2013), antirheumatic (Silva et al., 2015), antitumor (Santos et al., 2021), larvicidal effect against *Aedes aegypti* (Dos Anjos et al., 2023), and anticarcinogenic activities (Calou et al., 2014; Niero et al., 2011; Huang et al., 2021), besides having anti-adhesive activity against *H. pylori*

(Paula et al., 2021).

Studies by Jorge et al., (2004); Callies et al., (2017), and Guimarães et al., (2020) suggest that most biological activities in plants happen due to the presence of phenolic compounds, flavonoids, glycosides, terpenes, steroids, and alkaloids. These compounds are synthesized by plants from secondary metabolism in response to stress, promoting plant growth and development, and are also responsible for pigmentation and reproduction. Furthermore, they facilitate plants' adaptation to the environment and enhance their defense mechanisms (Betim et al., 2020). Primary and secondary metabolites (such as mucilage, lignified elements, lipophilic