

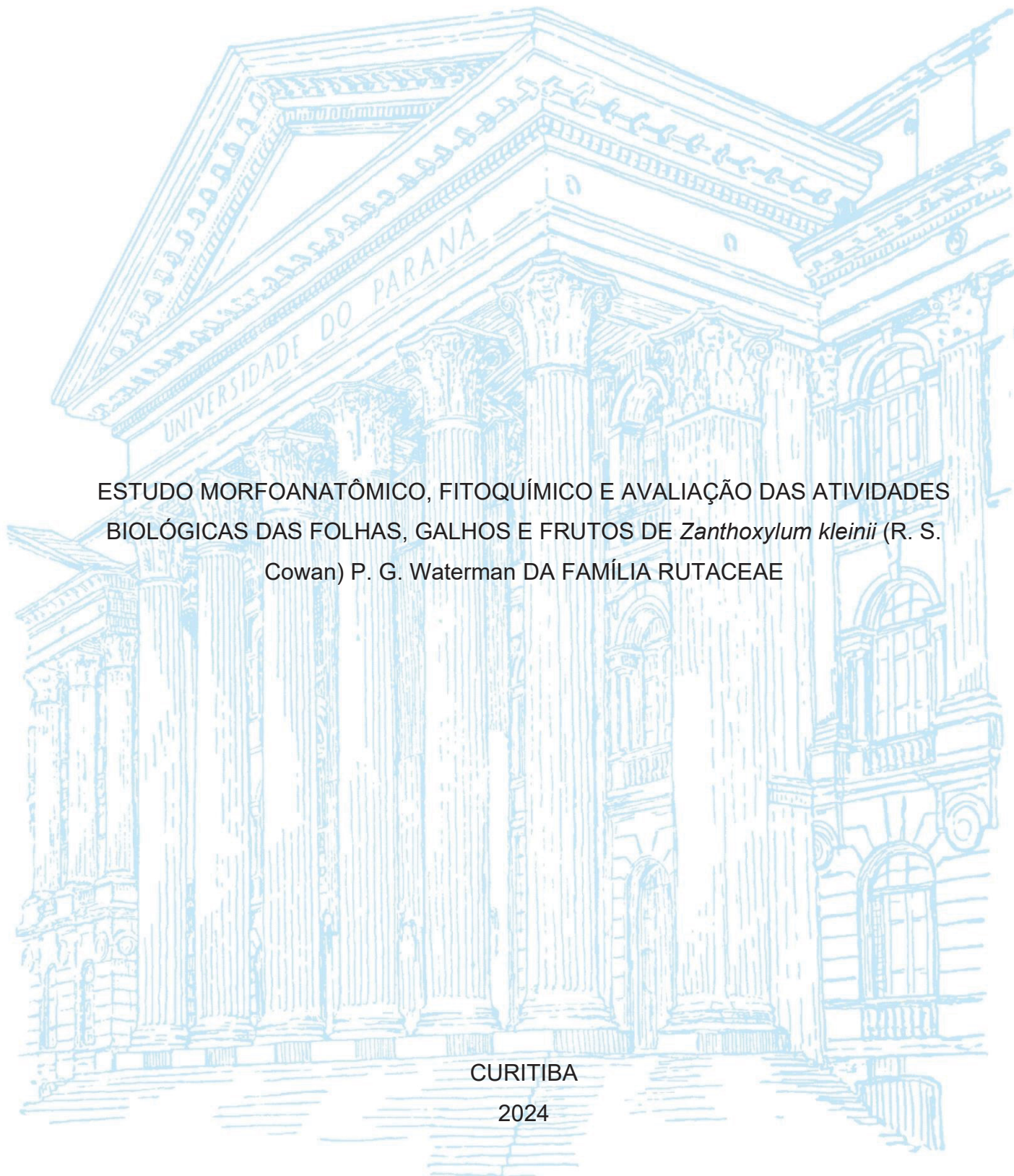
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINE AMORIM FLADZINSKI

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DAS FOLHAS, GALHOS E FRUTOS DE *Zanthoxylum kleinii* (R. S.  
Cowan) P. G. Waterman DA FAMÍLIA RUTACEAE

CURITIBA

2024



KARINE AMORIM FLADZINSKI

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DAS FOLHAS, GALHOS E FRUTOS DE *Zanthoxylum kleinii* (R. S.  
Cowan) P. G. Waterman DA FAMÍLIA RUTACEAE

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profª Drª. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadora: Profª Drª. Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2024

Fladzinski, Karine Amorim

Estudo morfoanatômico, fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das folhas, galhos e frutos de *Zanthoxylum kleinii* (R. S. Cowan) P.G. Waterman da família Rutaceae [recurso eletrônico] / Karine Amorim Fladzinski – Curitiba, 2024.  
1 recurso online : PDF

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

Orientador: Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias  
Coorientador: Profa. Dra. Deise Prehs Montrucchio

1. Rutaceae. 2. Óleos voláteis. 3. Microscopia eletrônica de varredura.  
4. Fitoalexinas. 5. Hesperidina. 6. Limoneno. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari.  
II. Montrucchio, Deise Prehs. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.75



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARINE AMORIM FLADZINSKI** intitulada: **ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS, GALHOS E FRUTOS DE *Zanthoxylum kleinii* (R.S. Cowan) P. G. Waterman DA FAMÍLIA RUTACEAE**, sob orientação da Profa. Dra. JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS, 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 mestra 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, 29 de Janeiro de 2024.

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Presidente da Banca Examinadora

LUCIANA GIBBERT  
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO)

LUCIANE DALARMI  
Avaliador Externo (CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE MARINGÁ - CURITIBA)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

À minha família, principalmente meus pais, Mario Fladzinski e Lourdes Kredens, e meus irmãos, Pedro Fladzinski e André Fladzinski pelo apoio e incentivo que sempre me deram durante toda a minha vida.

Ao Rui Barroso Santos Neto pela companhia nos dias difíceis.

À minha orientadora, professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, pelo incentivo e pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa.

À professora Dra. Deise Presh Montrucchio pela coorientação.

Aos professores Dr. Obdulio Gomes Miguel, Dra. Marilis Dallarmi Miguel e Dra. Luciane Dalarmi pelo auxílio no decorrer da pesquisa.

À professora Dra. Meri Bordignon Nogueira por ter me mostrado o caminho da ciência desde a minha graduação.

À doutoranda Cintia Aparecida dos Anjos pela amizade e pela parceria durante a realização dos testes em laboratório.

À doutoranda Elisiane de Bona Sartor pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

À doutoranda Keli Camargo pela amizade dentro e fora de laboratório.

À mestranda Luciana Sugita pelo auxílio com os testes antioxidantes.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas que participaram dessa jornada.

Aos técnicos e colaboradores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, especialmente o Paulo, a Gracinha e o Mauricio por toda ajuda.

Aos técnicos de todos os outros departamentos que colaboraram com a pesquisa.

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

À Dra. Mônica Surek pelas atividades antimicrobianas.

À Dra. Lorene Armstrong pelo auxílio com o estudo morfoanatômico da espécie.

À Inti de Souza e à Rodrigo Trompczynski Dall pela ajuda com a coleta do material vegetal.

À Universidade Federal do Paraná por mais uma etapa concluída.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Paraná pelo acolhimento e oportunidade.

Ao Núcleo de Estudos em Produtos Naturais e Farmacotécnica (NEPNF) pela oportunidade.

A todos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características morfoanatômicas, fitoquímicas e biológicas das folhas, galhos e frutos da espécie vegetal *Zanthoxylum kleinii* (R. S. Cowan) P. G. Waterman. A análise morfoanatômica da espécie demonstrou mesofilo dorsiventral nas folhas; presença de cavidades secretoras de óleo essencial nas folhas, no pecíolo e nos frutos; estômatos com cavidade subestomática nos frutos e foi identificado cristal de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  no pecíolo e coleteres nas folhas. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos fenólicos, mucilagem e conteúdo lipofílico. Após a extração etanólica e partição líquido-líquido utilizando Soxhlet foram obtidos os extratos brutos das folhas e dos galhos e as respectivas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Dos frutos foram obtidos os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcolico utilizando Soxhlet. A identificação do flavonoide hesperidina a partir da fração acetato de etila dos galhos ocorreu pela análise de espectros FTIR, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A análise fitoquímica das frações das folhas e dos galhos mostrou a presença de esteroides, flavonoides, cumarinas e taninos e nos extratos dos frutos, alcaloides, esteroides, flavonoides, cumarinas e taninos. Foram extraídos óleos essenciais das folhas e dos frutos. O óleo das folhas teve um rendimento de 0,12%, e seus compostos majoritários identificados foram  $\beta$ -felandreno (37,8%),  $\alpha$ -pineno (13,32%) e mirceno (10,05%). O óleo do fruto apresentou rendimento de 0,70% e seus compostos majoritários identificados foram o limoneno (20,16%), o o-cimeno (13,48%) e o terpinen-4-ol (10,77%). O óleo essencial dos frutos mostrou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* com concentração inibitória mínima (CIM) de 3,12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , *E. coli* com CIM de 0,78  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , *P. aeruginosa* e *E. faecalis* com CIM de 1,56  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . A atividade alelopática foi observada na maior concentração de óleo (1%), a qual influenciou na germinação, entretanto não teve efeito sobre o crescimento das sementes de *L. sativa*. Foi extraído polissacarídeo a quente e a frio das folhas, com rendimento de 18,83% e 14,06%, respectivamente. No espectro de raios X por dispersão em energia do polissacarídeo foram identificados oxigênio, carbono, cálcio, cloro, magnésio, enxofre, fósforo e alumínio. O polissacarídeo apresentou compostos fenólicos e o fator de proteção solar obtido foi entre 5,89 a 7,88. O teor de fenólicos totais foi considerado alto para todas as amostras e a maior concentração foi identificada na fração acetato de etila do galho. O teor de flavonoides totais foi maior para as frações das folhas. O potencial antioxidante avaliado pelo método de redução do fosfomolibdênio comparado com os controles de ácido ascórbico, BHT e rutina mostraram maior atividade nas frações do galho. Quando avaliado o potencial antioxidante pelo método DPPH• as frações obtidas com acetato de etila, clorofórmio e a remanescente das folhas e galhos mostraram maior potencial. Conforme apresentado nesse trabalho, o estudo morfoanatômico da espécie mostrou estruturas diferenciais para espécie, como coleter nas folhas e estômatos nos frutos, foi identificado o flavonoide hesperidina na fração acetato de etila do galho e o óleo essencial dos frutos mostrou potencial atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Rutaceae; óleos voláteis; microscopia eletrônica de varredura; fitoalexinas; hesperidina; limoneno

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the morphoanatomical, phytochemical and biological characteristics of the leaves, twigs and fruits of the plant species *Zanthoxylum kleinii* (R. S. Cowan) P. G. Waterman. The morphoanatomical analysis of the species demonstrated dorsiventral mesophyll in the leaves; presence of essential oil secreting cavities in the leaves, petiole and fruits; stomata with substomatal cavity in the fruits and CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> crystals were identified in the petiole and collectors in the leaves. Histochemical tests showed the presence of phenolic compounds, mucilage and lipophilic content. After ethanolic extraction and liquid-liquid partition using Soxhlet, crude extracts of leaves and branches and the respective hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions were obtained. From the fruits, hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts were obtained using Soxhlet. The identification of the flavonoid hesperidin from the ethyl acetate fraction of the twigs occurred by analyzing FTIR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra. The phytochemical analysis of the leaf and twig fractions showed the presence of steroids, flavonoids, coumarins and tannins and in the fruit extracts, alkaloids, steroids, flavonoids, coumarins and tannins. Essential oils were extracted from the leaves and fruits. The oil from the leaves had a yield of 0.12%, and its major compounds identified were β-phellandrene (37.8%), α-pinene (13.32%) and myrcene (10.05%). The fruit oil presented a yield of 0.70% and its major compounds identified were limonene (20.16%), o-cymene (13.48%) and terpinen-4-ol (10.77%). The essential oil of the fruits showed antimicrobial activity against *S. aureus* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.12 µg/µl, *E. coli* with an MIC of 0.78 µg/µl, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* with MIC of 1.56 µg/µl. Allelopathic activity was observed at the highest oil concentration (1%), which influenced germination, but had no effect on the growth of *L. sativa* seeds. Hot and cold polysaccharide was extracted from the leaves, with yields of 18.83% and 14.06%, respectively. In the energy-dispersive X-ray spectrum of the polysaccharide, oxygen, carbon, calcium, chlorine, magnesium, sulfur, phosphorus and aluminum were identified. The polysaccharide presented phenolic compounds and the sun protection factor obtained was between 5.89 and 7.88. The total phenolic content was considered high for all samples and the highest concentration was identified in the ethyl acetate fraction of the branch. The total flavonoid content was higher for leaf fractions. The antioxidant potential evaluated by the phosphomolybdenum reduction method compared with ascorbic acid, BHT and rutin controls showed greater activity in the twig fractions. When evaluating the antioxidant potential using the DPPH• method, the fractions obtained with ethyl acetate, chloroform and the remainder of leaves and branches showed greater potential. As presented in this work, the morphoanatomical study of the species showed differential structures for the species, such as vests in the leaves and stomata in the fruits, the flavonoid hesperidin was identified in the ethyl acetate fraction of the twig and the essential oil of the fruits showed potential antimicrobial activity.

Keywords: Rutaceae; volatile oils; scanning electron microscopy; phytoalexins; hesperidin; limonene

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- PRINCIPAIS VIAS DOS METABÓLITOS NAS PLANTAS.....	30
FIGURA 2	- ESTRUTURAS QUÍMICAS IDENTIFICADAS EM ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA RUTACEAE.....	34
FIGURA 3	- PONTOS EM UMA ESCALA DE AMARELO A VERMELHO INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO DE RUTÁCEAS NO MUNDO.....	36
FIGURA 4	- PRINCIPAIS CLASSES DE ALCALOIDES DERIVADOS DO ÁCIDO ANTRANÍLICO NA FAMÍLIA RUTACEAE.....	38
FIGURA 5	- <i>Zanthoxylum kleinii</i> EM SEU HABITAT.....	41
FIGURA 6	- FLUXOGRAMA COM AS ETAPAS DA METODOLOGIA DO TRABALHO.....	43
FIGURA 7	- TRITURADOR USADO NA TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	44
FIGURA 8	- EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES VEGETATIVAS DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	55
FIGURA 9	- EXTRAÇÃO HIDROALCÓOLICA DAS FOLHAS E CAULE UTILIZANDO APARATO SOXHLET.....	57
FIGURA 10	- ROTA-EVAPORADOR, EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA CONCENTRAR OS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	58
FIGURA 11	- ETAPAS DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS E DOS GALHOS.....	59
FIGURA 12	- DESENHO ESQUEMÁTICO DO MATERIAL UTILIZADO PARA FAZER CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	62
FIGURA 13	- ESPECTRÔMETRO FTIR UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS.....	64

FIGURA 14	- ESPECTROFOTÔMETROS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-Vis.....	65
FIGURA 15	- EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO DAS FOLHAS DE <i>Z. kleinii</i> .....	66
FIGURA 16	- DISTRIBUIÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. Sativa</i> NO FUNDO DA CAIXA.....	73
FIGURA 17	- HIPOCÓTILO E RADÍCULA, ESTRUTURAS AVALIADAS APÓS PERÍODO DO TESTE DE ALELOPATIA.....	75
FIGURA 18	- MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Z. Kleinii</i> .....	78
FIGURA 19	- MORFOANATOMIA DO FOLÍOLO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	80
FIGURA 20	- ANATOMIA DO PECÍOLO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	82
FIGURA 21	- ESPECTRO EDS E IMAGEM DE MEV DE CRISTAL PRISMÁTICO IDENTIFICADO NO PECÍOLO DE <i>Z.kleinii</i> .....	83
FIGURA 22	- DESCRIÇÃO ANATÔMICA DA RAQUIS DA ESPÉCIE <i>Z. Kleinii</i> .....	83
FIGURA 23	- ANATOMIA DO GALHO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	84
FIGURA 24	- ESPECTRO EDS E IMAGEM DE CÉLULAS DO XILEMA DO GALHO DE <i>Z. kleinii</i> .....	85
FIGURA 25	- MORFOANATOMIA DO FRUTO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .	86
FIGURA 26	- IMAGEM DO FRUTO DE <i>Z. Kleinii</i> COM OS PONTOS NOS QUAIS FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS EDS.	86
FIGURA 27	- TESTES HISTOQUÍMICOS DO FOLÍOLO, DO PECÍOLO E DO GALHO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	89
FIGURA 28	- TESTES HISTOQUÍMICOS DO FRUTO DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> . .....	90
FIGURA 29	- TESTES HISTOQUÍMICOS DO COLETER DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	91
FIGURA 30	- COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Z. kleinii</i> .....	99

FIGURA 31	- ESTRUTURA QUÍMICA DA HESPERIDINA, IDENTIFICADA NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO GALHO.....	104
FIGURA 32	- HESPERIDINA NA SUA FORMA AGLICONA E SEUS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO.....	104
FIGURA 33	- HESPERIDINA ISOLADA DOS GALHOS DE <i>Z. kleinii</i> x HESPERIDINA COMERCIAL.....	104
FIGURA 34	- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (FTIR) DO PBAE NA FAIXA DE 500 A 4000 $\text{cm}^{-1}$ .....	105
FIGURA 35	- ESPECTRO TOTAL DE $^1\text{H}$ DO PBAE EM DMSO, JANELA DE 0 PPM Á 12 PPM.....	107
FIGURA 36	- ESPECTRO TOTAL DE $^1\text{H}$ DO PBAE EM DMSO COM AMPLIAÇÃO DOS SINAIS, JANELA DE 0 PPM Á 12 PPM.....	108
FIGURA 37	- ESPECTRO TOTAL DE $^{13}\text{C}$ DO PBAE EM DMSO, JANELA DE 0 Á 200 PPM.....	109
FIGURA 38	- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}$ DO PBAE EM DMSO, DE 0 Á 40 PPM.....	110
FIGURA 39	- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}$ DO PBAE EM DMSO, DE 50 Á 85 PPM.....	111
FIGURA 40	- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE $^{13}\text{C}$ DO PBAE EM DMSO, DE 90 Á 200 PPM.....	112
FIGURA 41	- AMOSTRA DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>Z. kleinii</i> .....	114
FIGURA 42	- IMAGEM DE MEV DO POLISSACARÍDEO DE <i>Z. kleinii</i> E PONTOS DE OBTENÇÃO DE ESPECTROS EDS.....	115
FIGURA 43	- VARREDURA UV-Vis DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A QUENTE E POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A FRIO, DE 250 A 600 nm.....	116
FIGURA 44	- RESULTADO DA REAÇÃO DE LANE-ENOY PARA AÇÚCAR REDUTOR.....	118

FIGURA 45	- ESPECTRO FTIR DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>Z. kleinii</i> .....	119
FIGURA 46	- EXPANSÃO DO ESPECTRO FTIR DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>Z.kleinii</i> NA REGIÃO DE 1800 À 800 $\text{cm}^{-1}$ .....	120
FIGURA 47	- MICROPLACA COM OS RESULTADOS DO TESTE DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	123
FIGURA 48	- RESULTADO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE FRENTE AO MÉTODO DO RADICAL DPPH, APÓS CALCULAR A PORCENTAGEM DO ÍNDICE ANTIOXIDANTE DE PADRÕES E AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO.....	126
FIGURA 49	- INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Z. kleinii</i> SOBRE ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> NA AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA.....	128
FIGURA 50	- CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Z. kleinii</i> .....	130

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- COMPOSTOS ISOLADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Zanthoxylum</i> .....	40
TABELA 2	- RELAÇÃO ENTRE O EFEITO ERITEMATÓGENO (EE) E A INTENSIDADE DE RADIAÇÃO (I) NOS COMPRIMENTOS DE ONDA ESPECÍFICOS.....	67
TABELA 3	- DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Z. Kleinii</i> PARA ENSAIO DE ALELOPATIA.....	72
TABELA 4	- COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE ESTRUTURAS PRESENTES NO INTERIOR DO FRUTO DE <i>Z. kleinii</i> .....	87
TABELA 5	- TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS NO COLETER DA ESPÉCIE <i>Z. kleinii</i> .....	91
TABELA 6	- RESULTADOS DOS ENSAIOS FOTOQUÍMICOS PRELIMINARES DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS.....	94
TABELA 7	- RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS PRELIMINARES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS.....	95
TABELA 8	- COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Z. kleinii</i> (CONTINUA).....	97
TABELA 9	- RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E DOS GALHOS E DOS EXTRATOS DOS FRUTOS.....	101
TABELA 10	- RESULTADO DA CCD REALIZADA PARA EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, GALHO E FRUTO, E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES.....	102
TABELA 11	- DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C DO COMPOSTO PBAE EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA HESPERIDINA.....	106
TABELA 12	- COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE DIVERSOS PONTOS NA AMOSTRA DE POLISSACARÍDEO DE <i>Z. kleinii</i> .....	116
TABELA 13	- COMPRIMENTOS DE ONDA DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A	

	QUENTE (PQ) E DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A FRIO (PF) DE 290 NM A 320 NM PARA CÁLCULO DO FPS.....	117
TABELA 14	- TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS DE EXTRATOS BRUTO, FRAÇÕES E POLISSACARÍDEO DE <i>Z. kleinii</i> .....	121
TABELA 15	- RESULTADO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	124
TABELA 16	- ÍNDICE ANTIOXIDANTE EM PORCENTAGEM DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PADRÕES FRENTE AO RADICAL DPPH.....	125
TABELA 17	- EQUIVALENTE TROLOX EM $\mu\text{g}$ POR MILIGRAMA DE AMOSTRA CALCULADOS A PARTIR DA REGRESSÃO LINEAR.....	127
TABELA 18	- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Z. kleinii</i> NA AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA.....	128
TABELA 19	- CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DO FRUTO DE <i>Z. kleinii</i> .....	130
TABELA 20	- CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA CADA CEPA BACTERIANA AVALIADA FRENTE AO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE <i>Z. kleinii</i> .....	131

## LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
BHT	Butilhidróxidotolueno
CCD	Cromatografia em camada delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente ácido gálico
EBG	Extrato bruto dos galhos
EBF	Extrato bruto das folhas
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva)
EQ	Equivalente quercetina
FAEG	Fração acetato de etila do galhos
FAEF	Fração acetato de etila das folhas
FAEFr	Fração acetato de etila dos frutos
FCG	Fração clorofórmio dos galhos
FCF	Fração clorofórmio das folhas
FCFr	Fração clorofórmio dos frutos
FHG	Fração hexano dos galhos
FHF	Fração hexano das folhas
FHFr	Fração hexano dos frutos
FOHFr	Fração hidroalcolica dos frutos
FRG	Fração remanescente dos galhos
FRF	Fração remanescente das folhas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PF	Polissacarídeo extraído a frio
PQ	Polissacarídeo extraído a quente

RMN      Ressonância magnética nuclear

UV        Ultravioleta

UV-Vis   Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivo geral.....	25
1.1.2	Objetivos específicos.....	25
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1	AS PLANTAS MEDICINAIS E SEU USO NA MEDICINA TRADICIONAL.....	27
2.2	METABÓLITOS ATIVOS NAS PLANTAS MEDICINAIS.....	29
2.3	POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS.....	31
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	32
2.4.1	Composição química dos óleos essenciais.....	33
2.5	A FAMÍLIA RUTACEAE.....	35
2.6	GENÊRO <i>Zanthoxylum</i> L.....	38
2.7	ESPÉCIE <i>Zanthoxylum kleinii</i> (R.S.Cowan) P.G.Waterman.....	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	44
3.1.2	Coleta, identificação e registro no SISGEN.....	44
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	45
3.2.1	Solução FAA.....	45
3.2.2	Secção do material vegetal.....	45
3.2.3	Face abaxial e adaxial.....	46
3.2.4	Montagem de lâminas semipermanentes.....	46
3.2.5	Testes histoquímicos.....	46
3.2.6	Imagens de microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.....	47
3.2.7	Espectroscopia de raio-X de energia dispersiva (EDS).....	47
3.3	PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS.....	48
3.3.1	Perda por dessecação.....	48
3.3.2	Determinação de cinzas totais.....	48
3.4	ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	49
3.4.1	Extrato Hidroalcoólico.....	49

3.4.1.1	Pesquisa de Alcaloides.....	50
3.4.1.2	Pesquisa de Leucoantocianidinas.....	50
3.4.1.3	Pesquisa de heterosídeos flavonicos.....	51
3.4.1.4	Pesquisa de flavononois.....	51
3.4.1.5	Pesquisa de dihidroflavonas.....	51
3.4.1.6	Pesquisa de flavononas.....	51
3.4.1.7	Pesquisa de cumarinas.....	52
3.4.1.8	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	52
3.4.1.9	Pesquisa de esteroides e triterpenos.....	53
3.4.2	Extrato aquoso.....	53
3.4.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	53
3.4.2.2	Pesquisa de heterosídeos saponinícos.....	54
3.4.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos.....	54
3.5	EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	54
3.5.1	Hidrodestilação.....	54
3.5.2	Caracterização do óleo essencial.....	56
3.6	PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	56
3.6.1	Extração por Soxhlet de folhas e galhos.....	56
3.6.1.1	Determinação do teor de sólido do extrato bruto.....	57
3.6.1.2	Fracionamento do extrato bruto.....	58
3.6.2	Extração por Soxhlet dos frutos.....	59
3.6.3	Rendimento dos extratos brutos e frações.....	60
3.7	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	60
3.8	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS.....	63
3.8.1	Identificação dos compostos químicos por ressonância magnética nuclear (RMN).....	63
3.8.2	Espectroscopia na região do infravermelho (IR).....	63
3.8.3	Espectrofotometria UV-Vis.....	64
3.9	POLISSACARÍDEO.....	65
3.9.1	Extração e armazenamento.....	65
3.9.2	Análise fotoprotetora <i>in vitro</i> .....	66
3.9.3	Determinação de açúcares pelo método de <i>Lane-Eynon</i> .....	67

3.10	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	68
3.10.1	Determinação do teor de fenólicos totais.....	68
3.10.2	Determinação do teor de flavonoides totais.....	68
3.11	POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	69
3.11.1	Potencial antioxidante pelo teste Redução do Fosfomolibdênio.....	69
3.11.2	Determinação da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH.....	70
3.12	ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	72
3.12.1	Germinação.....	73
3.12.2	Crescimento.....	74
3.13	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
4.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	77
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	77
4.2.1	Morfologia externa das folhas, dos galhos, pecíolo, coleter e frutos de <i>Z. kleinii</i> (R.S. Cowan) P.G. Waterman.....	77
4.2.2	Descrição morfoanatômica do folíolo da espécie <i>Z. kleinii</i> (R.S. Cowan) P.G. Waterman.....	79
4.2.3	Descrição anatômica de pecíolo de <i>Z. kleinii</i> (R.S. Cowan) P.G. Waterman.....	81
4.2.4	Descrição anatômica da ráquis de <i>Z. kleinii</i> .....	83
4.2.5	Descrição anatômica dos galhos de <i>Z. kleinii</i> .....	84
4.2.6	Descrição morfoanatômica do fruto.....	85
4.2.7	Testes histoquímicos do folíolo, pecíolo, raquis, galhos e frutos de <i>Z. kleinii</i> (R.S. Cowan) P.G. Waterman.....	88
4.2.8	Descrição morfoanatômica dos coleteres.....	90
4.3	PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS.....	93
4.3.1	Perda por dessecação.....	93
4.3.2	Determinação de cinzas totais.....	93
4.4	ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	94
4.5	EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE <i>Z. kleinii</i> .....	95
4.5.1	Compostos identificados no óleo essencial das folhas.....	96

4.5.2	Compostos identificados nos frutos de <i>Z. kleinii</i> (R.S. Cowan) P.G. Waterman.....	100
4.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FOLHAS E GALHOS E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES.....	101
4.7	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CCD.....	101
4.8	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTO QUÍMICO.....	103
4.9	POLISSACARÍDEO.....	113
4.9.1	Espectro EDS do polissacarídeo.....	114
4.9.2	Varredura UV-Vis e FPS de amostra de polissacarídeo.....	116
4.9.3	Determinação de açúcar redutor pelo método de <i>Lane-Enoy</i> .....	118
4.9.4	Espectro infravermelho (IR) do polissacarídeo.....	119
4.10	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	120
4.11	POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	123
4.11.1	Potencial antioxidante pelo teste de redução do fosfomolibdênio.....	123
4.11.2	Determinação da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH.....	125
4.12	ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	128
4.12.1	Germinação.....	128
4.12.2	Crescimento.....	129
4.13	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	131
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>136</b>
	<b>APÊNDICE 1 - ESPECTROS EDS DO FRUTO DE <i>Z. kleinii</i> (1 E 2)...</b>	<b>151</b>
	<b>APÊNDICE 2 - ESPECTROS EDS DO FRUTO DE <i>Z. kleinii</i> (3 E 4)...</b>	<b>152</b>
	<b>APÊNDICE 3 - ESPECTROS EDS DO FRUTO DE <i>Z. kleinii</i> (5 E 6)..</b>	<b>153</b>
	<b>APÊNDICE 4 - ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (1 E 2).....</b>	<b>154</b>
	<b>APÊNDICE 5 - ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (3 E 4).....</b>	<b>155</b>
	<b>APÊNDICE 6 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (5 E 6).....</b>	<b>156</b>

<b>APÊNDICE 7 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (7 E 8).....</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE 8 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (9 E 10).....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO - SISGEN.....</b>	<b>159</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram amplamente empregadas ao longo dos anos, em todo território brasileiro, ligadas à medicina popular e a práticas culturais passadas de geração para geração. A partir dos anos 1990, o Sistema Único de Saúde passou a incorporar o uso das plantas medicinais, culminando com a implantação da fitoterapia na saúde pública (RIBEIRO et al., 2019).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos foi encorajado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, o Ministério da Saúde lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) em 2006 (BRASIL, 2006a), oferecendo aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) a Fitoterapia. Outra portaria relacionada a plantas medicinais é o Decreto nº. 5.813, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006b). Em 2009, por meio da Portaria GM/MS nº. 533, foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), essa lista conta com 71 espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse para o SUS (BRASIL, 2009).

Em 2012 foi publicada a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), instrumento que visa auxiliar na Assistência Farmacêutica no SUS, este conta com doze fitoterápicos, com segurança e eficácia comprovados (BRASIL, 2022).

Desde que as plantas medicinais tiveram esse respaldo legal, os fitoterápicos vêm ganhando cada vez mais espaço na saúde pública, com mais investimentos direcionados a pesquisas. Uma das principais estratégias para o fortalecimento da fitoterapia no SUS é a parceria com universidades para comprovar por meios científicos a utilização de determinados medicamentos (RIBEIRO et al., 2019).

O estudo realizado por Zago et al. (2018) analisou quais países apresentam maior frequência de artigos científicos sobre plantas medicinais que foram publicados entre 1991 e 2013. O Brasil ficou em segundo lugar, perdendo apenas para Índia (ZAGO, et al. 2018). Esse mesmo estudo mostra que ocorreu um aumento gradativo de pesquisas entre 2006 e 2014, isso se deve a quantidade de metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais que ainda não foram estudados.

O aumento na pesquisa de fitoterápicos pode ser justificado por alguns motivos como o alto custo dos medicamentos industrializados, difícil acesso a um

sistema de saúde de qualidade ou pela falta de medicamentos nos pontos de distribuição (PINTO et al., 2020).

Embora o Brasil tenha ficado bem colocado, observando os índices da pesquisa, a quantidade de trabalhos é diminuta em relação ao número de espécies. De acordo com um grupo de botânicos há mais de 25 mil espécies de plantas nativas em território brasileiro (BFG, 2021), sendo 43% exclusivas do território nacional. Sua vasta diversidade faz com que seja um território bastante cogitado para pesquisa de novos produtos naturais (FIORAVANTI, 2016).

A família Rutaceae constitui o maior grupo de plantas da ordem Sapindales, com cerca de 158 gêneros e 2.206 espécies (WFO, 2023). No Brasil foram descritas aproximadamente 240 espécies, sendo que destas, 107 são endêmicas (RUTACEAE, 2023). Possui importância medicinal e agrônômica, conhecida principalmente pelos frutos comestíveis como laranja, limão, tangerina e toranja (GURIB-FAKIM, 2006). A família possui metabólitos secundários que despertam interesse de pesquisadores, como alcaloides (derivados do ácido antranílico), cumarinas, flavonoides e limonoides (GURIB-FAKIM, 2006; ISIDORO, et al. 2012). Conta com vários representantes de valor medicinal a citar, *Pilocarpus jaborandi* Holmes e *Ruta graveolens* var. *angustifolia* Wall. Uma característica importante dessa família são as glândulas produtoras de óleo nos galhos, folhas, flores e frutos (RUTACEAE, 2023).

O gênero *Zanthoxylum* L. possui mais de 200 espécies, sendo 27 espécies distribuídas no Brasil, nove são endêmicos, a maioria delas estão localizadas em áreas tropicais e poucas são encontradas em áreas temperadas (PIRANI; GROppo 2023). Muitas espécies produzem metabólitos secundários com atividades biológicas como alcaloides, cumarinas, terpenos, lignanas, esteroides e flavonoides (RIOS et al., 2018). A espécie *Zanthoxylum kleinii* (R.S.Cowan) P.G.Waterman é descrita como espécie madeireira para confecção de ferramentas, construção civil e recuperação de áreas degradadas (FERNANDES, 2022). Sua ocorrência foi relatada principalmente nos estados do Sul do Brasil (TROPICOS, 2023).

Há um crescente interesse dos pesquisadores em produtos naturais, pois, as plantas apresentam muitas atividades como: potenciais antioxidante (OLIVEIRA et al., 2015), antimicrobiano (ZAMORA et al., 2023), fungicida derivado de plantas (LI et al., 2022), herbicidas naturais (RIOS et al., 2018), fotoproteção (KUMAR SANTHANAM et al. 2017), além disso, extratos ou óleo essencial podem ser

combinados com fármacos aumentando o efeito farmacológico e reduzindo os eventos adversos de drogas sintéticas (ZAMORA et al., 2023).

Por meio de revisão de literatura foi possível constatar que o gênero *Zanthoxylum* apresenta potencial farmacológico, algumas espécies desse gênero apresentam compostos químicos biologicamente ativos. A espécie *Z. kleinii* não apresenta relatos sobre morfoanatomia, perfil fitoquímico e atividades biológicas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as características morfoanatômicas, fitoquímica e atividades biológicas das folhas, galhos, frutos e polissacarídeo da espécie *Zanthoxylum kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman, da família Rutaceae.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Coletar o material vegetal (folhas, galhos e frutos);
- Identificar a espécie vegetal e realizar cadastro no SISGEN;
- Realizar análises físico-químicas (cinzas, perda por dessecação) das folhas e galhos;
- Avaliar as características morfoanatômicas das partes aéreas (folha, pecíolo, ráquis e galhos) e fruto da espécie *Zanthoxylum kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman;
- Realizar os ensaios para análise fitoquímica preliminar por meio da marcha fitoquímica para as folhas de *Z. kleinii*;
- Extrair o óleo essencial das folhas e dos frutos pela técnica da hidrodestilação utilizando aparato *Clevenger*;
- Fazer a caracterização química do óleo essencial das folhas e dos frutos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas;
- Obter o extrato hidroalcolico das folhas, dos galhos e frutos, e fracionar usando solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila) e calcular o teor de sólidos dos extratos brutos de folhas e galhos e o rendimento de cada fração;

- Fazer a cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos brutos das folhas e galhos, suas frações, dos extratos brutos dos frutos e polissacarídeo;
- Isolar e identificar compostos químicos presentes nos extratos brutos de folhas e galhos, suas frações e extratos brutos dos frutos;
- Extrair os polissacarídeos, calcular o rendimento e fazer sua caracterização;
- Quantificar os fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos brutos de folhas e galhos e suas frações, frações do fruto e polissacarídeo;
- Avaliar o potencial antioxidante, por meio dos testes: fosfomolibdênio e radical DPPH dos extratos brutos de folhas e galhos e suas frações, frações do fruto e polissacarídeo;
- Investigar o potencial alelopático do óleo essencial dos frutos de *Z. kleinii* sobre a espécie *Lactuca sativa*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana pelo método de diluição em caldo e avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais, extratos brutos e polissacarídeo;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AS PLANTAS MEDICINAIS E SEU USO NA MEDICINA TRADICIONAL

As plantas contam com uma variedade de metabólitos, com estruturas químicas complexas, despertando interesse nos pesquisadores (SILVEIRA et al., 2021). O poder curativo das plantas é conhecido desde a antiguidade, com o surgimento da escrita os povos antigos fizeram vários registros sobre as propriedades das plantas, separando-as em benéficas ou nocivas. A primeira descrição encontrada foi a obra chinesa *Chinesa Pen Ts'ao* (2.800 a.C.) de Shen Nung. No início da Era Cristã (50 d.C) o médico grego Pedanius Dioscorides escreveu a obra *De Matéria Médica* principal referência utilizada por médicos e farmacêuticos da época em que vários medicamentos tiveram sua atividade comprovada mostrando sua contribuição para área medicinal (SILVEIRA et al., 2021).

A população antiga fazia uso das plantas de acordo com suas experiências empíricas, além da observação do uso das plantas pelos animais (OLIVEIRA et al., 2006). Na idade contemporânea, com o avanço na área química, os extratos vegetais foram sendo substituídos por substâncias isoladas e identificadas. Nesse período foram isolados a morfina, a quinina e a atropina. A partir do século XX, com o advento da elucidação das estruturas químicas das plantas, moléculas isoladas se tornaram fármacos (SILVEIRA et al., 2021).

Apesar de ser utilizada por muitos anos, a escolha de determinada espécie para seu uso deve considerar algumas características como a etnobotânica, a quimiotaxonomia, a função ecológica e a interação planta-ambiente. A etnobotânica investiga a relação entre os povos e as plantas, registrando o conhecimento popular sobre determinadas espécies. Muitos produtos farmacêuticos foram descobertos a partir da observação do uso das plantas por povos nativos (GURIB-FAKIM, 2006). Medicamentos como Acheflan<sup>®</sup> obtido através do óleo essencial de *Cordia verbenácea* teve atividade comprovada ao observar o uso popular (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A investigação da interação planta-meio ambiente pode contribuir com a descoberta de novas drogas pois as vias biossintéticas das plantas podem ser alteradas pelo meio que estas se encontram (SILVEIRA et al., 2021)

A FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou 1800 novas moléculas para serem utilizadas como fármacos nas últimas quatro décadas, sendo que 23% tem origem nos produtos naturais e seus derivados, esses dados mostram a importância dessa fonte para descoberta de novos medicamentos (SILVEIRA et al., 2021).

De acordo com WHO (*World Health Organization*) cerca de 80% da população mundial utiliza medicina tradicional, abrangendo práticas como medicina ayurvédica e misturas de ervas (WHO, 2022).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contendo mais de 50 mil espécies (incluindo algas fungos e plantas), sendo que destes mais de 35 mil plantas são endêmicas do nosso país (BFG, 2021), apesar disso, apenas 25% dos fitoterápicos registrados são oriundos de espécies vegetais presentes na América do Sul. Estima-se que menos de 15% das espécies tenham sido estudadas para fins de utilização na medicina (ZAGO, 2018).

A partir de 1978 a OMS passou a reconhecer o uso de plantas medicinais como uma estratégia efetiva em saúde. No Brasil, com a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) em 2006, foi instaurado o uso de plantas medicinais e fitoterapia no SUS, com enfoque na Atenção Primária à Saúde (APS) (BRASIL, 2006a). Essa medida ajudou também na valorização do conhecimento popular (PATRICIO, 2022). Outra portaria relacionada a plantas medicinais é o Decreto nº. 5.813, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006b). Por meio da Portaria GM/MS nº. 533, foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), abrangendo 71 espécies com potencial terapêutico para gerar produtos de interesse ao SUS, essa lista tem como finalidade subsidiar pesquisas de fitoterápicos que possam ser utilizados pela população, com segurança e eficácia (BRASIL, 2009).

As plantas medicinais e fitoterápicos fazem parte do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (CBAF) no qual é definido um conjunto de plantas que será disponibilizado aos usuários do SUS. A RENAME atualmente conta com doze fitoterápicos. A lista RENAME tem atualização permanente e por meio dela os municípios podem selecionar os itens que farão parte de sua própria lista, a REMUME (Relação Municipal de Medicamentos Essenciais) (BRASIL, 2022).

## 2.2 METABÓLITOS ATIVOS NAS PLANTAS MEDICINAIS

As plantas contam com diversas funções celulares, em cada célula podem ocorrer reações químicas com a finalidade de sintetizar substâncias complexas a partir de substâncias simples, ou para degradar as complexas e obter as simples. A esse conjunto de reações dá-se o nome de metabolismo (SÁNCHEZ, 2022).

Dois tipos de metabolismo podem ser realizados pelas plantas: primário e secundário. O metabolismo primário produz metabólitos que atuam no crescimento, desenvolvimento e reprodução, como os açúcares, proteínas, lipídeos e aminoácidos (HARBORNE, 1999). O metabolismo secundário das plantas atua na produção de metabólitos de natureza química diversa. Estes são importantes na adaptação das espécies ao estresse ambiental e na defesa contra predadores e patógenos (BORGES et al., 2020; GURIB-FAKIM, 2006).

Os metabólitos secundários, ou metabólitos especializados, desenvolvem-se em espécies naturais, como as plantas (CUNHA et al., 2016). São encontrados em pequenas quantidades e são produzidos quando a espécie se encontra sob estresse, ou seja, em condições externas que afetam seu desenvolvimento. Quando uma planta é ameaçada por outro organismo vivo (bactérias, insetos, ervas daninhas) ou por fatores ambientais (temperaturas extremas, excesso de umidade ou radiação ultravioleta) utilizam seus metabólitos secundários como defesa (RIOJA SOTO, 2020). Em geral pertencem a umas das três classes de moléculas: terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados (HARBORNE, 1999). Além de proporcionar a proteção das espécies, esses compostos são comercialmente utilizados pela indústria farmacêutica (BORGES et al., 2020; CUNHA et al., 2016).

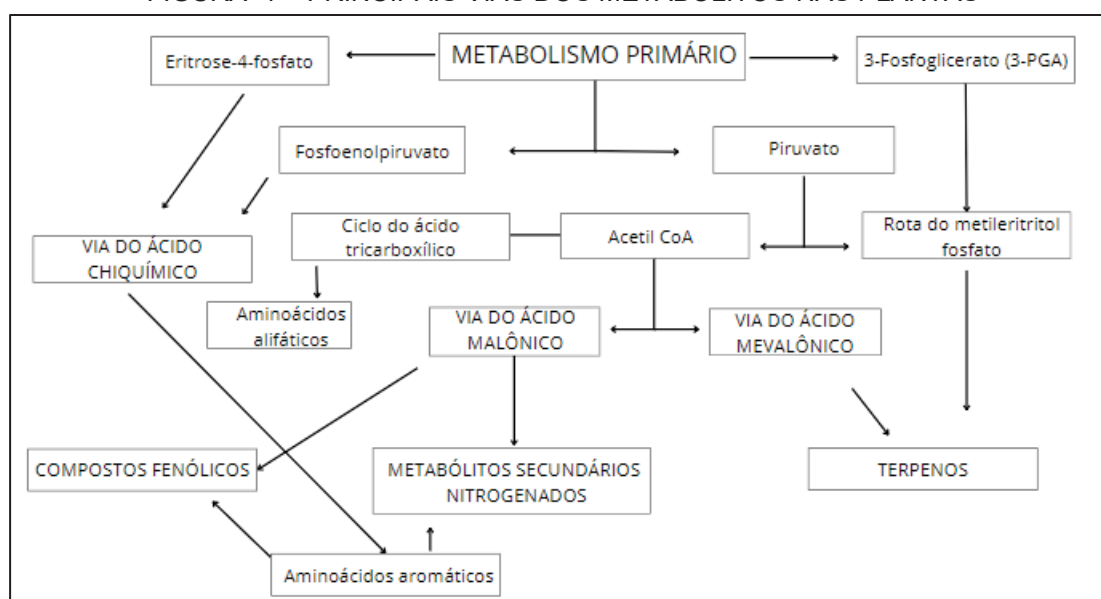
Os terpenos são hidrocarbonetos naturais, podem ser moléculas pequenas voláteis (mono e sesquiterpenos) (HARBORNE, 1999), hormônios ou componentes celulares como pigmentos carotenoides. Os terpenoides são formados pela rota do ácido mevalônico (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000) (FIGURA 1). Esses compostos estão entre os mais ativos contra insetos e fungos, devido principalmente ao seu aroma característico. Um exemplo não volátil dessa classe é o limonoide, responsável pelo sabor amargo nos cítricos (BORGES et al., 2020).

Os compostos fenólicos são estruturas aromáticas que contém pelo menos um grupo fenol, ou seja, uma hidroxila funcional em um anel aromático. Esse grupo

conta com os flavonoides (flavonas e flavonóis), isoflavonoides (isoflavonas), taninos, antocianinas, ligninas e cumarinas. Por ser um grupo bastante diverso desempenha diferentes papéis nas plantas, como defesa contra patógenos e atração de polinizadores devido a suas cores e atividade alelopática por afetar o crescimento de outras plantas. A maioria dos compostos fenólicos são derivados da fenilalanina, vindo da rota do ácido chiquímico (FIGURA 1) (HARBORNE, 1999; VERPOORTE; ALFERMANN, 2000).

No grupo dos compostos nitrogenados, estão principalmente os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e alguns aminoácidos. Esses compostos são derivados do ácido chiquímico (FIGURA 1). Esses compostos atuam na defesa das plantas, entretanto, sua produção nas plantas depende da disponibilidade de nitrogênio no meio. Além disso, alcaloides podem ser encontrados em maior quantidade em tecidos de armazenamento (raízes, frutos e sementes) do que em folhas (HARBORNE, 1999).

FIGURA 1 – PRINCIPAIS VIAS DOS METABÓLITOS NAS PLANTAS



FONTE: Adaptado de Taiz e Zeigert (2004).

Os metabólitos primários também são importantes para defesa das plantas, fornecendo intermediários biossintéticos para o metabolismo secundário para iniciar as respostas de defesa, ou atuando diretamente contra patógenos, polissacarídeos e proteínas por exemplo podem apresentar características antivirais (DUARTE et al., 2023).

## 2.3 POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ESPÉCIES VEGETAIS

Os polissacarídeos (açúcares) são metabólitos primários encontrados nas plantas, são um tipo de polímero biológico que apresentam mais de dez monossacarídeos, estes podem ser homo ou hetero polissacarídeos conectados por ligações glicosídicas (SHAN et al., 2022; YARLEY et al., 2021).

Uma revisão realizada por Zhan et al. (2015) encontrou 131 medicamentos com carboidratos na Farmacopeia dos Estados Unidos, na Chinesa, na Japonesa e na Europeia, sendo utilizados como excipientes ou medicamentos. Os polissacarídeos derivados de vegetais e animais representam 77% dessa pesquisa, seguido por oligossacarídeos e monossacarídeos.

O isolamento dos polissacarídeos das plantas envolve etapas como homogeneização do material vegetal, extração, saturação e purificação (BARASHKOVA et al., 2020). Quando extraído de produtos naturais pode apresentar impurezas, por isso é necessário realizar a separação dos componentes para relacioná-lo com as atividades biológicas (YARLEY et al., 2021). Entretanto, essas etapas podem remover outros metabólitos que são extraídos junto com o polissacarídeo, pois os polissacarídeos podem se apresentar conjugados com aminoácidos, proteínas e lipídios, e isso resulta em uma perda de atividade biológica (BARASHKOVA et al., 2020; YARLEY et al., 2021).

Os polissacarídeos de origem vegetal são moduladores imunológicos, além disso, podem apresentar potencial antioxidante e propriedades como antienvhecimento, antimicrobiana e antitumoral (SHAN et al., 2022; YARLEY et al., 2021). A atividade inibitória dos polissacarídeos apresenta correlação com seu conteúdo fenólico (YARLEY et al., 2021).

Alguns estudos com polissacarídeo podem ser observados em espécies da do gênero *Zanthoxylum*, o polissacarídeo extraído da casca da espécie *Zanthoxylum schinifolium* fo. *macrocarpum* (Loes.) Rehder apresentou atividade antienvhecimento (SHAN et al. 2022); o polissacarídeo extraído de *Citrus limon* var. *luteopulpa* hort. ex Yu. Tanaka foi utilizado na formulação de nanopartículas esféricas de selênio, essa formulação apresentou efeitos antitumorais (ZHOU et al., 2021); polissacarídeos extraídos da espécie *Zanthoxylum bungeanum* var. *punctatum* C.C. Huang continham principalmente ácido galacturônico, este se

mostrou promissor para o tratamento de doença de Parkinson (HUANG et al., 2023) e o polissacarídeo extraído do pericarpo de *Z. bungeanum* se mostrou promissor para doença de Alzheimer (HU et al. 2023).

## 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são conhecidos há milênios. Durante o período Neolítico (antes de 4.000 a.C.) eram extraídos das plantas apenas espremendo. Os Egípcios usavam óleos aromáticos para tratamentos de beleza e rituais sagrados. A China conta com “Shennong's Herbal”, o livro médico mais antigo (2.700 a.C.) e contém diretrizes de uso para mais de 365 plantas. Na Índia a base da saúde da população é a Ayurveda, livro tradicional que descreve o uso, tanto médico quanto religioso, de mais de 700 tipos diferentes de plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

Há relatos bíblicos do uso das plantas medicinais e óleos. Durante a Idade Média, a Igreja Católica proibiu o uso de óleos para tratamento médico pois eram associados à feitiçaria. Apesar das perseguições, os monges mantiveram secretamente a tradição (COWAN, 1999).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019) os óleos essenciais ou óleos voláteis são óleos obtidos de plantas, por processos físicos, que evaporam à temperatura ambiente sem deixar resíduo. São constituídos por misturas complexas de substâncias de baixa massa molecular, que determinam seu odor e sabor. Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si.

Os óleos essenciais são substâncias complexas, normalmente conhecidos como metabólitos secundários das plantas. Em um único óleo essencial podem ser identificados até 400 substâncias (GROOT; SCHIMIDT, 2016).

Para os vegetais, os óleos desempenham diversas funções, uma delas é a adaptação às condições ambientais em que os óleos funcionam como sinais químicos informando às plantas sobre mudanças climáticas ou a presença de herbívoros. Essas respostas adaptativas podem culminar com a produção de compostos secundários tóxicos. Muitos dos componentes químicos presentes nos óleos exibem atividades antimicrobianas e antifúngicas. Além disso, podem atrair polinizadores, influenciar a competição entre outras espécies, inibindo crescimento de outras plantas (CARVALHO, 2023; PICHERSKY; GERSHENZON 2002).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de diversas partes das plantas, cascas, folhas, flores e sementes. São lipofílicos e solúveis em solventes orgânicos, de natureza hidrofóbica e tem menor densidade do que a água. Os rendimentos de extração dependem do tipo de espécie das partes da planta utilizadas, mas um rendimento muito baixo, como 1%, pode torná-los altamente valiosos (AZIZ et al., 2018).

Os terpenos são a maior classe de produtos químicos encontrados em óleos essenciais. As classes mais importantes de terpenos se tratando de óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (GROOT; SCHIMIDT, 2016). Outros compostos orgânicos presentes são álcoois, éteres, ésteres, cetonas, aldeídos, fenóis, lactonas e éteres fenólicos (grupo oxigenado) (AZIZ et al., 2018).

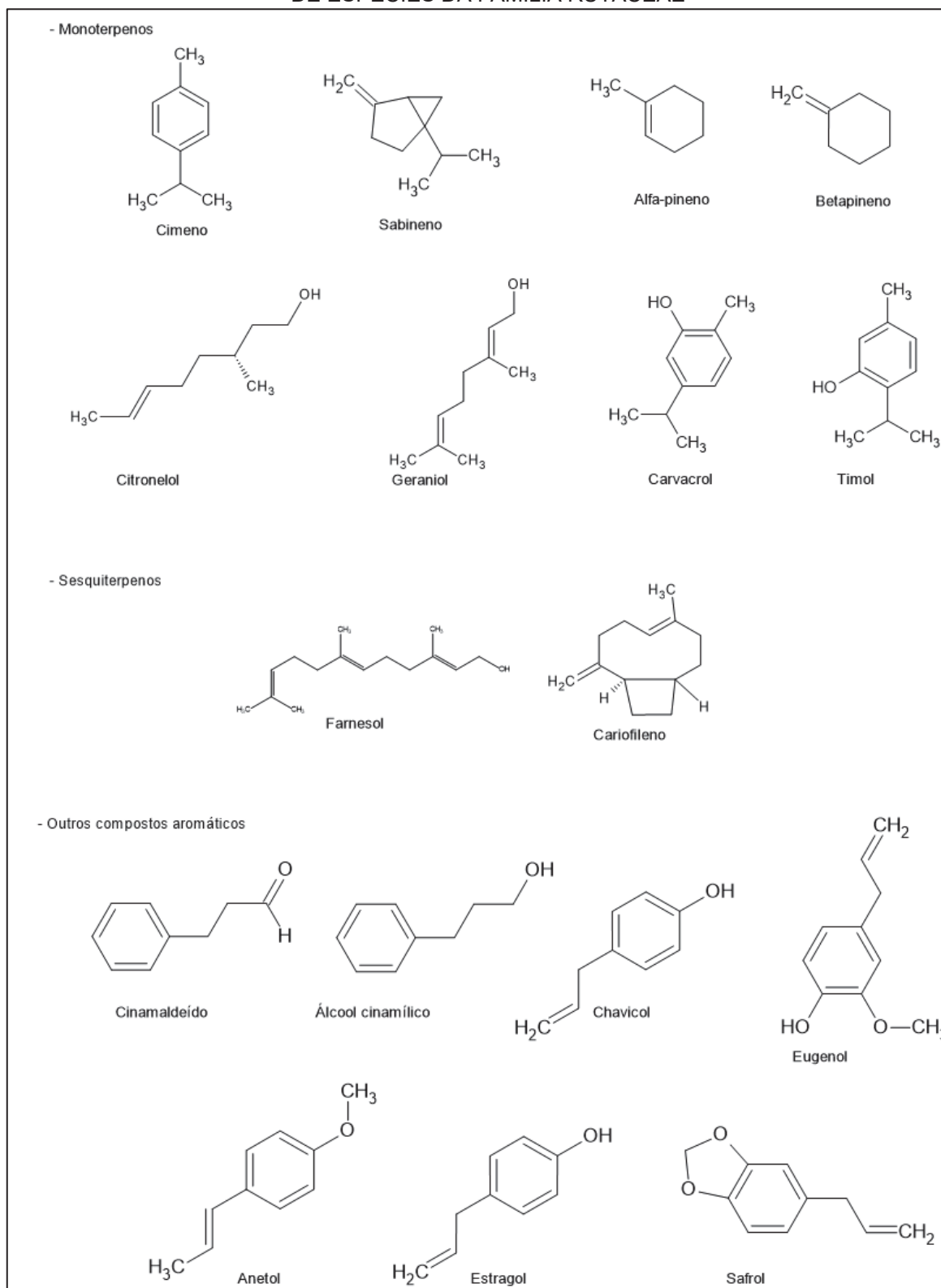
Geralmente, o óleo essencial tem dois a cinco componentes em maior concentração, os quais determinam as propriedades biológicas dos óleos (GROOT; SCHIMIDT, 2016).

Com o surgimento de novas doenças e maior resistência bacteriana, os óleos tem sido estudados para potenciais aplicações médicas. Esses compostos naturais tem sido associados à atividade bactericida, virucida e fungicida em ensaios clínicos (LI et al., 2020; RAMSEY et al., 2022). No estudo de Zamora et al. (2023), foi descrito que a combinação de óleo essencial com antibióticos comerciais mostrou um efeito sinérgico. Outra aplicação para compostos orgânicos voláteis, de acordo com Zhang et al. (2021), é o potencial como bioconservantes em alimentos após sua colheita, devido as suas atividades antimicrobianas e antifúngicas.

#### 2.4.1 Composição química dos óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais podem ser amplamente classificados como frações voláteis e não voláteis. A composição química geral da fração volátil do óleo aromático inclui componentes monoterpenos, sesquiterpenos e outros compostos aromáticos (FIGURA 2) e derivados oxigenados juntamente com álcoois, aldeídos, alifáticos e ésteres (QUADRO 1). Os carotenoides, ácidos graxos, flavonoides e ceras que são classificados como resíduos não voláteis, compreendem 1-10% em peso de óleo essencial isolado (AZIZ et al., 2018).

FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS IDENTIFICADAS EM ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA RUTACEAE



FONTE: adaptado de Bakkali et al. (2008).

QUADRO 1 – CLASSE DOS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAS

COMPONENTES QUÍMICOS	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIAS
Terpenos	Monoterpenos: formado por duas unidades de isoprenos. Apresenta propriedades antibacterianas, analgésicas, estimulantes e expectorantes.	AZIZ et al., 2018.
	Sesquiterpenos: formado por três unidades de isopreno. Pode ser linear, monocíclico ou bicíclico. Quando presente no óleo, são menos voláteis. Apresenta ação anti-inflamatória.	AZIZ et al., 2018; CIMINO, et al., 2021; TISSERAND, et al. 2014
Álcoois	Os álcoois podem aparecer nas estruturas isolado, ou combinado a um terpeno ou éster. Os álcoois fornecem propriedades aos óleos essenciais como antisséptica, antiviral, antibacteriana e germicida. São considerados seguros para serem utilizados, uma vez que não provocam reação tóxica no corpo ou na pele.	AZIZ et al., 2018.
Ésteres	Ocorrem a partir da interação entre álcoois e ácidos. A presença do grupo alcoólico nos ésteres confere a estes atividade anti-inflamatória. Na medicina, os ésteres tem propriedades antifúngicas e sedativas.	AZIZ et al., 2018.
Cetonas	As cetonas têm ação anticatarral, proliferante celular, expectorante e são frequentemente encontrados em plantas que são usadas para queixas do trato respiratório superior. Óleos essenciais com grupo cetona são vantajosos para a cicatrização de feridas.	AZIZ et al., 2018.

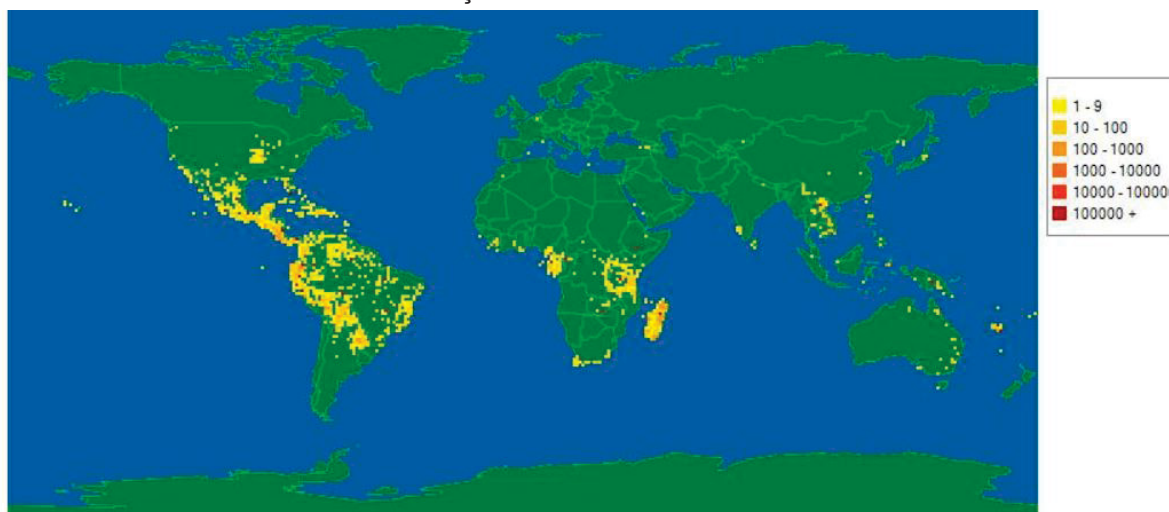
FONTE: A autora (2023).

## 2.5 A FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae possui importância medicinal e agrônômica, é conhecida principalmente pelos frutos comestíveis (laranjas, limões, tangerinas e toranjas) (GROPPO, et al., 2022). Conta com 158 gêneros e 2.206 espécies (WFO, 2023) distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais

(RUTACEAE, 2023). As espécies da família foram identificadas na América, na África e na Austrália (TROPICOS, 2023) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – PONTOS EM UMA ESCALA DE AMARELO A VERMELHO INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO DE RUTÁCEAS NO MUNDO



FONTE: Trópicos (2023).

Os constituintes da família são em sua maioria árvores tropicais, altas e reforçadas, mas também pode ser encontrados arbustos menores, espinhosos ou aculeados (RUTACEAE, 2023). Uma descrição da anatomia geral da família foi descrita por Metcalfe et al. (1950), estes apontam presença de células oleosas, glândulas, células resinosas em galhos jovens, tricomas unicelulares, tricomas peltados, tricomas estrelados e tricomas multicelulares.

O que diferencia as espécies de Rutacea e das outras famílias da ordem Spidales é a presença de cavidades secretoras, contendo óleos aromáticos. As cavidades oleosas são encontradas principalmente nas folhas, mas podem estar espalhados por quase toda a planta. Monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanos estão universalmente presentes na família (GROPPO et al., 2022; KUBITZKI, 2010; RUTACEAE, 2023). De acordo com Groppo et al. (2022), existem células de resina na medula, os tricomas também estão presentes, sendo geralmente unicelulares, às vezes tricomas uni seriados e peltados, estrelados e glandulares, as estruturas do xilema são uniforme em todas as Rutaceae e exibe um nível relativamente alto de especialização.

A família Rutaceae apresenta gêneros importante na obtenção de óleos, como *Boronia* Sm. e *Ruta* L. O gênero *Ruta* conta com a espécie

*Ruta graveolens* var. *angustifolia* Wall. conhecida popularmente como arruda, usada na medicina como anti-helmíntica, febrífuga e emenagoga (RUTACEAE, 2023).

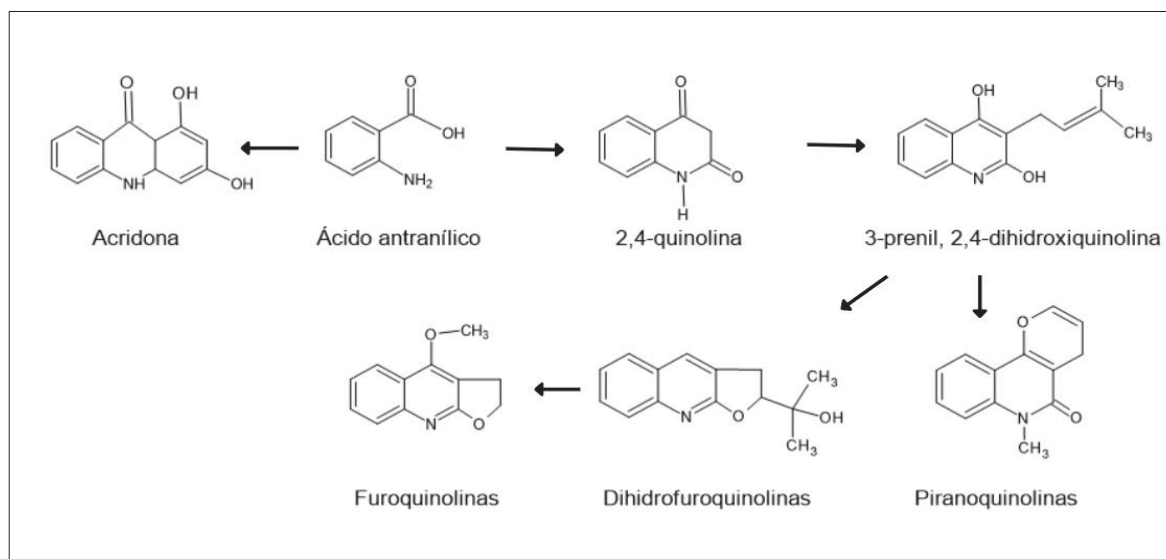
Outro gênero utilizado nos medicamentos é o *Pilocarpus* Vahl, em que a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf, conhecida popularmente como jaborandi, é uma fonte natural da pilocarpina, usado contra o glaucoma (FILHO et al., 2020). Alguns gêneros são comercialmente usados como madeiras (por exemplo, *Flindersia* R.Br., *Balfourodendron* Corr. Mello ex Oliv., *Euxylophora* Huber e *Zanthoxylum* Lam.) Outras propriedades foram reportadas, como antimicrobianas, antifúngicas e pesticidas naturais (GROPPO et al., 2022; LOPES et al., 2013).

Os membros da família têm uma das maiores diversidades de metabólitos secundários (KUBITZKI, 2010) isso contribui para o isolamento de novos compostos (MARQUES et al., 2022). São geralmente caracterizados por uma combinação específica de compostos pertencentes a diferentes classes, dentre as quais as quinolonas e acridonas derivadas do ácido antranílico se destacam por serem altamente diversificadas com muitos restritos às espécies de Rutaceae (GROPPO et al., 2022). Alcaloides derivados do ácido antranílico são os de maior ocorrência (FIGURA 4) (WATERMAN, 1993), outros grupos de substâncias que contribuem para o perfil fitoquímico característico de Rutaceae incluem cumarinas, acetofenonas, flavonoides, terpenos e limonoides (KUBITZKI, 2010).

Os alcaloides fito-carbazol são encontrados em algumas espécies dessa família, incluindo espécies do gênero *Zanthoxylum* sp. Essa classe de alcaloides pode apresentar potencial, a citar, antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígena, larvicida e atividade neuro protetora (TAN et al., 2022).

Depois dos alcaloides, os limonoides são os compostos mais característicos de Rutaceae. Os limonoides são originários dos triterpenos tetracíclicos tirucallane, os quais têm despertado interesse devido a sua atividade biológica (KUBITZKI, 2010). Os limonoides degradados podem apresentar efeito antiangiogênico, atividade fungistática, atividade neuro protetora e atividade anti-inflamatória (DURÁN-PEÑA et al., 2023).

FIGURA 4 - PRINCIPAIS CLASSES DE ALCALOIDES DERIVADOS DO ÁCIDO ANTRANÍLICO NA FAMÍLIA RUTACEAE



FONTE: Adaptado de WATERMAN (1993).

A maioria das Rutáceas apresenta dispersão entomófila, uma vez que, os insetos seriam atraídos pelo odor das folhas e/ou pelo néctar (GROPPO et al., 2022).

## 2.6 GENÉRO *Zanthoxylum* L.

É um dos gêneros mais conhecidos da família Rutaceae, por ser o membro mais primitivo da família (RIOS et al., 2018) e compreende mais de 200 espécies distribuídas no mundo. No Brasil, encontra-se distribuído por quase todo o território (PIRANI; GROppo, 2023). Também está distribuído em regiões de clima quente no leste da Ásia e leste da América do Norte (KUBITZKI, 2010).

O gênero *Zanthoxylum* possui um habitat como arvoretas ou árvores de folha caduca, que variam de 6 a 18 metros de altura. Possui espinhos nos caules, galhos e nas folhas, são frequentemente robustos ou comprimidos lateralmente (KUBITZKI, 2010). De acordo com a literatura, todas as partes são estudadas, folha, casca, fruto e raiz.

Suas características morfoanatômicas incluem indumento de tricomas estrelados, folhas imparipinadas, inermes ou aculeadas, raque estreitamente alada, folíolos opostos, oblongos a estreito-elípticos com 0,6-2,5 cm comprimento, 0,3-0,8 cm largura, ápice emarginado, margem crenulada e base aguda a arredondada. (KUBITZKI, 2010; RUTACEAE, 2023).

Uma pesquisa bibliográfica realizada por Fernandes et al. (2022) entre 2021 e 2022 constatou que 14 espécies do gênero são usadas como plantas medicinais no Brasil. Algumas espécies utilizadas popularmente são: *Zanthoxylum rhoifolium* var. *formosanum* (Lillo) P.G. Waterman usada contra processos inflamatório e microbianos (GONZAGA et al., 2003); *Zanthoxylum ekmanii* (Urb.) Alain, empregada para o tratamento de malária e dor de dente (FACUNDO et al., 2005); *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St.-Hil., seu uso popular é como relaxante muscular, antiespasmódico, analgésico e antifúngico (SILVA et al., 2008); *Zanthoxylum chiloperone* Mart. ex Engl., utilizado como tratamento de infecções fúngicas e de protozoários (CEBRIÁN-TORREJÓN et al., 2011) e *Zanthoxylum naranjillo* utilizada no Brasil em doenças associadas a processos inflamatórios (FERREIRA; ARIAS, 2001).

A composição química desse gênero é bem diversificada e apresenta potencial farmacológico, uma das classes mais frequentes é de alcaloides, também são descritos lignanas, cumarinas, amidas, flavonoides, terpenos, taninos e óleos voláteis (FILHO et al., 2020; RIOS et al., 2018; SILVA et al., 2008; SYARI et al., 2019).

As ações biológicas estudadas com maior frequência estão associadas com atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida, atividade antitumoral, propriedades anti-inflamatórias e atividade antioxidante. A TABELA 1 apresenta exemplos de atividades biológicas e metabolitos isolados no gênero.

TABELA 1 - COMPOSTOS ISOLADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Zanthoxylum*

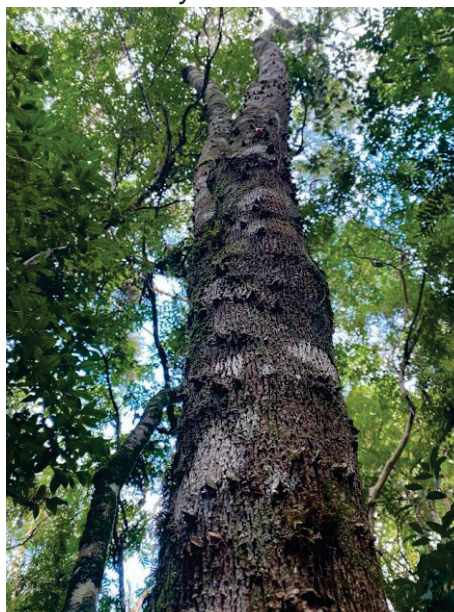
Espécie	Parte Vegetal	Produto de extração	Classe do metabólito	Atividade biológica	Referências
<i>Z. armatum</i>	Folhas	Extrato metanólico	Flavonoide Alcaloide Terpeno	Inibição enzimática Antidiarreica	ALAM; SHAH (2022)
<i>Z. chiloperone</i>	Casca de raiz	Extrato com diclorometano	Cumarina e alcaloide	Antiparasitário contra <i>P. falciparum</i>	CEBRIÁN-TORREJÓN et al. (2011)
<i>Z. tingoassuiba</i>	Casca de raiz	Extrato metanólico	Cumarinas e alcaloides	Antiparasitário contra <i>T. cruzi</i> e <i>L. Amazonensis</i>	COSTA et al. (2018)
<i>Z. zanthoxiloides</i>	Casca de caule e casca de raiz	Extrato de diclorometano	Alcaloides	Antiparasitário contra <i>P. falciparum</i>	GOODMAN et al. (2019)
<i>Z. acanthopodium</i>	Partes aéreas	Óleo essencial	Terpeno	Larvicida	HE et al. (2018)
<i>Z. elephantiasis</i>	Casca do caule	Extrato etanólico	Alcaloide Cumarina Lignana	Anti-inflamatório	MÁRQUEZ et al. (2005)
<i>Z. caribaeum</i>	Folhas	Óleo essencial	Terpeno	Mortalidade de insetos	NOGUEIRA et al. (2014)
<i>Z. nitidum</i>	Toda planta	Extrato etanólico	Alcaloides	Efeito antiproliferativo em células de cancro humano	QIN et al. (2023)
<i>Z. limonella</i>	Frutas	Óleo essencial	Terpeno	Antifúngica Antibacteriana	SUPABPHOL; TANGJITJAREON KUN (2014)
<i>Z. limonella</i>	Caule	Diclorometano	Alcaloide	Antifúngica Antibacteriana	SUPABPHOL; TANGJITJAREON KUN (2014)
<i>Z. acanthopodium</i>	Frutos	Óleo essencial	Alcaloide	Anticancerígeno	SYARI et al. (2019)
<i>Z. chiloperone</i>	Folhas	Extrato de hexano	Alcaloide	Antinociceptiva Anti-inflamatória	VILLALBA et al. (2007)

FONTE: A autora (2022).

## 2.7 Espécie *Zanthoxylum kleinii* (R.S.Cowan) P.G.Waterman

A espécie *Zhantoxylum kleinii* é endêmica do Brasil que tem como sinônimo *Fagara kleinii* R.S. Cowan. Popularmente é conhecida como 'juvevê' ou 'tembetari' (FIGURA 5), é encontrada principalmente na forma de arvoretas ou árvores até 10 metros de altura (PIRANI; GROPPPO, 2023).

FIGURA 5 – *Zanthoxylum kleinii* EM SEU HABITAT



FONTE: A autora (2022).

A classificação da espécie está indicada no QUADRO 2.

QUADRO 2 - CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE *Z. kleinii* (R. S. Cowan) P. G. Waterman

REINO	Plantae
FILO	Tracheophita
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Sapindales
FAMILIA	Rutaceae
GENÉRO	<i>Zanthoxylum</i> L.
ESPÉCIE	<i>Zanthoxylum kleinii</i> (R. S. Cowan) ou <i>Fagara kleinii</i> R.S.Cowan

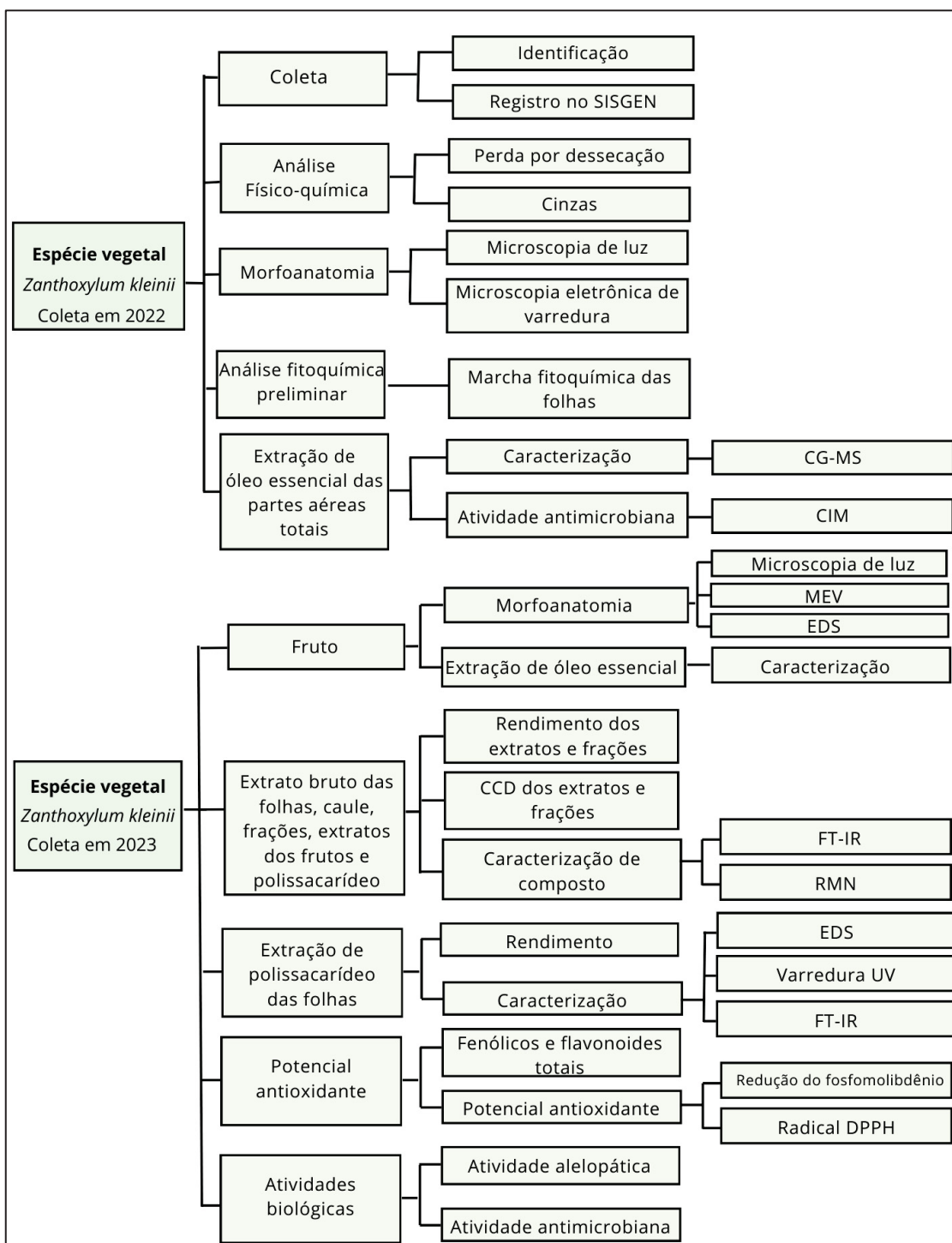
FONTE: GBIF (2023).

Sua ocorrência foi confirmada nos estados do Sul do Brasil. Algumas cidades onde foi registrada sua presença são: Caxias do Sul - RS, Canoinhas - SC, Curitiba - PR, Lages - SC e Curitiba - PR. Sua presença também foi registrada no estado da Bahia e no Distrito Federal (TROPICOS, 2023).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas do trabalho foram realizadas de acordo com o fluxograma mostrado na FIGURA 6.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA COM AS ETAPAS DA METODOLOGIA DO TRABALHO



FONTE: A autora (2023).

### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

#### 3.1.2 Coleta, identificação e registro no SISGEN

Aproximadamente 1 kg de partes vegetativas aéreas de *Z. kleinii* foi coletado em maio de 2022, no Capão CIFLOMA, localizado na Universidade Federal do Paraná, nas seguintes coordenadas geográficas 25°26'53.2"S 49°14'25.4"W. A coleta foi realizada pelo Rodrigo Trompczynski Dall.

As partes aéreas totais foram coletadas em 2022 para realização do estudo morfoanatômico da espécie e extração de óleo essencial. Das partes aéreas, 300 g de folhas foram separados para fazer a extração do óleo essencial e o restante do material foi direcionado para os estudos morfoanatômicas. A partir da constatação do potencial fitoquímico da espécie foi realizada uma nova coleta em 2023 para realizar os extratos brutos e frações. Em janeiro de 2023 foram coletados 4 kg de partes aéreas, 1 kg de galhos e 71 g de frutos. A coleta foi realizada por Inti de Souza.

As folhas e galhos foram separados. Do material coletado, 524 g de galhos foram direcionados para extração de óleo essencial, o restante do material foi acondicionado em sacos de rafia e deixados secar à temperatura ambiente, protegido da luz do sol e da umidade, durante uma semana. Após esse período o material seco foi encaminhado ao triturador (FIGURA 7).

FIGURA 7 - TRITURADOR USADO NA TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL



FONTE: A autora (2022).

A identificação foi feita por comparação com a espécie catalogada no Herbário Escola de Florestas Curitiba-EFC, com número EFC-11981.

A atividade de acesso ao patrimônio genético para as duas coletas, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com título 'Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico de espécies vegetais', sob número A0A1FD4.

## 3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

### 3.2.1 Solução FAA

A solução FAA consiste em um fixador de rápida penetração, que preserva relativamente bem a morfologia sem danificar o material. De acordo com Johansen (1940) a técnica consiste em misturar no momento do uso: formalina 5 ml, ácido acético glacial 5 ml e álcool etílico a 50% v/v (ou 70% v/v) 90 ml. O material vegetal foi acondicionado em solução FAA, e deixado por 72 horas. Em seguida o material foi lavado com água destilada e desidratado em álcool 70% (v/v) (OLIVEIRA et al., 2000; ARRUDA, 2021).

### 3.2.2 Secção do material vegetal

Técnica simples e rápida, feita manualmente com auxílio de um suporte de isopor, no qual se inserem as peças a serem cortadas. As secções foram feitas a partir do material vegetal conservado em solução FAA, no sentido transversal e paradérmico, com o auxílio de lâminas de corte (OLIVEIRA et al., 2000). Para realização dessa técnica foram executados os seguintes passos:

- Escolher o material a ser seccionado (limbo, pecíolo ou galho);
- O material pode ser apoiado em isopor, ou em outro material de apoio;
- Deve-se segurar o material com uma mão, e com outro cortar, com auxílio de uma lâmina de corte nova;
- As secções foram acondicionadas em vidro relógio contendo água destilada;
- Algumas secções foram selecionadas e retiradas com auxílio de um pincel, em seguida foi realizada a coloração específica;

- Para a coloração foi usados fucsina: água destilada 1:9 (v/v) e azul de astra: água destilada 1:1 (v/v), sendo o tempo de 2 segundos na fucsina e 2 minutos no azul de astra;
- Após corar, os cortes foram lavados em água destilada, e colocados em lâmina de vidro;
- Para preparar a lâmina permanente, foram adicionadas até duas gotas de glicerina 50% (v/v) sob o corte, colocado uma lamínula sobre o corte e a lamínula foi selada utilizando esmalte incolor.

### 3.2.3 Face abaxial e adaxial

Para análise da face abaxial e adaxial das folhas, os cortes foram feitos enrolando a folha no dedo, e fazendo cortes finos com a lâmina de corte. Os cortes foram diafanizados, e corados separadamente, em Safranina diluída em água destilada 1:1 (v/v) com auxílio de um pincel, em seguida colocados em água destilada. Por fim, foram montadas lâminas semipermanentes, com glicerina 50% (v/v) e lamínula.

### 3.2.4 Montagem de lâminas semipermanentes

Para montar as lâminas, os cortes mais delgados foram colocados sob a lâmina de vidro. Foram adicionadas duas a três gotas de glicerina 50% (v/v) sob os mesmos (OLIVEIRA et al., 2000). Com o auxílio de uma agulha, a lamínula foi colocada sobre a glicerina cuidadosamente, para não formar bolhas. Por último a lamínula foi selada com esmalte. Então as lâminas foram limpadas com água destilada e guardadas em local apropriado.

### 3.2.5 Testes histoquímicos

Para a realização dos testes microquímicos, as secções do material fresco foram colocadas em água destilada e submetidos a reagentes específicos para cada classe de substâncias. Os reagentes utilizados foram: Sudam III (compostos lipídicos) (DUARTE et al., 2010); lugol (grãos de amido) (FIGUEIREDO 2007); floroglucina clorídrica (elementos lignificados) (DUARTE et al., 2010); cloreto férrico

(compostos fenólicos) (FIGUEIREDO 2007); azul de metileno (mucilagens) (LEMOS et al., 2022) e dicromato de potássio (compostos fenólicos) (FIGUEIREDO 2007).

### 3.2.6 Imagens de microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura

As lâminas foram examinadas e as fotomicrografias foram registradas no microscópio óptico Olympus CX 31 acoplado à câmera digital Olympus, modelo C-7070, no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

A caracterização morfológica das superfícies das folhas, pecíolos, raques e galhos de *Z. kleinii* foi realizada por um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para realizar o MEV, os materiais vegetais foram conservados em FAA 70. Para remoção de impurezas, o material foi previamente levado ao sonicador em água destilada, no *Digital Ultrasonic Cleaner CD-4860*, por 5 minutos, na Central analítica da UFPR. Após esse procedimento o material foi desidratado em concentrações etanólicas crescentes (80% v/v, 90% v/v e absoluto) (GROSS et al., 2014).

Após desidratação do material vegetal, pequenos cortes foram colocados em *stubs* (suporte para colocar as secções), as amostras foram revestidas com metal em um revestido a vácuo (GOLDIN et al., 2016). As imagens do pecíolo foram realizadas no MEV VEGA3 TESCAN, e analisadas por um microscópio eletrônico de varredura, no laboratório multiusuário (C-LABMU), na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As imagens do polissacarídeo foram realizadas no centro de microscopia eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360-LV.

### 3.2.7 Espectroscopia de raio-X de energia dispersiva (EDS)

A análise realizada pela espectroscopia de raio-X de energia dispersiva (EDS - *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) foi realizada em cristais, em células vegetais sem cristais (branco) e em amostras de polissacarídeo de *Z. kleinii*. Um microscópio eletrônico de varredura (VEGA3 TESCAN e JEOL JSM 6360-LV) foi acoplado à Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS). Para obtenção dos espectros EDS a amostra não passa por nenhum revestimento prévio. Em uma

primeira análise realiza-se uma varredura de menor ampliação para identificar a área de interesse, em seguida as capturas de EDS são realizadas.

A análise EDS foi realizada no complexo laboratório multiusuário (C-Labmu) na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e no centro de microscopia eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### 3.3 PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS

#### 3.3.1 Perda por dessecação

O ensaio foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019), utilizando o método gravimétrico. Para isso foram pesados com exatidão 3 g da droga vegetal, folhas e galhos, secos e triturados, e foram acondicionadas em cadinhos previamente pesados e identificados. Foram usados 3 cadinhos para esse ensaio. As amostras foram levadas a estufa, entre 100 °C e 105 °C, durante cinco horas, até peso constante, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas correspondesse a, no máximo, 0,25% de amostra. Foi feito o cálculo da porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

O ensaio foi realizado em triplicata e os dados obtidos após peso constante foram analisados pela seguinte equação 1.

$$\% \text{ de perda por dessecação} = P1 - P2 / P3 \times 100 \quad (1)$$

Em que:

P1 = peso do pesa-filtro contendo amostra antes de secagem em estufa (g);

P2 = peso do pesa-filtro contendo amostra depois de secagem em estufa (g);

P3 = peso da amostra (g);

100 = fator de porcentagem.

#### 3.3.2 Determinação de cinzas totais

O ensaio foi realizado de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019). Os mesmos cadinhos usados para determinação de umidade foram submetidos a incineração, a 600 °C, por 6 horas. Ao término desse período, os cadinhos foram levados ao dessecador, para que ficassem a temperatura ambiente e em seguida foram pesados. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca (equação 2).

$$\% \text{ resíduo por incineração} = P2 - P1 / P3 \times 100 \quad (2)$$

Em que:

P1 = peso do cadinho depois da calcinação e resfriamento (g);

P2 = peso do cadinho com a amostra depois da calcinação e resfriamento (g);

P3 = peso inicial da amostra (g);

100 = fator de porcentagem.

### 3.4 ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Os ensaios preliminares foram realizados com objetivo de identificar os principais grupos metabólicos presentes nas folhas de *Z. kleinii*. Para isso, foram preparados dois extratos iniciais, hidroalcoólico e aquoso das folhas, e em seguida, foram realizados testes de acordo com Miguel (2003) e Moreira (1979), que apresentavam resultados de coloração e/ou precipitação.

#### 3.4.1 Extrato Hidroalcoólico

Para obtenção de extrato hidroalcoólico 30%, foram utilizadas 60g de folhas secas e trituradas, em 200mL de álcool etílico a 70% (v/v). O material ficou em maceração com auxílio de calor por 1 hora, em 70°C. Após esse período, o material foi filtrado, e completado seu volume com etanol 70% (v/v) até 200mL.

O extrato bruto das folhas foi concentrado até um terço do seu volume e fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol absoluto) utilizando um funil de separação. Para obter cada fração, partimos de 20 mL de extrato bruto em qual foram adicionados 10 mL de cada

solvente para realizar a extração, o solvente foi adicionado três vezes obtendo-se um volume de 30 mL, cada fração teve seu volume completado até 200 mL com o respectivo solvente.

O objetivo foi identificar a presença das seguintes classes químicas: alcaloides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, flavonóis, dihidroflavonas, cumarinas, substâncias iridoidais, heterosídeo antraquinônico, esteroides ou triterpenos.

#### 3.4.1.1 Pesquisa de Alcaloides

Para a pesquisa qualitativa de alcaloides foram utilizados reativos gerais de alcaloides: Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff, Reativo de Bouchardt e Reativo de Bertrand.

Foi levado ao funil de separação 50 mL de cada fração, e acrescidos de 10 mL de HCl 1%. A fração hidroalcolica foi levada à secura em banho maria, a 70°C, o resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e acrescido de 20 mL de HCl a 1%. Para cada amostra testada foram feitos 5 tubos de ensaio, cada um com 1 mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo adicionou-se 2 gotas de cada reativo.

A reação foi considerada positiva a presença de alcaloides na amostra quando apresentou as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardt: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Um tubo contendo somente o extrato foi utilizado como branco.

#### 3.4.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

Foram levados à secura 10 mL das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcolica) dissolvidos com 5 mL de álcool etílico. Posteriormente foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado, e levado ao aquecimento em chapa de aquecimento até a ebulição.

O resultado foi considerado positivo quando apresentou a coloração vermelha, devido ao efeito batocrômico.

#### 3.4.1.3 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Para esta pesquisa foi utilizado 20 mL de cada fração, (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica) e essas foram levadas à secura e dissolvidos posteriormente com 10 mL de etanol. Dessas frações, 5 mL foram transferidos para cada tubo de ensaio. A fração hidroalcóolica não passou pela secura, foi transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200 mg de limalha de ferro e HCl fumegante lentamente. O resultado positivo foi observado quando ocorreu o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

#### 3.4.1.4 Pesquisa de flavononois

Para essa pesquisa foi feita a reação do Oxálico Bórico ou Reação de Taubock. Para o teste, 10mL de cada fração hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levados à secura, depois adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico 1:1 (v/v), levando novamente a secura, a este resíduo foram adicionados 5mL de éter etílico.

A visualização foi realizada em aparelho de ultravioleta, se houver fluorescência a reação é considerada positiva.

#### 3.4.1.5 Pesquisa de dihidroflavonas

O ensaio de Pacheco visa colocar em cápsulas de porcelana 10 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica) e levar à secura em banho maria. O resíduo obtido foi aquecido em chapa de aquecimento, com alguns cristais de acetato de sódio anidro (AcONa), 0,1 mL de anidrido acético e 0,1 mL de HCl concentrado.

O resultado positivo para este teste deve apresentar coloração roxa característica, devido ao efeito batocrômico das bandas I e II.

#### 3.4.1.6 Pesquisa de flavononas

O ensaio consiste em colocar em cápsulas de porcelana 10 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica), e levar a secura. Dissolver com 10mL de etanol. Transferir 5mL de cada fração para tubo de ensaio, juntar uma pastilha de zinco e adicionar lentamente cerca de 1mL de HCl fumegante. Reação exotérmica, deve ser realizada em recipiente com gelo, na capela.

O resultado positivo para flavonona e flavonol não apresenta coloração,

#### 3.4.1.7 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas concentrou-se 30 mL das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica) até 5mL em banho maria, a 50°C. A fração hidroalcóolica foi levada até pH 1 por adição de 5 mL de HCl concentrado. Essa mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 vezes com 10 mL). Após esse processo essas frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5 mL.

De cada fração foram transferidos 3 mL, para tubos de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de NaOH N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366 nm e ficaram em exposição à luz por 15 minutos. Na reação positiva foram observadas fluorescência azul ou verde amarelada.

De cada fração de extratos etéreos, foram adicionados 2 mL de cada em um papel filtro, em pontos previamente marcados com grafite, foram feitos três pontos com manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com solução de NaOH N, recém preparadas. A mancha 1 foi coberta com papel alumínio, em seguida o papel filtro foi exposto à luz ultravioleta por 15 min. A reação positiva apresentou fluorescência com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

#### 3.4.1.8 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato, de 250 mL de capacidade, foram adicionados 30mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila junto com 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por 30 minutos, e posteriormente filtrada com auxílio de papel de filtro, adicionando-se em seguida, 30 mL de água.

Após a mistura ser filtrada esta foi transferida para um funil de separação, para extração com éter etílico (duas vezes com 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5 mL, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Reação de Borntraeger). A fração hidroalcoólica foi extraída com éter etílico (duas vezes com 10 mL).

A reação é considerada positiva se houver a observação de coloração vermelha.

#### 3.4.1.9 Pesquisa de esteroides e triterpenos

As frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica (10 mL) foram evaporadas até a secura e os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0 mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio. Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. A coloração obtida poderá indicar:

- Rósea ou azul: presença de triterpenos penta cíclicos;
- Verde: esteroides função hidroxila;
- Amarela: grupamento metila no carbono C14;

#### 3.4.2 Extrato aquoso

Para identificar os metabólitos solúveis em água foi feito um extrato aquoso a 20% com 40 g do vegetal e 200 mL de água em banho-maria por uma hora, à 70°C. Após este processo o material foi filtrado e foi completado o volume com água até 200 mL.

Esse extrato foi utilizado para pesquisar a presença das seguintes classes químicas: heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponinicos e heterosídeos cianogênicos.

##### 3.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Para este teste foram separados 5 mL de extrato aquoso em 3 tubos de ensaio. No primeiro tubo de ensaio colocou-se HCl 1% até pH 4. No segundo tubo

de ensaio foi alcalinizado com NaOH até pH 10. O terceiro tubo de ensaio foi neutralizado a pH 7.

A reação positiva foi observada quando:

- Em meio ácido apresenta tons avermelhados;
- Em meio alcalino apresenta tons azulados;
- Em meio neutro apresenta tons violáceos;

Foram transferidos para funil de separação 10 mL do extrato após ser neutralizado, e foi feita uma extração com álcool butílico (2 vezes de 10 mL). Reuniu-se as duas frações obtidas (20 mL) em uma cápsula de porcelana e foram concentradas até 5 mL em banho-maria. Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecidos até ebulição. A reação positiva apresenta coloração vermelha, pela formação da antocianidina.

#### 3.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para realização do teste de espuma foram utilizados 3 tubos de ensaio com 5 mL de extrato. Os tubos de ensaio foram agitados energicamente por 5 minutos em movimentos sucussionais, então ficou em repouso por 30 minutos. O teste foi considerado positivo se após esse período a espuma apresentar altura superior a 1 cm.

#### 3.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Para esta análise foi utilizada a reação de Schoembein, a qual consiste em colocar 5 mL de extrato em cápsula de porcelana e 4 gotas de NaOH a 10%, três cristais de sulfato ferroso e uma gota de cloreto férrico a 1%.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

#### 3.5.1 Hidrodestilação

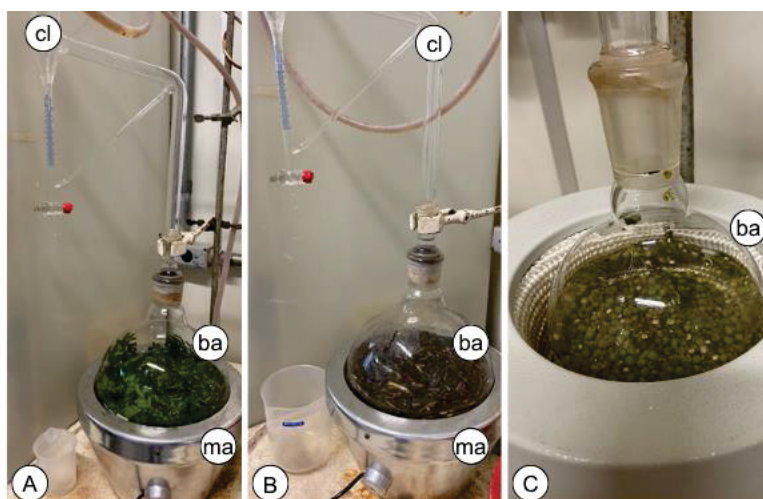
Para obter o óleo essencial o material passou pelo processo de hidrodestilação utilizando *clevenger* (FIGURA 8) seguindo a recomendação da Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019). O sistema é constituído por balão de fundo redondo, uma manta aquecedora, e um condensador. O processo consiste em colocar o material vegetal em contato com água destilada e levar a aquecimento em manta até ebulição por 6 horas (FB 6 ed. 2019).

Para as folhas, 328,1 g de material vegetal fresco (folíolo, raquis, pecíolo) foram colocados em balão de fundo redondo com 3,5 litros de água destilada por seis horas por contínuas (FIGURA 8A).

Para os galhos, o procedimento foi realizado duas vezes, utilizando 400 g de material seco e 524,00 g de material fresco. O galho foi seccionado em pedaços menores e acondicionado em balão, adicionado 3 litros de água destilada e levado à fervura por seis horas (FIGURA 8B).

Os frutos (67 g) foram acondicionados em balão e completados com um litro de água destilada, então ficaram em processo de hidrodestilação por seis horas (FIGURA 8C).

FIGURA 8 - EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES VEGETATIVAS DA ESPÉCIE *Z. kleinii*



FONTE: A autora (2022/2023).

LEGENDA: A: extração de óleo essencial das folhas; B: extração de óleo essencial dos galhos; C: extração de óleo essencial dos frutos. cl: aparato *clevenger*; ba: balão; ma: manta aquecedora.

O óleo obtido das folhas e frutos foi armazenado em recipiente hermético escuro, em um freezer a -20 °C, para posterior análises.

### 3.5.2 Caracterização do óleo essencial

Os óleos essenciais das folhas e dos frutos foram enviados para o laboratório LECOSIN da UFPR para realizar a caracterização. As amostras foram diluídas em diclorometano (1µL/mL) e foram analisadas separadamente.

A amostra de óleo essencial foi injetada em equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS/MS), marca SHIMADZU (Quioto, Quioto, Japão) (modelo GC-2010 Plus), detector de massas do tipo triplo quadrupolo (modelo TQ8040 com ionização por elétrons) e injetor automático (modelo AOC-5000 Plus). A coluna instalada foi uma coluna capilar DB-5 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Califórnia, EUA), fase estacionária não polar (5%-*Phenyl*)-*methylpolysiloxane*, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm. A programação do equipamento partiu da temperatura de injeção a 250.00°C, modo de injeção *split*, utilizando He como gás de arraste, pressão de 59.0 kPa, com vazão do gás de arraste em 1.02 mL/min e com o forno com temperatura inicial de 60°C, com taxa de aquecimento de 3 K/min, com isoterma final a 250°C por 5min.

O espectro de massa dos constituintes do óleo essencial foi comparado com os padrões do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (ADAMS, 2017).

## 3.6 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

### 3.6.1 Extração por Soxhlet de folhas e galhos

Os extratos foram preparados com auxílio do aparato de Soxhlet modificado de acordo com a técnica descrita por Carvalho et al. (2009). Inicialmente 500 g de folhas e 440 g de galhos da espécie *Z. kleinii* foram acondicionados em aparato Soxhlet modificado (CARVALHO et al., 2009) e colocados 3,2 L de álcool etílico absoluto 99,5% para folhas e 3 L de álcool etílico absoluto 99,5% para extração dos galhos (FIGURA 9A e 9B).

Esse método consiste em fazer a extração contínua sólido-líquido. O solvente é aquecido no balão até entrar em ebulição. O vapor formado sobe pelo tubo lateral até o condensador, onde sofre condensação, gotejando no extrator e pingando sobre

a o material vegetal. Quando o nível do solvente atingir o sifão, o solvente é sifonado pelo braço lateral, levando consigo as substâncias solúveis.

FIGURA 9 - EXTRAÇÃO HIDROALCÓOLICA DAS FOLHAS E CAULE UTILIZANDO APARATO SOXHLET



FONTE: A autora (2023).

Legenda: A: extração hidroalcolica das folhas secas e trituradas; B: extração hidroalcolica dos galhos secos e triturados;

O processo se repete enquanto o sistema ficar em aquecimento. Cada ciclo para folhas levou aproximadamente 40 horas de aquecimento até que o líquido do sifão tivesse aparência límpida, e para os galhos aproximadamente 30 horas cada ciclo de extração. Esse procedimento foi repetido mais três vezes para as folhas, totalizando quatro ciclos, e mais uma vez para os galhos, totalizando dois ciclos para extração total.

Após o resfriamento, o solvente pode ser evaporado por destilação e reciclado. O extrato bruto ficou armazenado em recipiente apropriado (vidro de conserva), protegido da luz.

#### 3.6.1.1 Determinação do teor de sólido do extrato bruto

O teste foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019), para calcular o teor de sólidos do extrato bruto, foram utilizadas três placas de petri, previamente limpas e dessecadas. Cada placa de petri foi tarada em balança analítica e foram pipetados 10 mL de extrato bruto em cada placa. As placas foram levadas a secura total em estufa a 105 °C até peso constante. As placas foram resfriadas em dessecador e pesadas, a diferença do peso da placa com o resíduo sólido e a placa vazia indicou o teor de sólido em 10 mL de extrato bruto. A partir desse dado foi calculado o rendimento do total de extrato bruto utilizando a equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = \text{teor de sólidos totais} / \text{material vegetal seco} \times 100 \quad (3)$$

### 3.6.1.2 Fracionamento do extrato bruto

Foram reservados 3 g de extrato bruto hidroalcólico das folhas para os ensaios posteriores qual foi denominado extrato bruto das folhas (EBF) o restante do extrato bruto hidroalcólico foi concentrado em rota evaporador (FIGURA 10). Em seguida o material concentrado retornou para o aparato soxhlet modificado (CARVALHO et al., 2009) para obter as partições utilizando solventes com polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

FIGURA 10 – ROTA EVAPORADOR, EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA CONCENTRAR OS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.



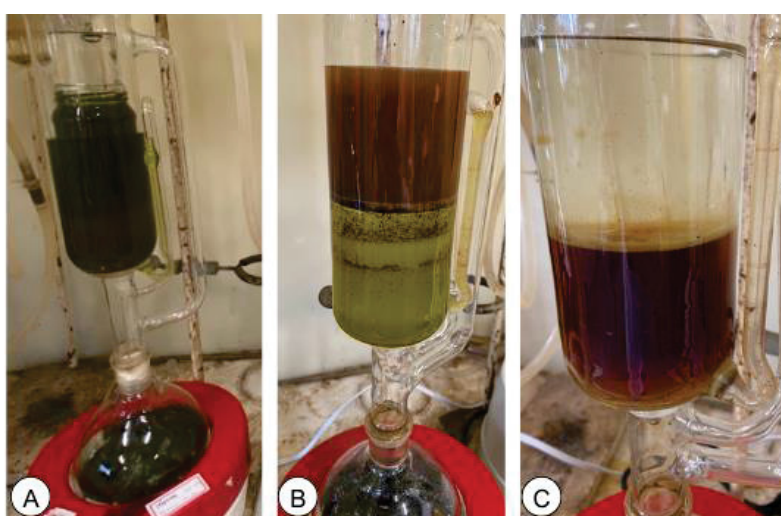
FONTE: A autora (2022).

O mesmo procedimento foi realizado com os galhos, 3 g de extrato bruto hidroalcólico dos galhos foram separados e denominado extrato bruto dos galhos

(EBG), o restante do extrato bruto hidroalcoólico foi concentrado em rota evaporador e levado novamente ao soxhlet para obter as partições utilizando solventes com polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

O fracionamento foi realizado pela extração líquido-líquido, utilizando o aparato de soxhlet modificado, conectado em um condensador e a um balão de fundo redondo com pedras de porcelana. O sistema fechado ficou em aquecimento em uma manta sob aquecimento (FIGURA 11).

FIGURA 11 - ETAPAS DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: A: extrato bruto sendo fracionado com solvente hexano; B: extrato bruto sendo fracionado com solvente clorofórmio; C: extrato bruto sendo fracionado com acetato de etila.

Para obter a fração hexano foram necessárias 30 horas em aquecimento, as frações clorofórmio e acetato de etila foram obtidas após 8 horas aproximadamente.

Após esse processo foram obtidas as frações hexano das folhas (FHF) e fração hexano dos galhos (FHG), fração clorofórmio das folhas (FCF) e fração clorofórmio dos galhos (FCG), fração acetato de etila das folhas (FAEF) e fração acetato de etila dos galhos (FAEG), fração remanescente das folhas (FRF) e fração remanescente dos galhos (FRG).

O rendimento de cada fração foi realizado em relação ao material vegetal seco de folhas e galhos.

### 3.6.2 Extração por Soxhlet dos frutos

Os frutos não passaram pelo procedimento de extração hidroalcóolica para obter o extrato bruto, foram colocados em contato direto com solventes de polaridade crescente, hexano, clorofórmio, acetato de etila e por fim etanol absoluto. Após essa extração foram obtidos os extratos hexano do fruto (FHFr), clorofórmio do fruto (FCFr), acetato de etila do fruto (FAEFr) e hidroalcóolica do fruto (FOHFr).

O rendimento de cada extrato foi realizado em relação ao material vegetal seco de frutos.

### 3.6.3 Rendimento dos extratos brutos e frações

Após obter as frações das folhas e galhos e os extratos dos frutos foi realizado o cálculo para o rendimento de acordo com o material inicial de vegetal seco e triturado (equação 4).

$$\text{Rendimento (\%)} = \text{teor de sólidos totais/material vegetal seco} \times 100 \quad (4)$$

## 3.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica que consiste em uma fase estacionária fixada em uma placa de alumínio e uma fase móvel, composta por uma combinação de solventes, chamado eluente. A amostra a ser analisada é aplicada sobre a fase estacionária, que é um adsorvente.

As amostras avaliadas por essa técnica foram os extratos brutos das folhas e galhos e suas frações, os extratos dos frutos e as amostras de polissacarídeo.

O procedimento foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019), utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60, UV 254, e eluentes e reveladores específicos para cada grupo químico pesquisado (QUADRO 3).

QUADRO 3 - INSTRUÇÕES PARA PESQUISA DE METABÓLITOS ESPECÍFICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE CCD (CONTINUA).

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	EVIDÊNCIAS	REFERÊNCIAS
Esteroides/ Triterpenos	Tolueno/Aceta to de Etila (93:7)	<b>Vanilina fosfórica (v/v)</b> - Solução de vanilina 1% em etanol - Ácido fosfórico 5% (1:1)	Coloração rosa/violácea após aquecimento em chapa (105 °C)	OLIVEIRA et al. (2014) WAGNER; BLADR (1996)
Alcaloides	Clorofórmio/M etanol (95:5)	<b>Reativo de Dragendorff (m/v)</b> -Carbonato de bismuto 5 g -Iodeto de potássio 25 g -Ácido clorídrico concentrado 12 mL -Água destilada qsp 100 mL	Coloração alaranjada na presença de alcaloides	OLIVEIRA et al. (2014) VALENTE et al. 2006.
	Acetato de Etila/ Hexano/ Metanol / Ácido fórmico (4:2:2:0,2)	<b>Reativo de Dragendorff (m/v)</b> -Carbonato de bismuto 5 g -Iodeto de potássio 25 g -Ácido clorídrico concentrado 12 mL -Água destilada qsp 100 mL	Coloração alaranjada na presença de alcaloides	
	Acetato de Etila/ Hexano/ Metanol / Dietilamina (4:4:5:0,2)	<b>Reativo de Dragendorff (m/v)</b> -Carbonato de bismuto 5 g -Iodeto de potássio 25 g -Ácido clorídrico concentrado 12 mL -Água destilada qsp 100 mL	Coloração alaranjada na presença de alcaloides	
Flavonoides	Acetato de Etila/ Ácido Fórmico/Ácido Acético Glacial/Água Destilada (100:11:11:26)	<b>NEU (m/v)</b> - Difenoil-etil-oxi-etil-amino 1 g - Metanol qsp 100 ml	Coloração amarela quando exposta a luz UV.	WAGNER; BLADR (1996)
Cumarinas	DCM/Acetona (1:1) ou Clorofórmio/ Acetona (1:1)	<b>Hidróxido de Potássio 1% (m/v)</b> -Hidróxido de Potássio 1 g; - Etanol qsp 100 mL	Coloração azul ou verde quando exposto a luz UV.	

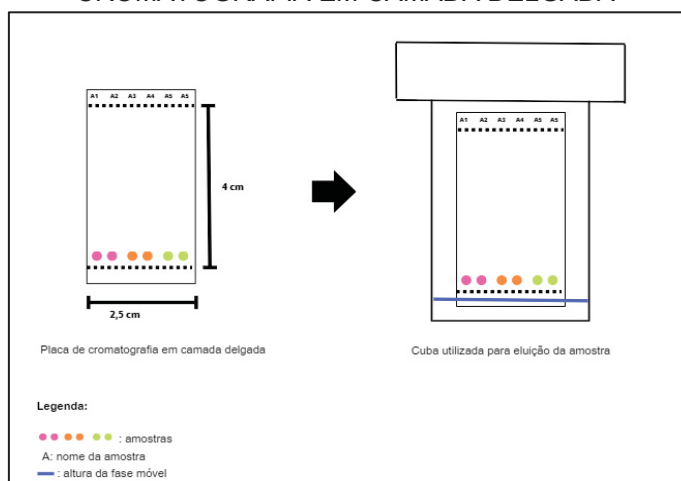
QUADRO 4 - INSTRUÇÕES PARA PESQUISA DE METABÓLITOS ESPECÍFICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE CCD (CONCLUSÃO).

Taninos	Acetato de Etila/ Ácido Fórmico/Ácido Acético Glacial/Água Destilada (100:11:11:26)	<b>Cloreto Férrico 2% (m/v)</b> -Cloreto Férrico 2g -Metanol ou Água Destilada qsp 100 mL	Coloração verde na presença de taninos condensáveis, azul para taninos hidrolisáveis e marrom para compostos fenólicos.	OLIVEIRA et al. (2014) WAGNER; BLADR (1996)
Antraquinonas	Acetato de etila/Metanol/Água destilada (100:17:13)	<b>Hidróxido de Potássio 5% (m/v)</b> -Hidróxido de Potássio 5 g; - Etanol qsp 100 mL	Coloração vermelha	WAGNER; BLADR (1996)

FONTE: A autora (2023).

Os materiais utilizados para esta técnica consistem em: placa de sílica, cuba, capilar de vidro para aplicação da amostra, fase móvel e sistema revelador. Nesse método utiliza-se um capilar para fazer a aplicação das amostras (FIGURA 12) 0,5 cm acima do limite inferior da placa. O limite superior é demarcado com auxílio de um lápis. Após aplicação da amostra a placa é colocada em cuba contendo solvente específico. O solvente não deve ultrapassar a linha inferior da placa. A eluição ocorre quando o solvente atingir o limite superior da placa, ou seja, o solvente foi eluído por 4 cm. Em seguida, deve-se retirar a placa e deixar secar a temperatura ambiente. Após placa cromatográfica estar seca será revelada com revelador específico, descritos no QUADRO 3.

FIGURA 12 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MATERIAL UTILIZADO PARA FAZER CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA



FONTE: A autora (2023).

### 3.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS

Durante o fracionamento do galho foi identificado a presença de um precipitado branco na fração acetato de etila do galho (FAEG). Esse precipitado foi separado do solvente e deixado secar, a quantidade final foi de 20 mg de um pó amarelo claro.

Esse precipitado, identificado como PBAE foi analisado em RMN e FTIR.

Após realizar o RMN do isolado, este foi comparado com um padrão comercial de flavonoide utilizando o método FTIR.

#### 3.8.1 Identificação dos compostos químicos por ressonância magnética nuclear (RMN)

O precipitado separa durante o fracionamento (PBAE) passaram por um teste de solubilidade para escolha do melhor solvente para realizar a análise. Ambas as amostras foram preparadas em DMSO. Para o PBAE, foram diluídos 10 mg de precipitado em 500  $\mu$ L de solvente (m/v). As demais amostras analisadas tiveram todo seu precipitado diluído em DMSO, pois apresentaram quantidades inferiores a 10 mg.

Para RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foi utilizado espectrofotômetro Bruker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná

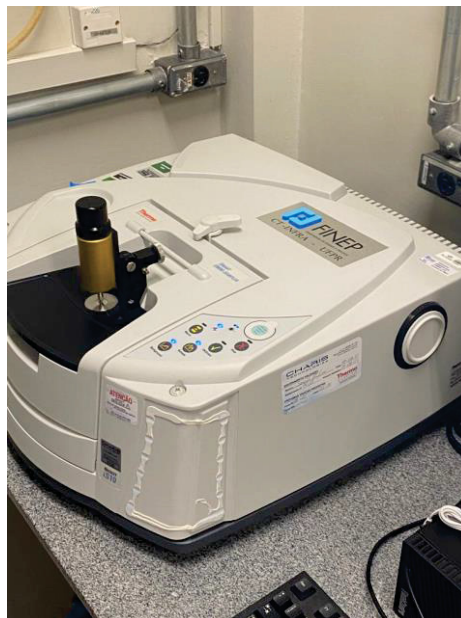
#### 3.8.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho (IR) ou infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) fornece análises de pequenas moléculas ou complexos moleculares. Cada amostra tem um espectro característico na região do infravermelho, tornando possível realizar a identificação dos compostos. (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009).

A análise de infravermelho (FTIR) foi realizada na Central Analítica do PPGCF, no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (UFPR),

utilizando Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 10, *Thermo Scientific*® (FIGURA 13). As medidas foram realizadas com resolução de  $6\text{ cm}^{-1}$  e acumulação de 32 varreduras.

FIGURA 13 – ESPECTRÔMETRO FTIR UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS



FONTE: A autora (2023).

### 3.8.3 Espectrofotometria UV-Vis

Essa técnica detecta as interações entre a radiação eletromagnética na região ultravioleta-visível (UV-Vis) e a matéria (PICOLLO et al., 2018). É uma técnica considerada rápida, fácil, sensível e de baixo custo. Além disso, pode ser utilizada para determinações qualitativas e quantitativas (SANTOS et al., 2022).

A região do ultravioleta abrange uma faixa de 10 a 380 nm do espectro eletromagnético, comumente é subdividida em três sub-regiões principais que são UVA, de 320 a 380 nm, UVB, de 280 a 320 nm e UVC, de 100 a 280 nm (PICOLLO et al., 2018).

As análises em UV-Vis foram realizadas no *Shimadzu UV-1800 UV-Vis spectrophotometer* (FIGURA 14-A) e na *Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate* (FIGURA 14-B), ambos na central analítica do PPGCF no Campus Jardim Botânico da UFPR.

FIGURA 14 – ESPECTROFOTÔMETROS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-Vis



FONTE: A autora (2023).

### 3.9 POLISSACARÍDEO

#### 3.9.1 Extração e armazenamento

A extração da mucilagem foi realizada de acordo com Muñoz et al. (2012) na proporção 1:20 (folhas: água destilada) e com diferentes condições de temperatura, a frio e a quente (60 °C).

Os polissacarídeos foram extraídos das folhas de *Z. kleinii*, secas a temperatura ambiente. Para realizar a extração o material vegetal ficou em contato com água quente e água fria, ambos sob agitação por duas horas (FIGURA 15).

Após extração, o material foi acondicionado em potes de plástico e levados ao freezer. Após as amostras congelarem foram levadas ao liofilizador *Bench Top Pro*, 3 mt, a -75,5 °C, por 216 horas, na central analítica do Campus Jardim Botânico na UFPR. Depois de liofilizado, o material foi pesado e acondicionado em freezer.

FIGURA 15 - EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO DAS FOLHAS DE *Z. kleinii*



Fonte: A autora (2022).

NOTA: o material estava envolto pelo tecido do tipo organza.

O rendimento do polissacarídeo foi calculado pela equação 5.

$$\text{Rendimento (\%)} = P1 / P2 \times 100 \quad (5)$$

Em que:

P1 = Peso do polissacarídeo liofilizado (g);

P2 = Peso do material inicial (g).

### 3.9.2 Análise fotoprotetora *in vitro*

Uma varredura no foi realizada entre os comprimentos de ondas 600 a 200 nm em espectrofotômetro UV-Vis, com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico para verificar também a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB) entre 290 a 320 nm de acordo com Dutra et al. (2004).

O polissacarídeo liofilizado foi diluído em água destilada, a concentração utilizada para determinar o FPS foi 0,2 mg/mL. Para determinação dos valores de FPS *in vitro* utilizou-se a equação de Mansur et al. (1986).

O produto entre o efeito eritematígeno (EE) e a intensidade de radiação (I) é constatado em cada comprimento de onda de acordo com os dados representados na TABELA 2.

TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE O EFEITO ERITEMATÓGENO (EE) E A INTENSIDADE DE RADIAÇÃO (I) NOS COMPRIMENTOS DE ONDA ESPECÍFICOS

Comprimento de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

FONTE: Dutra et al. (2004).

### 3.9.3 Determinação de açúcares pelo método de *Lane-Eynon*

O método de *Lane-Eynon*, também conhecido como método de *Fehling*, consiste na redução completa dos íons cúpricos do reagente de *Fehling* a óxido cuproso, devido a presença de açúcares redutores. A solução inicial é azul, devido ao íon cúprico, ao final de reação forma-se um precipitado vermelho de óxido cuproso.

O teste foi realizado da seguinte forma, em um tubo de ensaio foi colocado 2,5 mL da solução *Fehling* A e 2,5 mL da solução *Fehling* B e levado até aquecimento em ebulição branda. Essa solução foi colocada em uma cápsula de porcelana e aquecida em chapa de aquecimento. A essa solução foi adicionado 0,1 g do polissacarídeo dissolvido em 2 mL de água destilada e levado à fervura novamente.

A formação de precipitado amarelo ou vermelho indica a presença de açúcar redutor.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

#### 3.10.1 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos foi determinado em triplicata pelo método *Folin-Ciocalteu*, esse método foi realizado de acordo com o descrito por Devequi-Nunes et al. (2018).

Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 20 µL de amostra 200 µg/mL (FHF, FHG, FHFr, FCF, FCG, FCFr, FAEF, FAEG, FAEFr, FRF, FRG, FRFr, FOHFr, polissacarídeo ou ácido gálico), 80 µL de solução de carbonato de sódio (7,5 g/100 mL) e 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* 1 N aquoso. Foi realizado um branco para cada amostra, com 20 µL de amostra (200 µg/mL) e 180 µL de metanol. O teste foi realizado em triplicata. A placa foi deixada no escuro por uma hora e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 690 nm.

A concentração fenólica total foi comparada com a curva padrão de ácido gálico em metanol (µg/mL), pela equação de regressão linear  $y = 0,0012x + 0,0371$  ( $r^2 = 0,9982$ ) e expressos em equivalente de ácido gálico (µg de EAG/mg de amostra).

#### 3.10.2 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de fenólicos foi determinado em triplicata pelo método descrito por Surek et al. (2022).

Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 100 µL de amostra (200 µg/mL) (FHF, FHG, FHFr, FCF, FCG, FCFr, FAEF, FAEG, FAEFr, FRF, FRG, FRFr, FOHFr, polissacarídeo ou quercetina) e 100 µL de cloreto de alumínio em metanol (2 g/100 mL). Foi realizado um branco para cada amostra, com 100 µL de amostra e 100 µL de metanol. O teste foi realizado em triplicata.

A placa foi deixada no escuro por uma hora e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 414 nm.

A concentração de flavonoides totais foi comparada com a curva padrão de quercetina em metanol (µg/mL) pela equação de regressão linear  $y = 0,0193x + 0,0435$  ( $r^2 = 0,9948$ ) e expressos em equivalente de ácido gálico (µg de EAG/mg de amostra).

### 3.11 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Muitas substâncias presentes nos organismos são capazes de impedir ou amenizar o ataque de radicais livres, essas substâncias são conhecidas como antioxidantes. Nos vegetais, a presença de metabólitos secundários como os flavonoides e os taninos, torna-os ricos em antioxidantes (SACRAMENTO et al., 2023).

Os compostos fenólicos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, uma característica em comum nesse grupo é a presença de pelo menos uma unidade de fenol. Alguns compostos são solúveis em solventes orgânicos, alguns são solúveis em água por apresentar característica de ácido carboxílico e glicosídeos (SACRAMENTO et al., 2023).

A avaliação do potencial antioxidante do polissacarídeo, do extrato bruto das folhas, galhos, fruto e suas respectivas frações, foi realizada pelos métodos fosmolibdênio e DPPH•.

De acordo com Oliveira et al. (2015) o potencial antioxidante não deve se basear em apenas uma metodologia.

#### 3.11.1 Potencial antioxidante pelo teste Redução do Fosfomolibdênio

Esse teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por Prieto et al. (1999). Esse ensaio consiste em avaliar o potencial antioxidante de uma mistura complexa.

As amostras avaliadas por essa técnica foram EBF, FHF, FCF, FAEF, FRF, EBC, FHC, FCC, FAEC, FRC, FHF<sub>r</sub>, FCF<sub>r</sub>, FAEF<sub>r</sub>, FOHF<sub>r</sub>, PQ e PF. Como controle positivo foram utilizados BHT, ácido ascórbico e rutina. As amostras foram preparadas em metanol (0,2 mg/mL).

Inicialmente foi preparada a solução de reagente fosfomolibdênio, qual consiste na mistura de 20 mL de ácido sulfúrico (3 mol/L), 28 mL de fosfato de sódio anidro (0,1 mol/L), 12 mL de molibdato de amônio (0,03 mol/L) e água destilada qsp 100 mL.

Em seguida, foram adicionados em tubo de ensaio com tampas 0,3 mL de amostra, 1,5 mL de água destilada e 1 mL da solução reagente de fosfomolibdênio.

No tubo branco a amostra foi substituída por metanol. Cada amostra foi preparada em triplicata.

Os tubos foram levados ao banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Após esse período, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, e em seguida, as amostras foram transferidas para uma microplaca para realizar a leitura em espectrofotômetro, a 690 nm.

A capacidade antioxidante relativa de cada amostra foi expressa utilizando as equações 6, 7 e 8.

$$\text{AAR\% (Ácido Ascórbico)} = (A1 - A2 / \text{abs ácido ascórbico} - A2) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{AAR\% (Rutina)} = (A1 - A2 / \text{abs rutina} - A2) \times 100 \quad (7)$$

$$\text{AAR\% (BHT)} = (A1 - A2 / \text{abs BHT} - A2) \times 100 \quad (8)$$

Em que:

A1 = absorbância da amostra;

A2 = absorbância do branco.

### 3.11.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH

A atividade antioxidante baseia-se na captação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), essa molécula é bastante conhecida por ser um radical orgânico, livre e estável, sendo utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante. Em 1995 foi modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset para determinar o potencial de compostos fenólicos em amostras biológicas (OLIVEIRA et al., 2015).

O radical DPPH de cor púrpura ou violeta, quando uma substância antioxidante doar um átomo de hidrogênio ao radical, esse passará para sua forma estável (DPPH-H) alterando sua coloração para violeta claro ou amarelo (OLIVEIRA et al., 2015; TOMEI et al., 2007). Essa alteração de cor pode ser acompanhada por um espectrofotômetro devido sua observação na luz visível (TOMEI et al., 2007).

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Salgueiro et al., (2014) com modificações.

Para preparar o DPPH pesou-se 3 mg do radical em um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com metanol absoluto. A solução foi preparada na ausência de luz para não ocorrer degradação pela exposição a luz.

Inicialmente foi realizada uma curva de calibração feita com o antioxidante de referência, trolox (*6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroma Ne-2-Carboxylic Acid*). Uma solução mãe de 1 mg/mL de padrão trolox foi preparada, em seguida foram feitas diluições utilizando metanol para obter as seguintes concentrações: 2 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL, 12,5 µg/mL.

Foram avaliadas as frações de folhas e galhos (FHF, FHG, FCF, FCG, FCFr, FAEF, FAEG, FRF e FRG,) extratos dos frutos (FHFfr, FAEFr, FRFr e FOHFfr) e amostras de polissacarídeo (PQ e PF) de *Z. kleinii*, foi realizada uma solução mãe em metanol de 200 µg/mL, e a atividade foi determinada pela porcentagem de inibição em relação ao padrão trolox, BHT e ácido ascórbico, preparados na mesma concentração.

O teste foi realizado em microplacas, em quintuplicata. Em cada poço foi adicionado 71 µL de amostra ou controle positivo e 29 µL de DPPH•. Para cada amostra foi preparado um branco, no poço do branco foram pipetados 71 µL de amostra ou controle positivo e 29 µL de metanol. No controle negativo, cada poço continha 71 µL de metanol e 29 µL de DPPH.

As placas foram deixadas no escuro por 30 minutos, após esse período foi feita a leitura em espectrofotômetro, em 540 nm.

Os resultados para o índice antioxidante (IA) de inibição do DPPH• foram calculados pela equação 9.

$$IA\% = 100 - \frac{\text{Abs Amostra} - \text{Abs Branco}}{\text{Abs Negativo}} \times 100 \quad (9)$$

Em que:

Abs amostra = absorbância da amostra;

Abs do branco = absorbância do branco;

Abs do Negativo = absorbância do negativo.

Os valores obtidos para cada amostra foram submetidos ao Scott-Knott e o gráfico foi construído por meio do GraphPad Prism® 5.04 (Trial).

### 3.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

De acordo com Weston et al. (1996) a atividade alelopática diz respeito a ação de uma planta sobre plantas próximas devido a produção de fitotoxinas, interferindo nas plantas vizinhas. Esses componentes estão presentes em quase todas as plantas, na maioria dos tecidos. Sob condições apropriadas esses componentes, denominados aleloquímicos, são liberados no ambiente. A atividade desses componentes vem sendo usada como alternativa aos defensivos agrícolas, herbicidas e inseticidas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

A espécie *Lactuca sativa* (alface) apresenta sensibilidade aos aleloquímicos, por esse motivo é utilizada nas pesquisas em laboratório (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Para realização desse teste foi utilizada metodologia de Dias et al. (2005) e Alvez et al. (2014) com adaptações. A amostra utilizada para realização do teste foi o óleo essencial obtido dos frutos de *Z. kleinii*. O óleo foi preparado em diferentes concentrações (TABELA 3), partindo de uma solução estoque (SE) de 1%. Para obter essa solução, 0,25 g de óleo foi solubilizada em 0,25 g de polissorbato 80, na proporção de 1:1 (m/m). Nessa solução foram adicionados 10 mL de água destilada e transferido para balão volumétrico de 25 mL, onde completou-se com água destilada para obter a concentração de 1%.

TABELA 3 - DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Z. Kleinii* PARA ENSAIO DE ALELOPATIA

Diluição %	Volume de SE	Volume de água
1	10 mL	-
0,1	1000 µL	9 mL
0,01	100 µL	9,9 mL
0,001	10 µL	9,990 mL

Fonte: A autora (2023).

LEGENDA: SE = solução estoque.

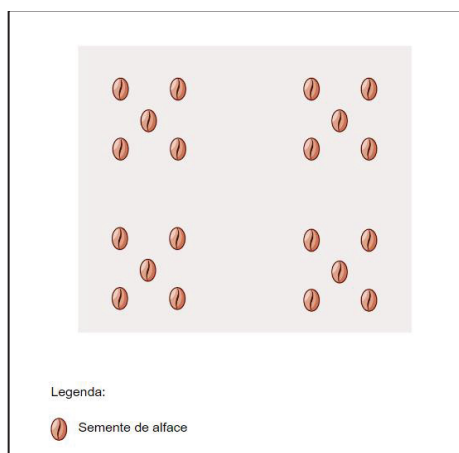
Para este ensaio foram utilizadas caixas gerbox (caixas de poliestireno cristal, quadradas com 11 cm de comprimento e 3,5 cm de altura, contendo tampas), estas foram previamente higienizadas em hipoclorito 2,5 % (v/v) por um período de 24

horas, após esse tempo as caixas foram lavadas com água destilada e antes de serem utilizadas para o ensaio foram desinfetadas com etanol 70% e deixadas secar em temperatura ambiente por um dia.

Foi colocado 1 papel de filtro em cada caixa gerbox, os papeis foram recortados de maneira que encaixasse perfeitamente no fundo da caixa, sem que ficassem espaços sem papel ou com folga. Na tampa da caixa foram colados dois papeis filtros com auxílio de uma fita dupla face.

Colocou-se aproximadamente 5 mL de água destilada em cada papel filtro na base da caixa gerbox, em seguida as sementes de *Lactuca sativa* foram dispostas como na FIGURA 16.

FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DAS SEMENTES DE *L. Sativa* NO FUNDO DA CAIXA



FONTE: A autora (2023).

Para cada concentração foram preparadas duas caixas Gerbox, uma para avaliar a germinação das sementes e uma para avaliar o crescimento. Além disso, duas caixas Gerbox foram utilizadas como controle, uma para avaliar o crescimento colocando apenas água destilada sob o papel filtro e a outra para avaliar a influência do polissorbato 80 sobre as sementes, utilizando a mesma concentração usada para diluição do óleo essencial (1%), ambas sob as mesmas condições.

Todas as placas foram envoltas com papel alumínio para evitar exposição a luz, mantidas sob temperatura de aproximadamente 20°C e envoltas com sacos plásticos para evitar o secamento das placas devido a evaporação da água (FERREIRA; AQUILA, 2000).

### 3.12.1 Germinação

Para avaliar a germinação da semente foram realizadas leituras diárias, sempre no mesmo horário, abrindo as placas em fluxo laminar, durante sete dias. O teste foi realizado em quatro repetições. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento, que pode ocorrer devido à expansão do embrião em contato com o óleo essencial (FERREIRA; AQUILA, 2000).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado anotando diariamente o número de sementes germinadas e ao final somou-se as sementes germinadas por dia, dividindo-se pelo respectivo número de dias contados a partir da semeadura de acordo com a equação 10 (MAGUIRE et al., 1962).

$$IVG = (G1 / N1 ) + (G2 / N2 ) + \dots + (Gn / Nn ) \quad (10)$$

Em que:

G = número de sementes germinadas;

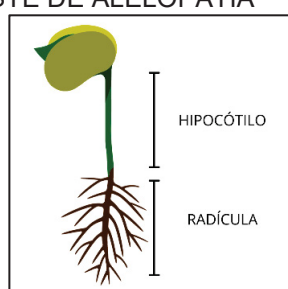
N = número de dias da semeadura.

As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao teste Scott-Knott no programa SISVAR<sup>®</sup>. O gráfico foi construído por meio do *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5.04 (Trial).

### 3.12.2 Crescimento

O crescimento foi avaliado após sete dias de protrusão radicular, foi medido o alongamento da raiz (radícula) e do hipocótilo (FIGURA 17) utilizando papel milimetrado.

FIGURA 17 - HIPOCÓTILO E RADÍCULA, ESTRUTURAS AVALIADAS APÓS PERÍODO DO TESTE DE ALELOPATIA



FONTE: A autora (2023).

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott no programa SISVAR® e o gráfico foi construído por meio do *GraphPad Prism*® 5.04 (Trial).

### 3.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com Surek et al. (2021), de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (COCKERILL et al., 2012), utilizando microplacas de 96 poços de fundo em “U” com tampa.

Para o ensaio antimicrobiano foram utilizadas as cepas: *Escherichia coli* (American Type Culture Collection [ATCC] 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA, ATCC 6538). As cepas, inicialmente armazenadas em 20% de glicerol em caldo BHI (-80 °C), foram reativadas em caldo BHI e cultivadas em ágar Mueller-Hinton para a obtenção de colônias isoladas a (35 ± 1) °C.

A solução estoque utilizada no ensaio foi preparada utilizando óleo volátil das folhas, óleo volátil do fruto, extrato bruto das folhas, extrato bruto dos galhos e polissacarídeo de *Z. kleinii*.

As amostras de óleo foram diluídas em DMSO 1:1 (v/v), as amostras de extrato bruto foram preparadas diluindo 20 mg/mL em DMSO (m/v) e amostras de polissacarídeo foram diluídas em água 10 mg/mL (m/v).

As diluições para concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial, extratos brutos e polissacarídeo foram feitas em série, para o óleo essencial foi de 0,19 a 12,50 µL/mL, para os extratos brutos foi de 1000 µg/mL a 250 µg/mL e para o polissacarídeo foi de 500 µg/mL a 125 µg/mL. Todos os poços foram completados com caldo Mueller Hinton II até um volume final de 200 µL.

O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina 0,85%, a partir de uma cultura em placa com 18 h de crescimento, com turbidez equivalente à escala McFarland 0,5 (~1,0 × 10<sup>8</sup> UFC/mL). Esta suspensão foi então diluída 1:20 (~5 × 10<sup>5</sup> UFC/mL) e desta solução 10 µL foram adicionados a cada poço.

Como controle negativo, os microrganismos foram tratados com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram incubadas por mais 18h a ( $35 \pm 1$  °C), para posterior determinação da CIM.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Em 2022 foi realizada uma coleta de folhas, 400 g foram utilizadas frescas para realizar a extração de óleo essencial, aproximadamente 200 g de material fresco foi separado para os estudos morfoanatômicos e o restante, após secar em temperatura ambiente, foi triturado obtendo-se 600 g. O material triturado foi direcionado para os ensaios fitoquímicos preliminares. A secagem rápida do material coletado evita a degradação dos componentes, pelo ar ou por microrganismos (GURIB-FAKIM, 2006).

Em 2023 foi realizada nova coleta de folhas, galhos e frutos. As folhas e galhos foram secos a temperatura ambiente, a sombra, e trituradas. Após trituração foram obtidos 4 kg de folhas e 1 kg de galho e 67 g de frutos. Os frutos foram acondicionados em recipiente apropriado e armazenados em freezer.

### 4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

#### 4.2.1 Morfologia externa das folhas, galhos, pecíolo, coleter e frutos de *Z. kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman

De acordo com a morfologia externa da espécie *Z. kleinii*, a espécie se apresenta na forma de árvore, com cerca de 10 metros de altura. O tronco diferencia das demais espécies por apresentar espinhos abertos (FIGURA 18A) ou presença de microfissuras. Os galhos utilizados neste trabalho são demonstrados na FIGURA 18B.

A análise morfológica das folhas demonstrou que são folhas compostas, imparipinadas, com espinhos ou inermes, quando presentes os espinhos encontram-se voltados para face abaxial da folha, na raquis (FIGURA 18C e 18D).

Os folíolos de *Z. kleinii* apresentaram em média 0,8 cm de largura e 2,2 cm de comprimento, sendo formato oblongo-elíptico. Seu ápice mostrou formato emarginado, característica que a distingue de *Z. armatum* pois esta apresenta ápice agudo (IBRAR et al., 2017).

O pecíolo tem em média 1,6 cm de comprimento, e apresenta forma semicilíndrica. Característica observada também nas espécies *Zanthoxylum fagara* subsp. *aguilarii* (Standl. & Steyererm.) Reynel que varia de 0,6 a 2,7 cm de comprimento (semicilíndrico), e *Z. syncarpum*, que varia de 1,5 a 3,0 cm de comprimento (semicilíndrico) (MELO et al., 2004).

FIGURA 18 - MORFOLOGIA EXTERNA DE *Z. Kleinii*



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A: tronco com presença de acúleos; B: galhos separados das folhas; C: ramo foliar; D: detalhe dos espinhos na face abaxial da folha; E: frutos no ramo; F: frutos (es: espinho; pe: pecíolo).

Os frutos de *Z. kleinii* são globulares, assim como *Z. armatum*, *Z. bungeanum* e *Z. limonella* (BARKATULLAH et al., 2014; CHAROENSUP et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Quando maduros os frutos da espécie *Z. kleinii* apresentam aproximadamente 5 mm de diâmetro, sua superfície apresentou-se ondulada (FIGURA 18E e 18F), os frutos de *Z. bungeanum* apresentam o mesmo tamanho, entretanto os frutos apresentam coloração vermelho ou vermelho-arroxeadado (ZHANG et al., 2017).

Os frutos são classificados como secos, indeiscentes do tipo aquênio (OLIVEIRA et al., 2000).

A frutificação ocorre entre os meses de fevereiro e março (PIRANI; GROppo, 2023) na espécie *Z. armatum* a frutificação ocorre de julho a novembro (PYAKUREL et al., 2022) e em *Z. rhetsa* a frutificação ocorre de outubro a novembro (PHAM et al., 2021), enquanto em *Z. bungeanum* a colheita dos frutos ocorre de agosto a outubro na China (ZHANG et al., 2017).

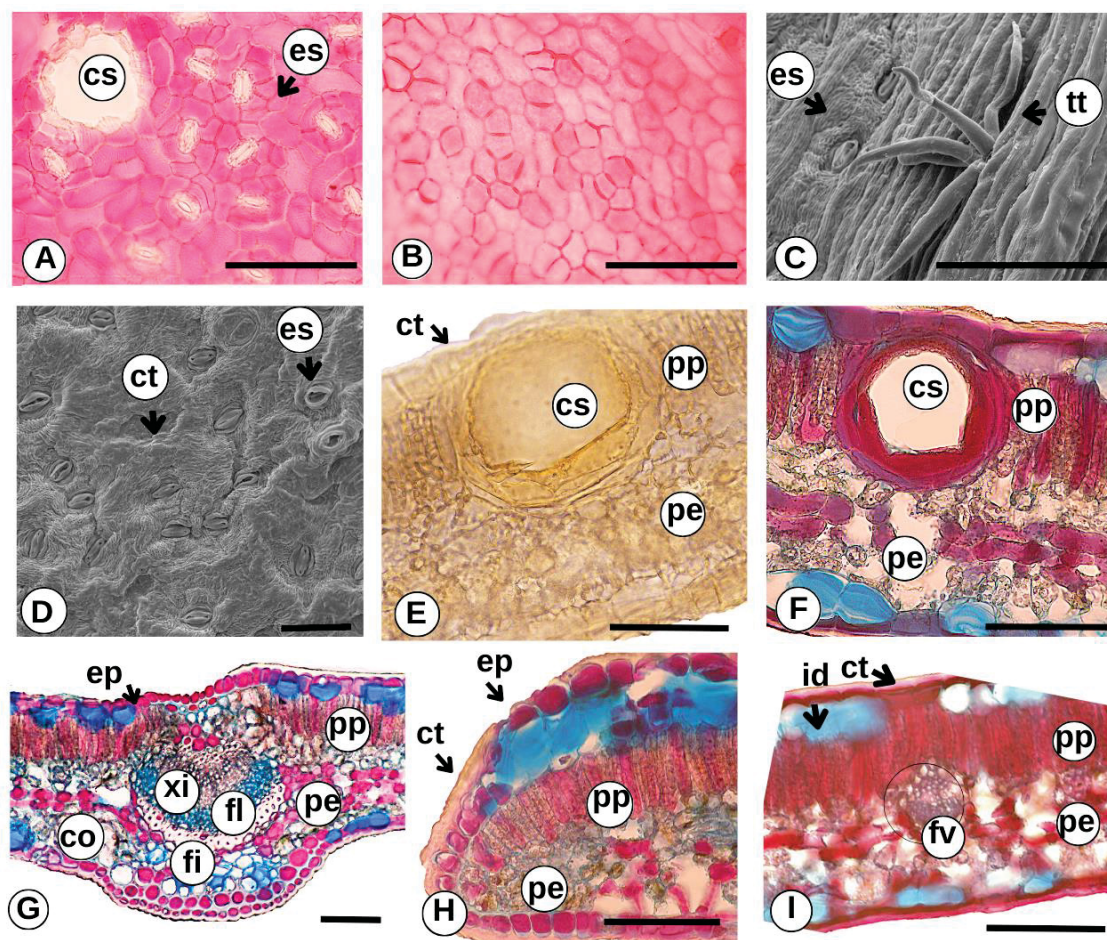
#### 4.2.2 Descrição morfoanatômica do folíolo da espécie *Z. kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman

Em vista frontal, o lado adaxial e abaxial, apresentam células epidérmicas com paredes retas e contorno poligonal, as paredes são anticlinais retas (FIGURA 18A e 18B), essas características são comuns nas espécies do gênero *Zanthoxylum* identificadas na China (MING et al., 2008).

Os estômatos ocorrem na face abaxial da folha (FIGURA 19C E 19D) sendo classificada como hipoestomática. Os estômatos presentes podem ser classificados em anisocíticos, tetracíticos e anomocíticos. Os estômatos estão no nível das outras células dérmicas, assim como descrito para *Z. armatum* e *Zanthoxylum coco* Gillies ex Hook. f. & Arn. (OGGERO et al., 2016)

Na superfície da epiderme foram observados tricomas tectores acima da nervura central (FIGURA 19C) não sendo observado em outras regiões da epiderme da lâmina foliar.

Cavidades secretoras de óleo essencial foram observadas ao longo do parênquima paliçádico próximo a epiderme (FIGURA 19E e 19F), essa característica difere de espécie para espécie, na espécie *Spiranthera odoratissima* var. *grandiflora* Engl. as cavidades estão presentes tanto no parênquima paliçádico quanto no lacunoso (MATOS et al., 2014).

FIGURA 19 - MORFOANATOMIA DO FOLÍOLO DA ESPÉCIE *Z. kleinii*

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: [A,B,E,F,G,H,I: microscopia de luz; C-D: microscopia eletrônica de varredura]. A e B: superfície da epiderme foliar; C e D microscopia eletrônica de varredura face abaxial do folíolo; E-I: seções transversais do folíolo. co: colênquima; cs: cavidade secretora; ct: cutícula; fi: fibra; fl: floema; me: medula; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; tt: tricoma tector; xi: xilema.

Em seção transversal apresenta mesofilo dorsiventral, formado por uma camada de parênquima paliçádico voltado para face adaxial e três camadas de parênquima lacunoso na face abaxial, além de uma nervura central proeminente em ambas as faces (FIGURA 19F e 19G). Ao longo do mesofilo pequenos feixes vasculares podem ser observados (FIGURA 19I).

A cutícula é espessa e estriada, pode ser observada em ambos os lados da lamina foliar (FIGURA 19I) e a epiderme é uniestratificada e presença de idioblastos logo abaixo da epiderme em ambas as faces, corado com azul de astra (FIGURA 19I).

Feixes colaterais de pequeno porte, rodeados por bainha e fibras justapostas ao floema, assim como observado na *Z. armantum* (ALAM, et al., 2015; BARKATULLAH, et al., 2014).

A nervura central em seção transversal tem formato plano-convexo (FIGURA 20G), o que a diferencia da *Z. caribaeum*, que se apresenta no formato côncavo-convexo (ANDRADE, et al., 2020), mas é semelhante a *Z. armantum*, qual apresentou mesma característica (BARKATULLAH, et al., 2014). Na descrição da *Z. armantum* a nervura central é revestida por uma fina camada de cutícula, contrastando com *Z. kleinii* (ALAM et al., 2015). Abaixo da cutícula é observado o parênquima, em que também são encontrados idioblastos fenólicos.

O método de dupla coloração usado neste estudo distinguiu entre tecidos lignificados e não lignificados. Os tecidos lignificados foram corados de vermelho por fucsina básica, enquanto que os tecidos não lignificados foram corados de azul pelo azul de astra.

#### 4.2.3 Descrição anatômica de pecíolo de *Z. kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman

O pecíolo possui formato plano-convexo, revestido por camada de cutícula estriada (FIGURA 20A), formando flanges cuticulares. A epiderme é uniestratificada em todas as regiões do pecíolo (FIGURA 20A).

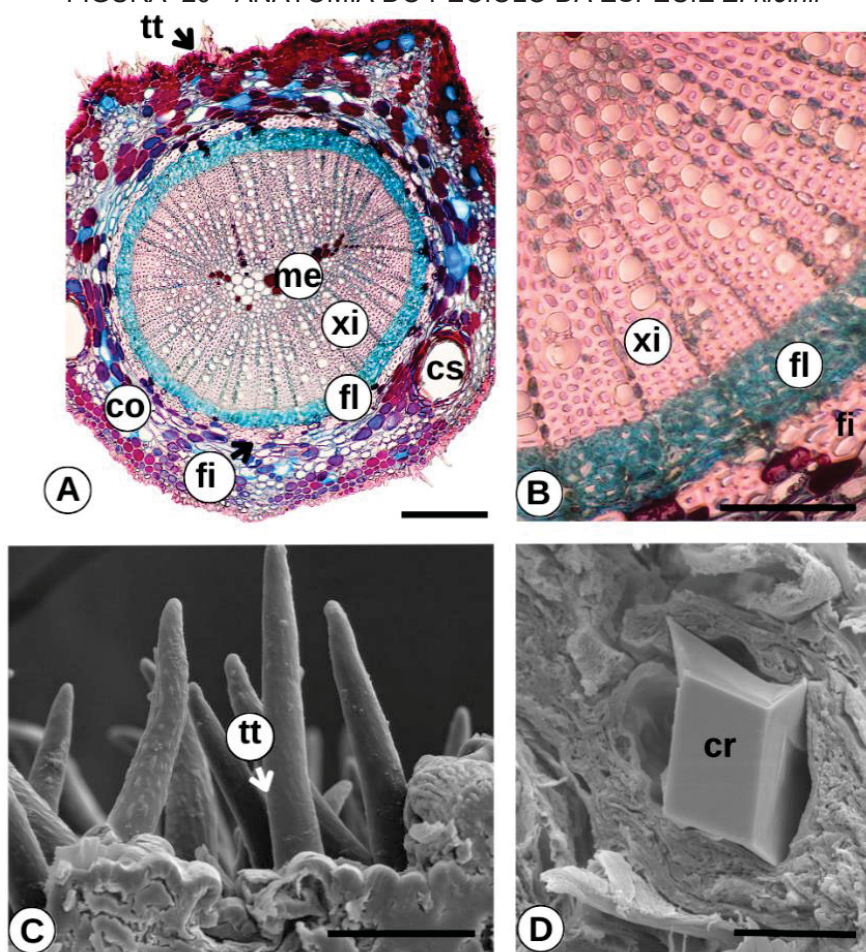
A porção média do córtex do parênquima exibe células maiores do que as porções corticais externa e interna em todas as porções de pecíolos. A região cortical é composta por 8-11 camadas de células do parênquima, semelhante ao perfil da *Luvunga crassifolia* (SHUNMUGAM, et al., 2021).

As cavidades secretoras (FIGURA 20A) são observadas ao longo da região cortical assim como na espécie *Luvunga crassifolia* (SHUNMUGAM, et al., 2021).

Os tecidos vasculares são organizados em cilindro fechado (FIGURA 20A), com o floema circundando o xilema e presença de medula.

A espécie apresenta células esclerenquimatosas (camadas de fibras pericíclicas) pequenas e dispostas irregularmente ao redor do floema (FIGURA 20A e 20B).

O pecíolo apresenta tricomas multicelulares entrelaçados ao longo da sua epiderme (FIGURA 20A e 20C). Alguns tricomas lembram espinhos recurvados. Diferente de *Z. kleinii* as espécies *Z. coco* e *Z. armatum* apresentam pecíolo glabro (OGGERO et al., 2016).

FIGURA 20 - ANATOMIA DO PECÍOLO DA ESPÉCIE *Z. kleinii*

FONTE: A autora (2023).

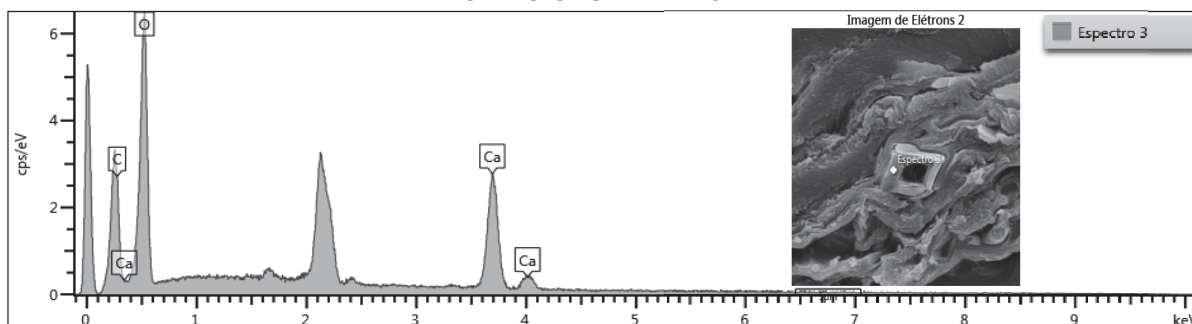
LEGENDA: [A-B: microscopia de luz; C-D: microscopia eletrônica de varredura]; A-B seções transversais do pecíolo; C: tricoma não glandular; D: cristal prismático. [co: colênquima; cr: cristal; fi: fibra; fl: floema; me: medula; tt: tricoma tector; xi: xilema]. Barras de escalas: A: 200  $\mu\text{m}$ ; B: 100  $\mu\text{m}$ ; C: 100  $\mu\text{m}$ ; D: 5  $\mu\text{m}$ .

Raros cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados no pecíolo de *Z. kleinii* (FIGURA 20D). Cristais são comuns na família Rutaceae, sua formação pode refletir uma condição ambiental (DE ANDRADE et al., 2020). Cristais de oxalato de cálcio foram observados nas folhas de *Z. armatum*, no formato de prismas (BARKATULLAH et al., 2017) e nas folhas de *Zanthoxylum leprieurii* Guill. & Perr. na forma de drusas (GONÇALVES et al., 2019).

Os espectros EDS das microanálises qualitativas de raios-X dos cristais de *Z. kleinii* apresentaram picos proeminentes de cálcio (29,03%), carbono (16,75%) e oxigênio (54,22%) (FIGURA 21).

A composição do cristal sugere que sejam cristais de oxalato de cálcio.

FIGURA 21 - ESPECTRO EDS E IMAGEM DE MEV DE CRISTAL PRISMÁTICO IDENTIFICADO NO PECÍOLO DE *Z. kleinii*



FONTE: C-LABMU (2022).

NOTA: O pico próximo a 0 keV é o pico de ruído, e em 2.2 keV aproximadamente, é o sinal do ouro, material utilizado para revestir a amostra por pulverização catódica.

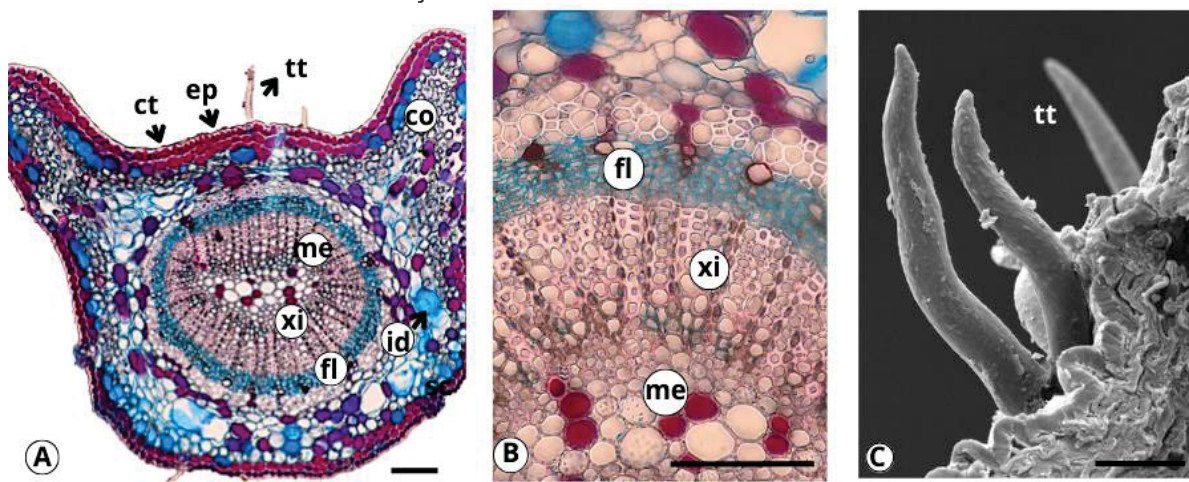
#### 4.2.4 Descrição anatômica da ráquis de *Z. kleinii*

A raquis apresenta formato plano-convexo e possui duas projeções laterais (FIGURA 22A) semelhante a raquis de *Z. coco* (OGGERO et al., 2016). A epiderme é uniestratificada, formada por cutícula espessa e tricomas tectores isolados (FIGURA 22A e 22C), sendo seguida de colênquima anular.

As cavidades secretoras não estão presentes na raquis de *Z. kleinii*, entretanto, outras espécies podem apresentar essa característica, como *Z. coco* (OGGERO et al., 2016).

Na raquis, também observamos a presença de idioblastos abaixo da epiderme, coradas em azul (FIGURA 21A e 21B).

FIGURA 22 - DESCRIÇÃO ANATÔMICA DA RAQUIS DA ESPÉCIE *Z. Kleinii*



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: [A-B: microscopia de luz; C: microscopia eletrônica de varredura]; A-B seções transversais da raquis; C: tricoma não glandular. [co: colênquima; ct: cutícula; ep: epiderme; fl: floema; id: idioblasto; me: medula; tt: tricoma tector; xi: xilema].

#### 4.2.5 Descrição anatômica dos galhos de *Z. kleinii*

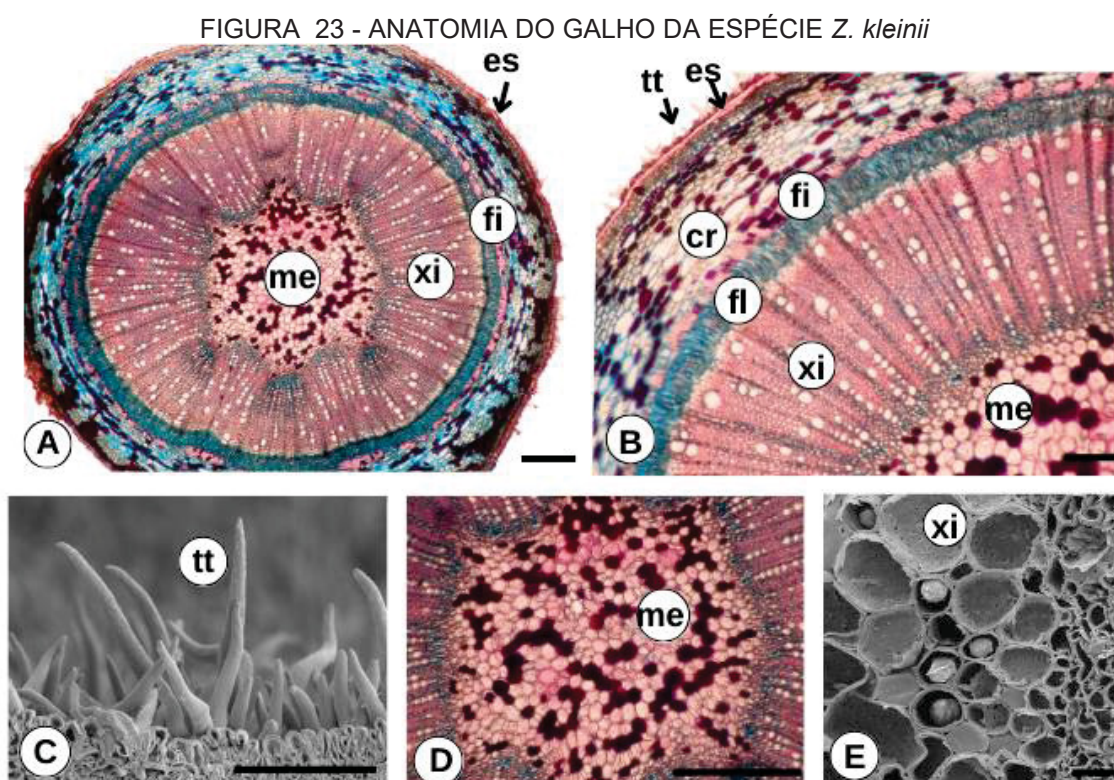
O galho apresenta contorno circular, uma camada de células epidérmicas revestidas com uma camada de cutícula (FIGURA 23A).

O córtex do galho apresentou características semelhantes ao do pecíolo e da raquis. No galho, assim como na raquis, não há presença de cavidades secretoras.

Tricomas tectores são distribuídos ao longo da superfície dos galhos (FIGURA 23B e 23C). Em *Z. armatum* não foi relatado a presença de tricomas na casca do galho (SINGH et al., 2020).

No parênquima medular são observadas presença de esclereides coradas em rosa (FIGURA 23D).

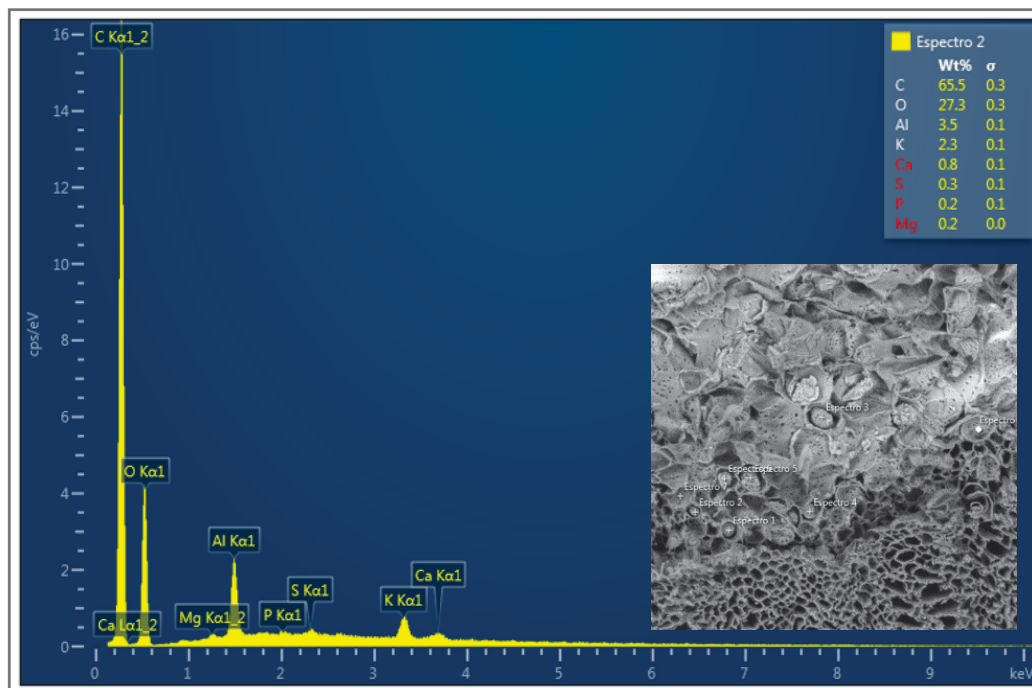
Na FIGURA 23E é possível observar que as células do xilema apresentam uma substância em seu interior, foi realizado um EDS para auxiliar na identificação do composto (FIGURA 24). Os elementos químicos identificados foram C (65,5%), O (27,3%), Al (3,5%) e K (2,3%).



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: [A,B,D: microscopia de luz; C, E: microscopia eletrônica de varredura]; A,B,D seções transversais do galho ; C: tricoma não glandular; E: xilema. [co: colênquima; ct: cutícula; ep: epiderme; fl: floema; id: idioblasto; me: medula; tt: tricoma tector; xi: xilema].

FIGURA 24 - ESPECTRO EDS E IMAGEM DE CÉLULAS DO XILEMA DO GALHO DE *Z. kleinii*



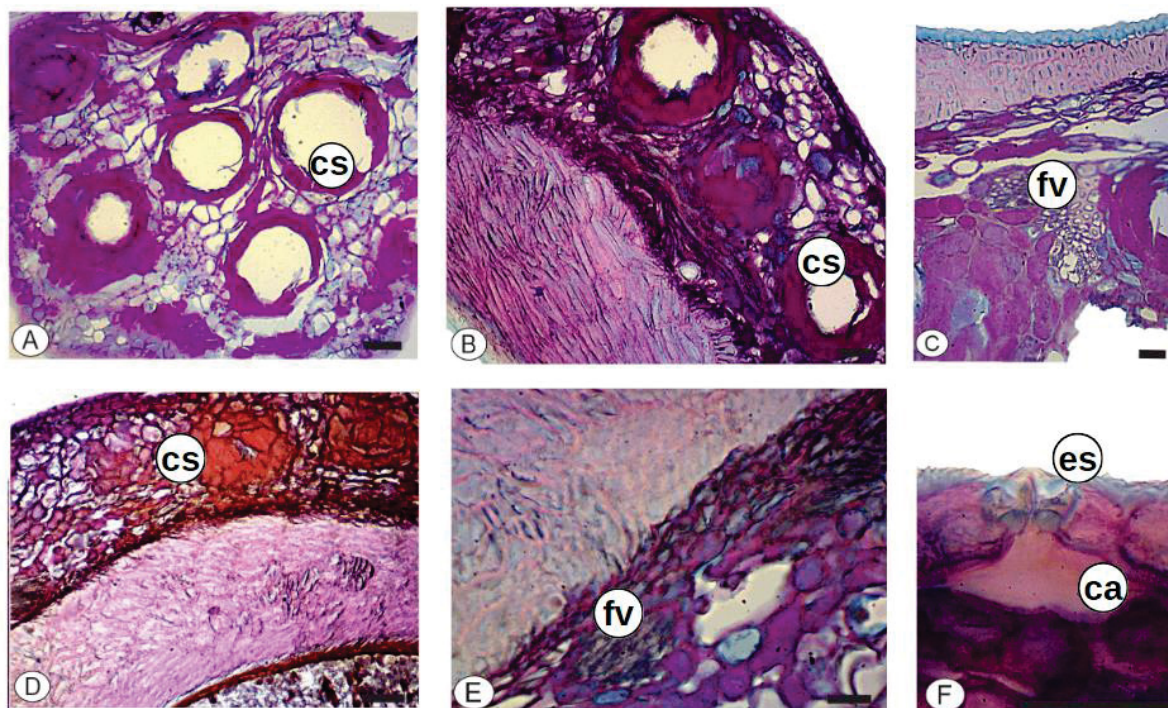
FONTE: CME-UFPR (2023).

#### 4.2.6 Descrição morfoanatômica do fruto

Pode-se observar que o fruto apresenta duas porções, ou seja, fruto e semente. A parede da fruta apresenta três porções, epicarpo, mesocarpo e endocarpo. As mesmas características foram descritas para fruto da espécie *Z. armatum* e *Z. limonella* (BARKATULLAH et al., 2014; CHAROENSUP et al., 2016).

O corte paradérmico mostra células epidérmicas retas, com contorno poligonal com tamanhos variados. Entre as células epidérmicas foi possível observar presença de cavidades secretoras de óleo essencial (FIGURA 25A, 25B E 25E).

A epiderme do fruto é revestida por camada rugosa de cutícula (FIGURA 25B), também foram observados estômatos na superfície epidérmica. O estômato apresenta cavidade sub estomática (FIGURA 25F).

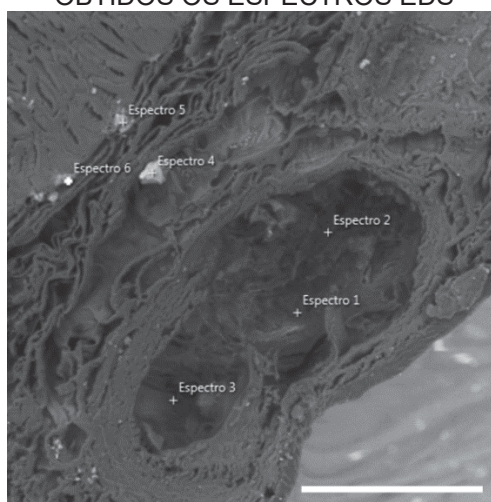
FIGURA 25 - MORFOANATOMIA DO FRUTO DA ESPÉCIE *Z. kleinii*

Fonte: A autora (2023).

LEGENDA – A-F: Imagens de Microscópio óptico; G-I: Microscopia eletrônica de varredura do fruto de *Z. kleinii*. A: corte paradermico do fruto; B corte transversal do fruto com detalhes para cavidades secretoras; C: corte transversal dos frutos com detalhe para o feixe vascular; D: cavidade secretora de óleo essencial; E: feixe vascular; F: estômato com cavidade subestomática. Ca: cavidade subestomática; cs: cavidade secretora; es: estômato; fv: feixe vascular.

Barras de escalas: A-B-C 50 µm; D-E: 25 µm; F: 10 µm.

Na FIGURA 26 pode ser observada uma imagem de microscopia eletrônica de varredura do fruto, com as áreas onde foram obtidos os espectros EDS.

FIGURA 26 - IMAGEM DO FRUTO DE *Z. Kleinii* COM OS PONTOS NOS QUAIS FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS EDS

FONTE: CME-UFPR (2023).

NOTA: Barra de escala 100 micrometros.

Os espectros com a composição elementar e porcentagem de cada elemento são apresentados nos apêndices 1, 2, 3 e resumidos na TABELA 4.

No interior da cavidade secretora a composição elementar apresentou como principal constituinte o carbono, seguido de oxigênio e alumínio. A estrutura na qual foi obtida o espectro 4 mostrou carbono como elemento principal, seguido de oxigênio, alumínio, cálcio, silício e ferro. As estruturas que resultaram no espectro EDS 5 e 6 apresentaram carbono como elemento principal, seguido de oxigênio, alumínio e cálcio.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE ESTRUTURAS PRESENTES NO INTERIOR DO FRUTO DE *Z. kleinii*

	C (%)	O (%)	Al (%)	Ca (%)	Si (%)	Fe(%)
ESPECTRO 1	59,1	25,9	12,7	-	-	-
ESPECTRO 2	57,6	25,2	15,0	-	-	-
ESPECTRO 3	58,3	26,3	13,2	-	-	-
ESPECTRO 4	42,9	18,9	6,5	11,8	8,5	8,1
ESPECTRO 5	35,8	32,2	4,8	26,4	-	-
ESPECTRO 6	52,4	29,8	9,1	7,5	-	-

FONTE: A autora (2023).

Na composição elementar dos frutos de *Zanthoxylum ovalifolium* foram identificados os elementos potássio (1,78%), cálcio (0,57%), fosforo (0,17%), magnésio (0,029%) e presença de ferro (74,5 ppm) (PAVANI et al., 2021), mostrando-se diferente dos frutos de *Z. kleinii*.

Nos frutos de *Z. armatum* foi utilizado o método de espectroscopia de decomposição induzida por laser para identificar os diferentes elementos presentes em sua composição, foram observados em espectros a presença dos elementos ferro, cálcio, magnésio, silício, potássio, lítio, sódio e alumínio. Esse mesmo estudo analisou o solo próximo da planta e constatou a presença dos elementos cálcio, magnésio, manganês, titânio, sódio, ferro, alumínio, lítio, potássio, bário e silício. Essa análise sugere que elementos não essenciais a espécie como alumínio, bário, silício, lítio e titânio podem ter sido transportados pelo solo (SHAHIDA et al., 2020).

Em nosso estudo não analisamos a composição do solo, entretanto, a presença dos elementos alumínio, ferro e silício sugere que estes podem ter sido transportados do solo para a planta visto que não são elementos essenciais.

#### 4.2.7 Testes histoquímicos do folíolo, pecíolo, raquis, galho e frutos de *Z. kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman

As seções realizadas de cada parte do vegetal foram expostas a diferentes tipos de reagentes para mostrar quais compostos estavam presentes.

Todas as estruturas (folíolo, raquis, pecíolo e galho) apresentaram compostos fenólicos, estes foram identificados pela reação com cloreto férrico e dicromato de potássio. Na folha foi possível identificar na epiderme, nas células subepidérmicas, distribuído entre os parênquimas e na nervura central (FIGURA 27B, 27E e 27J). No pecíolo, na raquis e no galho estão distribuídos em maior quantidade na epiderme e regiões subepidérmicas. No fruto os compostos fenólicos podem ser visualizados na FIGURA 28B e 28E. O perfil de compostos fenólicos está de acordo com a descrição das folhas de *Zanthoxylum bungeanum* var. *zimmermannii* (Rehder & E.H. Wilson) C.C. Huang, em qual os principais locais de produção são a epiderme, tecido paliçádico, células do parênquima, floema e câmbio vascular (ZHANG et al., 2023).

A espécie *Z. kleinii* mostrou reação positiva para células mucilaginosas quando corado com azul de metileno, no folíolo, pecíolo e raquis (FIGURA 27F, 27H e 27K), em regiões próximas à epiderme e no parênquima cortical. A espécie *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler mostrou presença de células mucilaginosas na epiderme, se estendendo até o parênquima paliçádico (MENSAH, 2012). Essa característica foi descrita para outros gêneros de Rutaceae como *Acmadenia*, *Adenandra*, *Agasthosma*, *Barosma*, *Coleonema*, *Diosma*, *Empleurum*, *Flindersia*, *Macrostylis* e *Phellodendron* (DE ANDRADE et al., 2020).

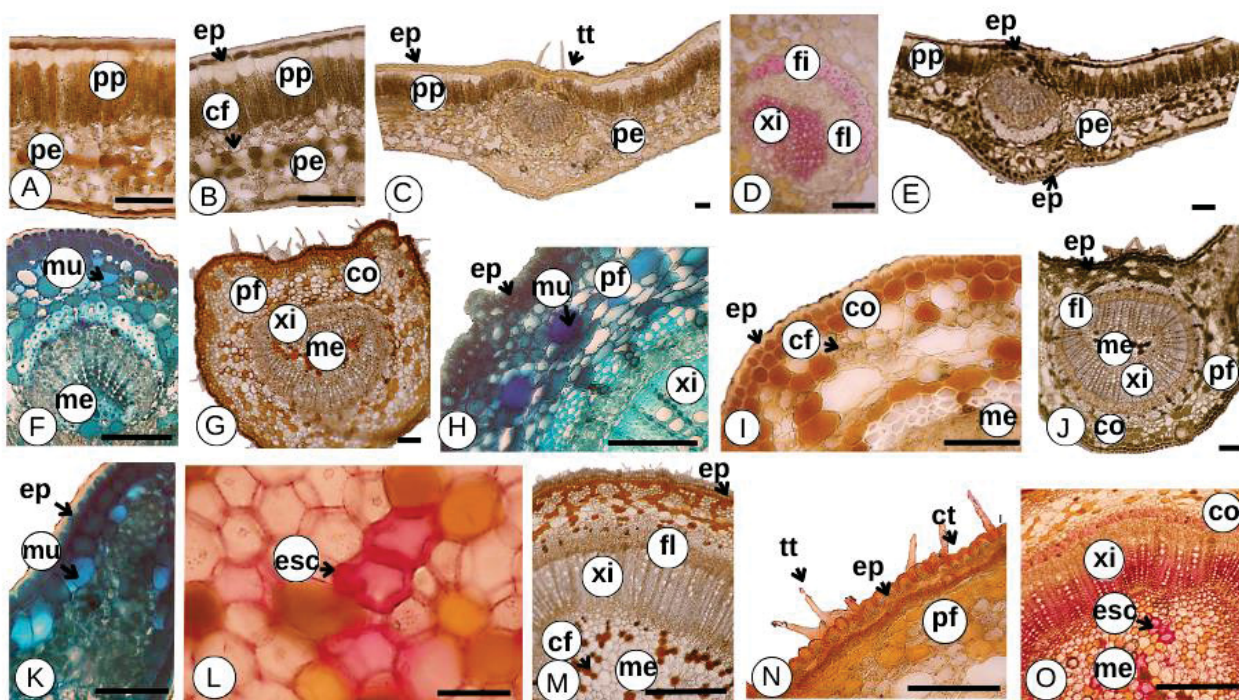
A presença de lignina na espécie *Z. kleinii* foi identificada pelo teste floroglucina clorídrica, esse reagente corou a lignina nas fibras e no xilema do folíolo que apresentaram coloração rosa a vermelho (FIGURA 27D). Pecíolo, raquis, galhos e fruto (FIGURA 28C) também foram positivos para este teste.

O conteúdo lipofílico reagiu positivamente ao Sudam III, encontrado em *Z. kleinii* na folha, no pecíolo, na ráquis, no galho (FIGURA 27N). No fruto pode-se

observar a presença de lipídios na FIGURA 28G. Em todas estas estruturas houve reação quando expostas a esse reagente: cutícula, epiderme, em regiões abaixo da epiderme, tricomas tectores e glandulares e no parênquima medular.

Grãos de amidos foram detectados na espécie *Z. kleinii* pela reação com lugol, a presença de amido ocorre na lâmina foliar (FIGURA 27C), na ráquis, no galho, no pecíolo e no fruto (FIGURA 28F). Outra espécie do gênero que apresenta capacidade de estocar amido em suas células é *Zanthoxylum armatum* (OGGERO et al., 2016).

FIGURA 27 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO FOLÍOLO, PECÍOLO E GALHO DA ESPÉCIE *Z. kleinii*



FONTE: A autora (2023).

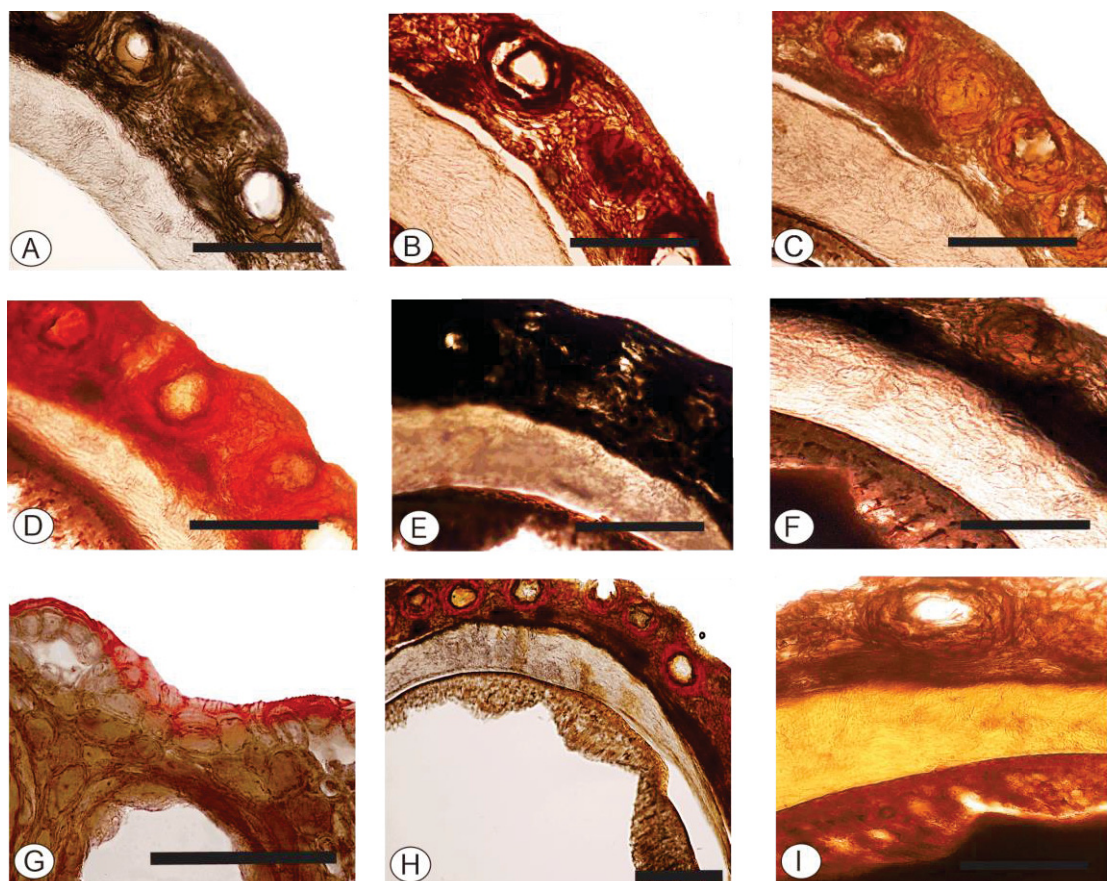
LEGENDA: a: lamina foliar (dicromato de potássio); b: lamina foliar (cloreto férrico); c: lamina foliar (lugol); d: nervura central do folíolo (floroglucina); e: nervura central do folíolo (cloreto férrico); f: nervura central do folíolo (azul de metileno); g: pecíolo (dicromato); h: pecíolo (azul de metileno); i: ráquis (dicromato); j: ráquis (cloreto férrico); k: ráquis (azul de metileno); l: galhos (floroglucina); m: galho (dicromato); n: galho (sudam). o: galho (floroglucina). [ co: colênquima; cf: composto fenólico; ct: cutícula; ep: epiderme; esc: escleride; fl: floema; id: idioblasto; me: medula; pf: parênquima fundamental; tt: tricoma tector; xi: xilema].

Barras de escalas: a - b = 100 µm, c = 50 µm, d = 100 µm, e = 50 µm, g - h = 100 µm, i = 50 µm, j - k = 100 µm, l - o = 100 µm.

No fruto foi realizado a pesquisa com reagente de vanilina clorídrica, de acordo com Ventrella et al. (2013) esse reagente cora os taninos condensados de vermelho. Pode-se observar nas figuras 28D e 28H a coloração avermelhada.

Na figura 28I foi identificado a presença de alcaloides, usando o reagente de Wagner. Esse reagente cora os alcaloides de castanho avermelhado (VENTRELLA et al., 2013).

FIGURA 28 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO FRUTO DA ESPÉCIE *Z. kleinii*



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: A: branco; B: dicromato de potássio; C: floroglucina clorídrica; D: vanilina clorídrica; E: cloreto férrico; F: lugol; G: sudam III; H: vanilina clorídrica; I: wagner.

#### 4.2.8 Descrição morfoanatômica dos coleteres

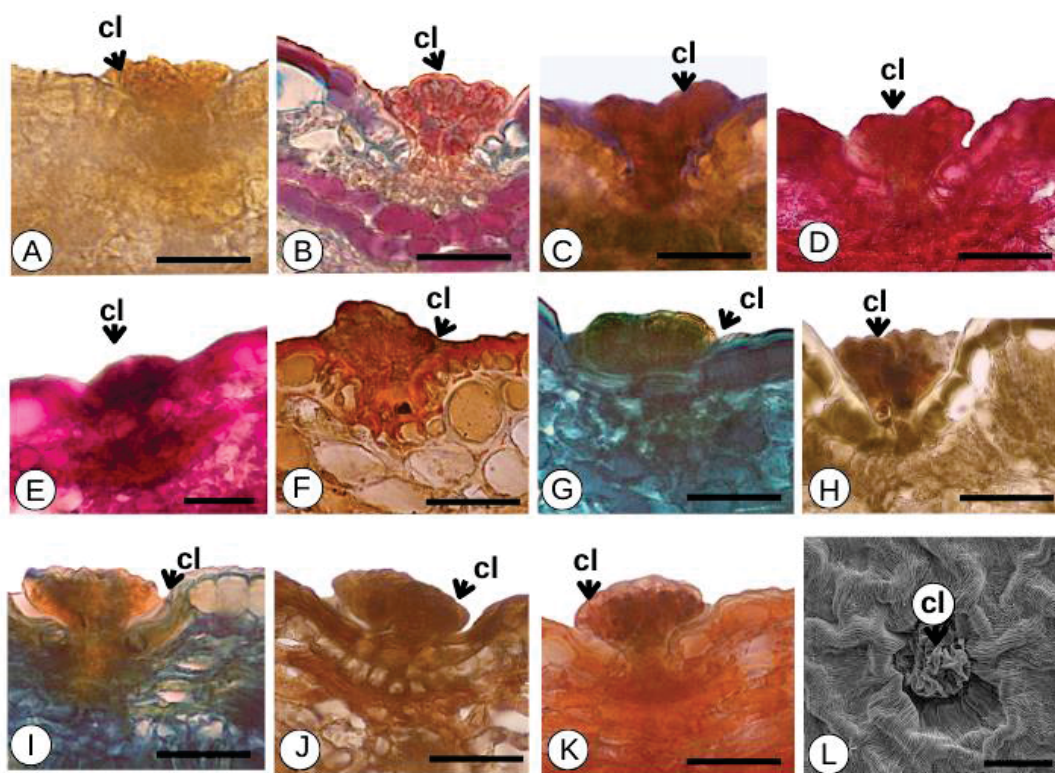
Os coleteres são considerados importantes na proteção do tecido meristemático, principalmente contra perdas de água e ataques de patógenos, devido à sua posição e natureza do produto químico, constituído por componentes resinosos como terpenoides e compostos fenólicos (MACEDO et al., 2016), na TABELA 5 são apresentados os resultados dos testes histoquímicos dessa estrutura, e na FIGURA 29 é possível observas as imagens microscópicas desses testes.

TABELA 5 - TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS NO COLETER DA ESPÉCIE *Z. kleinii*

Coloração	Composto marcado	Cor	Resultado
Sudan III	lipídeos totais	Vermelho	+
Sudam black	lipídeos totais	azul a negro	+
NADI	óleos essenciais e resina	Violeta	+
Vermelho de rutênio	pectina	Vermelho	+
Cloreto férrico	compostos fenólicos	verde- marrom	+
Schiff	polissacarídeos	Magenta	+
Azul brilhante	proteínas	azul claro	+
Xilidine Ponceau	proteínas	Vermelho	+

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: + indica resultado positivo

FIGURA 29 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO COLETER DA ESPÉCIE *Z. kleinii*

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: A: coleter sem coloração; B: coleter com coloração azul de astra e fucsina; C: oleorresinas com coloração roxa após teste NADI; D: conteúdo de pectina após reação com vermelho de rutênio; E: conteúdo de polissacarídeos identificados após a reação de Schiff; F: conteúdo lipídico evidenciado após coloração com Sudan III; G: azul de metileno evidenciando mucilagens; H: Compostos fenólicos evidenciados após reação com cloreto férrico; I: azul brilhante de comassie indicando a presença de proteínas; J: sudan black corando lipídeos; K: conteúdo proteico corado com xilidina; L: imagem de microscopia eletrônica de varredura do coleter senescente. Barras de escalas: a - d = 50  $\mu$ m, e-i = 100  $\mu$ m, f - l = 50  $\mu$ m

Diferentes reações histoquímicas foram realizadas nessa estrutura visando confirmar sua classificação como coleter. Na figura 29A é possível observar o coleter sem nenhuma coloração e na figura 29B o coleter corado com azul de astra e fucsina.

De acordo com Ventrella et al. (2013) o resultado do teste NADI deve apresentar coloração azul para óleos essenciais a vermelho para oleorresina, quando ocorre a presença dos dois compostos apresenta uma coloração violeta à purpura. A FIGURA 29C mostra que o coleter teve resultado positivo para o teste, assim como no coleter de *Z. nemorale* (MACEDO et al., 2016).

O Azul de metileno cora mucilagens em azul, a FIGURA 29G mostra o resultado positivo após essa reação. A presença de mucilagens no coleter também pode ser confirmada pela reação com vermelho de rutênio. De acordo com Figueiredo (2007) na histoquímica esse composto detecta presença de pectinas e mucilagens. O vermelho de rutênio cora as pectinas com coloração vermelha (VENTRELLA et al., 2013), na FIGURA 29D, pode-se observar o conteúdo de pectinas e mucopolissacarídeo no coleter de *Z. kleinii*. A espécie *Zanthoxylum minutiflorum* também teve reação positiva no coleter para pectina usando o reagente vermelho de rutênio (MACEDO, 2016).

O reagente de Schiff cora os polissacarídeos neutros com coloração magenta (VENTRELLA et al., 2013), pode-se observar a reação desse teste na FIGURA 29E. No trabalho de Andrade, et al (2020) a espécie *Z. caribaeum* também apresenta esse resultado positivo para o teste de Schiff.

Os reagentes Sudam III e Sudan black coram os lipídeos, de vermelho e azul negro respectivamente. As FIGURAS 29F e 29J mostram que a reação foi positiva para estes reagentes. Nas espécies *Z. minutiflorum*, e *Z. nemorale* o colleter apresentou pontuações positivas quando corado com Sudan Black. A espécie *Z. nemorale* também apresentou pontuações positivas quando corado com Sudan IV (MACEDO et al., 2016).

Os compostos fenólicos foram evidenciados pelo cloreto férrico a indicados na FIGURA 29H.

As proteínas são evidenciadas pelo reagente azul brilhante de Comassie, tendo como resultado as proteínas coradas em azul claro (FIGUEIREDO, 2007), ilustrado na FIGURA 29I. As proteínas são confirmadas pelo reagente xilidina qual cora as proteínas em vermelho (VENTRELLA et al., 2013) evidenciada na FIGURA

29K. A espécie *Z. nemorale* também apresenta resultado positivo para proteínas após reação com reagente xilidine (MACEDO et al., 2016).

Coleteres atingem sua senescência mostrando enrugamento gradual das células secretoras que culmina com sua necrose e queda (MACEDO et al., 2016), essa estrutura pode ser observada na imagem de MEV (FIGURA 29L).

Essa estrutura está inserida entre células epidérmicas em depressões, como na espécie *Z. armatum* (OGGERO et al., 2016), diferente da espécie *E. febrifuga* var. *fruticosa* Hassl., qual raramente é observado em depressões e pode ser encontrado em ambas as faces do limbo foliar (FRANCO et al., 2018).

### 4.3 PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS

#### 4.3.1 Perda por dessecação

Para realizar a dessecação até peso constante, a secagem deve continuar até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,0005 g por grama do material utilizado (BRASIL, 2019).

A perda por dessecação das folhas e galhos de *Zanthoxylum kleinii* foram realizadas em estufa em temperatura constante de 50°C. As folhas apresentaram em média perda de  $(12,18 \pm 0,2269)\%$  e o galho teve uma perda de  $(12,17 \pm 0,2293)\%$ .

#### 4.3.2 Determinação de cinzas totais

De acordo com Shah e Seth (2010) é uma análise importante para detectar adulterações e determinar o conteúdo de impurezas inorgânicas presente em substâncias orgânicas, como sais metálicos. Neste trabalho, calculamos a quantidade de cinzas totais nas folhas e nos galhos.

A quantidade de cinzas (g) foi calculada em relação a droga seca (g), foram obtidos os seguintes resultados, em média  $(6,0461 \pm 0,2164) \%$  para folhas e  $(3,7341 \pm 0,8734) \%$  para galhos.

Na espécie *Z. ovalifolium* a quantidade de cinzas encontradas para as folhas foi de 3,8% (PAVANI et al., 2021).

#### 4.4 ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Para realizar a avaliação fitoquímica preliminar da espécie *Zanthoxylum kleinii*, foram realizados dois testes qualitativos a fim de realizar a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários presentes na espécie vegetal. A marcha fitoquímica, na qual se observam reações de coloração e precipitação, e a análise fitoquímica realizada por CCD (cromatografia em camada delgada). A CCD é uma técnica qualitativa amplamente utilizada, por ser econômica e permitir analisar mais de uma amostra simultaneamente (GURIB-FAKIM, 2006).

Na marcha fitoquímica foram pesquisados metabólitos solúveis em extrato hidroalcolico e solúveis em extrato aquoso. Após a conclusão dos testes, encontrou-se como principais constituintes no extrato hidroalcolico das folhas as leucoantocianidinas, flavononois, cumarinas, substancias iridoidias e esteroides/triterpenoides) (TABELA 6).

TABELA 6 - RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS PRELIMINARES DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS.

Grupo fitoquímico	Teste	FRAÇÕES			
		HEX	CLO	AE	OH
Alcaloides	Reativo de Mayer	-	-	-	-
	Reativo de Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo de Bouchardt	-	-	-	-
	Reativo de Bertrand	-	-	-	-
Leucoantocianidinas		-	+	+	-
Heterosideo flavonico		-	-	-	-
Flavononois	Reação de Taubock	-	-	+	-
Dihidroflavonois	Ensaio de Pacheco	-	-	-	-
Flavononas	Ensaio com zinco em HCl	-	-	+	+
Cumarinas	HCl e éter etílico	-	-	+	+
Substâncias iridoidais	Floroglucinol e HCl R	-	-	-	-
	Acido sulfurico R	-	-	-	-
Heterosídeos antraquinonicos		-	-	-	-
Esteroides e triterpenos		+	+	-	-

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: +: Resultado positivo; - : resultado negativo; HEX: hexano; CLO: clorofórmio; AE: acetato de etila; OH: hidroalcoólica.

Os resultados obtidos a partir do extrato aquoso das folhas de *Z. kleinii* indicam a presença de taninos condensáveis. Os outros testes realizados não mostraram reação positiva. Os resultados foram dispostos na TABELA 7.

TABELA 7 - RESULTADOS DOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS PRELIMINARES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS

Grupo fitoquímico	Testes	Fração aquosa das folhas
Heterosídeos antocianinico	Extração com álcool butílico	-
Heterosídeos saponinicos	Ensaio de espuma	-
Heterosídeos cianogênicos	Reação de Schoembein	-
Taninos condensáveis	Cloreto férrico	+

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: +: resultado positivo; -: resultado negativo

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE *Z. kleinii*

A partir de 328,1 g de material vegetal fresco, folhas, coletados durante o outono, foram obtidos 0,4 ml de óleo essencial. O rendimento obtido foi de 0,12%. O óleo apresentou cor amarelo claro, e aroma cítrico. O rendimento foi semelhante ao de outra espécie do gênero, as folhas de *Zanthoxylum armantum*, apresentaram um rendimento de 0,088% a 0,176% no trabalho realizado por Negi et al. (2012). No trabalho de Bhatt et al. (2017) o rendimento de óleo obtido das folhas de *Z. armatum* variou de 0,1% no inverno a 0,43% no verão. A espécie *Z. piperitum* DC. teve rendimento de 0,015% de óleo essencial obtido das partes aéreas (DONALD et al., 2016), inferior a *Z. kleinii*. Entretanto, há espécies que apresentam rendimentos mais elevados, como no caso das folhas de *Z. rhoifolium* que tiveram um rendimento de 0,57% de óleo essencial (GONZAGA et al., 2003).

Para o fruto, 71 g foram submetidos ao método de extração utilizando *clevenger*, e foi obtido 0,5 mL. O rendimento foi de aproximadamente 0,7%.

O gênero mostra que há bastante variação entre os rendimentos do óleo essencial obtidos do fruto de cada espécie, os frutos de *Z. acanthopodium* mostraram rendimento de 8,01% de óleo (SIBERO et al., 2020) e os frutos de *Z. rhoifolium* tiveram um rendimento de 1,5% (GONZAGA et al., 2003).

Conforme observado em alguns estudos a diferença de altitude, localização geográfica, maturidade das plantas, a estação em que foi realizada a extração e o estresse ambiental contribuem para diferentes rendimentos de óleo essencial extraído das espécies vegetais (BHATT et al., 2017; SILVEIRA et al., 2021; SIBERO et al., 2020).

#### 4.5.1 Compostos identificados no óleo essencial das folhas

Após a análise do óleo essencial em CG-MS, foram identificados 30 compostos, 63,9% dos constituintes foram identificados, os outros componentes do óleo não apresentaram quantidade suficiente para realizar a identificação.

Os principais componentes do óleo essencial das folhas de *Z. kleinii* pertencem a classe dos monoterpenos, sendo o  $\beta$ -felandreno (37,8%),  $\alpha$ -pineno (13,32%) e mirceno (10,05%). Os compostos encontram-se listados na TABELA 8.

A quantidade de (-)- $\beta$ -felandreno em óleos de casca de limão varia de 31% a 54%, 40-46% em óleo de lima e 24-37% em óleo de bergamota, mas tende a ser muito menor em tangerina (1-3%) ou óleos de laranja (~1%) (STEINBERG et al., 2017).

No óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum setulosum* P. Wilson o composto  $\beta$ -felandreno foi o constituinte majoritário (37,5%) seguido pelo  $\alpha$ -pineno (11,9%) (BOEHME et al., 2006).

Estudos mostram que os felandrenos ( $\alpha$ -felandreno e  $\beta$ -felandreno) são conhecidos pelas atividades anti-inflamatória, anti-hiperalgésica, antidepressiva e antifúngica (PICCINELLI et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

O composto  $\beta$ -felandreno foi o constituinte majoritário no óleo essencial obtido das partes aéreas totais de *Z. piperitum*, com rendimento de 29,39%, seguido pelo  $\alpha$ -pineno com rendimento de 9,75%, composição semelhante ao óleo obtido das partes aéreas de *Z. kleinii*. Esse estudo avaliou a atividade nociceptiva do óleo, nesse estudo foi constatado que há uma atividade antinociceptiva significativa e que o óleo tem potencial como analgésico (DONALD et al., 2016).

Em alguns estudos  $\beta$ -felandreno apresentou atividade seletiva contra acetilcolinesterase, com valor de IC 50 de 120,2  $\mu$ g/mL (BONESI et al., 2010). Também foi relatado que grandes quantidades de  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ - e O  $\beta$ -

felandreno nos óleos essenciais são responsáveis pelas atividades antioxidantes e antibacterianas (PHI et al., 2015).

Em *Z. rhetsa*, coletada no Vietna, o óleo essencial extraído das folhas frescas apresentou principalmente o sabineno (38,35%), terpinen-4-ol (13,71%),  $\gamma$ -Terpineno (6,47%). O  $\alpha$ -pineno (5,62%), o  $\beta$ -felandreno (2,5%) e o mirceno (2%) também foram identificados nas folhas porem em concentração inferiores a *Z. kleinii* (PHAM et al., 2021).

Na espécie *Z. armatum* coletadas durante o verão os componentes majoritários foram o 2-Undecanono (43%) e o  $\beta$ -felandreno (36,5%), a mesma espécie coletada no inverno, mostrou o 2-Undecanono (61,5%) como componente majoritário, seguido do  $\alpha$ -pineno (9,7%) e  $\beta$ -felandreno (7,2%) (BHATT et al., 2017).

Algumas espécies contam com sesquiterpenos como componentes majoritários em sua composição, como as folhas frescas de *Z. rhoifolium* espécie de qual o óleo mostrou germacreno-D (34%) e o biciclogermacreno (23%).

TABELA 8 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Z. kleinii* (CONTINUA)

ID	TR	AI	AI Referência	Nome do composto	Área relativa (%)	Classificação
001	5,23	924	924	$\alpha$ -Thujene	0,51	monoterpeno
002	5,435	932	932	$\alpha$ -Pinene	13,32	monoterpeno
003	5,865	948	946	Camphene	0,2	monoterpeno
004	6,46	970	969	Sabinene	7,04	monoterpeno
005	6,625	977	974	$\beta$ -Pinene	0,46	monoterpeno
006	6,9	987	988	Myrcene	10,05	monoterpeno
007	7,46	1006	1002	$\alpha$ -Phellandrene	0,62	monoterpeno
008	7,8	1016	1014	$\alpha$ -Terpinene	1,26	monoterpeno
009	8,2	1027	1024	Limonene	5,96	monoterpeno
010	8,26	1029	1025	$\beta$ -Phellandrene	37,8	monoterpeno
011	8,395	1033	1032	(Z)- $\beta$ -Ocimene	0,29	monoterpeno
012	8,755	1043	1044	(E)- $\beta$ -Ocimene	2,91	monoterpeno
013	9,195	1055	1054	$\gamma$ -Terpinene	1,93	monoterpeno
014	10,205	1084	1085	$p$ -Mentha-2,4(8)-diene	0,97	monoterpeno monoterpeno
015	10,74	1099	1095	Linalool	0,19	oxigenado
016	11,275	1112	-	NI, Baixa S/R	0,09	-
017	11,725	1123	1118	cis- $p$ -Menth-2-en-1-ol	0,33	monoterpeno oxigenado
018	12,435	1140	1136	trans- $p$ -Menth-2-en-1-ol	0,22	monoterpeno oxigenado

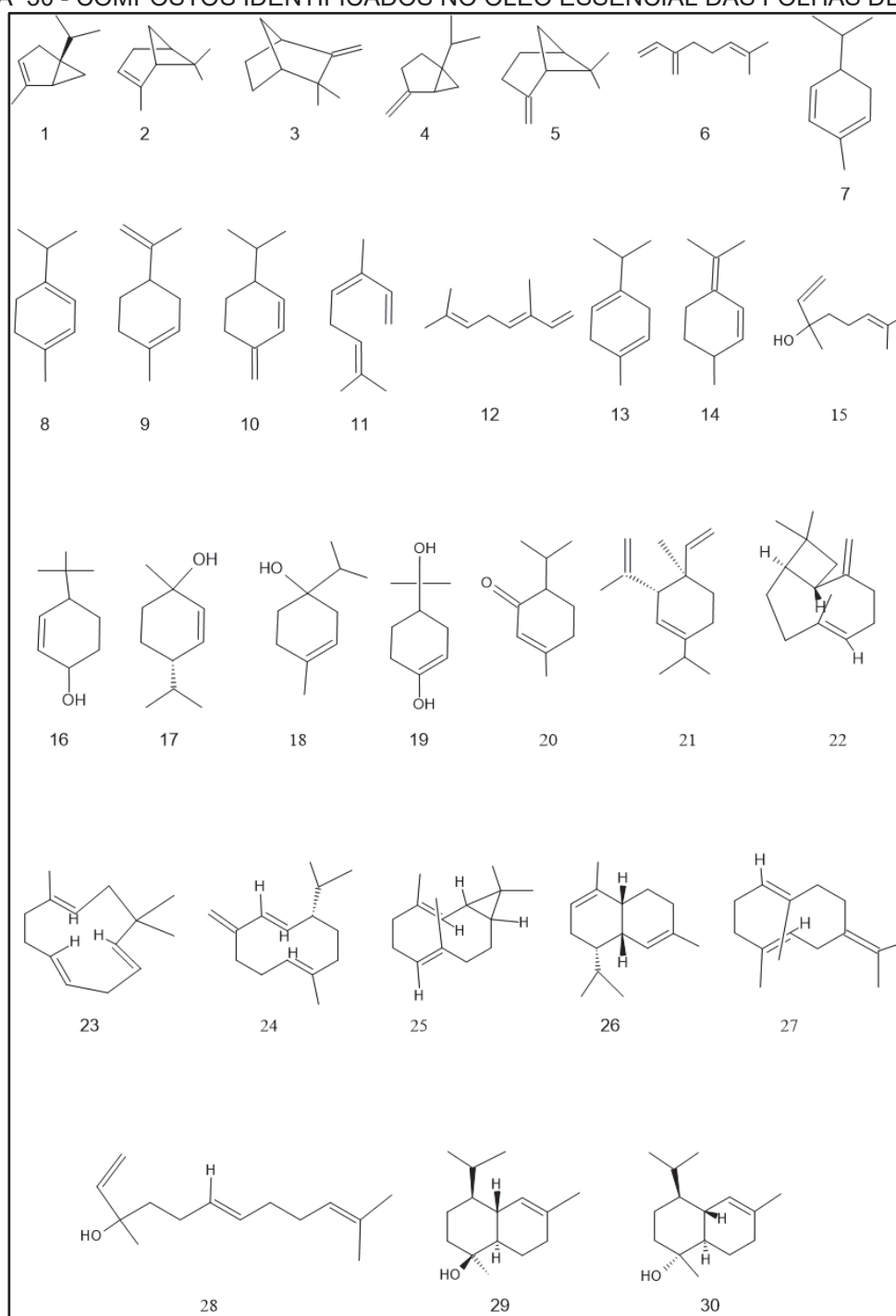
TABELA 8 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Z. kleinii* (CONCLUSÃO).

ID	TR	AI	AI Referência	Nome do composto	Área relativa (%)	Classificação
019	14,02	1178	1174	Terpinen-4-ol	2,88	monoterpeno oxigenado
020	14,63	1193	1186	$\alpha$ -Terpineol	0,21	monoterpeno oxigenado
021	15,215	1207	-	NI, Baixa S/R	0,1	-
022	17,09	1250	1249	Piperitone	0,14	monoterpeno oxigenado
023	19,565	1308	-	NI, Baixa S/R	0,17	-
024	20,595	1332	1335	$\delta$ -Elemene	0,61	sesquiterpeno
025	22,275	1372	-	NI, Baixa S/R	0,12	-
026	22,855	1386	-	NI, Baixa S/R	0,19	-
027	24,07	1415	1417	(E)-Caryophyllene	0,88	sesquiterpeno
028	24,49	1425	-	NI, B.E.I.	0,13	-
029	25,535	1451	1452	$\alpha$ -Humulene	0,34	sesquiterpeno
030	26,345	1470	-	NI, Baixa S/R	0,34	-
031	26,58	1476	1480	Germacrene D	4,25	sesquiterpeno
032	27	1486	-	NI, Baixa S/R	0,16	-
033	27,165	1490	1494	Bicyclogermacrene	2,09	sesquiterpeno
034	27,305	1494	-	NI, Baixa S/R	0,12	-
035	27,5	1499	-	NI, Baixa S/R	0,1	-
036	27,635	1502	-	NI, Baixa S/R	0,11	-
037	27,89	1508	-	NI, Baixa S/R	0,08	-
038	28,11	1514	1511	$\delta$ -Amorphene	0,51	sesquiterpeno
039	29,626	1553	1559	Germacrene B	0,28	sesquiterpeno sesquiterpeno
040	29,85	1558	1561	(E)-Nerolidol	0,32	oxigenado
041	30,34	1571	-	NI, Baixa S/R	0,23	-
042	30,68	1580	-	NI, Baixa S/R	0,17	-
043	31,015	1588	-	NI, Baixa S/R	0,16	-
044	31,39	1598	-	NI, Baixa S/R	0,12	-
045	32,3	1622	-	NI, Baixa S/R	0,22	-
046	32,85	1637	1638	epi- $\alpha$ -Cadinol	0,49	sesquiterpeno oxigenado
047	33,335	1650	1652	$\alpha$ -Cadinol	0,33	sesquiterpeno oxigenado

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: ID: número do composto; TR: tempo de retenção; AI: NI: não identificado; S/R: sinal/ruído.

As estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial das folhas foram ilustradas na FIGURA 30.

FIGURA 30 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Z. kleinii*

Fonte: A autora (2023).

Legenda: 1:  $\alpha$ -Thujene; 2:  $\alpha$ -Pinene; 3: Camphene; 4: Sabinene; 5:  $\beta$ -Pinene; 6: Myrcene; 7:  $\alpha$ -Phellandrene; 8:  $\alpha$ -Terpinene; 9: Limonene; 10:  $\beta$ -Phellandrene; 11: (Z)- $\beta$ -Ocimene; 12: (E)- $\beta$ -Ocimene; 13:  $\gamma$ -Terpinene; 14: p-Mentha-2,4(8)-diene; 15: Linalool; 16: cis-p-Menth-2-en-1-ol; 17: trans-p-Menth-2-en-1-ol; 18: Terpinen-4-ol; 19:  $\alpha$ -Terpineol; 20: Piperitone; 21:  $\delta$ -Elemene; 22: (E)-Caryophyllene; 23:  $\alpha$ -Humulene; 24: Germacrene D; 25: Bicyclogermacrene; 26:  $\delta$ -Amorphene; 27: Germacrene B; 28: (E)-Nerolidol; 29: epi- $\alpha$ -Cadinol; 30:  $\alpha$ -Cadinol.

Nota: Estrutura desenhada com auxílio do software ACD/ChemSketch®

#### 4.5.2 Compostos identificados nos frutos de *Z. kleinii* (R.S. Cowan) P.G. Waterman

Os frutos de *Z. kleinii* apresentaram 90 compostos, inicialmente foram identificados os componentes majoritários, sendo os três monoterpenos, o limoneno (20,16%), o *o*-cimeno (13,48%) e o terpinen-4-ol (10,77%), o resultado foi confirmado pelo índice de retenção e por similaridade.

Quando analisamos os componentes de outras espécies do gênero podemos observar que diversos compostos majoritários foram obtidos. Nos frutos frescos de *Z. rhetsa* 23 componentes foram identificados, sendo que os principais foram sabineno (41,13%), terpinoleno (27,05%) e limoneno (7,30%) (PHAM et al., 2021). No estudo de Naik et al. (2015) o óleo essencial obtido das sementes de *Z. rhetsa* teve como constituinte principal o terpinen-4-ol (32,1%), semelhante a *Z. kleinii*, seguido do  $\alpha$ -terpineol (8,2%), sabineno (8,1%)  $\beta$ -felandreno (7,4%). O composto limoneno foi identificado como majoritário no óleo essencial obtido dos frutos de *Z. limonella* (57,94%) (WONGKATTIYA et al., 2018) e no óleo essencial dos frutos de *Zanthoxylum avicenna* (Lam.) DC. (41,2%) (TRUNG et al., 2016).

Os dois monoterpenos mais abundantes na natureza são os enantiômeros do limoneno. O S-(-)-limoneno é principalmente encontrado em ervas como *Mentha* spp, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2007).

No estudo de Piccinelli et al. (2014) o limoneno inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica. Em um levantamento realizado por Vieira et al. (2018) foi constatado que o limoneno apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e antinociceptiva.

O óleo volátil obtido do pericarpo de *Z. schinifolium* foi capaz de suprimir a proliferação do fungo *Aspergillus flavus*, seus constituintes majoritários foram linalol (50,31%), D-limoneno (20,92%) e  $\beta$ -felandreno (13,75%) (LI et al., 2022).

O óleo das sementes de *Z. armatum* apresentaram um odor pungente e desagradável, conta com compostos tóxicos em sua composição como a piperitona, (Z)-mirtanol e citronelal (AHMAD et al., 2022).

As diferenças encontradas nas mesmas espécies podem ser influenciadas pelo tempo de destilação, condições geográficas e ambientais, o modo como a planta é cultivada (GROOT; SCHIMIDT, 2016; NAIK et al., 2015; YAIPHAREMBI et al., 2022).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FOLHAS E GALHOS E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES

O rendimento do extrato bruto das folhas e do extrato bruto do galho de *Z. kleinii* foi calculado a partir do teor de sólidos de cada extrato. O teor de sólidos para o extrato das folhas foi de  $0,0722 \pm 0,001$  g/mL, e  $0,0412 \pm 0,0007$  g/mL.

O rendimento de cada fração está relacionado na TABELA 9. O cálculo foi realizado comparando a quantidade obtida de cada fração em relação ao material vegetal total seco e triturado

TABELA 9 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E DOS GALHOS E DOS EXTRATOS DOS FRUTOS

Fração	Folhas (%)	Galhos (%)	Frutos (%)
Hexano	2,83	0,52	0,52
Clorofórmio	1,40	0,87	0,45
Acetato de etila	0,17	0,34	0,24
Remanescente	3,62	2,69	-
Hidroalcoólica	-	-	0,50

FONTE: A autora (2023).

De acordo com os dados demonstrados na TABELA 9, as frações que apresentaram maior rendimento são a fração hexano das folhas (2,83%), fração remanescente das folhas (3,62%) e dos galhos (2,69%).

O extrato das folhas de *Z. armatum* realizado com hexano teve um rendimento de 4,80%, com clorofórmio teve um rendimento de 6,10% (IBRAR et al., 2017), valores superiores ao obtido pra *Z. kleinii*.

O extrato hidroalcoólico do fruto de *Z. schinifolium* foi extraído com etanol 70% por 3 dias e apresentou rendimento de aproximadamente 11% (KIM et al., 2021). Os frutos de *Z. armatum* tiveram um rendimento de 10,8% quando extraído com etanol, 9,40% quando extraído com hexano, 6,10% quando extraídos com clorofórmio (IBRAR et al., 2017).

#### 4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CCD

Para avaliação por CCD, foram utilizadas amostras de extratos brutos de folhas e galho, suas respectivas frações, as frações dos frutos e as amostras de polissacarídeo. Os resultados são exibidos na TABELA 10.

TABELA 10 - RESULTADO DA CCD REALIZADA PARA EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS, GALHO E FRUTO, E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES

Metabólitos	EBF	FHF	FCF	FAEF	FRF	EBG	FHG	FCG
<b>Esteroides e triterpenos</b>	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>Alcaloides</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>	+	-	+	+	+	+	-	+
<b>Cumarinas</b>	+	+	+	-	-	+	+	+
<b>Taninos</b>	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>Antraquinonas</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabólitos	FAEG	FRG	FHF <sub>r</sub>	FCF <sub>r</sub>	FAEF <sub>r</sub>	FOHF <sub>r</sub>	PQ	PF
<b>Esteroides e triterpenos</b>	-	-	+	+	-	-	NR	NR
<b>Alcaloides</b>	-	+	-	+	+	-	NR	NR
<b>Flavonoides</b>	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>Cumarinas</b>	-	-	-	+	+	-	+	-
<b>Taninos</b>	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Antraquinonas</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: + = Resultado positivo; - = resultado negativo; NR: não realizado; EBF: extrato bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAEF: fração acetato de etila das folhas; FRF: fração remanescente das folhas; EBG: extrato bruto dos galhos; FHG: fração hexano dos galhos; FCG: fração clorofórmio dos galhos; FAEG: fração acetato de etila dos galhos; FRG: fração remanescente dos galhos; FHF<sub>r</sub>: fração hexano dos frutos; FCF<sub>r</sub>: fração clorofórmio dos frutos; FAEF<sub>r</sub>: fração acetato de etila dos frutos; FOHF<sub>r</sub>: fração hidroalcolica dos frutos; PQ: polissacarídeo extraído a quente; PF: polissacarídeo extraído a frio.

Os resultados obtidos para folhas utilizando a técnica de CCD apresentaram os mesmos resultados quando avaliados pela marcha fitoquímica.

De acordo com os resultados da pesquisa fitoquímica por CCD, pode ser observado que tanto as folhas quanto os galhos e os frutos apresentaram resultados positivos para os grupos esteroides e triterpenos, flavonoides, cumarinas e taninos. O resultado para antraquinona foi negativo em todas as frações pesquisadas. E alcaloides apresentou resultado positivo apenas na fração de galhos e frutos.

Outras espécies do gênero também contam com a presença desses metabólitos, nas folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba* foram detectados triterpenos, antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos e cumarinas utilizando CCD (SILVA et al., 2020), também não foi relatada a presença de alcaloides. Contudo, na espécie *Z. armatum* foi identificado alcaloide nas folhas, mas em menor

concentração que nos galhos e frutos, essa espécie conta ainda com a presença de saponinas nas folhas (IBRAR et al., 2017) o que a diferencia de *Z. kleinii*.

Na espécie *Z. nitidum* foram identificados mais de 70 alcaloides em raiz, ou casca de raiz. Cumarinas, flavonoides e terpenos também foram isolados de raiz (LU et al., 2020).

Os frutos de *Zanthoxylum acanthopodium* apresentaram resultado positivo para pesquisa de alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides/triterpenos, cumarinas e saponinas na fração hidroalcolica (FARIDA et al., 2020), enquanto *Z. kleinii* mostrou-se positivo apenas para flavonoides nessa fração. Na fração acetato de etila os frutos de *Z. acanthopodium* não mostrou resultado positivo para taninos (FARIDA et al., 2020) diferente de *Z. kleinii*. Na fração de n-hexano os frutos de *Z. acanthopodium* são positivos para esteroides e óleos essenciais (FARIDA et al., 2020) semelhante ao resultado obtido para os frutos de *Z. kleinii*.

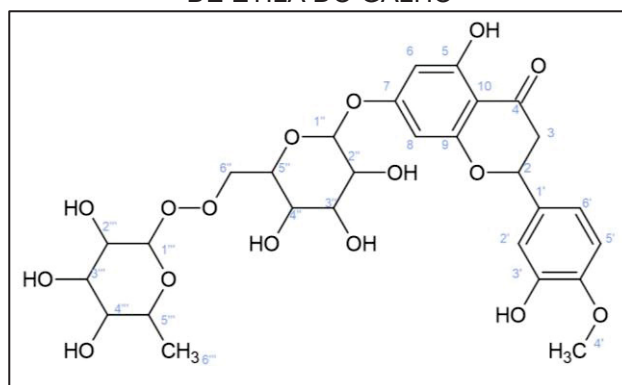
#### 4.8 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTO QUÍMICO

O precipitado formado durante a partição do galho da espécie *Z. kleinii*, no solvente clorofórmio, apresentou na CCD reação positiva para flavonoides e taninos, entretanto não foi identificado devido a insuficiência de material para realizar o RMN.

O composto PBAE foi visualizado enquanto era realizava o fracionamento do extrato bruto dos galhos, percebeu-se que na fração acetato de etila formou um precipitado branco. Esse precipitado foi então separado do solvente acetato de etila. Após secar em temperatura ambiente, o precipitado foi lavado com hexano, para remoção de impurezas, em seguida, foram feitos alguns testes para caracterização do material. A CCD mostrou presença de flavonoides, o RMN e o FTIR mostraram bandas características do flavonoide hesperidina.

A partir de 0,882 kg de galhos, secos e triturados, foram obtidos 20,0 mg de hesperidina (FIGURA 31 e 32). Resultando em um rendimento de 0,002%.

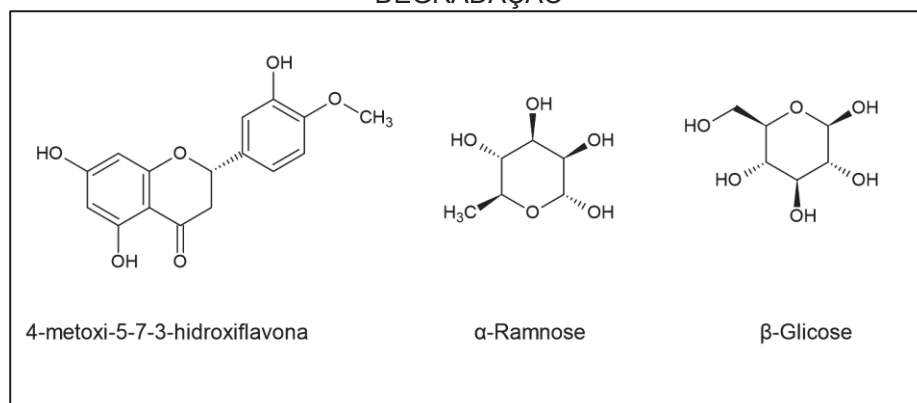
FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DA HESPERIDINA, IDENTIFICADA NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO GALHO



FONTE: A autora (2023).

Nota: Estrutura desenhada com auxílio do software ACD/ChemSketch®

FIGURA 32 - HESPERIDINA NA SUA FORMA AGLICONA E SEUS COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO

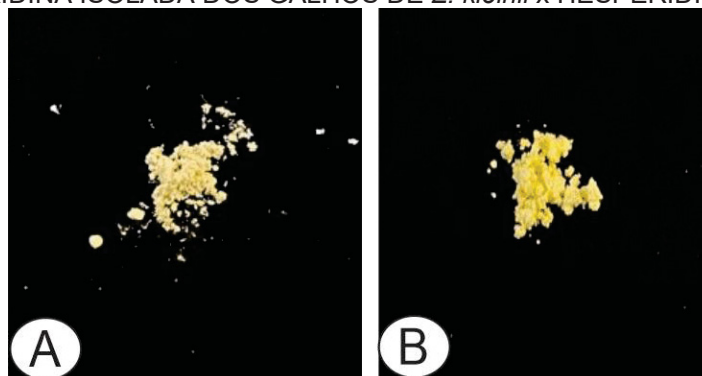


FONTE: A autora (2023).

Nota: Estruturas desenhadas com auxílio do software ACD/ChemSketch®

Na FIGURA 33 foram feitas duas fotos, comparando o composto isolado dos galhos de *Z. kleinii* e uma amostra comercial de hesperidina.

FIGURA 33 - HESPERIDINA ISOLADA DOS GALHOS DE *Z. kleinii* x HESPERIDINA COMERCIAL

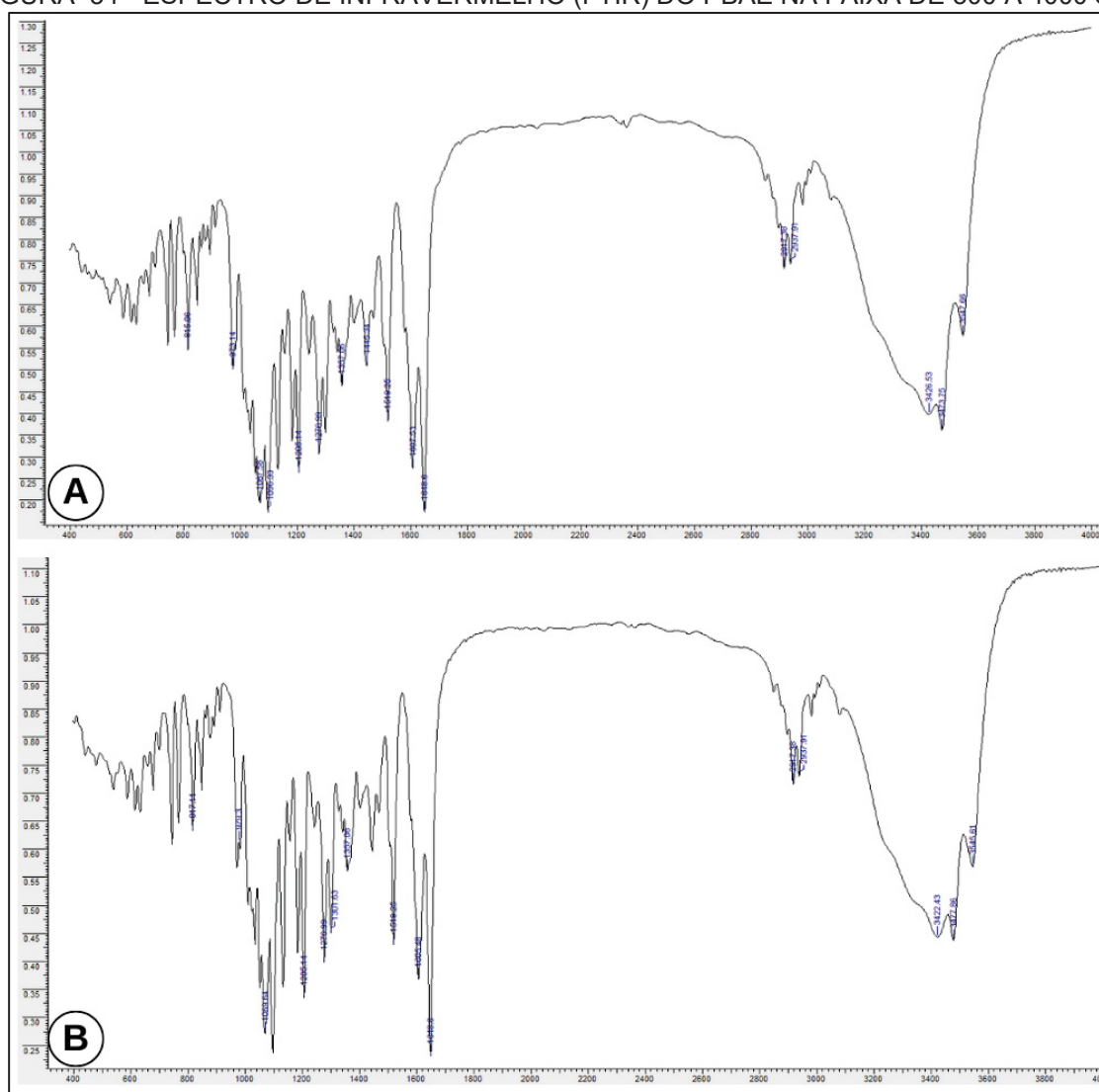


FONTE: A autora (2023).

Para identificação da hesperidina aproximadamente 2 mg foram levados ao infravermelho (FTIR), e foi obtido um espectro de infravermelho da amostra (FIGURA 34), o espectro apresentou fortes bandas de estiramento de OH em 3544 e 3470  $\text{cm}^{-1}$ , de CH (alifático) em 2970  $\text{cm}^{-1}$ , de C=C (aromático) em 1606, 1520, e 1446  $\text{cm}^{-1}$ , de C=O (aldoses e cetoses) em 1646  $\text{cm}^{-1}$ , além de estiramentos de C-O em 1300, 1277, 1240, 1204, 1183, 1154, 1132, 1094, 1051, 1035  $\text{cm}^{-1}$ .

Estas bandas coincidem com as bandas encontradas em um espectro teórico tido como referência (CYPRIANO et al., 2017).

FIGURA 34 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (FTIR) DO PBAE NA FAIXA DE 500 A 4000  $\text{cm}^{-1}$



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: A: padrão comercial da hesperidina; B: isolado dos galhos da espécie *Z. kleinii*

Na TABELA 11 são apresentados os deslocamentos de  $^1\text{H}$  experimental e teórico, e  $^{13}\text{C}$  experimental e teórico. Nas FIGURAS 35 e 35 são demonstrados os

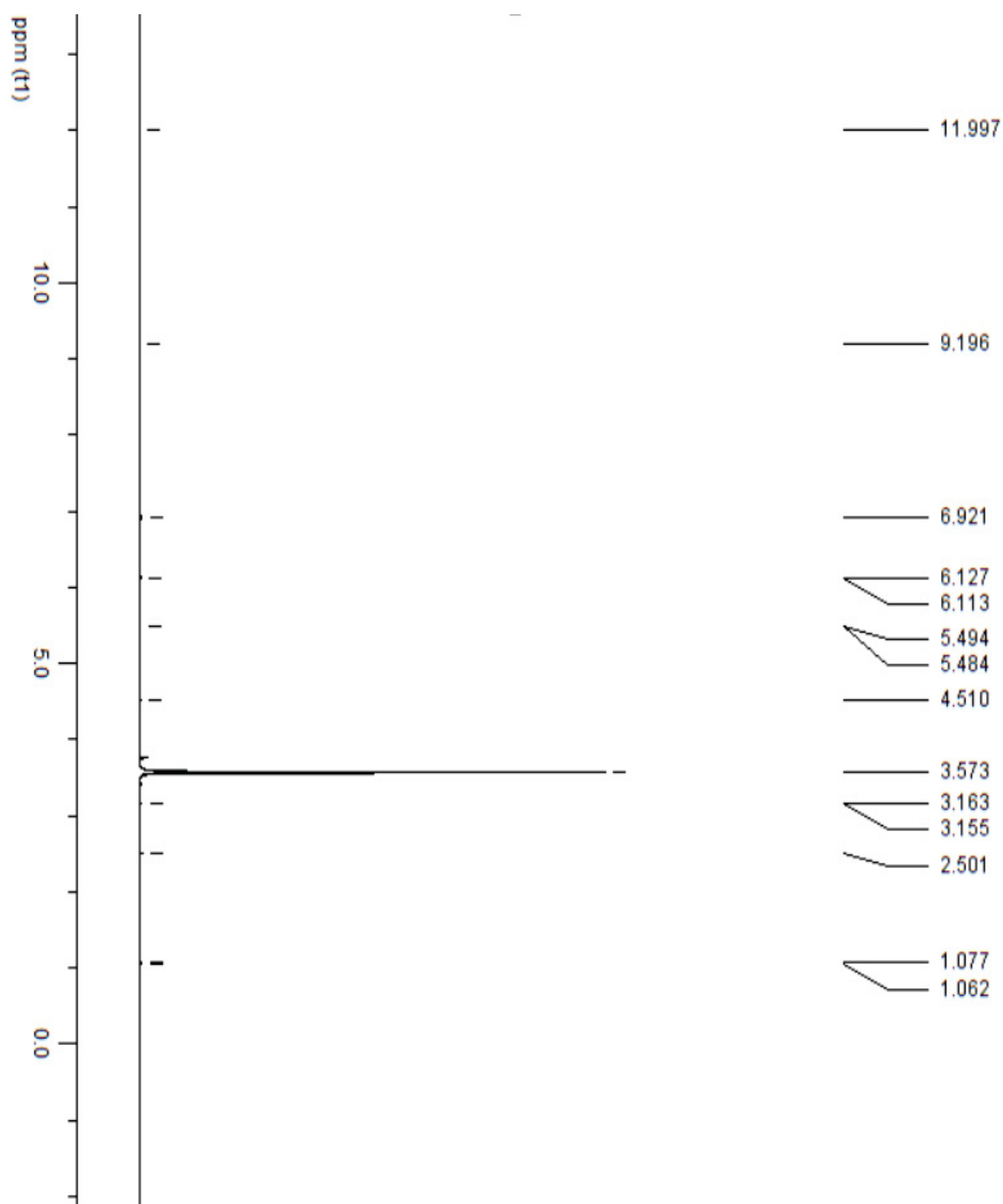
deslocamentos de  $^1\text{H}$  da amostra. Nas FIGURAS 36 á 40 são demonstrados os deslocamentos do  $^{13}\text{C}$  da amostra.

TABELA 11 - DESLOCAMENTO QUÍMICO DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO PBAE EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA HESPERIDINA

Posição	RMN de $^1\text{H}$ experimental	RMN de $^1\text{H}$ Teórico*	RMN de $^{13}\text{C}$ experimental	RMN de $^{13}\text{C}$ Teórico*
2	5,494 dd	5.50 dd	78,275	78,12
3			41,958	42,02
4			196,916	197,3
5	11,997 s	12.01 s	162,941	163,4
6	2,127 d	6,12 d	96270	96,62
7			165,039	165,4
8			95,434	95,79
9			162,941	162,8
10			103,210	103,6
1'			130,798	131,4
2'	6,921 m	6,91 m	114,043	114,5
3'	9,196 s	9,12 s	146,361	147,7
4'	3,757 s	3,77 s	147,857	148,2
5'	6,921 m	6,91 m	111,927	112,3
6'	6,921 m	6,91 m	117,833	118,2
1''	4,959 d	4,97 d	99,344	99,65
2''			71,966	72,98
3''			75,420	75,74
4''			70,165	70,25
5''			75,420	75,30
6''			65,932	65,69
1'''	4,510 s	4,53 s	100,506	100,9
2'''			70,165	69,95
3'''			70,599	69,32
4'''			71,966	71,83
5'''			68,211	68,11
6'''	1,083 d	1,08 d	17,731	18,11

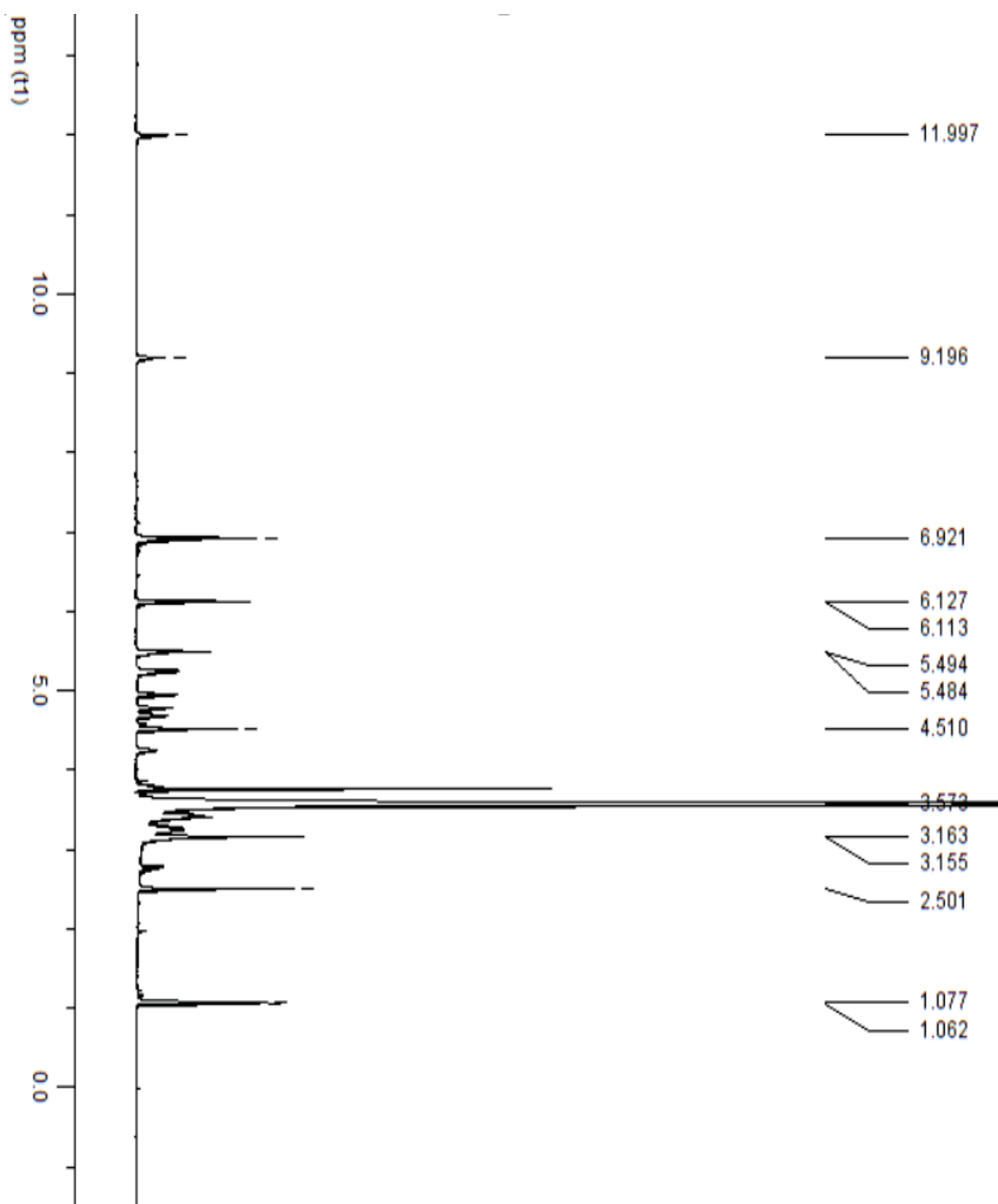
FONTE: A autora (2023).

NOTAS: \*NIZAMUTDINOVA et al. (2008). Os valores foram dados em ppm em relação ao sinal de TMS utilizado como padrão interno. Sinais: sl=simpleto; d=dubleteo; dd=duplodubleteo; m=multiplato.

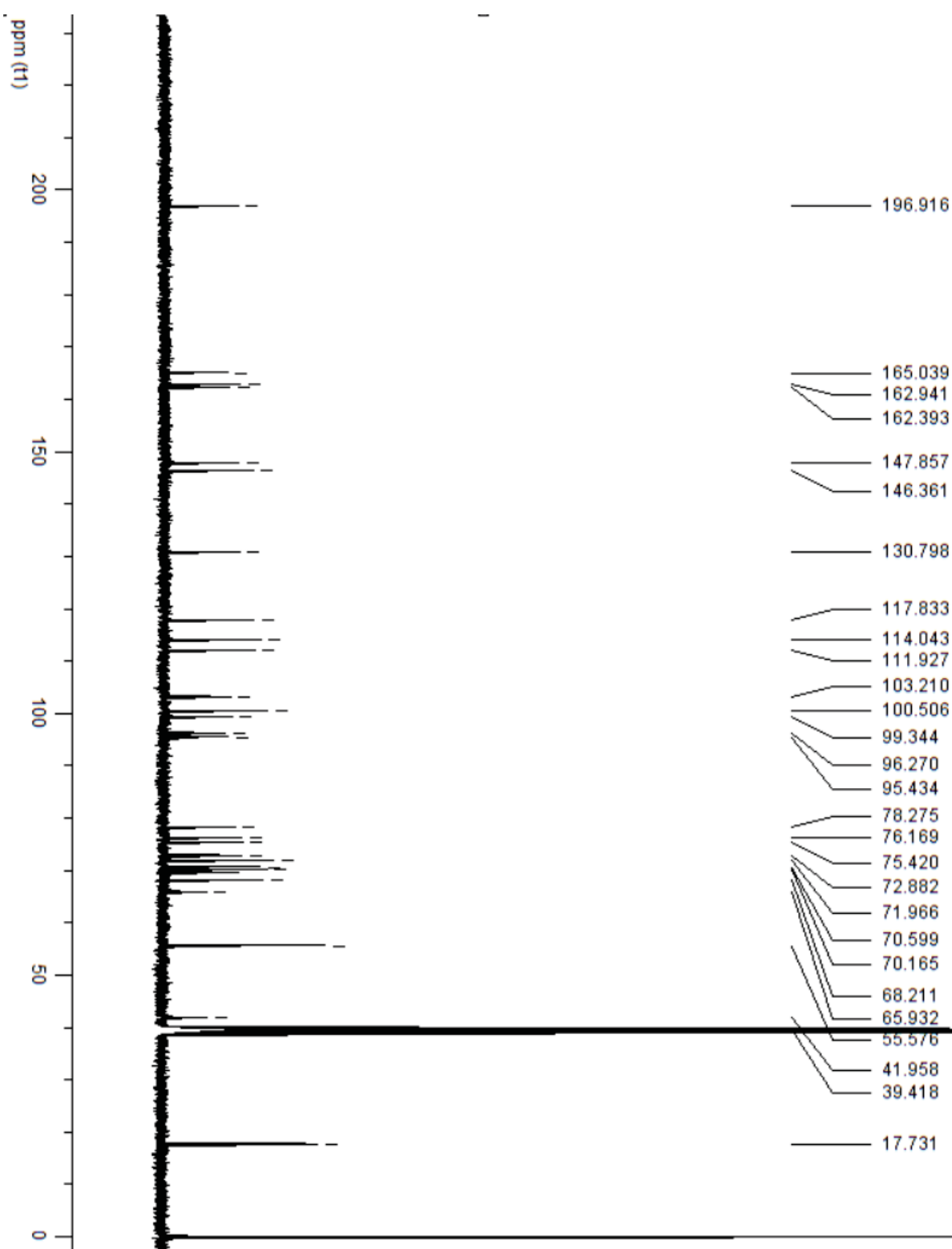
FIGURA 35 – ESPECTRO TOTAL DE  $^1\text{H}$  DO PBAE EM DMSO, JANELA DE 0 PPM À 12 PPM.

FONTE: A autora (2023).

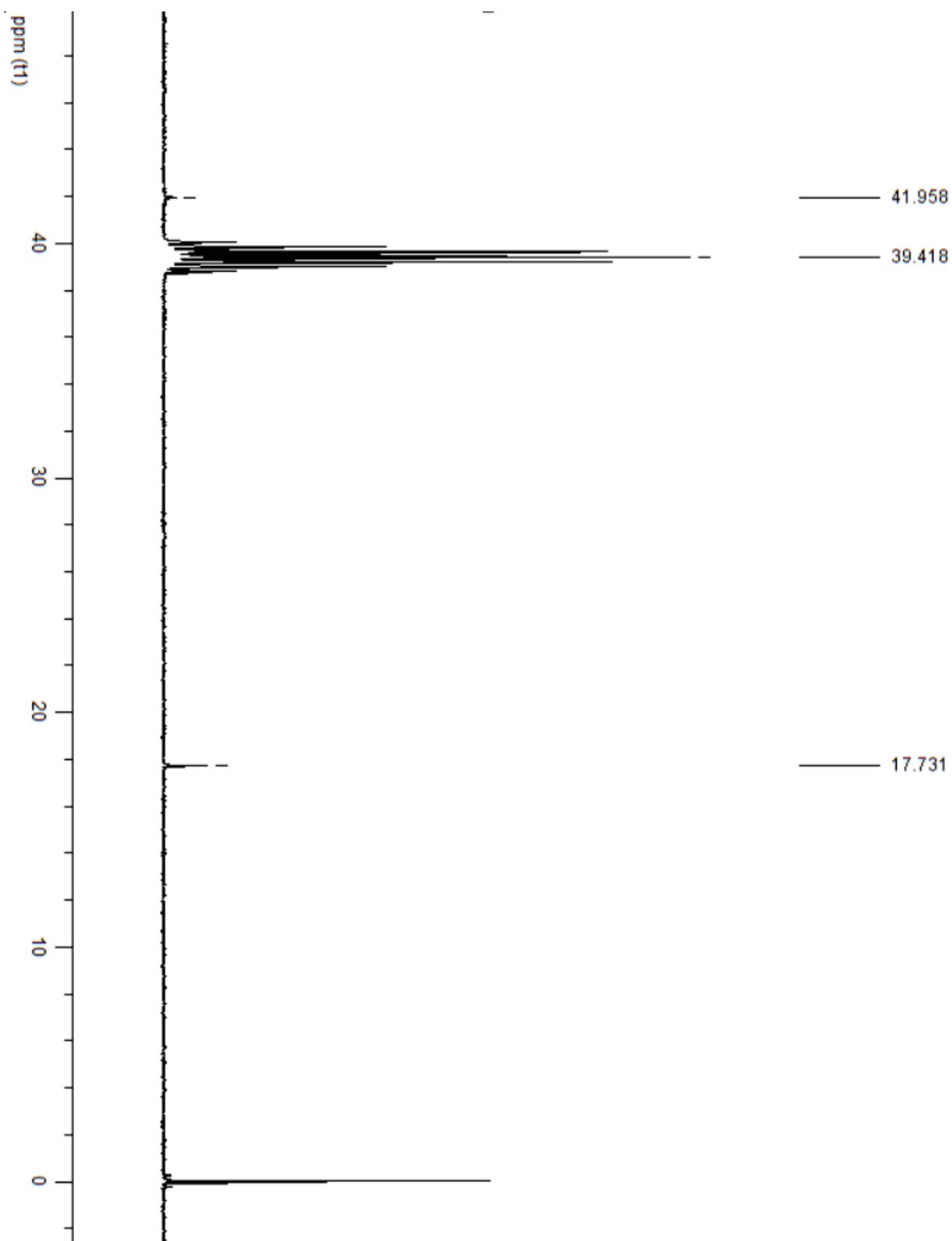
FIGURA 36 - ESPECTRO TOTAL DE  $^1\text{H}$  DO PBAE EM DMSO COM AMPLIAÇÃO DOS SINAIS, JANELA DE 0 PPM À 12 PPM



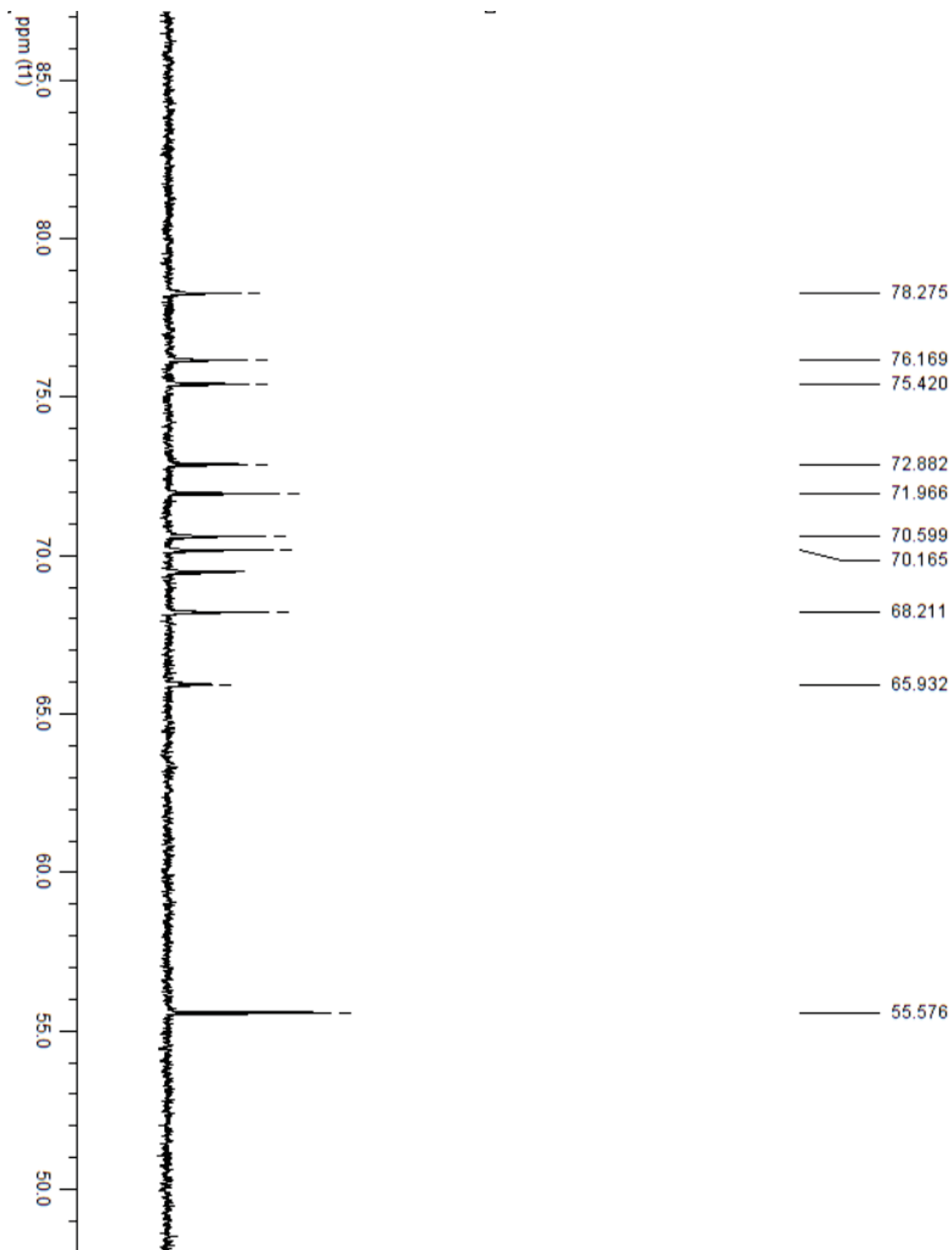
FONTE: A autora (2023).

FIGURA 37 - ESPECTRO TOTAL DE  $^{13}\text{C}$  DO PBAE EM DMSO, JANELA DE 0 Á 200 PPM

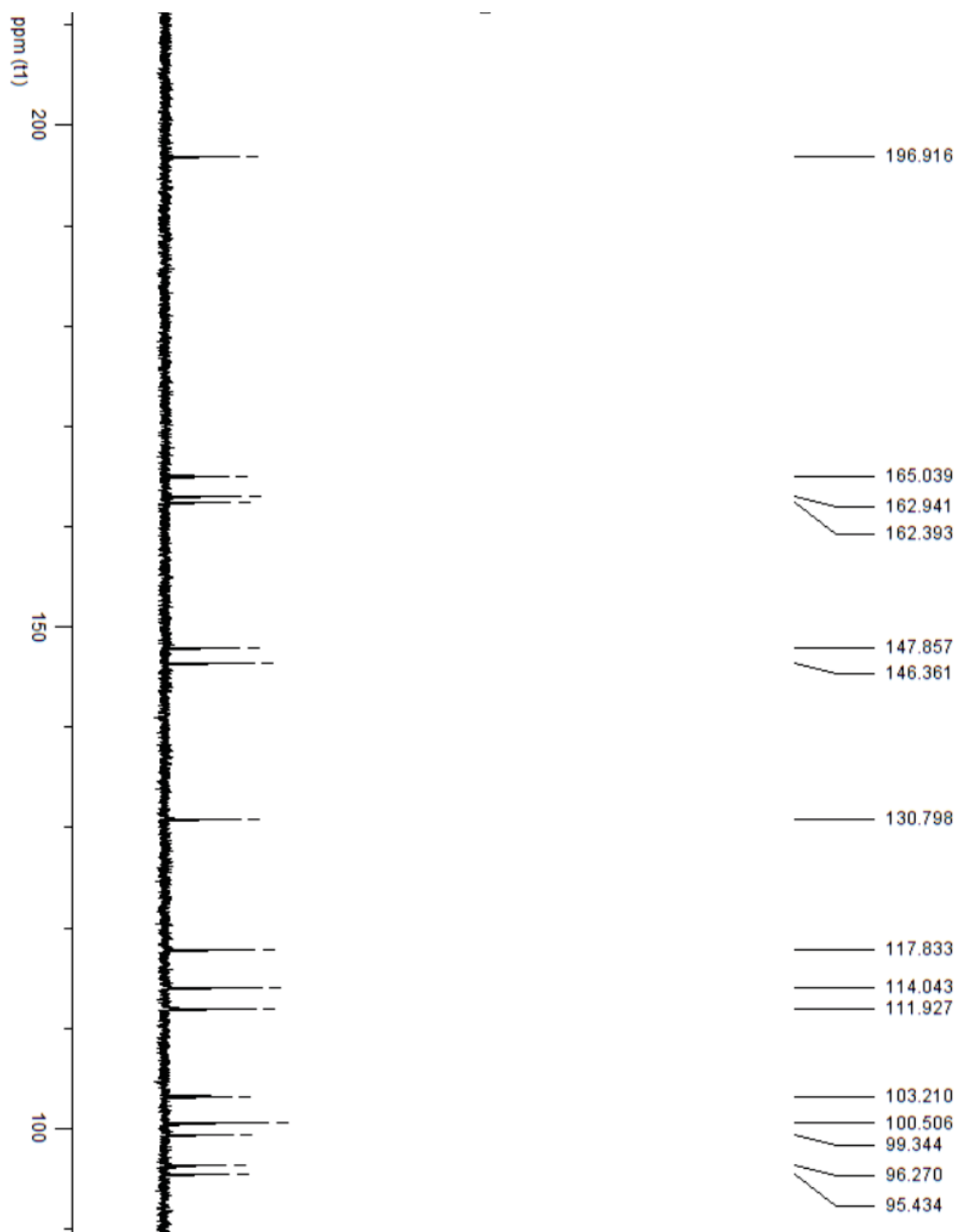
FONTE: A autora (2023).

FIGURA 38 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  DO PBAE EM DMSO, DE 0 Á 40 PPM

FONTE: A autora (2023).

FIGURA 39 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  DO PBAE EM DMSO, DE 50 Á 85 PPM

FONTE: A autora (2023).

FIGURA 40 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  DO PBAE EM DMSO, DE 90 Á 200 PPM

FONTE: A autora (2023).

A hesperidina foi identificada em outras espécies do gênero, em *Z. nitidum* foi isolada do extrato de éter de petróleo da casca do caule (LU et al., 2020), em *Z. rhetsa* foi identificado na fração acetato de etila da casca (KUMAR SANTHANAM et al., 2017), em *Z. zanthoxyloides* foi identificado em extrato de diclorometano da casca do caule e casca da raiz (GOODMAN et al., 2019), em *Zanthoxylum rigidum* a hesperidina foi isolada no extrato metanólico feito a partir da casca da raiz (MOCCELINI et al., 2009). Em sua pesquisa, Tine et al. (2017) isolou 732,4 mg de hesperidina no galho de *Z. Zhanthoxyloides*, quantidade 30 vezes maior que o encontrado em *Z. kleinii*, entretanto, em seu estudo Tine et al. (2017) utilizou metanol para fazer a extração dos metabólitos.

A hesperidina tem ação antioxidante, pode reduzir a radicais livres de oxigênio, aumentar a resistência capilar, além disso possui propriedades analgésicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias (CERDAN, 2013; HAJIALYANI et al., 2019). Esse composto foi relatado em outras espécies da família Rutaceae, principalmente no gênero *Citrus*. Devido a sua relevância para a indústria farmacêutica, novos métodos de extração vêm sendo avaliados.

Um estudo realizado por Phucharoenrak et al. (2022) determinou qual foi o rendimento de hesperidina obtido das cascas de limão utilizando um método de extração verde e variando as condições de extração pH, temperatura, concentração de etanol. A condição que teve maior rendimento de hesperidina foi a extração com etanol 80% em pH 7 e 50°C, quando foi obtido 3,35 mg/g de casca seca de limão. Enquanto *Z. kleinii* teve um resultado de 0,023 mg/g de galhos, ou seja, 140 vezes menor.

Em um trabalho com cascas de laranja, foram obtidos 0,180 mg/g de laranjas, utilizando 100% de metanol para fazer a extração (FENG et al., 2020). Resultado quase 8 vezes maior que para os galhos da espécie *Z. kleinii*.

Realizando algumas alterações nas condições do experimento com galhos de *Z. kleinii* o rendimento de hesperidina encontrada nos galhos de *Z. kleinii* pode ser maior.

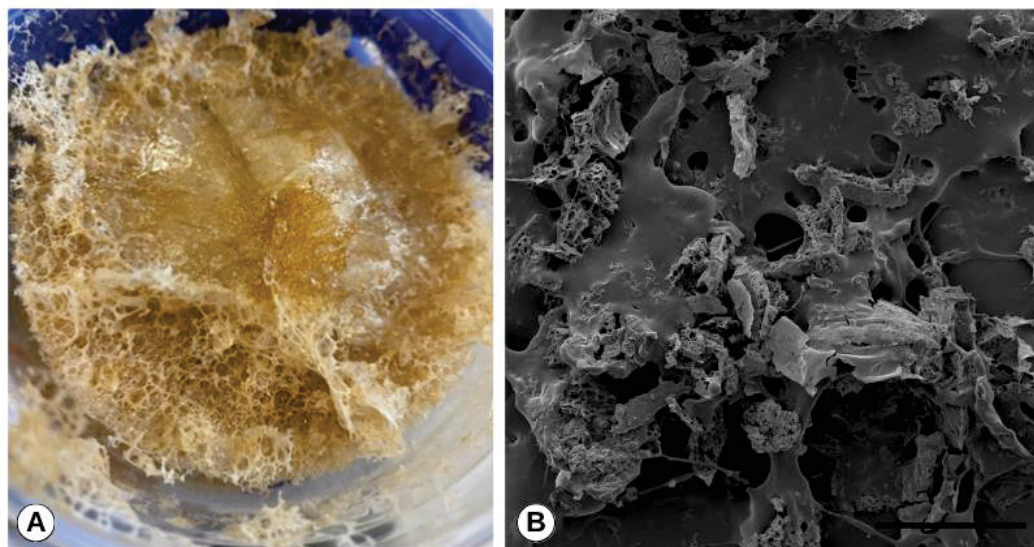
#### 4.9 POLISSACARÍDEO

Após realizar a extração do polissacarídeo das folhas de *Z. kleinii* este foi liofilizado e armazenado para posterior análises. O rendimento após realizar

extração a quente foi de 18,83% e 14,06% quando feito a extração a frio. O polissacarídeo liofilizado pode ser observado na FIGURA 41A, e a imagem de microscopia eletrônica de varredura esta demonstrada na FIGURA 41B.

O polissacarídeo utilizado nesse estudo é bruto, sem purificação e separação de seus constituintes.

FIGURA 41 - AMOSTRA DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *Z. kleinii*



Fonte: A autora (2023).

LEGENDA: A: polissacarídeo após liofilização; B: imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de polissacarídeo. Barra de escala: 500  $\mu\text{m}$ .

#### 4.9.1 Espectro EDS do polissacarídeo

O espectro EDS foi realizado com uma amostra de polissacarídeo extraído a quente. Quando observamos as FIGURAS 41B e a 42 é possível verificar uma diferença de cores na amostra de polissacarídeo o que sugere uma composição heterogênea.

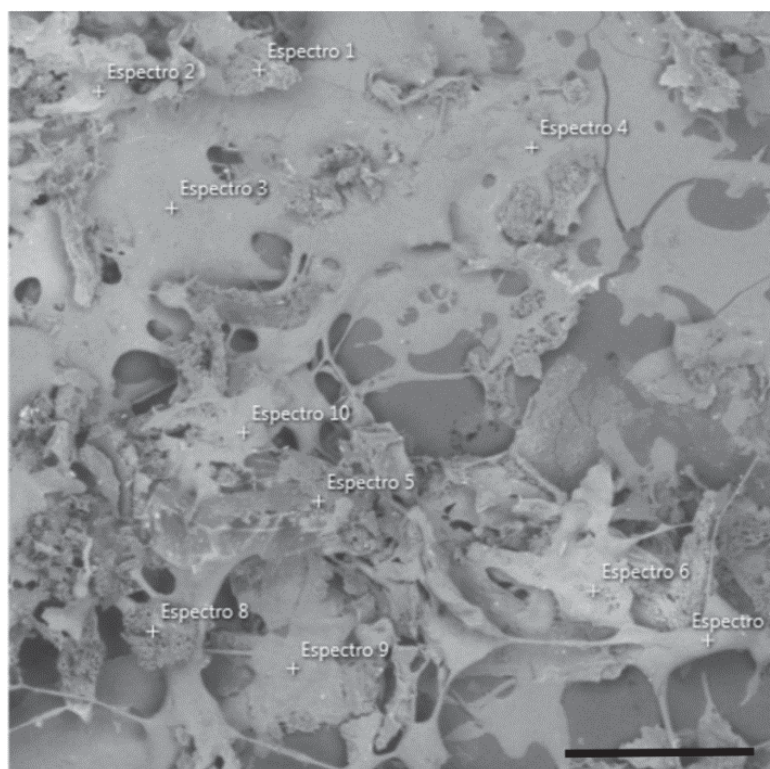
A amostra de polissacarídeo foi levada até a CME-UFPR onde foi realizada a foto em MEV (FIGURA 42) e obtido os espectros EDS (apêndice 4, 5, 6, 7 e 8) em diversos pontos da amostra. A amostra avaliada estava liofilizada homogeneizada antes de ser analisada.

Para obter os espectros EDS, a amostra foi colocada em uma fita adesiva, qual fica sobre um 'STUB' (estrutura metálica que é utilizada como suporte para

amostras, é colocado no microscópio eletrônico de varredura) e não foi revestida com nenhum tipo de material antes da obtenção dos espectros.

Para a amostra polissacarídeo, foram obtidos dez espectros EDS (apêndice 4, 5, 6, 7, 8) devido sua heterogeneidade.

FIGURA 42 - IMAGEM DE MEV DO POLISSACARÍDEO DE *Z. kleinii* E PONTOS DE OBTENÇÃO DE ESPECTROS EDS



FONTE: CME-UFPR (2023).  
NOTA: Barra de escala 500 µm.

Após avaliação dos espectros, os resultados da composição elementar foram organizados na TABELA 12. Como pode-se observar cada área do polissacarídeo avaliada teve uma composição elementar distinta. O elemento carbono foi o mais abundante em quase todas as avaliações, seguido do oxigênio, cálcio, cloro, magnésio, enxofre, fósforo, ferro, alumínio e silício.

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE DIVERSOS PONTOS NA AMOSTRA DE POLISSACARÍDEO DE *Z. kleinii*

	C (%)	O (%)	Ca (%)	Cl (%)	Mg (%)	S (%)	P (%)	Fe (%)	Al (%)	Si (%)
ESPECTRO 1	40,3	43,5	1,1	-	-	-	0,3	10,5	1,5	0,8
ESPECTRO 2	51,0	36,7	3,9	1,4	-	-	-	-	-	-
ESPECTRO 3	55,8	32,6	3,1	1,5	0,9	0,6	0,3	-	-	-
ESPECTRO 4	53,3	31,7	5,3	2,0	1,0	0,8	0,4	-	-	-
ESPECTRO 5	68,2	27,7	1,1	0,5	0,3	0,6	-	-	-	-
ESPECTRO 6	59,6	36,9	1,3	0,4	0,6	-	-	-	-	-
ESPECTRO 7	60,0	35,0	1,4	0,5	0,7	0,3	-	-	-	-
ESPECTRO 8	66,4	31,1	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-
ESPECTRO 9	58,4	27,6	5,6	1,6	-	0,6	-	-	-	-
ESPECTRO 10	58,8	37,5	0,9	0,4	0,6	0,2	-	-	-	-

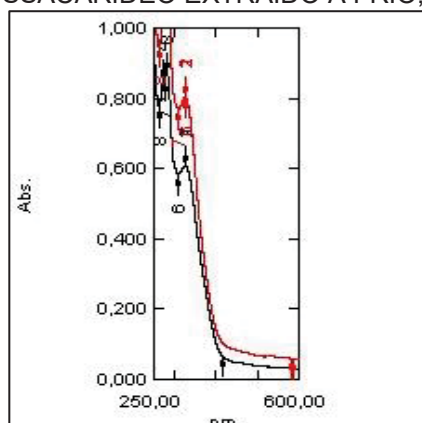
FONTE: A autora (2023).

#### 4.9.2 Varredura UV-Vis e FPS de amostra de polissacarídeo

As amostras de polissacarídeo extraído a quente (PQ) e polissacarídeo extraído a frio (PF) foram submetidas a espectrometria UV-Vis, na faixa de 250 a 600 nm, para determinar o comprimento de onda ótimo de leitura. O máximo de absorbância para essas amostras foi entre 250 e 350 nm aproximadamente.

Foi possível observar que as duas amostras apresentaram diferenças no perfil espectral (FIGURA 43).

FIGURA 43 - VARREDURA UV-Vis DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A QUENTE E POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A FRIO, DE 250 A 600 nm



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: a linha em preto representa o polissacarídeo extraído a quente; A linha vermelha representa o polissacarídeo extraído a frio.

Após a realização da varredura em UV-Vis foram selecionadas algumas absorvâncias em comprimentos de onda específicos (TABELA 13) para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de acordo com a técnica proposta no trabalho de Dutra et al. (2004).

Os filtros orgânicos contêm metabólitos secundários que atuam como bloqueadores dos raios UV, estes são principalmente taninos e flavonoides, grupos que se destacam na como antioxidantes naturais (GAZZANI et al., 2008). Estruturas que contêm anéis aromáticos com um grupo substituinte doador de elétrons podem absorver a radiação UV (FLOR 2007). Como a amostra de polissacarídeo mostrou a presença de flavonoides isso motivou a pesquisa do FPS.

TABELA 13 - COMPRIMENTOS DE ONDA DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A QUENTE (PQ) E DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO A FRIO (PF) DE 290 NM A 320 NM PARA CÁLCULO DO FPS

Comprimento de onda nm	PQ	PF
290	0,757	0,956
295	0,643	0,837
300	0,604	0,794
305	0,589	0,774
310	0,584	0,770
315	0,591	0,780
320	0,602	0,796

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: PQ = polissacarídeo extraído a quente e PF = polissacarídeo extraído a frio

Após o cálculo o polissacarídeo extraído a quente (PQ) apresentou FPS *in vitro* de 5,89 e o o polissacarídeo extraído a frio (PF) apresentou FPS *in vitro* de 7,88.

De acordo com a RDC nº 30 de 1 de junho de 2012 da Anvisa o nível de proteção *in vivo* varia de acordo com FPS, de 6,0 a 14,9 é considerado de baixa proteção, de 15,0 a 29,9 é considerado de média proteção e de 30,0 a 50,0 apresenta alta proteção (BRASIL, 2012). A espécie *Z. kleinii* mostrou resultados promissores para serem testado *in vivo*, junto com outros compostos que apresentem FPS, na forma de *blend* por exemplo.

A atividade fotoprotetora de outras espécies do gênero também foram avaliadas. O extrato de acetato de etila da casca, juntamente com a hesperidina que é um metabólito ativo na casca de *Z. rhetsa*, apresentou valor de FPS 13,36 e o extrato da casca obtido com butanol apresentou FPS de 8,6 (YAIPHAREMBI et al., 2022). O extrato aquoso das folhas da espécie *Z. tingoassuiba* teve um FPS equivalente a 3,021 utilizando a mesma equação descrita por Mansur et al. (1986) para o cálculo (SILVA et al., 2020).

#### 4.9.3 Determinação de açúcar redutor pelo método de *Lane-Enoy*

Esse método buscou identificar qualitativamente a presença de açúcar redutor no polissacarídeo extraído das folhas de *Z. kleinii*.

De acordo com Bolzan (2013), todos os monossacarídeos são redutores, dos oligossacarídeos a lactose e a maltose também são redutores.

Nesse método os sais cúpricos são reduzidos a quente transformando-se em sais cuprosos, na cor vermelho tijolo, que precipitam (TAVARES et al., 2009). Como podemos observar na FIGURA 44, após aquecimento em chapa, a solução apresentou uma coloração marrom.

FIGURA 44 - RESULTADO DA REAÇÃO DE *LANE-ENOY* PARA AÇÚCAR REDUTOR



FONTE: A autora (2023).

Esse resultado pode indicar a presença de açúcar redutor. O açúcar está relacionado ao crescimento, desenvolvimento, resposta ao estresse e resistência a doenças nas plantas. O açúcar redutor desempenha um papel importante nas vias

metabólicas, podendo atuar como moléculas sinalizadoras nas plantas por meio da sua interação com receptores de proteínas ou através de subprodutos do seu catabolismo e ajudam na produção de metabólitos secundários que melhoram as propriedades medicinais das plantas (ARSENAULT et al., 2010; KHATRI et al., 2020).

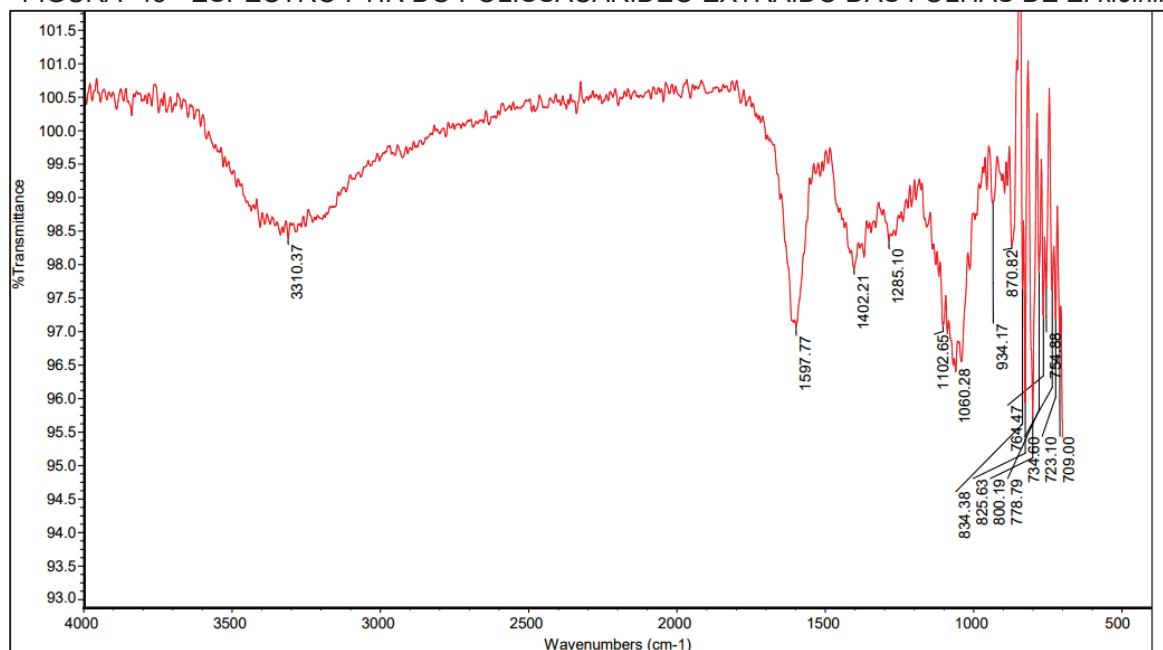
#### 4.9.4 Espectro infravermelho (IR) do polissacarídeo

A IR investiga as vibrações moleculares, com isso os grupos funcionais podem ser associados as bandas características de absorção infravermelha (BERTHOMIEU; HINERWADEL, 2009).

Ao analisar o espectro de infravermelho (FTIR) da amostra de polissacarídeo de *Z. kleinii* foi dado ênfase às bandas relativas aos grupos funcionais característicos desse tipo de amostra.

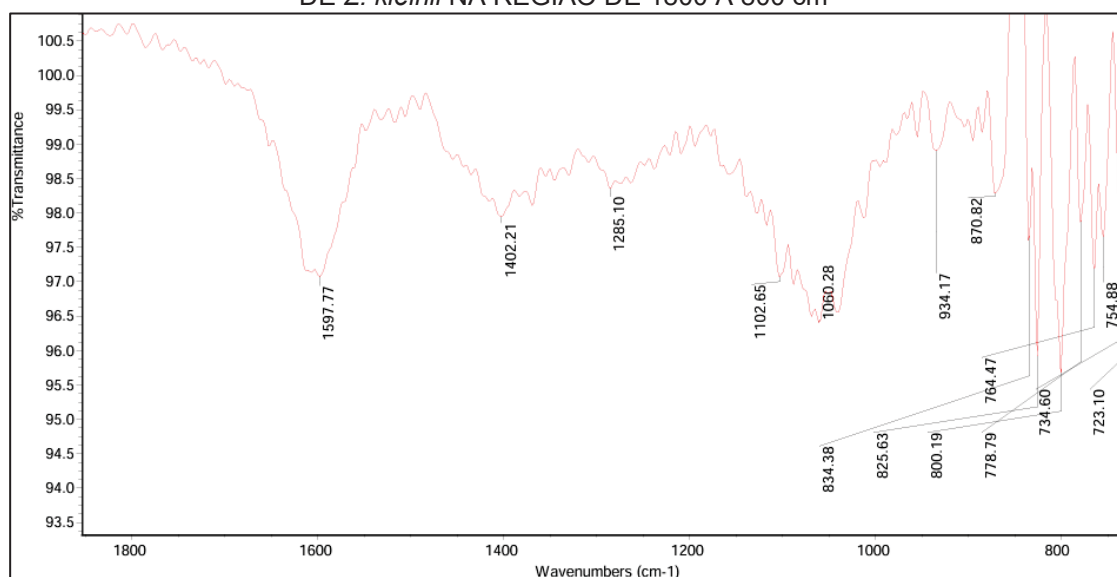
De acordo com Zhou et al. (2009) os polissacarídeos apresentam bandas características referentes aos grupos OH, em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub> em cerca de  $2.937\text{ cm}^{-1}$ , carboidratos entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  (C-OH e C-O-C entre  $1110$  e  $1018\text{ cm}^{-1}$ ). De acordo com o resultado obtido para o polissacarídeo de *Z. kleinii* (FIGURA 45 e 46) é possível observar as bandas nessas regiões.

FIGURA 45 - ESPECTRO FTIR DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *Z. kleinii*



FONTE: Central analítica PPGCF-UFPR (2023).

FIGURA 46 -EXPANSÃO DO ESPECTRO FTIR DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *Z. kleinii* NA REGIÃO DE 1800 À 800  $\text{cm}^{-1}$



FONTE: Central analítica PPGCF-UFPR (2023).

As estruturas para identificar proteínas são as amidas primárias entre 1720 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , amidas secundárias entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  e amidas terciárias com bandas entre 1450 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  (ZHOU et al., 2009). A amostra de polissacarídeo de *Z. kleinii* apresentou banda na região das amidas secundárias (1597,77  $\text{cm}^{-1}$ ) e amidas terciárias (1402,21  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerindo a presença de proteínas na amostra.

Os compostos fenólicos apresentam bandas características da ligação C-H entre 800 e 920  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda da ligação C-C-O entre 1260 e 1180  $\text{cm}^{-1}$  (SCHULZ, BARANSKA 2006). Percebe-se que a amostra analisada apresenta bandas nessas regiões, indicando a presença de compostos fenólicos.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os flavonoides desempenham funções importantes nas plantas como regular o crescimento das plantas e prevenir a invasão de microrganismos patogênicos (ZHENG et al., 2022).

Os resultados mostram que o extrato bruto e frações das folhas apresentaram teor de fenólicos totais na faixa de 750,00  $\mu\text{g}$  até 5141,67  $\mu\text{g}$  de EAG/mg de amostra, sendo a fração acetato de etila dos galhos (FAEG) com o maior valor e a fração acetato de etila (FAEF). Os maiores valores de fenólicos totais foram encontrados

nas frações acetato de etila dos galhos (FAEG), fração remanescente dos galhos (FRG), fração clorofórmio dos galhos (FCG) e na amostra de polissacarídeo extraído a frio (PF) (TABELA 14).

Em relação ao teor de flavonoides totais os extratos brutos e frações apresentaram valores na faixa de 19,59 µg à 121,92 µg de EAG/mg de amostra, o menor valor corresponde a amostra de polissacarídeo extraído a frio (PF) e o maior a fração hexano das folhas (FHF). Os maiores valores para este teste são encontrados nas frações hexano das folhas (FHF), clorofórmio das folhas (FCF) e no extrato bruto das folhas (EBF) (TABELA 14).

TABELA 14 - TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS DE EXTRATOS BRUTO, FRAÇÕES E POLISSACARÍDEO DE *Z. kleinii*

AMOSTRA	FENÓLICOS TOTAIS (µg de EAG/mg de amostra) Média ± DP	FLAVONOIDES TOTAIS (µg de EQ/mg de amostra) Média ± DP
EBF	2127,78 ± 21,38 <sup>e</sup>	111,20 ± 3,85 <sup>g</sup>
FHF	1416,67 ± 27,32 <sup>c</sup>	121,92 ± 4,10 <sup>h</sup>
FCF	1561,11 ± 22,95 <sup>c</sup>	120,20 ± 0,22 <sup>h</sup>
FAEF	750,00 ± 23,20 <sup>a</sup>	42,41 ± 0,23 <sup>b, c</sup>
FRF	758,33 ± 4,17 <sup>a</sup>	64,42 ± 3,66 <sup>e</sup>
EBG	1590,28 ± 18,79 <sup>c, d</sup>	38,91 ± 3,44 <sup>b</sup>
FHG	1772,22 ± 19,25 <sup>d</sup>	73,11 ± 2,25 <sup>f</sup>
FCG	2684,72 ± 10,49 <sup>f, g</sup>	51,00 ± 0,67 <sup>c, d</sup>
FAEG	5141,67 ± 16,67 <sup>h</sup>	56,44 ± 1,46 <sup>d, e</sup>
FRG	2811,11 ± 29,56 <sup>g</sup>	37,41 ± 1,80 <sup>b</sup>
FHF <sub>Fr</sub>	1030,56 ± 25,46 <sup>b</sup>	37,25 ± 0,80 <sup>b</sup>
FCFr	2058,33 ± 23,20 <sup>e</sup>	57,96 ± 2,32 <sup>d, e</sup>
FAEF <sub>Fr</sub>	2248,61 ± 8,67 <sup>e</sup>	55,71 ± 0,67 <sup>d</sup>
FOHF <sub>Fr</sub>	1140,28 ± 24,06 <sup>b</sup>	50,57 ± 1,20 <sup>c, d</sup>
PQ	2251,39 ± 19,69 <sup>e</sup>	42,22 ± 3,27 <sup>b, c</sup>
PF	2658,33 ± 29,17 <sup>f</sup>	19,59 ± 5,43 <sup>a</sup>

Fonte: A autora (2023).

LEGENDA: EBF: extrato bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAEF: fração acetato de etila das folhas; FRF: fração remanescente das folhas; EBG: extrato bruto dos galhos; FHG: fração hexano dos galhos; FCG: fração clorofórmio dos galhos; FAEG: fração acetato de etila dos galhos; FRG: fração remanescente dos galhos; FHF<sub>Fr</sub>: fração hexano dos frutos; FCF<sub>Fr</sub>: fração clorofórmio dos frutos; FAEF<sub>Fr</sub>: fração acetato de etila dos frutos;

FOHFr: fração hidroalcoólica dos frutos; PQ: polissacarídeo extraído a quente; PF: polissacarídeo extraído a frio; EAG: equivalente ácido gálico; EQ: equivalente quercetina. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey. Resultados expressos em média aritmética  $\pm$  Desvio padrão.

A amostra de polissacarídeo extraído a frio (PF) mostrou alto teor de fenólicos totais e baixo valor para flavonoides totais, esse resultado sugere que outros compostos fenólicos possam estar presentes na amostra.

De acordo com Chew et al. (2011) a quantidade de fenólicos totais nas plantas pode ser categorizado da seguinte maneira: quantidade alta ( $>5.000$  mg GAE/100 g), média alta (3.000 - 5.000 mg GAE/100 g), média baixa (1.000 - 3.000 mg GAE/100 g) e baixo ( $<1000$  mg GAE/100 g). De acordo com esses dados, todas as frações apresentaram alto teor de fenólicos quando transformadas para mg EAG/ 100 g amostra, por exemplo a FAEG, qual apresentou 514167,00 mg/100g de amostra.

O extrato de clorofórmio das folhas de *Z. armatum* mostraram valor de fenólicos totais de  $(17,74 \pm 0,02)$  mg de EAG por grama de amostra (SINGH et al., 2020), três vezes menos que a espécie *Z. kleinii*.

Quando analisamos outras espécies do gênero podemos observar que as espécies tem quantidades diferentes de fenólicos totais, o extrato hidroalcoólico do dos frutos de *Z. schinifolium* apresentaram  $(22,7 \pm 3,1)$  mg por grama de amostra (KIM et al., 2021). Os frutos de *Z. armatum* apresentaram  $(25,6 \pm 1,2)$  mg de de EAG por grama de extrato bruto (ALAM et al., 2019), quantidade inferior a todas as frações avaliadas dos frutos de *Z. kleinii*.

As folhas de *Z. armatum* mostraram uma quantidade de  $(77,18 \pm 0,06)$  mg de equivalente catequina por grama de amostra, para a quantificação de flavonoides totais, utilizando extrato de clorofórmio (SINGH et al., 2020), enquanto em *Z. kleinii* foi mensurado em 120,20 mg de EQ/mg de amostra utilizando mesmo solvente e mesma técnica.

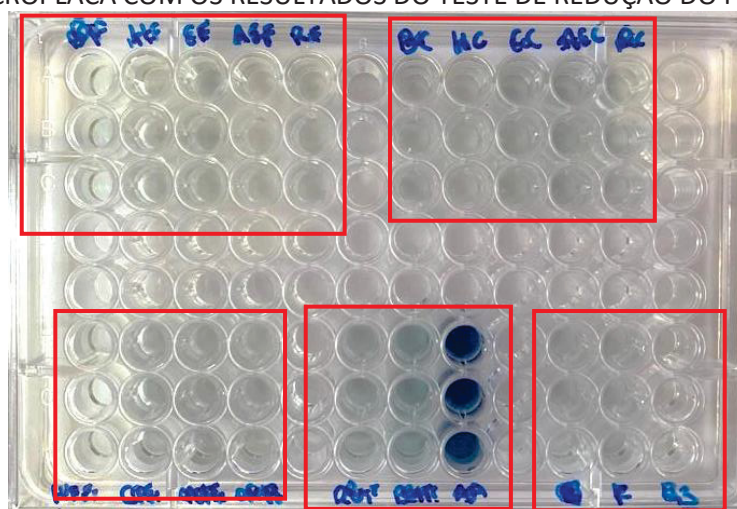
Em relação aos flavonoides totais também foram observados diferentes resultados entre as espécies do gênero, o extrato hidroalcoólico do dos frutos de *Z. schinifolium* apresentaram  $(18,6 \pm 2,5)$  mg por grama de amostra (KIM et al., 2021). Os frutos de *Z. armatum* mostraram valor de 26,3 mg de EQ por grama de extrato bruto (ALAM et al., 2019), enquanto para os frutos de *Z. kleinii* o menor valor descrito foi de 37,25 mg de EQ por grama.

## 4.11 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

### 4.11.1 Potencial antioxidante pelo teste de redução do fosfomolibdênio

De acordo com o trabalho de Prieto et al. (1999) o ensaio consiste na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V), formando um complexo verde. O resultado para o teste quantitativo está representado na FIGURA 47, na qual é possível observar a cor da reação.

FIGURA 47 – MICROPLACA COM OS RESULTADOS DO TESTE DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: EF: extrato bruto das folhas; HF: fração hexano das folhas; CF: fração clorofórmio das folhas; AEF: fração acetato de etila das folhas; RF: fração remanescente das folhas; BG: extrato bruto dos galhos; HG: fração hexano dos galhos; CG: fração clorofórmio dos galhos; AEG: fração acetato de etila dos galhos; RG: fração remanescente dos galhos; HFr: fração hexano do fruto; CFr: fração clorofórmio do fruto; AEFr: fração acetato de etila do fruto; RUT: padrão rutina; BHT: padrão BHT; AA: padrão ácido ascórbico; Q: polissacarídeo extraído a quente; F: polissacarídeo extraído a frio; B: branco.

De acordo com o a FIGURA 47, observamos que os extratos brutos, frações e polissacarídeo mostraram atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio, adquirindo uma coloração esverdeada característica.

A equação utilizada para os cálculos considera que o padrão tem atividade de 100%, a partir dessa informação calculou-se a porcentagem de inibição relativa de cada amostra em relação ao padrão. Foram utilizados os padrões de ácido ascórbico, BHT e rutina.

A fração clorofórmio das folhas (FCF), fração clorofórmio dos galhos (FCG), fração acetato de etila dos galhos (FAEG) e a fração clorofórmio do fruto (FCFr)

apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante, frente aos três padrões utilizados (ácido ascórbico, BHT e rutina) quando avaliados pelo teste de média de Tukey ( $p < 0,005$ ).

Os valores com as porcentagens relativas frente a cada padrão estão demonstrados na TABELA 15.

TABELA 15 - RESULTADO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO ÁCIDO ASCÓRBICO (%) Média ± DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO BHT (%) Média ± DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE A RUTINA (%) Média ± DP
EBF	15,79 ± 0,006 <sup>c, d</sup>	24,03 ± 0,009 <sup>c, d</sup>	49,42 ± 0,002 <sup>c, d</sup>
FHF	18,75 ± 0,011 <sup>d, e, f</sup>	28,53 ± 0,017 <sup>e, f, g</sup>	58,69 ± 0,036 <sup>d, e, f</sup>
FCF	23,00 ± 0,022 <sup>g</sup>	34,98 ± 0,034 <sup>g</sup>	71,97 ± 0,070 <sup>g</sup>
FAEF	6,75 ± 0,004 <sup>a</sup>	10,27 ± 0,007 <sup>a</sup>	21,14 ± 0,014 <sup>a</sup>
FRF	10,32 ± 0,004 <sup>b</sup>	15,70 ± 0,007 <sup>b</sup>	32,30 ± 0,014 <sup>b</sup>
EBG	17,36 ± 0,001 <sup>c, d</sup>	26,41 ± 0,002 <sup>c, d</sup>	54,34 ± 0,003 <sup>c, d</sup>
FHG	18,55 ± 0,018 <sup>d, e, f</sup>	28,22 ± 0,030 <sup>e, f, g</sup>	58,07 ± 0,058 <sup>d, e, f</sup>
FCG	32,10 ± 0,011 <sup>i</sup>	48,84 ± 0,017 <sup>i</sup>	100,46 ± 0,035 <sup>i</sup>
FAEG	28,52 ± 0,020 <sup>h</sup>	43,39 ± 0,031 <sup>h</sup>	89,25 ± 0,065 <sup>h</sup>
FRG	18,17 ± 0,007 <sup>d, e</sup>	27,64 ± 0,011 <sup>e, f</sup>	56,87 ± 0,024 <sup>d, e</sup>
FHF <sub>r</sub>	16,10 ± 0,010 <sup>c, d</sup>	24,50 ± 0,015 <sup>c, d</sup>	50,39 ± 0,003 <sup>c, d</sup>
FCF <sub>r</sub>	21,19 ± 0,004 <sup>e, f, g</sup>	32,23 ± 0,006 <sup>f, g, h</sup>	66,31 ± 0,013 <sup>e, f, g</sup>
FAEF <sub>r</sub>	14,48 ± 0,004 <sup>c</sup>	22,02 ± 0,007 <sup>c</sup>	45,30 ± 0,014 <sup>c</sup>
FOHF <sub>r</sub>	10,45 ± 0,008 <sup>b</sup>	15,89 ± 0,012 <sup>b</sup>	32,70 ± 0,002 <sup>b</sup>
PQ	17,82 ± 0,005 <sup>d</sup>	27,10 ± 0,007 <sup>e</sup>	55,75 ± 0,015 <sup>d</sup>
PF	21,46 ± 0,001 <sup>f, g</sup>	32,64 ± 0,002 <sup>g, h</sup>	67,15 ± 0,004 <sup>f, g</sup>
AA	100,00 <sup>j</sup>	-	-
BHT	-	100,00 <sup>j</sup>	-
RUTINA	-	-	100,00 <sup>j</sup>

Fonte: A autora (2023).

LEGENDA: EBF: extrato bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAEF: fração acetato de etila das folhas; FRF: fração remanescente das folhas; EBG: extrato bruto dos galhos; FHG: fração hexano dos galhos; FCG: fração clorofórmio dos galhos; FAEG: fração acetato de etila dos galhos; FRG: fração remanescente dos galhos; FHF<sub>r</sub>: fração hexano dos frutos; FCF<sub>r</sub>: fração clorofórmio dos frutos; FAEF<sub>r</sub>: fração acetato de etila dos frutos; FOHF<sub>r</sub>: fração hidroalcolólica dos frutos; PQ: polissacarídeo extraído a quente; PF: polissacarídeo extraído a frio; AA: ácido ascórbico. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

A partir dos dados demonstrados na TABELA 15 pode-se concluir que todas as amostras testadas apresentam atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio.

A maior atividade antioxidante para as frações clorofórmio da folha (FCF), fração clorofórmio dos galhos (FCG), fração acetato de etila dos galhos (FAEG) e a fração clorofórmio do fruto (FCFr) era esperada devido a concentração de compostos fenólicos nessas frações. Porém, a fração acetato de etila dos galhos (FAEG) apresentou alto teor de fenólicos e não teve resultado significativo nesse ensaio.

A amostra de polissacarídeo também teve atividade antioxidante, esse fato pode ser corroborado pela detecção de compostos fenólicos nessa amostra, identificados por CCD e pela quantificação de fenólicos totais.

#### 4.11.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH

Os resultados desse ensaio foram expressos de diferentes formas, comparando a atividade antioxidante em porcentagem com o padrão e as amostras na mesma concentração (200 µg/ml),

Após o cálculo do IA% (porcentagem do índice antioxidante) das folhas, dos galhos, frutos e padrões, os valores foram apresentados na TABELA 16 e na FIGURA 48.

TABELA 16 – ÍNDICE ANTIOXIDANTE EM PORCENTAGEM DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PADRÕES FRENTE AO RADICAL DPPH

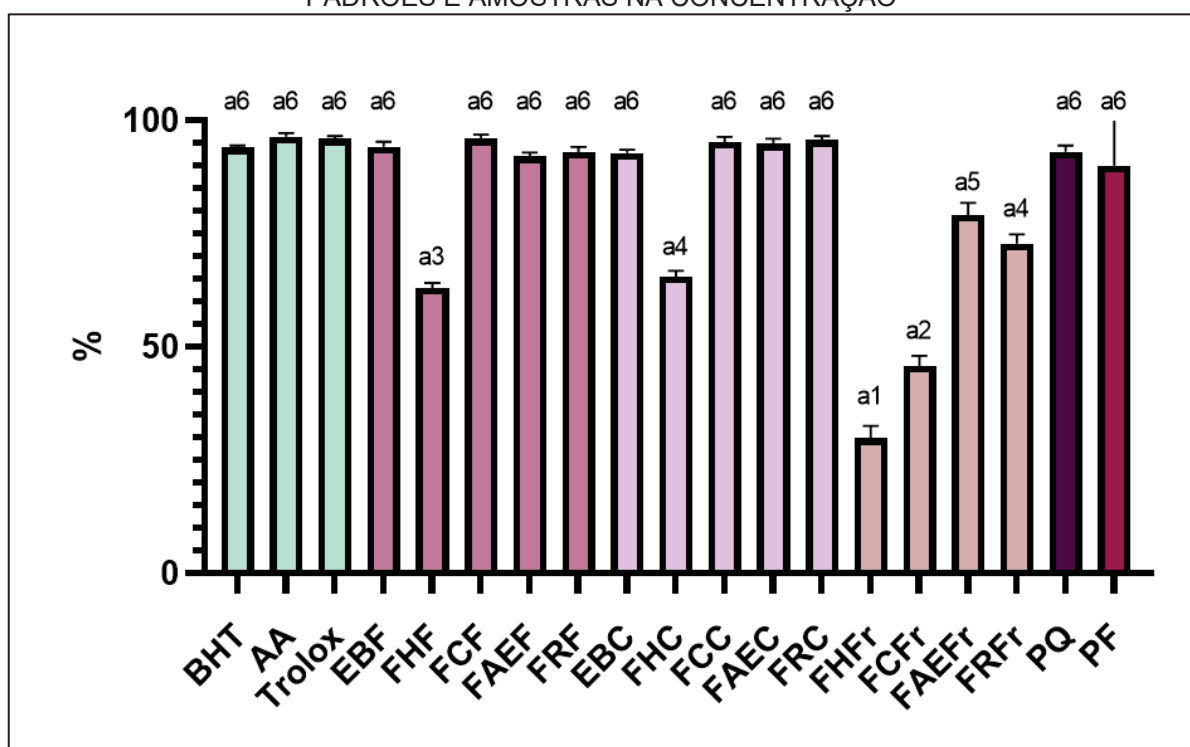
	Folha Média ± DP	Galhos Média ± DP	Fruto Média ± DP	Polissacarídeo Média ± DP	Padrões Média ± DP
EB	94,19 ± 1,12 <sup>a6</sup>	92,75 ± 0,81 <sup>a6</sup>	-	-	-
FH	61,58 ± 2,74 <sup>a3</sup>	64,25 ± 2,43 <sup>a4</sup>	29,79 ± 2,75 <sup>a1</sup>	-	-
FC	95,18 ± 1,54 <sup>a6</sup>	94,87 ± 1,33 <sup>a6</sup>	47,52 ± 2,20 <sup>a2</sup>	-	-
FAE	89,81 ± 5,41 <sup>a6</sup>	94,13 ± 1,62 <sup>a6</sup>	85,93 ± 2,71 <sup>a4</sup>	-	-
FR	93,71 ± 1,60 <sup>a6</sup>	95,15 ± 1,17 <sup>a6</sup>	-	-	-
FOH	-	-	74,45 ± 2,54 <sup>a6</sup>	-	-
PQ	-	-	-	93,00 ± 1,43 <sup>a6</sup>	-
PF	-	-	-	90,08 ± 10,01 <sup>a6</sup>	-
BHT	-	-	-	-	93,32 ± 0,77 <sup>a6</sup>
AA	-	-	-	-	95,68 ± 0,63 <sup>a6</sup>
TROLOX	-	-	-	-	94,92 ± 2,58 <sup>a6</sup>

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; FOH: fração hidroalcoólica; BHT: hidroxitolueno butilado; AA: ácido ascórbico. Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Scott-Knott

Como pode ser observado na TABELA 16, os padrões BHT, AA e trolox apresentaram um índice antioxidante acima de 93,32%, 95,68% e 94,92% respectivamente. Quando analisamos as demais amostras podemos observar que as frações clorofórmio da folha (FCF), do galho (FCG), a fração acetato de etila das folhas (FAEF), dos galhos (FAEG) e fração remanescente das folhas (FRF) e do galho (FRG) são estatisticamente semelhantes aos padrões. As frações hexano das folhas (FHF) e do galho (FHG) apresentam menos atividade que as demais frações. Em relação aos frutos, todas as frações apresentaram atividade inferior aos padrões.

FIGURA 48 – RESULTADO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE FRENTE AO MÉTODO DO RADICAL DPPH, APÓS CALCULAR A PORCENTAGEM DO ÍNDICE ANTIOXIDANTE DE PADRÕES E AMOSTRAS NA CONCENTRAÇÃO



FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: AA: ácido ascórbico; EBF: extrato bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAEF: fração acetato de etila das folhas; FRF: fração remanescente das folhas; EBC: extrato bruto dos galhos; FHG: fração hexano dos galhos; FCC: fração clorofórmio dos galhos; FAEG: fração acetato de etila dos galhos; FRG: fração remanescente dos galhos; FHFt: fração hexano dos frutos; FCFt: fração clorofórmio dos frutos; FAEFt: fração acetato de etila dos frutos; FOHFt: fração hidroalcoólica dos frutos; PQ: polissacarídeo extraído a quente e PF: polissacarídeo extraído a frio. Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Scott-Knott.

O comportamento do polissacarídeo frente ao radical DPPH é semelhante a amostra de polissacarídeo extraído do pericarpo de *Z. bungeanum*, em sua maior concentração (75 µg/mL) teve atividade de 80,25% enquanto no estudo de Li et al. (2015) *Z. bungeanum* atingiu 100% de atividade.

Para avaliar o potencial antioxidante de cada fração em equivalente de trolox os cálculos foram feitos a partir da equação de regressão linear ( $y = -0,0115x + 0,1956$ ) e expressos em equivalente de trolox (µg de ET/mg de amostra) (TABELA 17).

O resultado dos cálculos utilizando a regressão linear estão dispostos na TABELA 17.

TABELA 17 – EQUIVALENTE TROLOX EM µg POR MILIGRAMA DE AMOSTRA CALCULADOS A PARTIR DA REGRESSÃO LINEAR

	Folha Média ± DP	Galhos Média ± DP	Fruto Média ± DP	Polissacarídeo Média ± DP
EB	160,96 ± 0,72 <sup>a10</sup>	158,90 ± 0,45 <sup>a10</sup>	-	-
FH	63,39 ± 0,07 <sup>a3</sup>	67,95 ± 0,99 <sup>a4</sup>	17,33 ± 0,42 <sup>a1</sup>	-
FC	111,16 ± 0,24 <sup>a8</sup>	112,43 ± 1,01 <sup>a8</sup>	42,76 ± 0,91 <sup>a2</sup>	-
FAE	107,36 ± 0,44 <sup>a7</sup>	113,86 ± 0,73 <sup>a8</sup>	96,71 ± 1,64 <sup>a6</sup>	-
FR	110,59 ± 1,50 <sup>a8</sup>	110,33 ± 0,94 <sup>a8</sup>	-	-
FOH	-	-	80,63 ± 1,77 <sup>a5</sup>	-
PQ	-	-	-	158,38 ± 0,34 <sup>a10</sup>
PF	-	-	-	122,45 ± 5,67 <sup>a9</sup>

FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; FOH: fração hidroalcóolica; BHT: hidroxitolueno butilado; AA: ácido ascórbico. Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Scott-Knott.

Pode-se observar que quando os cálculos são feitos utilizando a regressão linear alguns valores ficaram acima de 100 µg ET/mg de amostra.

A partir dos resultados desse teste, podemos concluir que todas as frações apresentam potencial antioxidante.

## 4.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 4.12.1 Germinação

Para o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Lactuca sativa*, pode-se observar que não teve diferença estatística entre os controles, água destilada e polissorbato 80 1% (v/v), e o óleo volátil dos frutos de *Z. kleinii* nas concentrações 0,1%, 0,01% e 0,001%. Somente a amostra de óleo essencial na concentração de 1% interferiu na germinação das sementes de *L. sativa*. Os resultados podem ser observados na TABELA 18 e na FIGURA 49.

TABELA 18 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Z. kleinii* NA AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA

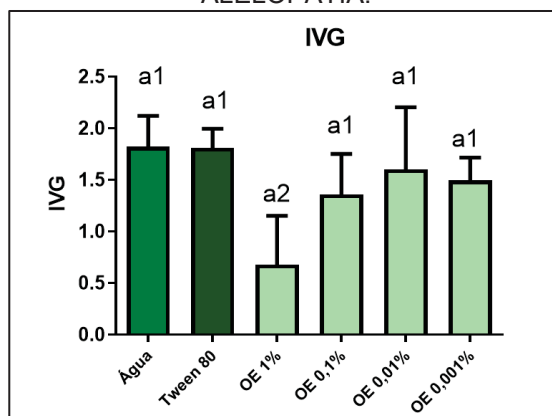
AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) Média ± DP
ÁGUA	-	1,82 ± 0,30 <sup>a1</sup>
Polissorbato 80	1%	1,56 ± 0,32 <sup>a1</sup>
OE	1%	0,67 ± 0,47 <sup>a2</sup>
OE	0,1%	1,35 ± 0,39 <sup>a1</sup>
OE	0,01%	1,6 ± 0,60 <sup>a1</sup>
OE	0,001%	1,49 ± 0,21 <sup>a1</sup>

FONTE: A autora (2023).

Legenda: OE: óleo essencial.

NOTA: Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Scott-knott.

FIGURA 49 – INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Z. kleinii* SOBRE ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *L. sativa* NA AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA.



FONTE: A autora (2023).

Legenda: OE: óleo essencial.

NOTA: Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Scott-knott.

De acordo com Ferreira e Aquila (2000) a germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento.

O óleo essencial das cascas dos frutos da espécie de *Citrus limettioides* da família Rutaceae mostrou diferenças estatísticas significativas no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *L. sativa*, nas concentrações de 0,25% a 1% de óleo, o IVG diminuía conforme a concentração de óleo aumentava (LOPES et al., 2017). Um isolado dos frutos de *Zanthoxylum limonella*, a xantoxilina teve efeito inibitório sob as sementes de amaranto chinês e capim-arroz, a inibição aumentou com o aumento das concentrações de xantoxilina (CHAROENYING et al., 2010). Extratos orgânicos de *Zanthoxylum affine* afetou a germinação de *L. sativa* na concentração de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo mais afetada pelo extrato hexânico (61,6%). O constituinte majoritário linarina identificado na mesma espécie também foi avaliado isoladamente, sendo que este não apresentou resposta dependente da dose porque as duas doses testadas (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) inibiram a germinação de *L. sativa* na mesma porcentagem (88,6%) (RIOS et al., 2018).

Em contrapartida, no trabalho de Turnes et al. (2014) foi demonstrado a influência positiva do extrato hidroalcolico das cascas de *Zanthoxylum rhoifolium* e suas frações sobre a germinação das sementes de *L. sativa*.

#### 4.12.2 Crescimento

Ferreira e Aquila (2000) recomendam em seu trabalho a avaliação morfológica, ou seja, emergência da radícula como primeira abordagem para avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento.

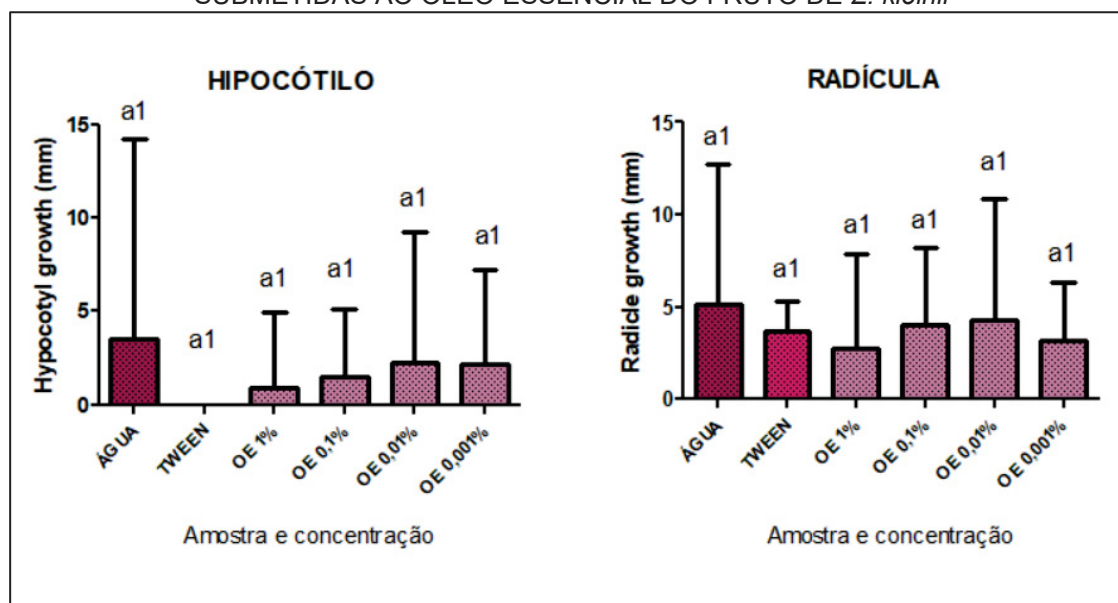
No crescimento da radícula as concentrações de óleo volátil avaliadas não apresentaram crescimento diferente dos controles (água destilada e polissorbato 80 1%) avaliados. Pode-se observar que o hipocótilo também não apresentou diferença estatística entre as diferentes concentrações do óleo essencial e os controles (água destilada e polissorbato 80 1%). Os resultados são apresentados na TABELA 19 e na FIGURA 50. Como não teve diferença estatística do controle, podemos afirmar que o óleo volátil não influenciou no crescimento dessas estruturas.

TABELA 19 – CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DO FRUTO DE *Z. kleinii*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA	RADÍCULA (mm) Média ± DP	HIPOCÓTILO (mm) Média ± DP
ÁGUA	-	5,15 ± 7,58 <sup>a1</sup>	3,55 ± 10,64 <sup>a1</sup>
Polissorbato 80	1%	3,65 ± 1,63 <sup>a1</sup>	0 ± 0 <sup>a1</sup>
OE	1%	2,75 ± 5,17 <sup>a1</sup>	0,90 ± 4,02 <sup>a1</sup>
OE	0,1%	4,00 ± 4,23 <sup>a1</sup>	1,50 ± 3,63 <sup>a1</sup>
OE	0,01%	4,30 ± 6,59 <sup>a1</sup>	2,30 ± 6,94 <sup>a1</sup>
OE	0,001%	3,15 ± 3,20 <sup>a1</sup>	2,20 ± 5,05 <sup>a1</sup>

FONTE: A autora (2023).

Legenda: OE: óleo essencial; Números iguais não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

FIGURA 50 – CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO ÓLEO ESSENCIAL DO FRUTO DE *Z. kleinii*

FONTE: A autora (2023).

Legenda: OE: óleo essencial; Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa a nível de  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

O óleo essencial das cascas dos frutos da espécie de *Citrus limettioides* da família Rutaceae mostrou diferenças estatísticas significativas no comprimento da raiz, quando avaliadas as concentrações de 0,25% a 2% do óleo essencial sobre as sementes de *L. sativa*. O comprimento da raiz reduziu com o aumento das concentrações utilizadas no teste, na concentração máxima não foi observado crescimento de raiz. O efeito alelopático foi atribuído ao dl-limoneno, composto majoritário no óleo essencial (87,50%) (LOPES et al., 2017). O isolado xantoxilina de

*Z. limonella* reduziu o comprimento da raiz no amaranto chinês e no capim-arroz na concentração de 625 µM (CHAROENYING et al., 2010). O crescimento de *L. sativa* foi afetado também pelos extratos metanol e acetona obtidos da espécie *Z. affin* em 30% aproximadamente (RIOS et al., 2018).

No trabalho de Turnes et al. (2014) foi demonstrado a influência positiva do extrato hidroalcoólico das cascas de *Zanthoxylum rhoifolium* e suas frações sobre o crescimento da radícula e hipocótilo de *L. sativa*.

#### 4.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O óleo essencial das folhas, as amostras extrato bruto das folhas, extrato bruto dos galhos e polissacarídeo não apresentaram atividade frente as bactérias avaliadas, gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), e as gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*).

O óleo essencial dos frutos apresentou atividade frente a todas as cepas testadas, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus*, o resultado é constatado quando observado na microplaca a ausência do crescimento das bactérias quando em contato com o óleo.

As concentrações mínimas de óleo essencial necessárias para inibir o crescimento bacteriano está descrito na TABELA 20.

TABELA 20 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA CADA CEPA BACTERIANA AVALIADA FRENTE AO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Z. kleinii*.

AMOSTRA	CEPA BACTERIANA	CIM
Óleo essencial extraído dos frutos de <i>Z. kleinii</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	3,12 µg/µl
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,78 µg/µl
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1,56 µg/µl
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	1,56 µg/µl

FONTE: A autora (2023).

Ao verificar outros estudos relatando a ausência da atividade antimicrobiana com óleos obtidos de folhas de outras espécies do gênero, corroborando com a presente pesquisa. E as espécies em que o óleo obtido das folhas apresentaram atividade antimicrobiana apresentaram compostos majoritários diferentes dos encontrados neste estudo.

O composto volátil obtido das folhas da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* var. *surparanaense* (Najera, Galdeano & Escal.) P.G. Waterman e o óleo obtido das folhas de *Z. rhoifolium* não apresentaram atividade inibitória contra *E. coli* (GONZAGA et al., 2003; SILVA et al., 2006). Além disso, o óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum avicennae* var. *touranense* Pierre não teve atividade contra o *S. aureus* (ANDILA, 2019).

Em contrapartida, o óleo essencial obtido das folhas de *Z. armatum* apresentou atividade moderadamente eficaz contra bactérias gram-negativas (*E. coli*) e atividade inibitória contra *S. aureus* utilizando 100 µL de óleo (MEHMOOD et al., 2013). Um dos principais componentes descritos para o óleo essencial dessa espécie foi o *bornyl acetate* (16%) e *cimeno* (8%) (NEGI et al., 2012). O óleo da casca de *Z. armatum* teve atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, apresentando como constituinte principal o  $\alpha$ -pineno (aproximadamente 30%). Este óleo foi usado na concentração de 0,75 µL/mL (DHAMI et al., 2019). O óleo das folhas de *Z. rhoifolium* inibiu o crescimento de *S. aureus* quando na concentração de 3,12 µg (GONZAGA et al., 2003).

O fruto de *Z. kleinii* mostrou atividade frente as quatro cepas. Quando avaliamos a atividade do óleo essencial obtido dos frutos de *Z. rhetsa*, a concentração inibitória mínima para *E. coli* foi de 100 µg/mL, para *P. aeruginosa* 200 µg/mL e para *S. aureus* mais que 200 µg/mL, sendo seus principais constituintes *sabineno* (41,13%), *terpinoleno* (27,05%) e *limoneno* (7,30%) (PHAM et al., 2021). No estudo de Naik et al. (2015) o óleo essencial das sementes de *Z. rhetsa* mostrou atividade antimicrobiana frente as cepas *S. aureus* e *E. coli*, sendo a CIM 35 µg/mL e 140 µg/mL respectivamente. Quando o *terpinen-4-ol* foi avaliado isoladamente mostrou um CIM de 35 µg/mL para *S. aureus* e 70 µg/mL para *E. coli*. O composto avaliado, *terpinen-4-ol*, também foi identificado como majoritário no óleo essencial dos frutos de *Z. kleinii*, isso pode justificar sua atividade antimicrobiana.

Os frutos de *Z. rhoifolium* não influenciaram o crescimento de *E. coli*, e frente a *S. aureus* inibiu seu crescimento quando aplicado 12,5 µg de óleo essencial (GONZAGA et al., 2003).

## 5. CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho foi possível obter dados inéditos a respeito da espécie *Zanthoxylum kleinii* (Rutaceae) mostrando que a espécie é promissora.

Este estudo forneceu informações sobre anatomia e histoquímica dos folíolos, raquis, pecíolo e galho da espécie *Z. kleinii*. As características que caracterizam a espécie são a forma da parede anticlinal da epiderme foliar, que apresentam forma poligonal; presença de cutícula na superfície foliar, pecíolo, raquis e no galho; cristais prismáticos de oxalato de cálcio no pecíolo; tricomas não glandulares simples no folíolo, raquis, pecíolo e galho. Através dos dados morfológicos e histoquímicos foi possível identificar grandes células secretoras nas folhas e pecíolo. Uma avaliação integrativa dos dados ontogenéticos e histoquímicos permitiu classificar o tricoma glandular como coleter para essa espécie. Coleteres foram identificados nos folíolos jovens, assim como já descritos em outras espécies do gênero *Zanthoxylum*. Nos frutos foram identificadas cavidades secretoras de óleo essencial e estômatos com cavidade subestomática. No EDS do fruto foram identificados principalmente a presença dos elementos carbono, oxigênio e alumínio.

As análises histoquímicas confirmaram a presença de compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido, elementos lignificados e células mucilaginosas nas folhas, pecíolo, raquis e galho desta espécie. O coleter apresentou reação positiva para compostos fenólicos, lipídicos, pectinas, proteínas, óleos e mucilagem.

As características físico químicas mostraram diferentes valores em relação a espécies Laranja amarga descrita na Farmacopeia Brasileira, entretanto foram utilizadas diferentes amostras das espécies.

A análise fitoquímica das frações das folhas e dos galhos mostrou a presença de esteroides e compostos fenólicos. Nas frações do fruto foram identificados alcaloides, esteroides e compostos fenólicos. No polissacarídeo foram caracterizados compostos fenólicos.

Foram extraídos óleos essenciais das folhas e dos frutos. O óleo das folhas teve um rendimento de 0,12%, e seu compostos majoritários identificados foram  $\beta$ -felandreno (37,8%),  $\alpha$ -pineno (13,32%) e mirceno (10,05%). O fruto apresentou rendimento de 0,7% e seus compostos majoritários identificados foram o limoneno (20,16%), o o-cimeno (13,48%) e o terpinen-4-ol (10,77%). O óleo essencial dos frutos mostrou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* com CIM de 3,12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , *E.*

*coli* com CIM de 0,78 µg/µl, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* com CIM de 1,56 µg/µl. Em contrapartida não teve atividade alelopática, pois não interferiu na germinação e no crescimento das sementes de *L. sativa* com diferentes concentrações

Após a identificação da presença de polissacarídeo nas folhas, foram realizadas duas extrações, a quente (PQ) e a frio (PF) das folhas secas e trituradas. O PQ teve um rendimento de 18,83% e o PF 14,06%. No espectro EDS do polissacarídeo foram identificados principalmente oxigênio, carbono, cálcio, cloro, magnésio, enxofre, fósforo e alumínio. Quando avaliado seu fator FPS foram obtidos valores entre 5,89 a 7,88.

Quando avaliado o teor de fenólicos totais dos extratos brutos e frações das folhas, galhos e frutos, e polissacarídeos, todos os valores foram considerados com alto teor de acordo com a referência consultada, sendo que as frações com maior quantidade foram as frações obtidas a partir do solvente clorofórmio. O valor de flavonoides totais apresentou maiores valores para as frações com maior teor de fenólicos totais.

O potencial antioxidante avaliado pelo método de redução do fosfomolibdênio comparado com os controles de ácido ascórbico, BHT e rutina mostraram maior atividade nas frações obtidas com clorofórmio. Quando avaliado a capacidade antioxidante pelo método DPPH•, as frações obtidas com acetato de etila, clorofórmio e a remanescente foram as que tiveram maior atividade, enquanto as frações obtidas com solvente hexano foram as que apresentaram menor valor.

Foi isolado e identificado o composto hesperidina, na fração acetato de etila dos galhos. A identificação foi realizada pela análise de espectros FTIR, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A partir da análise dos dados foi identificado o flavonoide.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Zanthoxylum* é conhecido por suas atividades biológicas e uso popular. Todas as partes dos vegetais podem ser utilizados, além disso, algumas espécies mostram óleos essenciais promissores. *Z. kleinii* não apresenta dados na literatura, sendo assim, esses resultados são inéditos para espécie.

O óleo essencial dos frutos mostrou atividade antibacteriana promissora frente as cepas testadas. O óleo não apresentou atividade alelopática frente as sementes de *L. sativa*, entretanto outros testes são necessários para confirmar que não causa fitotoxicidade.

A presença do polissacarídeo apresenta um componente promissor na espécie, pois apresenta fenólicos e FPS, mesmo que baixo.

A espécie mostrou atividade antioxidante significativa, esse fato justifica-se pelo flavonoide hesperidina isolado da espécie *Z. kleinii*.

A espécie mostrou-se promissora para estudos futuros, portanto, são necessários mais testes para aprofundar suas atividades biológicas e caracterizar novos compostos.

Os próximos passos para a pesquisa são aprofundar os estudos sobre seu potencial antimicrobiano; isolar e identificar compostos químicos presentes nos extratos brutos e frações e caracterizar o polissacarídeo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing. DOI: <https://doi.org/10.18434/T4D303>
- AHMAD, M. et al. Conversão do tóxico e perigoso óleo de semente de *Zanthoxylum armatum* em éster metílico usando nanopartículas de óxido de prata verdes e recicláveis. **Combustível**, v. 310, pág. 122296, 2022.
- ALAM, F. et al. Phenolic contents, elemental analysis, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of *Zanthoxylum armatum* DC fruit, leaves and bark extracts. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4, 2019.
- ALAM, F.; SHAH, A. J. Butyrylcholine esterase inhibitory activity and effects of extracts (fruit, bark and leaf) from *Zanthoxylum armatum* DC in gut, airways and vascular smooth muscles. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 2019. BioMed Central Ltd. Acesso em: 30/3/2022.
- ALAM, F. et al. Pharmacognostic study and development of quality control parameters for fruit, bark and leaf of *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae). **Ancient Science of Life**, v.34, n. 3, Mar. 2015.
- ALVES, M. C. S. et al. Allelopathic effect of essential oils of medicinal plants in *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 731-736, 2014.
- ANDILA, P. S. Antimicrobial activity of the essential oil of *Zanthoxylum avicennae*. **Buletin udayana mengabdi**, v. 18, n. 2, p. 90-95, 2019.
- ANDRADE, C. R. et al. Leaf anatomy and histochemistry of secretory structures of *Zanthoxylum caribaeum* Lam. (Rutaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, p. 961–968, 1 dez. 2020.
- ARRUDA, E. C. P. **Guia teórico-prático de anatomia vegetal Identificando células e tecidos**. Recife, Editora UFPE, 2021.
- ARSENAULT, Patrick R. et al. Effect of sugars on artemisinin production in *Artemisia annua* L.: transcription and metabolite measurements. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2302-2318, 2010.
- AZIZ, Z. A. A. et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 00, 2018
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** n.46, p. 446–475, 2008.

BARASHKOVA, A. S.; ROGOZHIN, E. A. Isolation of antimicrobial peptides from different plant sources: Does a general extraction method exist?. **Plant Methods**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2020.

BARKATULLAH, B. et al. Leaf, stem bark and fruit anatomy of *zanthoxylum armatum* dc. (RUTACEAE). **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 1343-1349. 2014.

BARREIRO, J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis research**, v. 101, p. 157-170, 2009.

BHATT, V. et al. Chemical composition of essential oil among seven populations of *Zanthoxylum armatum* from Himachal Pradesh: Chemotypic and seasonal variation. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 10, p. 1934578X1701201030, 2017.

BRASIL. DECRETO Nº 5.813, DE 22 DE JUNHO DE 2006. Aprova a **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 971, DE 03 DE MAIO DE 2006. Aprova a **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)** no Sistema Único de Saúde. 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009.

BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC Nº 30, DE 1º DE JUNHO DE 2012. Aprova o **Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos** e dá outras providências.

BRASIL. PORTARIA Nº 533, DE 28 DE MARÇO DE 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)** no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 6ª ed. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022.

BOLZAN, R. C. **Bromatologia**. Frederico Westphalen : Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Agrícola de Frederico Westphalen, 2013.

BFG (The Brazil Flora Group). **Flora do Brasil**. 1-28 pp. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. <http://doi.org/10.47871/jbrj2021001>. 2021

BOEHME, A. K. et al. Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Research**, v. 22, n. 1, p. 31-36, 2008.

BONESI, M. et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 25, n. 5, p. 622-628, 2010.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, 2020.

CARVALHO, Z. S. Potencial fitoquímico dos óleos essenciais: exploração e aplicações. **Boletim Científico Agrônomo do CCAAB/UFRB**, p. 18, 2023

CARVALHO, J. L. S. et al. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CEBRIAN-TORREJON, G. et al. The antiplasmodium effects of a traditional South American remedy: *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* against chloroquine resistant and chloroquine sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 652-661, 2011.

CERDAN, M. T. D. **Benefícios à saúde dos compostos Eriodictiol, Hesperidina e suas formas derivadas**. 2013.

CHAROENSUP, R. et al. Pharmacognostic specification of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston: Fruits and seeds in Thailand. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 7, n. 4, p. 134, 2016.

CHAROENYING, P.; TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. **Scientia horticultrae**, v. 125, n. 3, p. 411-416, 2010.

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, n. 1, p. 1-10, 2011.

CIMINO, C. et al. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 1–35, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). Disponível em: [/pmc/articles/PMC8001530/](https://doi.org/10.3390/ph13030303). Acesso em: 6/6/2022.

COCKERILL, F. R., WIKLER, M. A., ALDER, J. et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard — ninth Edition. In: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard**. Ed. 9, v. 32, n. 2, 2012.

COSTA, R. S. et al. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity of compounds isolated from the roots of *Zanthoxylum tingoassuiba*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 551-558, 2018.

COWAN, Marjorie Murphy. Produtos vegetais como agentes antimicrobianos. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

CYPRIANO, D. Z. A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 176-191, 2017.

DEVEQUI-NUNES, D. et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018.

DHAMI, A. et al.  $\alpha$ -Pinene rich bark essential oils of *Zanthoxylum armatum* DC. from three different altitudes of Uttarakhand, India and their antioxidant, in vitro anti-inflammatory and antibacterial activity. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 3, p. 660-674, 2019.

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

DONALD, Graciela Rocha et al. Antinociceptive activity of *Zanthoxylum piperitum* DC. Essential oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

DUARTE, M. R.; SIEBENROCK, M. C.N. Caracteres Anatômicos de Folha e Caule de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud., Piperaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**. v, 29 n,1 p. 45-51, 2010.

DUARTE, L. Maria Lembo et al. **SUBSTÂNCIAS NATURAIS DE PLANTAS: RELAÇÃO COM A DEFESA EM INFECÇÕES VIRAIS E APLICAÇÃO NA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**. 2023.

DURÁN-PEÑA, M. J. et al. Degraded limonoids: biologically active limonoid fragments re-enhancing interest in Meliaceae and Rutaceae sources. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-47, 2023.

DUTRA, E. A. et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 381-385, 2004.

FARIDA, Y. et al. The quality parameters, total flavonoids determination and antioxidant activity compound of andaliman fruit andaliman fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* dc.) extract. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, p. 34-40, 2021.

FENG, C-H. et al. Evaluation of different solvents on flavonoids extraction efficiency from sweet oranges and ripe and immature Seville oranges. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 9, p. 3123-3134, 2020.

FERNANDES, J. M. Espécies medicinais do gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae) no Brasil. **Research, Society and Development**. v. 11, n.10, 7 ago. 2022.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R. Essential Oils from Leaves of Two Paraguayan Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* **Journal os Essencial oil Research**, v. 13, p. 200-201, 2001.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos. **Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa**, v. 11, p. 640-643, 2007.

FIORAVANTI, C. **A maior diversidade de plantas do mundo**. Disponível em:< <https://revistapesquisa.fapesp.br/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/>>, 2016.

FLOR, J. et al. Protetores solares. **Química nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.

FRANCO, M. J. C. S.; ALBIERO, A. L. M. Estruturas secretoras em folha e caule de *Esenbeckia febrifuga* (A. St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart.(Rutaceae). **Hoehnea**, v. 45, p. 468-483, 2018.

GAZZANI, G. et al. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsome and the effect of thermal treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4123-4127, 1998.

GONZAGA, W. A. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 08, p. 773-775, 2003.

GROPPO, M.; AFONSO, L. F.; PIRANI, J. R. A review of systematics studies in the *Citrus* family (Rutaceae, Sapindales), with emphasis on American groups. **Brazilian Journal of Botany**, n. 45, p.181–200, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00784-y>

GROOT, A. C.; SCHMIDT, E. Essential oils, part III: chemical composition. **Dermatitis**, v. 27, n. 4, p. 161-169, 2016.

FACUNDO, V. A. et al. Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) Alain. **Química Nova**, v. 28, p. 224-225, 2005.

FILHO, D. E. S. et al. Compostos químicos isolados de extratos e óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum* Linnaeus (Rutaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Hoehnea** 47:Artigo e882019, 1 tab., 1 fig., 2020

GBIG - *Zanthoxylum kleinii* (R.S.Cowan) P.G.Waterman. Disponível em <<https://www.gbif.org/species/3837392>>

GOLDING, C. G. et al. The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. 26516, 2016.

GONÇALVES, M. et al. *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii*: a micromorphological, phytochemical and antibacterial evaluation. **Annals of Medicine**, v. 51, n. sup1, p. 81-81, 2019.

GOODMAN, C. D. et al. Anti-plasmodial effects of *Zanthoxylum zanthoxyloides*. **Planta Medica**, v. 85, n. 13, p. 1073-1079, 2019.

GROSS, E. et al. Téc Valéria. Curso teórico prático de técnicas em microscopia eletrônica. **Universidade Estadual de Santa Cruz**, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants. In: **Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products**. 1999. p. 1-25.

HE, Q.; WANG, W.; ZHU, L. Larvicidal activity of *Zanthoxylum acanthopodium* essential oil against the malaria mosquitoes, *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis*. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, 2018. BioMed Central Ltd.

HU, M. B.; GAO, K. X.; WANG, Y. et al. Characterization of Polysaccharides from the Pericarp of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim by Saccharide Mapping and Their Neuroprotective Effects. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1813, 2023.

HUANG, J.; HUI, H.; GAO, M. et al. Two polysaccharides in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim with protective effects against Parkinson's disease. 2023.

IAS - *International Allelopathy Society*. Disponível em: <https://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/> Acesso em: 17 de junho de 2023.

IBRAR, M. et al. Pharmacognostic and phytochemical studies of *Zanthoxylum armatum* DC. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, 2017.

ISIDORO, M. M. et al. Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Quím. Nova**, v. 35, n. 11, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100004>>

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York and London, 1940.

KHATRI, D. et al. Reducing sugar, total phenolic content, and antioxidant potential of nepalese plants. **BioMed Research International**, 2020.

KIM, J. G. et al. Comparative study of bioactivity and safety evaluation of ethanolic extracts of *Zanthoxylum schinifolium* fruit and pericarp. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5919, 2021.

KUBITZKI, K. et al. Rutaceae. In: **Flowering plants**. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 276-356.

KUMAR SANTHANAM, R. et al. Utilization of the ethyl acetate fraction of *Zanthoxylum rhetsa* bark extract as an active ingredient in natural sunscreen formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 165-172, 2017.

LI, Peiqin et al. Extraction optimization of polysaccharide from *Zanthoxylum bungeanum* using RSM and its antioxidant activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 19-27, 2015.

LI, Yanjun et al. Illicium verum essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination. **Food and chemical toxicology**, v. 141, p. 111347, 2020.

LI, Yan-Nan et al. Linalool, the main volatile constituent from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp, prevents growth of *Aspergillus flavus* in post-harvest grains. **Food Control**, v. 137, p. 108967, 2022.

LOPES, L. T. A. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Apl.** v. 34, n. 4, p. 503-511, 2013.

LOPES, P. H. R. et al. Composição Química e Avaliação do Efeito Alelopático de Óleos Essenciais de *Artemisia absinthium* L. e *Citrus limettioides*. **69ª Reunião Anual da SBPC - UFMG - Belo Horizonte/MG 16 a 22 de julho de 2017**

LU, Qiang et al. *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC: Traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 112946, 2020.

MACÊDO, T. P.; CORTEZ, P. A.; DO BOMFIM COSTA, L. C. First record of colleters in *Zanthoxylum* Linn. species (Rutaceae Juss., Sapindales): structural, functional and taxonomic considerations. **Flora**, v. 224, p. 66–74, 2016.

MAGUIRE, J. D. "Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor." **Crop Sci.** V. 2, p.176-177, 1962.

MANSUR, J. de S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros Dermatologia**, p. 121-4, 1986.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, p. 382-387, 2007.

MARQUES, L. G. A. et al. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**, 2022.

MÁRQUEZ, L. et al. Anti-inflammatory evaluation and phytochemical characterization of some plants of the *Zanthoxylum* genus. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 325, 2005.

MATOS, L. G. et al. Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil.(Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 574-584, 2014.

MEHMOOD, F.; AURANGZEB, M.; MANZOOR, F. et al. A Comparative Study of in vitro Total Antioxidant Capacity, in vivo Antidiabetic and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Leaves and Seeds of *Zanthoxylum armatum* DC. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 18, p. 10221, 2013.

MELO, M. de F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 73-90, 2004.

MENSAH, D. B. Leaf anatomical variation in relation to stress tolerance among some woody species on the Accra plains of Ghana. **Journal of Plant Development**, v. 19, 2012.

METCALFE, C. R. et al. Anatomia das Dicotiledôneas: folhas, caule e madeira, em relação à taxonomia, com notas sobre usos econômicos. Anatomia das Dicotiledôneas: folhas, caule e madeira, em relação à taxonomia, com notas sobre usos econômicos, 1950.

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

MING, C. A. O.; DIAN-XIANG, Z. Leaf epidermal morphology of *Zanthoxylum* *sl* (Rutaceae) from China. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, n. 4, p. 628, 2008.

MOCCELINI, S. K. et al. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 131-133, 2009.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Tribuna Farmacêutica*, v. 47, n. 1, p. 1 - 19, 1979.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of food Engineering*, v. 108, n. 1, p. 216-224, 2012.

MUNTOREANU, T.G.; CRUZ, R, S.; PINNA, G. F. M.; Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. *Plant systematics and evolution*, v. 296, p. 87-99, 2011.

NAIK, R. R. et al. GC-MS analysis and biological evaluation of essential oil of *Zanthoxylum rhesta* (Roxb.) DC pericarp. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 3, p. 181-193, 2015.

NIZAMUTDINOVA, I. T. et al. Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated human umbilical vein endothelial cells. *International immunopharmacology*, v. 8, n. 5, p. 670-678, 2008.

NEGI, J. S.; BISHT, A. K.; BISHT, B. R. et al. Major constituents, antioxidant and antibacterial activities of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, v. 11, n. 2, p. 68-0, 2012.

NOGUEIRA, J. et al. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* nymph. *Parasitology Research*, v. 113, n. 11, p. 4271–4279, 2014. Springer Verlag. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-014-4105-4>>. Acesso em: 26/5/2022.

OGGERO, A. J.; ARANA, M. D.; REINOSO, H. E. Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of species of *Zanthoxylum* (Rutaceae) from Central Argentina. *Polibotánica*, n. 42, p. 121-136, 2016.

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

OLIVEIRA, M. J. R. et al. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

OLIVEIRA, C. F. et al. Parâmetros de controle de qualidade de *Psychotria fraxistipula* lb sm., Klein & delprete (rubiaceae): umidade, cinzas e prospecção fitoquímica. *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 15, n. 4, p. 17-23, 2014.

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, p. 36-44, 2015.

PATRICIO, K. P. et al. O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. **Ciênc. saúde coletiva** 27 (02) 2022.

PAVANI, P.; NAIKA, R. Determination elemental composition and nutrient value of *Zanthoxylum ovalifolium*. **Plant Archives**, v. 21, n. 1, p. 2545-2548, 2021.

PHAM, C. B. et al. The chemical composition and biological activities of essential oils from *Zanthoxylum rhetsa* grown in Son La, Northwest Vietnam. **Journal of Food Quality**, v. 2021, p. 1-8, 2021.

PHI, L. N. T.; VY, T. T. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of peels' essential oils of different pomelo varieties in the south of Vietnam. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 6, p. 2426, 2015.

PHUCHAROENRAK, P.; MUANGNOI, C.; TRACHOOTHAM, D. A green extraction method to achieve the highest yield of limonin and hesperidin from lime peel powder (*Citrus aurantifolia*). **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 820, 2022.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PICCINELLI, A. C. et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 217-224, 2015.

PICOLLO, M; ACETO, M; VITORINO, T. UV-Vis spectroscopy. **Physical sciences reviews**, v. 4, n. 4, p. 20180008, 2018.

PINTO, E. G. et al. A fitoterapia no tratamento de pele: um estudo bibliográfico. **Biodiversidade**, v. 19, n. 3, 2020.

PIRANI, J.R.; GROPPPO, M. **Rutaceae** in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1124>>. Acesso em: 02 jun. 2023

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PYAKUREL, D. et al. Trade potentiality of oils extracted from *Prunus davidiana* (wild apricot), *Sapindus mukorossi* (soapnut) and *Zanthoxylum armatum* (Nepalese pepper) in Kailash Sacred Landscape, Nepal. **Environmental Challenges**, v. 7, p. 100490, 2022.

QIN, F. et al. Isoquinolinas não descritas de *Zanthoxylum nitidum* e seus efeitos antiproliferativos contra linhas celulares de câncer humano. **Fitoquímica**, v. 205, pág. 113476, 2023.

RUTACEAE in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB212>>. Acesso em: 02 jun. 2023

RAMSEY, J. T. et al. Focus: Plant-based Medicine and Pharmacology: Essential Oils and Health. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 93, n. 2, p. 291, 2020.

RIBEIRO, L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & saúde coletiva**, v. 24, p. 1733-1742, 2019.

RIOJA SOTO, T. C. Los metabolitos secundarios de las plantas y potencial uso en el manejo de plagas agrícolas en agroecosistemas desérticos. **Idesia (Arica)**, v. 38, n. 1, p. 3-5, 2020.

RIOS, M. Y. et al. Phytotoxic potential of *Zanthoxylum affine* and its major compound linarin as a possible natural herbicide. **ACS omega**, v. 3, n. 11, p. 14779-14787, 2018.

SACRAMENTO, V. M.; VELOSO, P. H. F.; ROYO, V. A. **Métodos para determinação de capacidade antioxidante** – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

SALGUEIRO, F. B. et al. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. **Química Nova**, v. 37, p. 821-826, 2014.

SÁNCHEZ, H. L. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundários en su adaptación y defensa. **Hermes**, v. 23, n. 2, 2022.

SANTOS, G. R. et al. Avanços analíticos baseados em modelos de calibração de primeira ordem e espectroscopia uv-vis para avaliação da qualidade da água: uma revisão-parte 1. **Química Nova**, v. 45, p. 314-323, 2022.

SHAH, B.; SETH, A. K. Testbook of Pharmacognosy & Phitochemistry. Elsevier, 2010.

SHAN, C. et al. Anti-aging effect of polysaccharides from the peel of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 476-484, 2022.

SHUNMUGAN, S. et al. Morphology and Anatomy of Leaf, Stem and Petiole of *Luvunga crassifolia* Tanaka (Rutaceae). **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**. v. 17. n. 6, p. 818-828, dez. 2021.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p. 13-25, 2007

SIBERO, M. T. et al. Antibacterial, cytotoxicity and metabolite profiling of crude methanolic extract from andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) fruit. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 9, 2020.

SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils from *Zanthoxylum Rhoifolium*. Leaves. *Pharmaceutical Biology*, v. 44, n. 9, p. 657-659, 2006.

SILVA, C. V. da et al. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Química Nova**, v. 31, p. 2052-2055, 2008.

SILVA, F. H. et al. Phytochemical profile and cytotoxic activitys of *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil extract. **International Journal of Bioscience and Medicine**. 2020; 4:10

SILVEIRA, E. R.; CARVALHO, J. C. S.; MATOS, T. M. Da planta ao fármaco: uma abordagem fitoquímica. in **BOTANICA DE INVERNO**, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2021.

SHAHIDA, S. et al. Use of laser-induced break spectroscopy for the determination of major and trace elements in *Zanthoxylum armatum*. **Emergent Materials**, v. 3, p. 625-636, 2020.

SINGH, A. et al. Biological activities and Phytochemical analysis of *Zanthoxylum armatum* DC. leaves and bark extracts collected from Kumaun region, Uttarakhand, India. **J. Med. Herbs Ethnomed**, v. 6, p. 1-10, 2020.

STEINBERG, Kelly Marie; SATYAL, Prabodh; SETZER, William N. Bark essential oils of *Zanthoxylum clava-herculis* and *Ptelea trifoliata*: Enantiomeric distribution of monoterpenoids. **Natural product communications**, v. 12, n. 6, p. 1934578X1701200632, 2017.

SUPABPHOL, R.; TANGJITJAREONKUN, J. Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum limonella* (Rutaceae): A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 1. Dec. 2014. University of Benin.

SUREK, M. et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021.

SUREK, Monica et al. Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. **LWT**, v. 161, p. 113370, 2022.

SYARI, D. M. et al. Evaluation of cytotoxic activity alkaloid fractions of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. Fruits. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 22, p. 3745, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGERT, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p. TRUEBA, G. P.; SANCHEZ, G. M. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 20, p. 297-306, 2001.

TAN, M. A.; SHARMA, N.; AN, S. S. A. Phyto-carbazole alkaloids from the rutaceae family as potential protective agents against neurodegenerative diseases. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 493, 2022.

TAVARES, J. T. de Q. et al. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química nova**, v. 33, p. 805-809, 2010.

TINE, Y. et al. LC-MS/MS analysis of flavonoid compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts and their antioxidant activities. **Natural product communications**, v. 12, n. 12, p. 1934578X1701201213, 2017.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential Oil Safety A Guide for Health Care Professionals**. 2 ed. 2014.

TOMEI, R.R; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Encontro Latino Americano De Iniciação Científica**, v. 11, p. 1963-1967, 2007.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 28 Oct 2023  
<<https://tropicos.org/name/50100200>>

TRUNG, Hoang D. et al. Chemical Constituents of Essential Oils from the Leaf, Flower and Fruit of *Zanthoxylum Avicenna* (Lam.) DC. (Rutaceae) from Vietnam. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 4, p. 1019-1024, 2016.

TURNES, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, 2014.

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, p. 216-223, 2006.

VENTRELLA, M. C.; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A. et al. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. **Viçosa, Universidade Federal de Viçosa**, 2013.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. (Ed.). **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Springer Science & Business Media, 2000.

VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.

VILLALBA, M. A.; CARMO, M. I.; LEITE, M. N.; SOUSA, O. V. **Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae)**. 2007.

ZAGO, L. M. S. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**. v.3. n.1. 2018

ZAMORA, C. M. P. ; TORRES, C. A.; GONZALEZ, A. M. Strategies to Improve Antimicrobial Activity of Natural Products: Approaches and Challenges. **Bioprospecting of Tropical Medicinal Plants**, p. 1265-1298, 2023.

ZHANG, Y.; WANG, F. Carbohydrate drugs: current status and development prospect. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 79-87, 2015.

ZHANG, M. et al. *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.(Rutaceae): a systematic review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2172, 2017.

ZHANG, J. et al. Anti-fungal activity, mechanism studies on  $\alpha$ -Phellandrene and Nonanal against *Penicillium cyclopium*. **Botanical studies**, v. 58, p. 1-9, 2017.

ZHANG, Shuaibing et al. Effects of hexanal fumigation on fungal spoilage and grain quality of stored wheat. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 10-17, 2021.

ZHANG, J.; YU, L.; HAN, N.; WANG, D. Characterization of phenolic chemotypes, anatomy, and histochemistry of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. **Industrial Crops and Products**, v. 193, p. 116149, 2023.

ZHENG, T.; SU, K-X.; SOL, B-Y. et al. Mecanismos de regulação da biossíntese de flavonóides de cascas de Hancheng Dahongpao (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim) em diferentes estágios de desenvolvimento por análise integrada de metabolômica e transcriptômica. **BMC Biologia Vegetal** , v. 1, pág. 1-15, 2022.

ZHOU, L. et al. Construction and antitumor activity of selenium nanoparticles decorated with the polysaccharide extracted from *Citrus limon* (L.) Burm. f.(Rutaceae). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 904-913, 2021.

ZHOU, X. et al. FT-IR methodology for quality control of arabinogalactan protein (AGP) extracted from green tea (*Camellia sinensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5121-5128, 2009.

WAGNER, H.; BLADR, S. **Plants drugs analysis**. 2o ed. Berlin, 2001.

WATERMAN, G. P. Phytochemical diversity in the order rutales. In: DOWNUM, K. R.; ROMEO, J. T.; STAFFORD, H. A. **Phytochemical Potential of Tropical Plants**. V. 27, Plenum Press, New York, 1993. P. 203-233.

WESTON, Leslie A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agronomy journal**, v. 88, n. 6, p. 860-866, 1996.

WFO – Plant List. Disponível em: <<https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-7000000536-2022-12?page=1>>

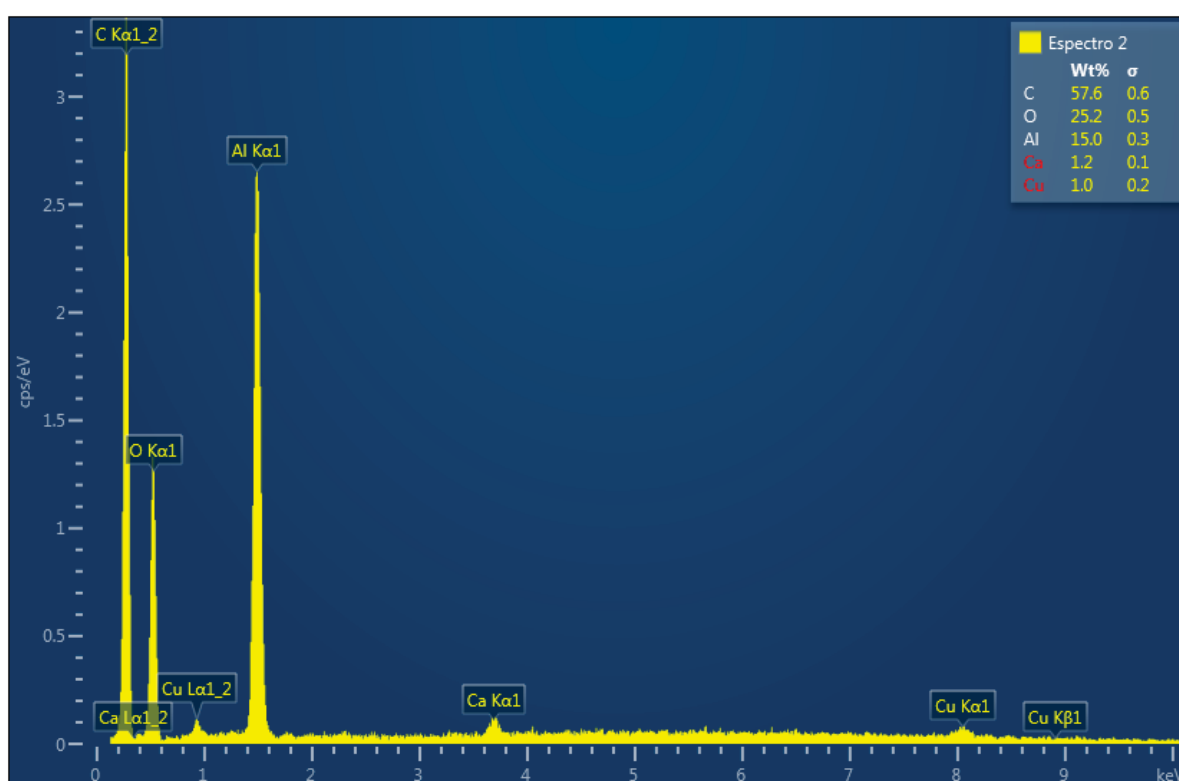
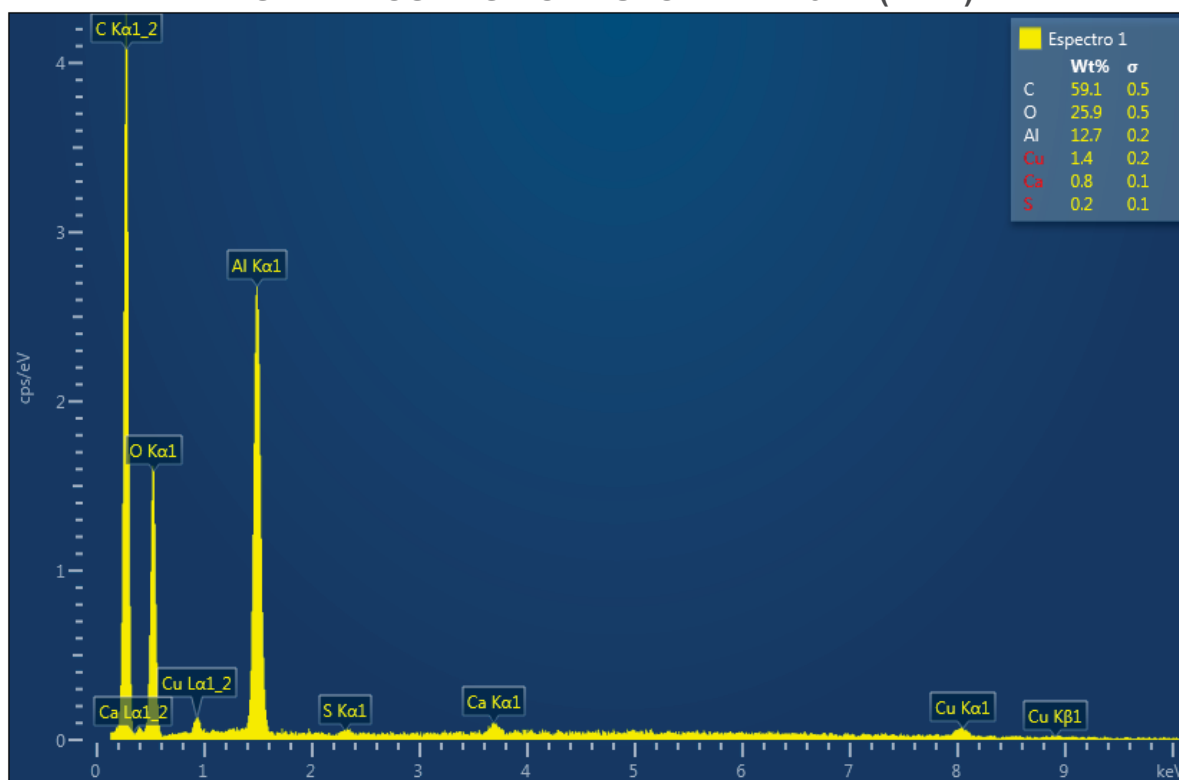
WHO. WHO establishes the Global Centre for Traditional Medicine in India, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/25-03-2022-who-establishes-the-global-centre-for-traditional-medicine-in-india>>. Acesso em: 14/12/2023

WONGKATTIYA, N. et al. Chemical compositions and biological properties of essential oils from *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC and *Zanthoxylum limonella* Alston. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 2, p. 12-18, 2018.

YAIPHAREMBI, N.; HUIDROM, E.; SINGH, H. B. Traditional importance, phytochemicals and pharmacological properties of Indian Prickly Ash (*Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC.): A review. **Pleione** 16(2): 115 - 129. 2022.

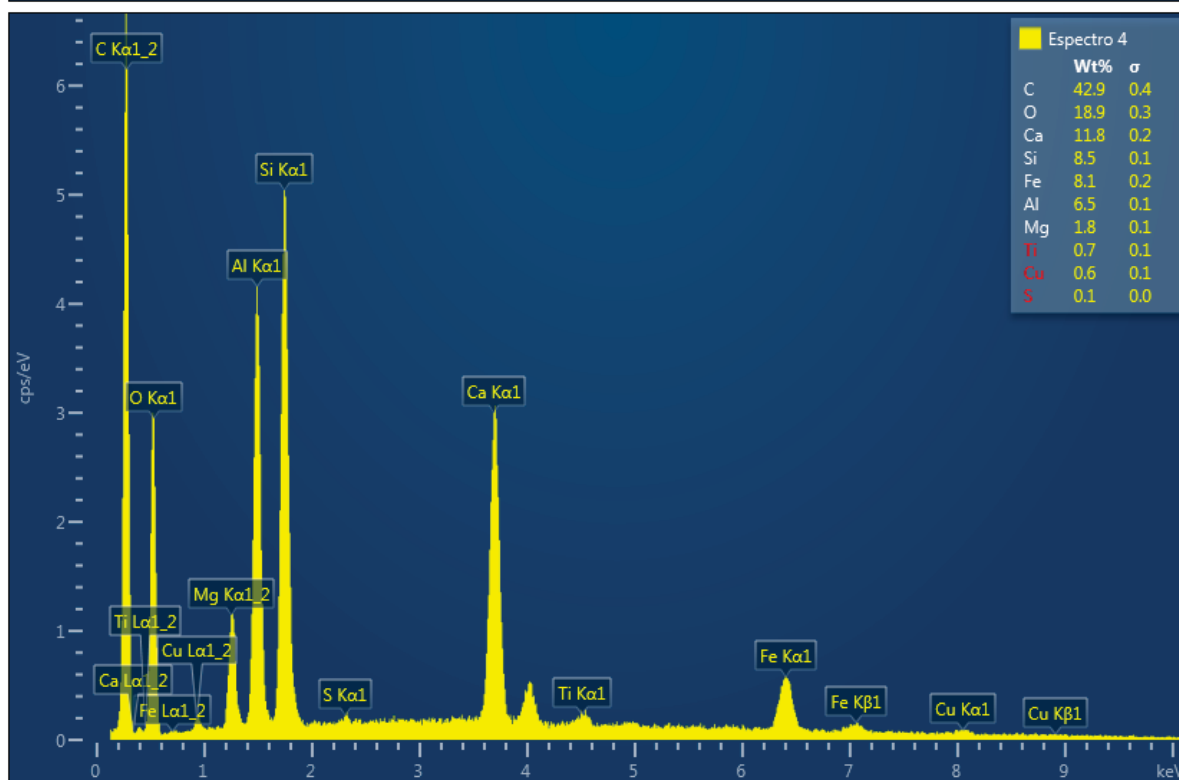
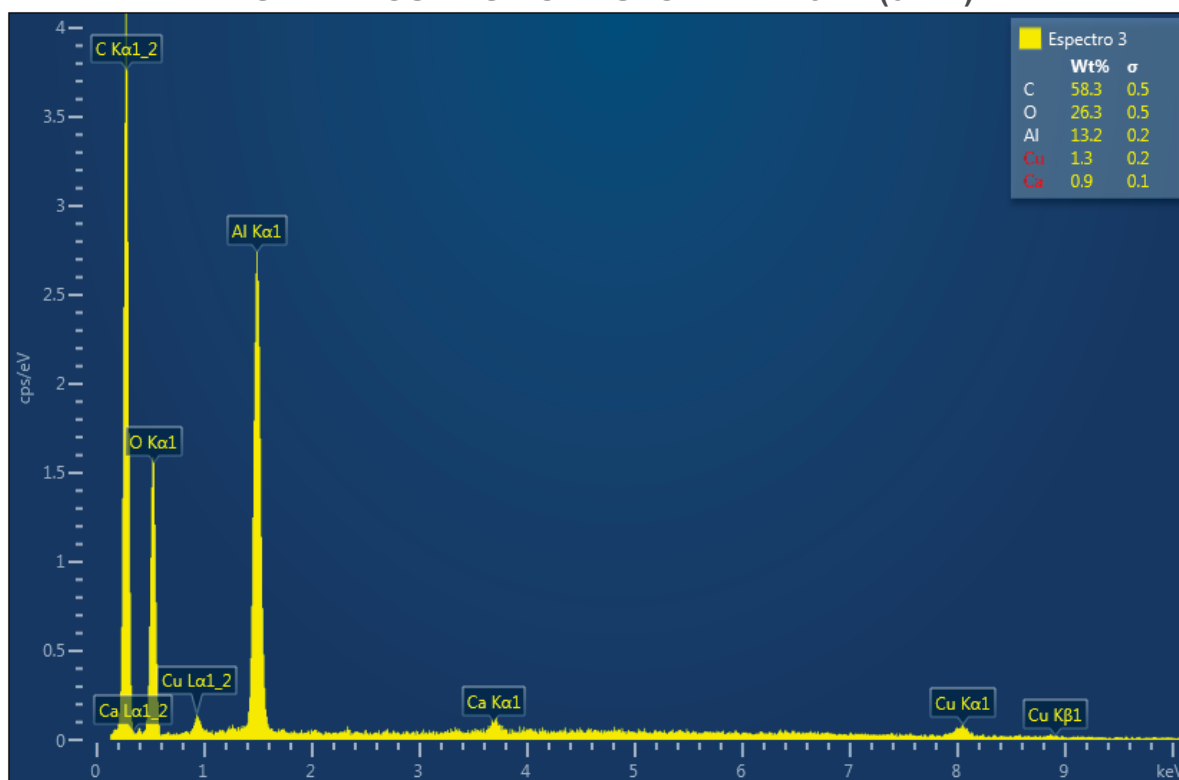
YARLEY, O. P. N. et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. **International journal of biological macromolecules**, v. 183, p. 2262-2271, 2021.

## APÊNDICE 1 – ESPECTROS EDS DO FRUTO DE *Z. kleinii* (1 E 2)



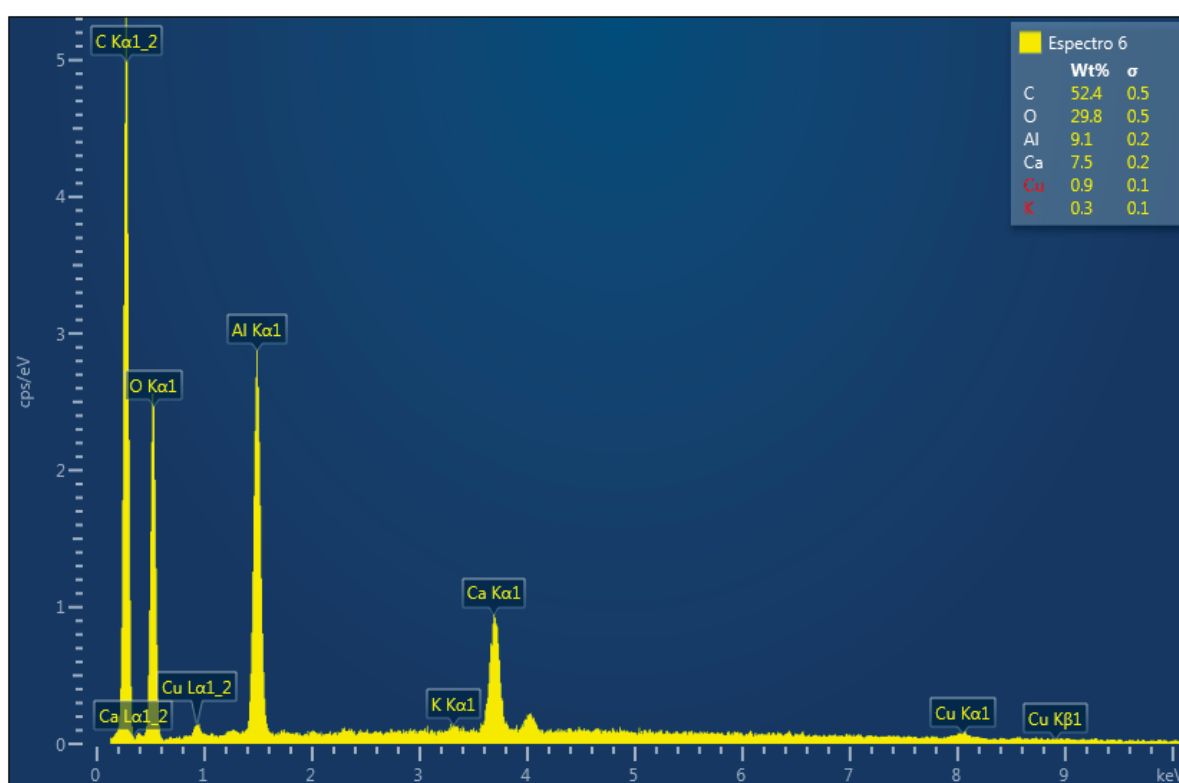
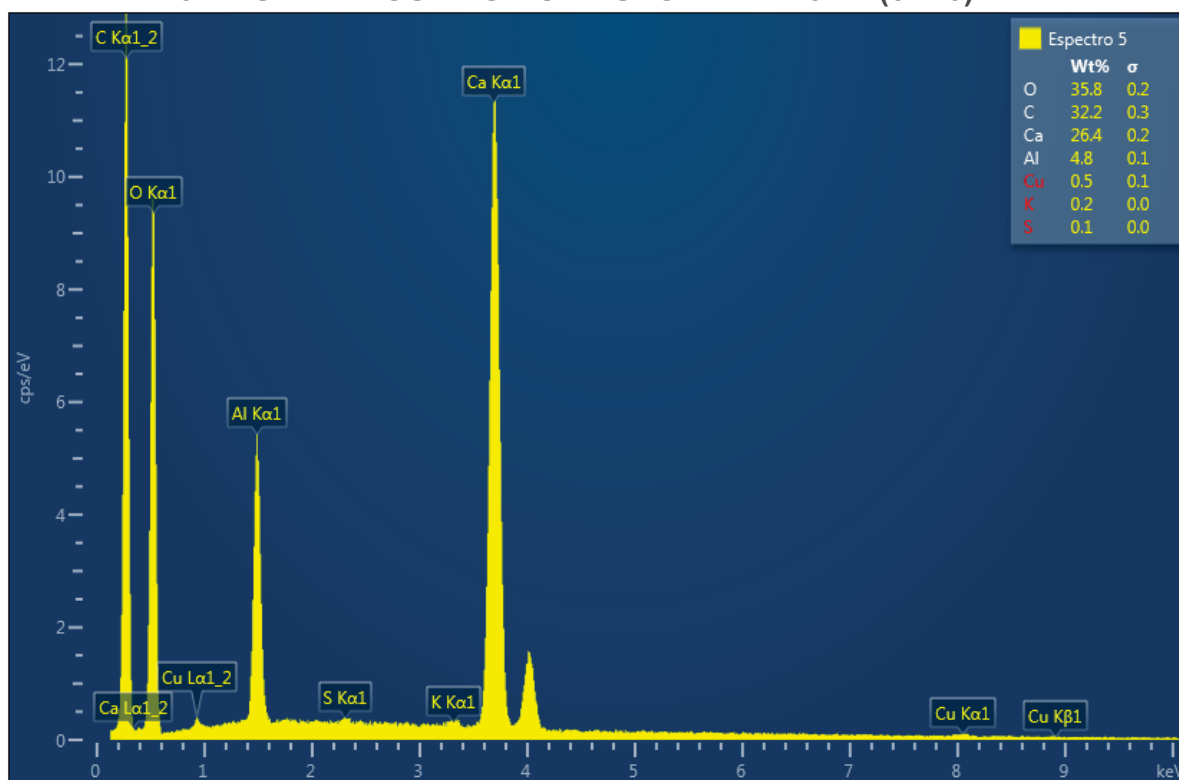
FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 2 – ESPECTROS EDS DO FRUTO DE *Z. kleinii* (3 E 4)



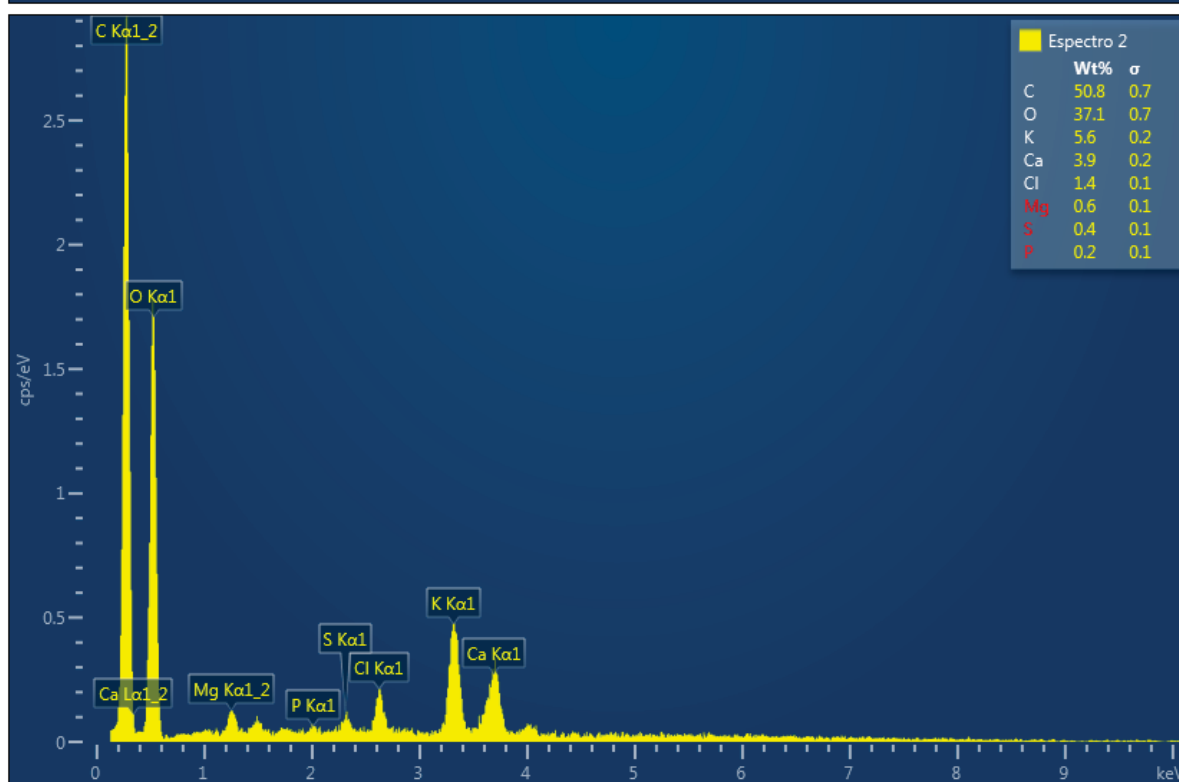
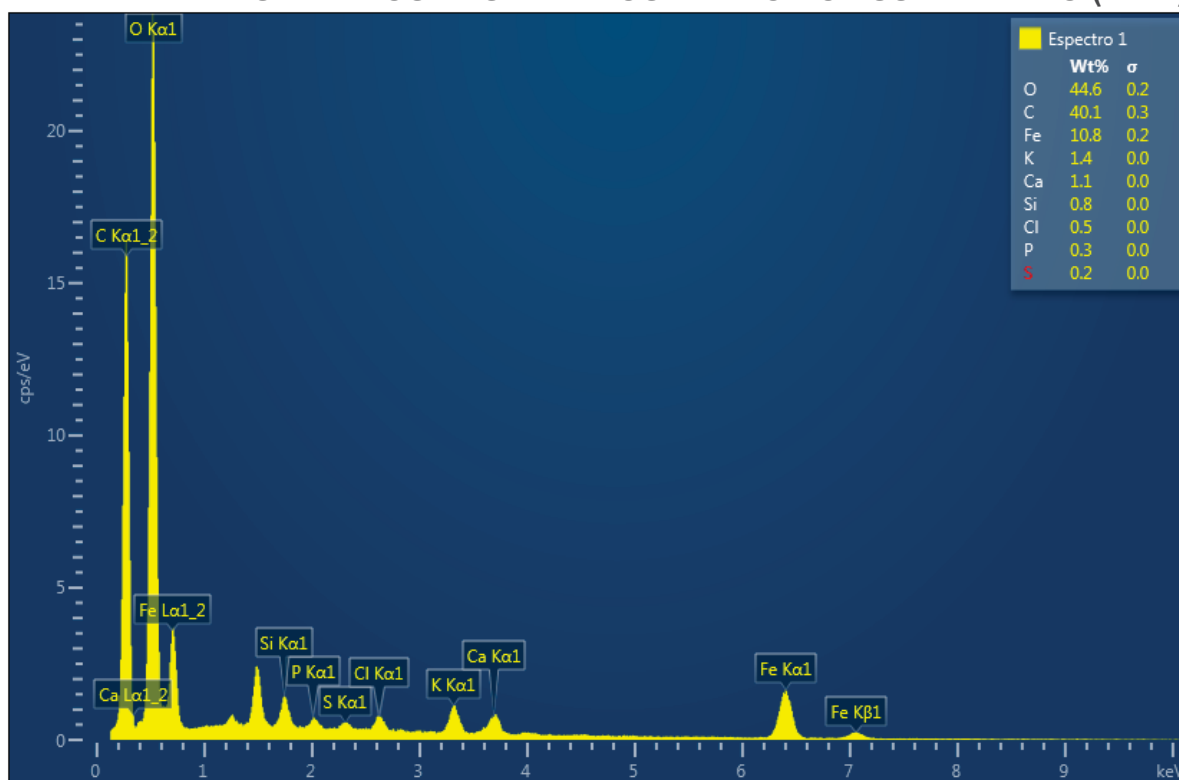
FONTE: CME, UFPR (2023).

### APÊNDICE 3 – ESPECTROS EDS DO FRUTO DE *Z. kleinii* (5 E 6)



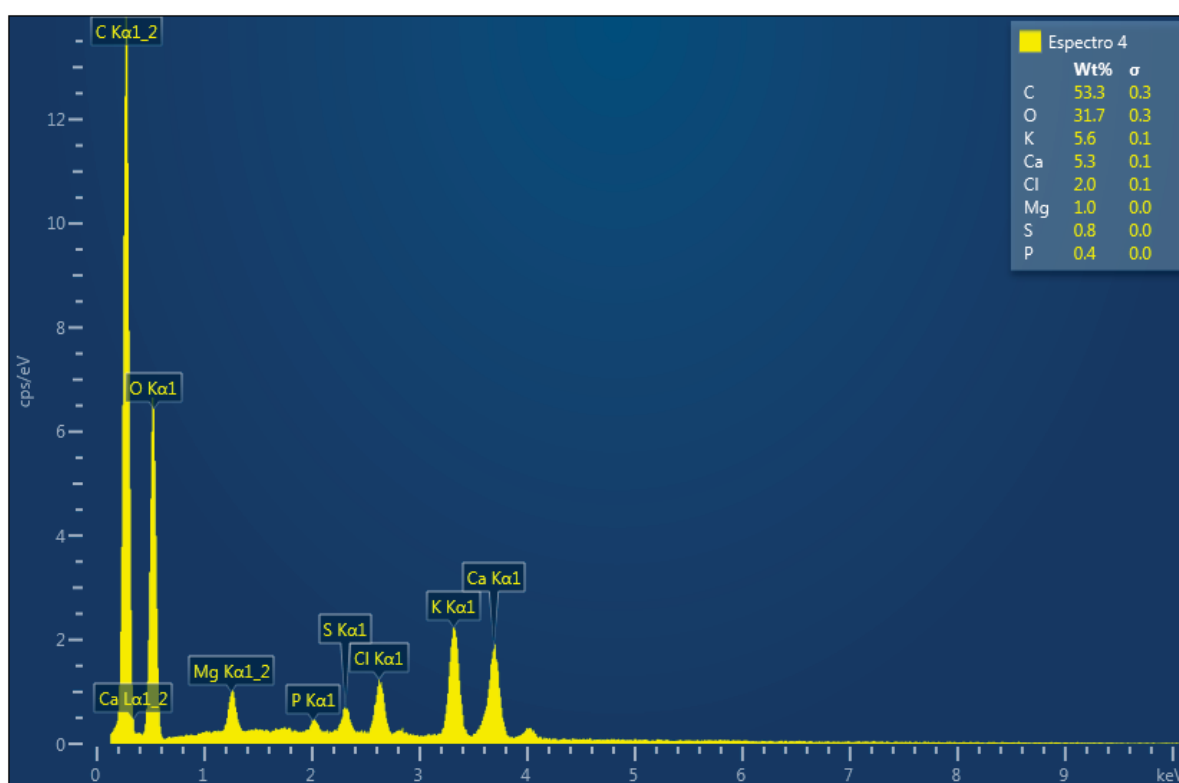
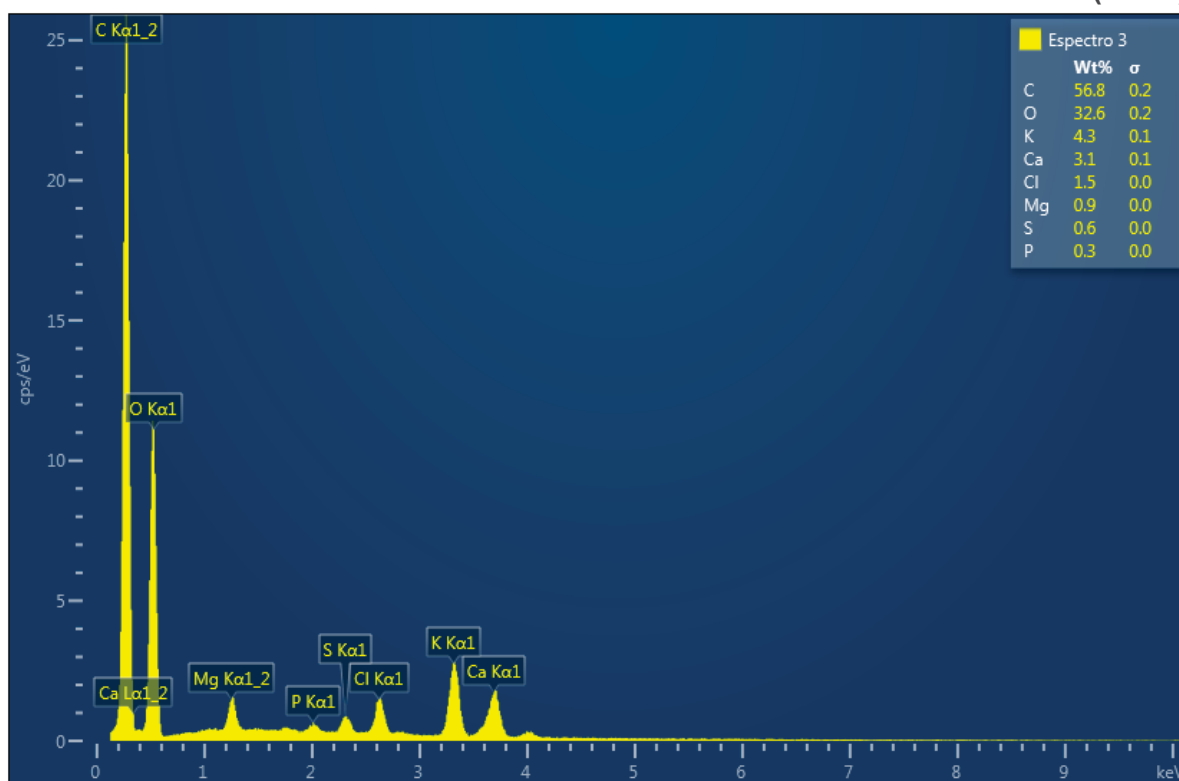
FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 4 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (1 E 2)



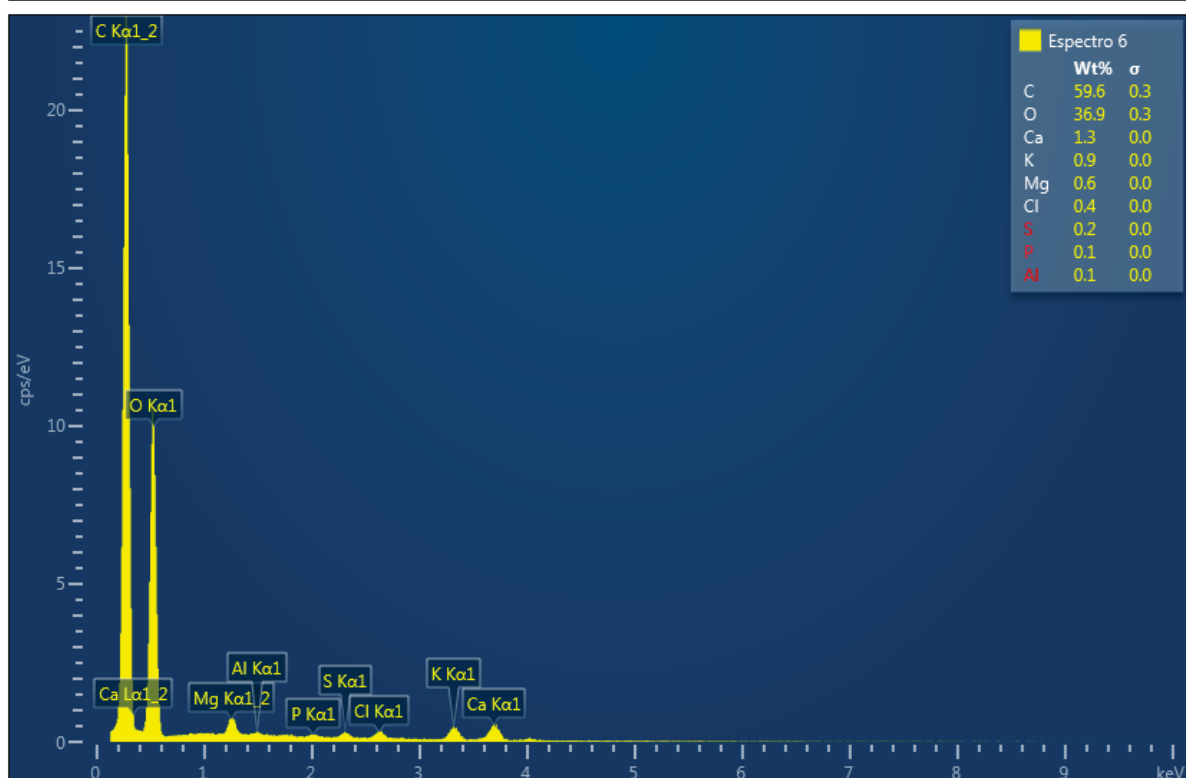
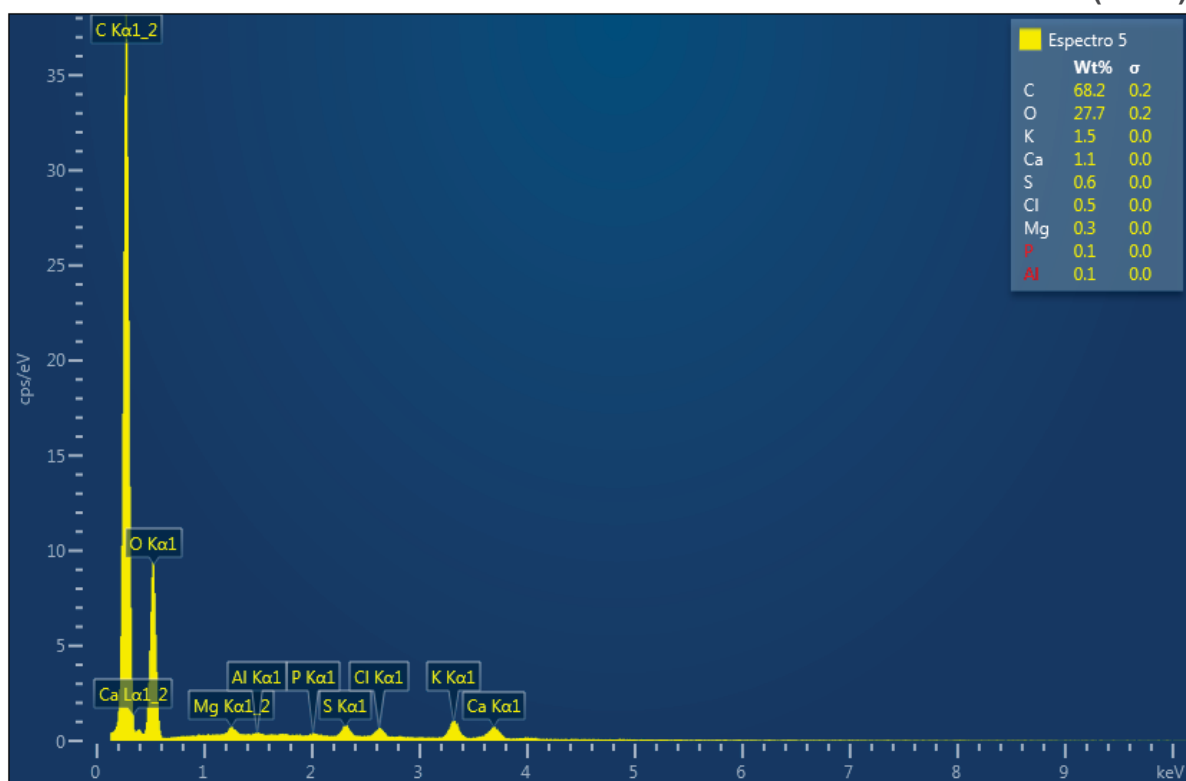
FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 5 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (3 E 4)



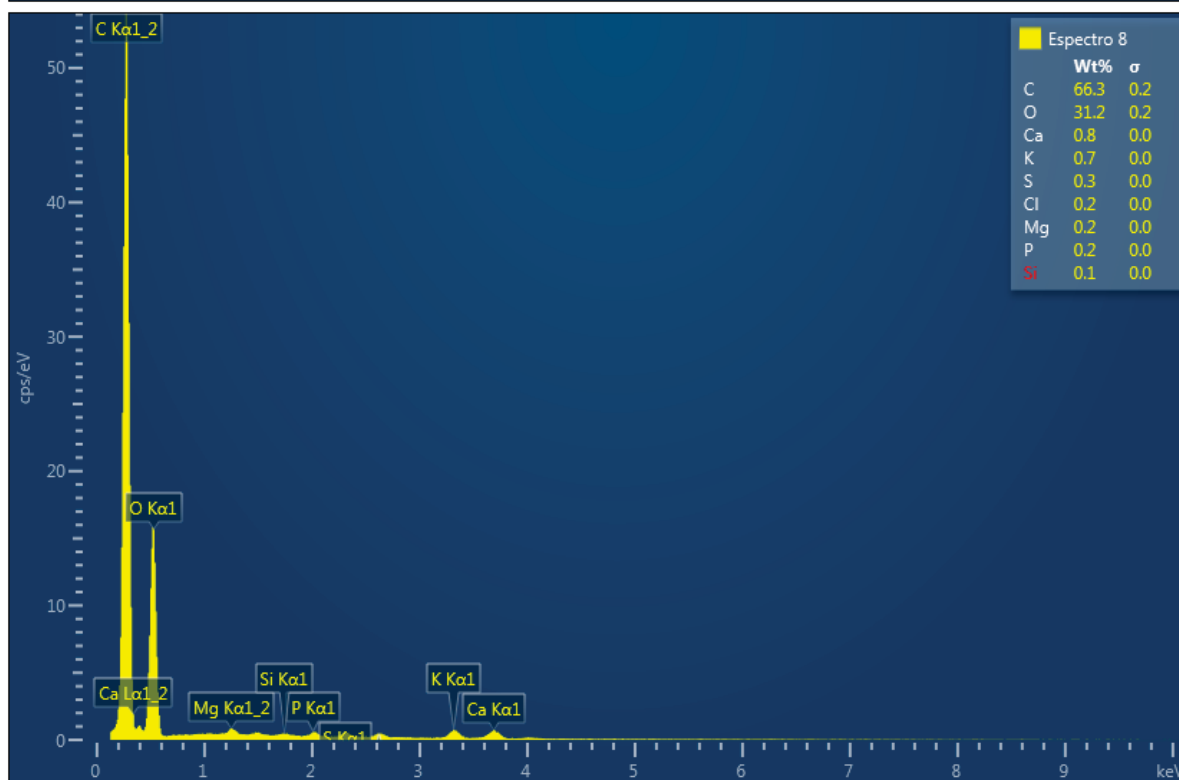
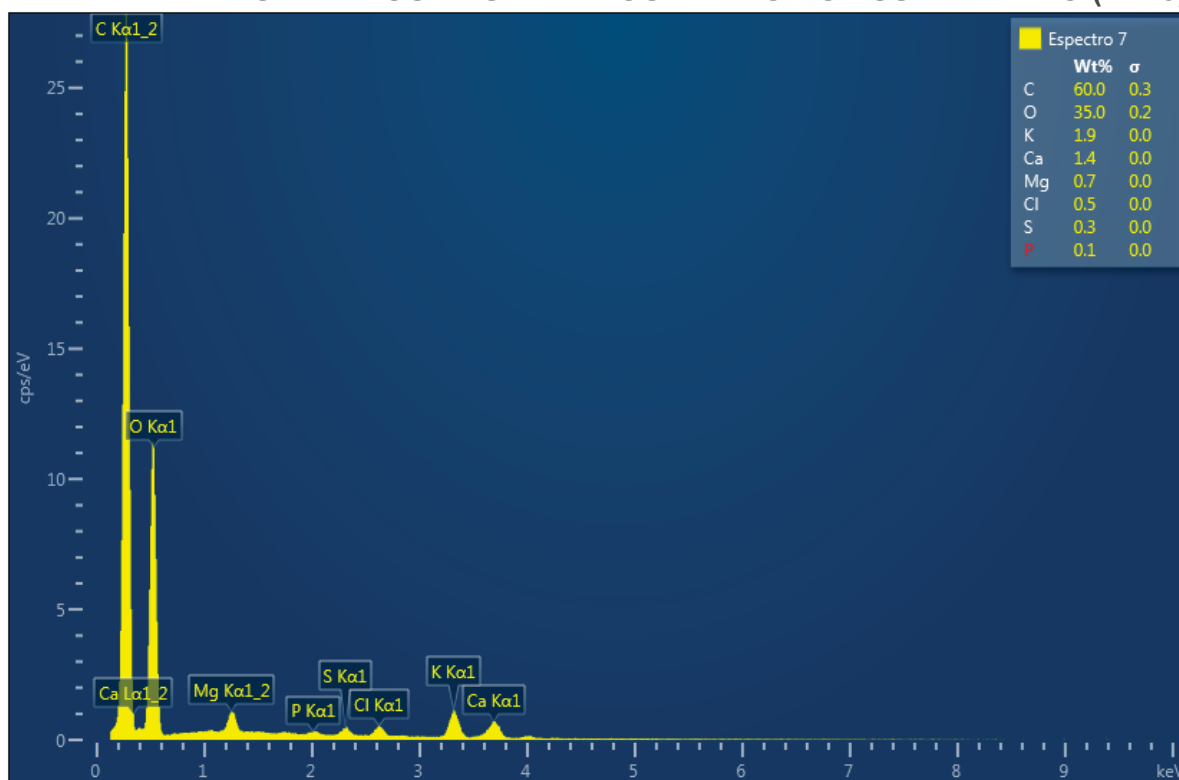
FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 6 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (5 E 6)



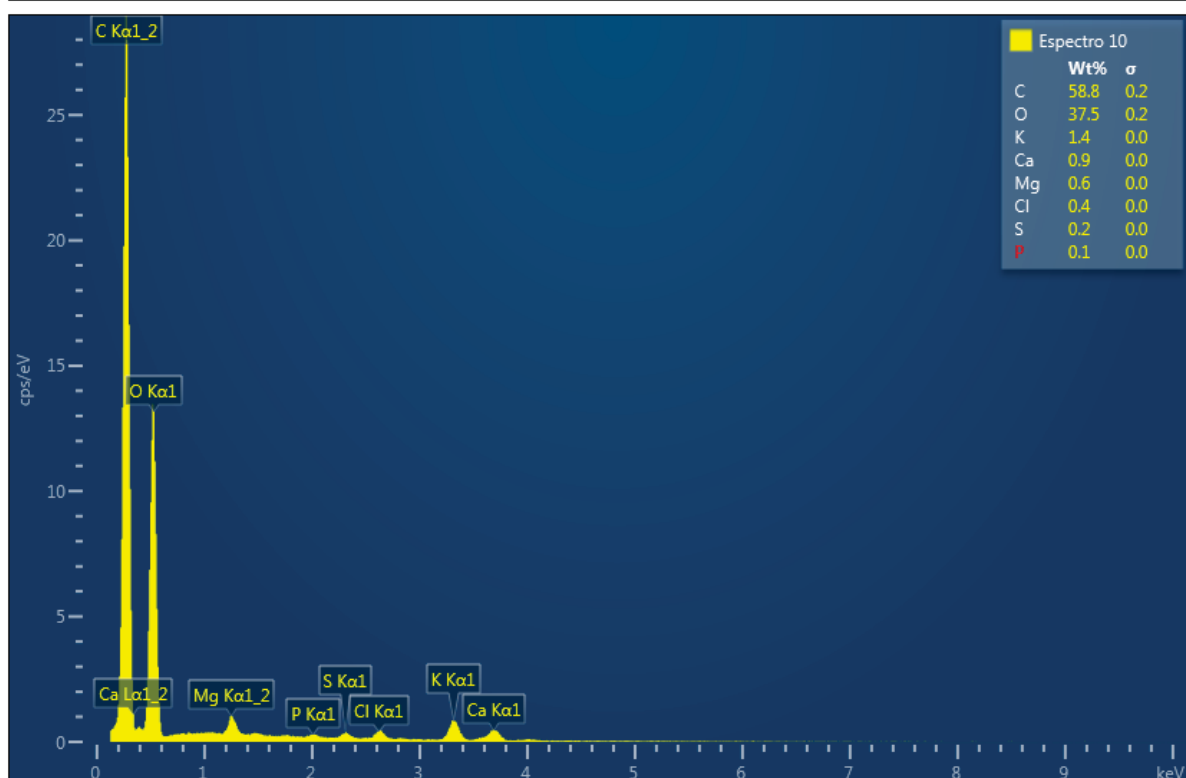
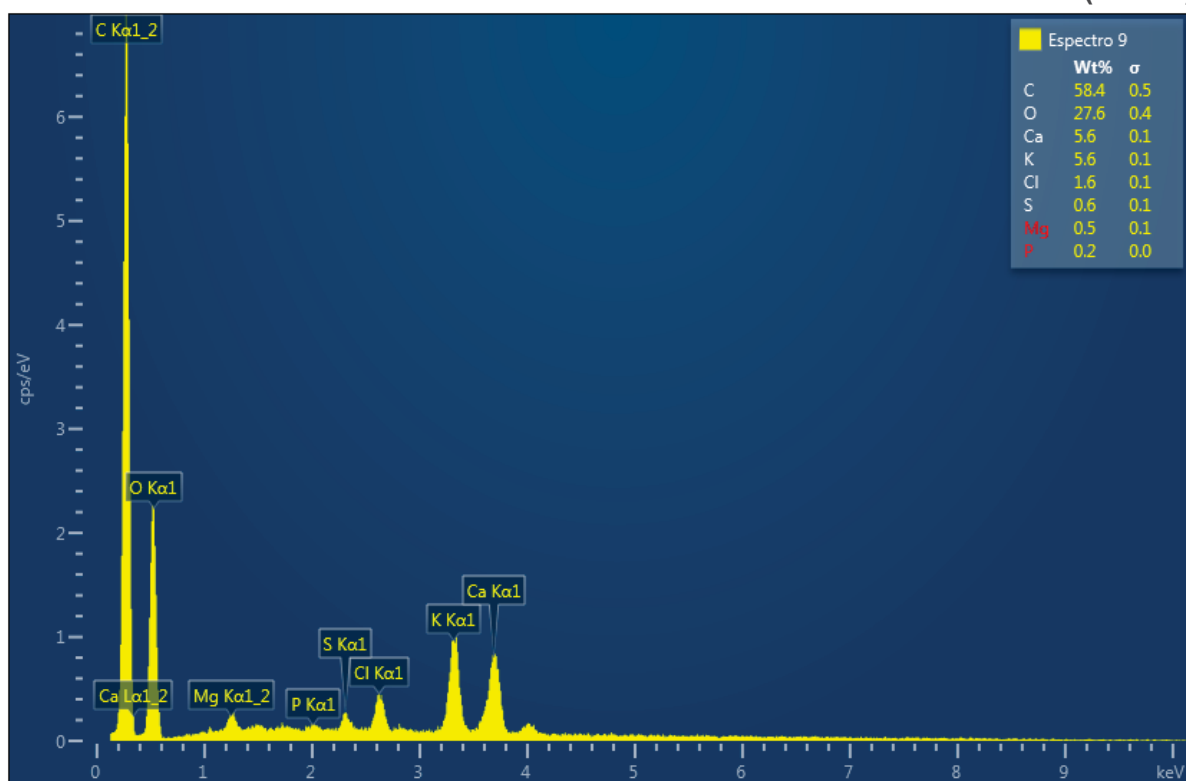
FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 7 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (7 E 8)




FONTE: CME, UFPR (2023).

## APÊNDICE 8 – ESPECTROS EDS DA AMOSTRA DO POLISSACARÍDEO (9 E 10)



FONTE: CME, UFPR (2023).

## ANEXO 1 – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO – SISGEN.



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

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
 Cadastro nº A0A1FD4

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

Número do cadastro:	A0A1FD4
Usuário:	Universidade Federal do Paraná
CPF/CNPJ:	75.095.679/0001-49
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

**Espécie**

Zanthoxylum kleinii  
 Cupania vernalis  
 Symplocos tetrandra


Título da Atividade: Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico de espécies vegetais

**Equipe**

Josiane de Fatima Gaspari Dias	Universidade Federal do Paraná
Karine Amorim Fladzinski	UFPR
KALIANE ASSUNÇÃO FARIA DA SILVA	UFPR
JULIANA DE FÁTIMA GARCIA	UFPR
Obdulio Gomes Miguel	UFPR
Marilis Dallarmi Miguel	UFPR
Deise Prehs Montrucchio	UFPR

Data do Cadastro:	05/09/2022 12:18:11
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:18 de 05/09/2022.



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