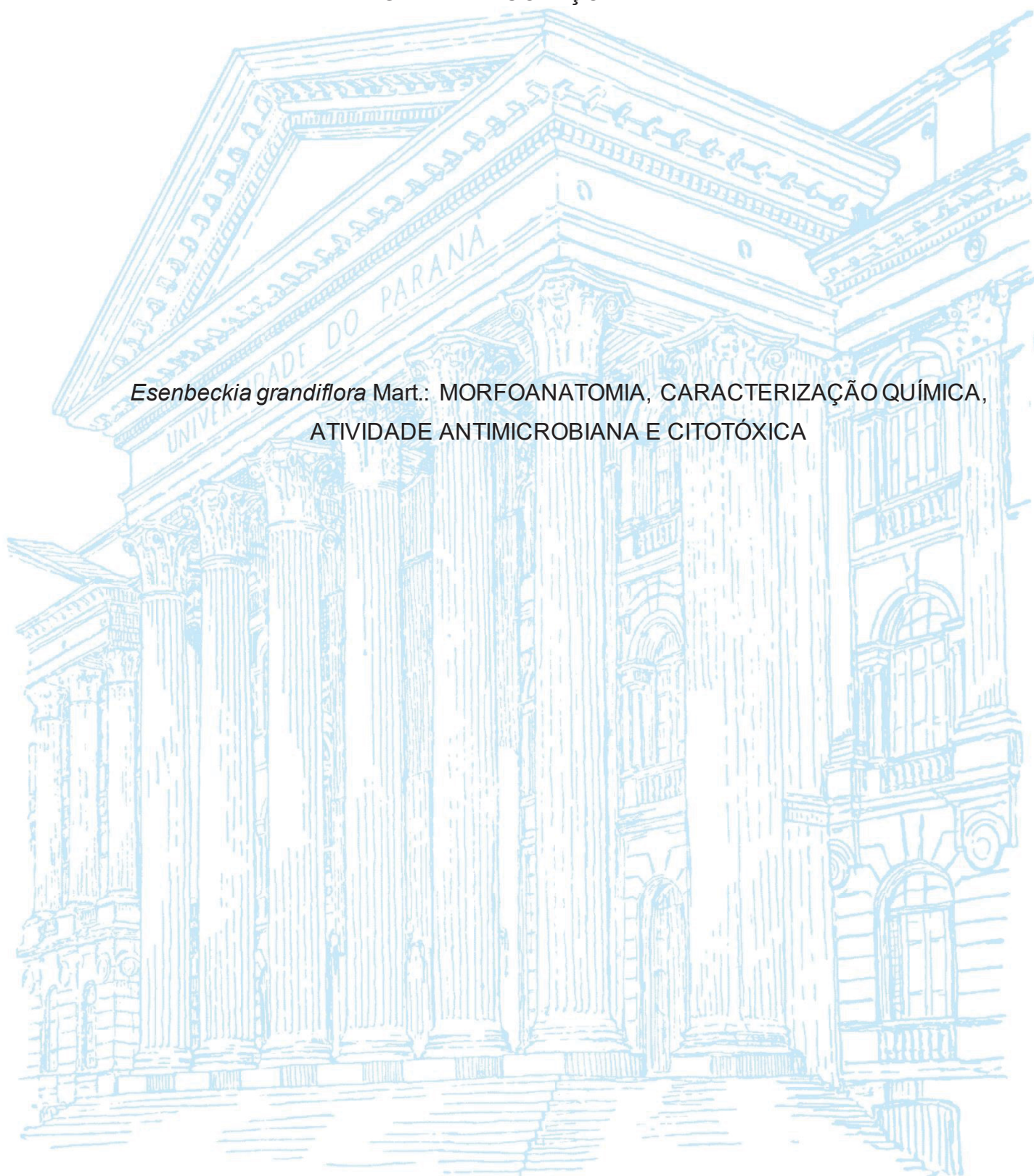


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA COLAÇO SILVESTRE

Esenbeckia grandiflora Mart.: MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA



CURITIBA

2022

GABRIELA COLAÇO SILVESTRE

Esenbeckia grandiflora Mart.: MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA

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

Orientador: Prof. Dr Fábio Seigi Murakami
Coorientadora: Prof^a Dr^a Thalita Gilda Santos

CURITIBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Silvestre, Gabriela Colaço

Esenbeckia grandiflora Mart. [recurso eletrônico] : morfoanatomia, caracterização química, atividade antimicrobiana e citotóxica / Gabriela Colaço Silvestre – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami

Coorientador: Profa. Dra. Thalita Gilda Santos

1. Rutaceae. 2. Microscopia. 3. Óleos voláteis. I. Murakami, Fábio Seigi. II. Santos, Thalita Gilda. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.75

TERMO DE APROVAÇÃO



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 **GABRIELA COLAÇO SILVESTRE** intitulada: *Esenbeckia grandiflora* Mart: **MORFOANATOMIA, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**, sob orientação do Prof. Dr. FÁBIO SEIGI MURAKAMI, 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, 28 de Novembro de 2022.


FÁBIO SEIGI MURAKAMI

Presidente da Banca Examinadora


JANE MAVRON BUÉL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)


WESLEY MAURÍCIO DE SOUZA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gilmar e Ana Silvestre,
a Ismael Kozoski [*in memoriam*] e,
a todos que de alguma forma se fizeram presentes em minha vida.

AGRADECIMENTO

A vida ensina que devemos ser sempre gratos. Gratos pelas bênçãos e a tudo que recebemos do universo e, principalmente, pelas pessoas que atravessam a nossa vida e que se instalam trazendo ensinamentos pessoais e profissionais. A realização deste trabalho é fruto de uma construção, na qual a participação de cada um foi essencial.

Primeiramente, agradeço à **Deus** por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final. Agradeço aos meus pais, **Gilmar e Ana Silvestre**, por nunca terem medido esforços para me proporcionarem um ensino de qualidade, dando todo o suporte e incentivo necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Aos meus irmãos, **Rafaela e Vinícius Silvestre**, pelo companheirismo e apoio em todas as etapas de minha vida. Ao meu namorado, **Guilherme Kozoski**, por ter me incentivado nos momentos difíceis, pelo companheirismo, suporte e por sempre acreditar em mim. Aos meus amigos (em especial a **Kathllen, Lorayne, Drielly, Paula, Julia e Douglas**), que sempre se fizeram presentes em minha vida e acreditaram em meus sonhos. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelos abraços e sorrisos compartilhados. A todos: agradeço por compreenderem minha ausência enquanto me dedicava a este projeto.

Ao meu orientador **Dr. Fábio Seigi Murakami**, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

À minha coorientadora **Dra. Thalita Gilda Santos**, por ter confiado em mim para realizar esse projeto e tantos outros. Obrigada por estar sempre disponível, por esclarecer inúmeras dúvidas, pelas palavras de incentivo, pelos conselhos, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade durante o processo. Obrigada por ajudar a construir a profissional e pessoa que sou hoje!

Ao botânico **Dr. André Luis de Gasper**, pela coleta e identificação do material vegetal utilizado no desenvolvimento desse projeto. À professora **Dra. Lorene Armstrong**, pelo suporte e ensinamentos transmitidos. Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (**C-LABMU**) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelas análises realizadas em microscopia eletrônica de varredura. À professora **Dra. Amanda Crisma** do laboratório de Hematologia (UFPR), pela câmera utilizada nas fotografias expostas neste trabalho.

A professora **Dra. Beatriz Helena L. de N. S. Maia** e aos colegas do laboratório LAPNEQ (UFPR), em especial à **Ma. Rebeca Gabriel de Camargo** e **Sara S. L. Graf**, por me receberem e auxiliarem quando a elas recorri. Ao professor **Dr. Cícero Deschamps** e ao **Dr. Roger Raupp Cipriano** do laboratório de Ecofisiologia (UFPR) pela análise de CG-DIC. Ao **Thiago José dos Santos**, por todo suporte técnico, treinamento e trocas de experiências no CG-EM.

A **Ma. Maria da Graça T. de Toledo** da Central Analítica pelo suporte e liofilização das amostras. A **Dra. Flávia L. D. Pontes** do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LCE) da UFPR, pelas análises em CL-EM/EM. Ao professor **Dr. Wesley M. de Souza** por possibilitar que as análises de citotoxicidade pudessem ser realizadas e, as minhas colegas **Ma. Juliana C. Atherino** e **Dra. Andressa F. Santos**, por todos os conhecimentos compartilhados. A minha amiga **Mariana Mengarda**, pela amizade e conhecimento compartilhado nos ensaios microbiológicos.

A minha parceira e amiga de laboratório **Ma. Viviana Michaluz**, pela companhia, conversas e por tornar meus dias de pesquisa mais leves.

A minha grande amiga **Lorayne Veri**, por me dar suporte emocional durante mais esta etapa da minha vida e, por ser minha consultora no *RStudio*.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** da UFPR, que tornaram possível a realização desta dissertação. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo auxílio financeiro. À **Universidade Federal do Paraná** pela infraestrutura e a todos os professores do curso, pela elevada qualidade de ensino oferecido.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero **muito obrigada!**

EPÍGRAFE

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

O gênero *Esenbeckia* Kunth. apresenta 28 espécies e, dentre estas têm-se *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae), uma árvore nativa brasileira amplamente presente na América do Sul. Popularmente conhecida como pau-de-cutia, canela-de-cutia e guaxupita, estudos relatam sua atividade antimicrobiana, inseticida e larvicida, além do potencial uso contra psoríase. O objetivo deste trabalho foi investigar a morfoanatomia, composição química, atividade antimicrobiana e atividade citotóxica dessa espécie. Técnicas de microscopia de luz óptica e eletrônica de varredura, bem como testes microquímicos foram realizados com folíolos, galho e fruto. Obteve-se o óleo volátil a partir da hidrodestilação de folíolos da espécie, o qual foi analisado por CG-EM e CG-DIC. Frações voláteis dos folíolos e galhos foram caracterizados por SHS-GC-MS. As condições de tempo e temperatura de incubação em *headspace* estático foram determinadas a partir de um planejamento fatorial 2² com ponto central. Extratos brutos provenientes do folíolo e do galho foram analisados por CL-EM/EM e testados frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Candida albicans* (ATCC 10231) para verificar sua atividade antimicrobiana. A atividade citotóxica do extrato dos folíolos foi avaliada frente às células HRT-18 e MDA-MB-231. Os resultados da morfoanatomia demonstraram que o folíolo é hipostomático e possui mesofilo dorsiventral, com nervura central colateral aberta. Cavidades secretoras, tricomas tectores e glandulares (raros) foram observados em folíolos, pecíolos e galhos da espécie. O fruto apresenta hipoderme uniestratificada e mesoderme com células parenquimáticas, cavidades secretoras e feixes vasculares. A injeção direta do óleo volátil possibilitou a identificação de 49 constituintes, em que se destacam como majoritários o germacreno D (28,32%) e biciclogermacreno (20,97%). A análise por S-HS dos folíolos permitiu a identificação de 53 constituintes, em que γ -muuroleno (18,04%) e (4Z)-hexenol (16,71%) são os mais abundantes. Para a fração volátil dos galhos, 53 compostos foram identificados, sendo γ -muuroleno (13,25%) e o δ -cadineno (10,52%) os de maior concentração. Ambos apresentaram perfis com predomínio de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Nos ensaios antimicrobianos, o extrato bruto dos folíolos não apresentou atividade frente aos microrganismos testados e o extrato bruto do galho apresentou uma CIM = 50,0 mg/mL frente as bactérias testadas. Para a atividade citotóxica, o extrato dos folíolos apresentou atividade promissora frente a linhagem HRT-18 (CI₅₀ = 69,16 μ g/mL e IS = 1,93).

Palavras-chaves: Rutaceae; *Esenbeckia grandiflora*; microscopia; óleo essencial; fração volátil; *headspace* estático.

ABSTRACT

The genus *Esenbeckia* Kunth. has 28 species and among them is *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae), a Brazilian native tree widely present in South America. Popularly known as *pau-de-cutia*, *canela-de-cutia* and *guaxupita*, studies report its antimicrobial, insecticidal and larvicidal activity, besides its potential use against psoriasis. The objective of this work was to investigate the morphoanatomy, chemical composition, antimicrobial activity, and cytotoxic activity of this specie. Optical and scanning electron microscopy techniques as well as microchemical tests were performed on leaflet, branch, and fruit. Volatile oil was obtained from hydrodistillation of leaflets of the specie, which was analyzed by GC-MS and GC-FID. Volatile fractions from the leaflets and branches were characterized by SHS-GC-MS. The incubation time and temperature conditions in static headspace were determined from a 2² factorial design of center point. Crude extracts from leaflet and branch were tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) and *Candida albicans* (ATCC 10231) to verify their antimicrobial activity. The cytotoxic activity of the leaflet extract was evaluated against HRT-18 and MDA-MB-231 cells. The results of morphoanatomy showed that the leaflet is hypostomatic and has dorsiventral mesophyll, with an open collateral central vein. Secretory cavities, non glandular trichomes and, rarely glandular trichomes were observed in leaflets, petioles, and branches of the specie. The fruit presents unstratified hypodermis and mesoderm with parenchymatic cells, secretory cavities, and vascular bundles. Direct injection of the volatile oil allowed the identification of 49 constituents, in which germacrene D (28.32%) and bicyclogermacrene (20.97%) both stand out as the major ones. The S-HS analysis of the leaflets allowed the identification of 53 constituents, in which γ -muurolene (18.04%) and (4Z)-hexenol (16.71%) are the most abundant. For the volatile fraction of the branches, 53 compounds were identified, with γ -muurolene (13.25%) and δ -cadinene (10.52%) being the most concentrated. Both showed profiles with a predominance of sesquiterpene hydrocarbons. In antimicrobial assays, the leaflet crude extract showed no activity against the tested microorganisms and the branch crude extract showed a MIC = 50.0 mg/mL against the tested bacteria. For cytotoxic activity, the leaflet crude extract showed promising activity against the HRT-18 strain (IC₅₀ = 69.16 μ g/mL and SI = 1.93).

Keywords: Rutaceae; *Esenbeckia grandiflora*; microscopy; essential oil; volatile fraction; static headspace.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- ORIGEM BIOSSINTÉTICA DO DIFOSFATO DE ISOPENTENILA E DO DIFOSFATO DE DIMETILALILA.....	30
FIGURA 2	- ESQUEMA DE FORMAÇÃO DOS TERPENÓIDES.....	31
FIGURA 3	- BIOSSÍNTESE DOS FENILPROPANOÍDES VOLÁTEIS.....	32
FIGURA 4	- SISTEMA DE <i>HEADSPACE</i> ESTÁTICO E DINÂMICO.....	35
FIGURA 5	- <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart. EM CAMPO.....	37
FIGURA 6	- REPRESENTAÇÃO DE MICROPLACA E DILUIÇÃO UTILIZADA NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO.....	48
FIGURA 7	- PARTES AÉREAS DAS ESPÉCIES <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	51
FIGURA 8	- VISTA FRONTAL DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	53
FIGURA 9	- SECÇÕES TRANSVERSAIS DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	55
FIGURA 10	- SECÇÕES TRANSVERSAIS E LATERAIS DO PECÍOLO DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	57
FIGURA 11	- ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS) DOS CRISTAIS DO PECÍOLO EM <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	58
FIGURA 12	- SECÇÕES TRANSVERSAIS E VISTA FRONTAL DO GALHO DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	59
FIGURA 13	- SECÇÕES TRANSVERSAIS (A-C, E) E PARADERMICAS (D e F) DO FRUTO DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	61
FIGURA 14	- ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO PELA HIDRODESTILAÇÃO DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	65
FIGURA 15	- CROMATOGRAMA DO ÓLEO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart. OBTIDO POR CG-EM	66
FIGURA 16	- ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO GERMACRENO D E BICICLOGERMACRENO NO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	67

FIGURA 17	- PROPOSTAS DE VIAS DE FRAGMENTAÇÃO PARA O GERMACRENOD	68
FIGURA 18	- CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	69
FIGURA 19	- CROMATOGRAMA OBTIDO POR SHS-GC-MS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	70
FIGURA 20	- ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO γ -MUUROLENO E (4Z)-HEXANOL NA FRAÇÃO VOLATIL DE GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	71
FIGURA 21	- CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLIOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	71
FIGURA 22	- CROMATOGRAMA OBTIDO POR S-HS-GC-MS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	72
FIGURA 23	- ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO γ -MUUROLENO E δ -CADINENO NA FRAÇÃO VOLATIL DE GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	73
FIGURA 24	- CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart. ANALISADOS POR HEADSPACE ESTÁTICO	73
FIGURA 25	- PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CG-EM PARA O ÓLEO VOLÁTIL E SHS-GC-MS PARA A FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	74
FIGURA 26	- DIAGRAMA DE VENN DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS EM <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	76
FIGURA 27	- PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	81
FIGURA 28	- SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO TTC	85

FIGURA 29	- ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO A PARTIR DE EXTRATOS BRUTOS DE FOLÍOLOS E GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	87
FIGURA 30	- EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO EXTRATO BRUTO DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart. SOBRE A VIABILIDADE CELULAR APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	88

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- SUPERFÍCIE RESPOSTA PARA O EFEITO DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPO E TEMPERATURA SOBRE O NÚMERO DE PICOS CROMATOGRÁFICOS.....	64
------------------	---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- EXEMPLOS DE FÁRMACOS OBTIDOS DE MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS.....	24
QUADRO 2	- PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO UTILIZADOS EM ANÁLISE POR HS-GC-MS.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- METABÓLITOS ISOLADOS DE FOLÍOLOS, GALHOS E RAÍZES DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	38
TABELA 2	- VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E SEUS NÍVEIS	42
TABELA 3	- MATRIZ FATORIAL 2 ² COM PONTO CENTRAL	43
TABELA 4	- CORRELAÇÃO ENTRE AS LEITURAS NO ESPECTROFOTÔMETRO E AS CONTAGENS EM PLACAS	49
TABELA 5	- TESTES MICROQUÍMICOS APLICADOS ÀS SECÇÕES TRANSVERSAIS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	62
TABELA 6	- MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM PONTO CENTRAL	63
TABELA 7	- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL E DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	77
TABELA 8	- CI50 (µg/mL) DETERMINADOS PARA O EXTRATO DE FOLÍOLOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart. EM LINHAGENS TUMORAIS TRATADAS POR 72 HORAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	-	graus Celsius
µg	-	micrograma
µL	-	microlitro
AcOEt	-	acetato de etila
ATCC	-	<i>American Type Collection Culture</i>
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CG-DIC	-	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	-	Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL-EM/EM	-	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
CHCl ₃	-	Clorofórmio
CI ₅₀	-	Concentração inibitória 50%
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CL-EM	-	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CoA	-	Coenzima A
DMAPP	-	difosfato de dimetilalila
DMSO	-	dimetilsulfóxido
eV	-	Elétron volt
FPP	-	Pirofosfato de farnesila
g	-	Grama
GPP	-	Pirofosfato de geranila
h	-	Hora
HS	-	<i>Headspace</i>
IPP	-	Pirofosfato de isopentenila
L	-	Litro
mg	-	Miligrama
min	-	minuto
mL	-	Mililitro
MTT	-	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NIST	-	<i>National Institute of Advanced Science and Technology</i>

nm	-	Nanômetro
NP/PEG	-	Difenilborato de aminoetanol/ polietilenoglicol-4000
PBS	-	Tampão fosfato-salino
RPMI	-	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SFB	-	Soro Fetal Bovino
HS	-	<i>Headspace</i>
S-HS	-	<i>Headspace</i> estático
SHS-GC-	-	Amostragem por <i>headspace</i> estático acoplado à Cromatografia em
MS		fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
TTC	-	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	-	Unidade de formação de colônias
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	PRODUTOS NATURAIS.....	24
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	26
3.2.1	Óleos voláteis.....	27
3.2.2	Biossíntese de óleos voláteis.....	28
3.2.3	Extração e análise de óleos voláteis	32
3.3	RUTACEAE JUSS.....	35
3.3.1	<i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	40
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	40
4.2.1	Índice estomático	40
4.2.2	Lâminas semipermanentes.....	41
4.2.3	Testes microquímicos	41
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG) e Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)	42
4.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR <i>HEADSPACE</i> ESTÁTICO	42
4.4	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. grandiflora</i>	43
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	44
4.6	PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>Esenbeckia grandiflora</i> Mart.	45
4.6.1	Análise qualitativa dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	45
4.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS	46
4.7.1	Determinação de atividade antimicrobiana	46
4.7.1.1	Microrganismos e preparo do inóculo	46
4.7.1.2	Preparo das amostras.....	46
4.7.1.3	Preparo dos controles.....	47

4.7.1.4	Preparo da solução de TTC	47
4.7.1.5	Método de microdiluição.....	47
4.7.1.6	Determinação da CIM dos extratos	48
4.7.2	Determinação da citotoxicidade	49
4.7.2.1	Cultivo celular.....	49
4.7.2.2	Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	ESTUDO MORFOANATÔMICO	51
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR HEADSPACE ESTÁTICO	62
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM <i>Esenbeckia grandiflora</i>	65
5.3.1	Óleo volátil de folíolos.....	65
5.3.2	Frações voláteis de folíolos e galhos	70
5.4	EXTRATOS BRUTOS DE FOLÍOLOS E GALHOS DE <i>E. grandiflora</i>	81
5.4.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	81
5.4.2	Determinação da atividade antimicrobiana	84
5.4.3	Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)	88
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE 1 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO FOLÍOLO DE <i>E. grandiflora</i>.....	109
	APÊNDICE 2 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO PECÍOLO DE <i>E. grandiflora</i>.....	110
	APÊNDICE 3 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO GALHO DE <i>E. grandiflora</i>	111
	APÊNDICE 4 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO FRUTO DE <i>E. grandiflora</i>.....	112
	ANEXO I – CADASTRO DE ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO – SISGEN.....	113

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que 80% da população mundial depende da medicina tradicional, principalmente à base de plantas (HAQ, 2004). Durante o século XIX, a maior parte dos fármacos foi obtida de plantas medicinais (YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). Atropina, cafeína, quinina e digoxina são alguns exemplos de fármacos que podem ser obtidos diretamente por processos extrativos de plantas. Em casos de substâncias com estruturas químicas complexas, a obtenção pode ser viabilizada por precursores naturais. Além disso, as substâncias obtidas de produtos naturais podem servir de protótipos de fármacos, como ocorreu no desenvolvimento dos anestésicos locais e hipnoanalgésicos a partir da cocaína e morfina, respectivamente (BERNARDES *et al.*, 2017).

O sucesso do uso de metabólitos vegetais é evidente e continua sendo um campo promissor a ser explorado (ANWAR; TEO; TAN, 2019). O Brasil possui cerca de 20% das plantas superiores do mundo. Apesar disso, poucos produtos foram desenvolvidos e comercializados a partir de constituintes ativos derivados da biodiversidade brasileira (CALIXTO, 2019).

Por apresentarem uma grande variedade de componentes bioativos, os óleos voláteis demonstram diversas propriedades biológicas (PANDA *et al.*, 2020), como ação analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiparasitária, bactericida e fungicida (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007; MENDES *et al.*, 2010; RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010; SILVA *et al.*, 2017; FARIAS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Os óleos voláteis também podem ser utilizados na área de cosméticos, agricultura e produtos sanitários. Entretanto, alguns possuem potencial tóxico e outros iniciam reações alérgicas (ALI *et al.*, 2015; FALLEH *et al.*, 2020; PANDA *et al.*, 2020).

Existem famílias que são conhecidas por apresentarem óleos voláteis, entre elas está a família Rutaceae Juss. (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017). Franco e Albiero (2018) relataram a presença de cavidades secretoras, idioblastos e tricomas glandulares em folíolos de *E. grandiflora*, estruturas que são compatíveis com o armazenamento de óleos essenciais. Entretanto, até o momento, não foram localizados dados referentes à extração e caracterização química do óleo volátil da espécie.

Características microscópicas de folíolos, frutos e sementes de *Esenbeckia grandiflora* Mart. foram relatadas previamente (SILVA; PAOLI, 2006; CRUZ *et al.*, 2017; FRANCO; ALBIERO, 2018; PASCHOALINI *et al.*, 2022). A descrição detalhada da morfoanatomia do galho da espécie não foi encontrada na literatura. Quanto ao pecíolo, foi descrito a presença de tricomas glandulares, cavidades secretoras e fibras perivasculares (CRUZ *et al.*, 2017). Contudo, detalhes sobre as características da epiderme, córtex e cilindro vascular não estão descritos.

Dentre as atividades biológicas descritas para *E. grandiflora*, o potencial antimicrobiano foi avaliado com frações de extratos alcoólicos dos folíolos da espécie frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, obtendo-se como resultado uma atividade antimicrobiana fraca (NOVAIS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2010). Entretanto, não foram recuperados estudos sobre extratos produzidos com álcool etílico 70%. Além disso, a capacidade inibitória frente a outros microrganismos pode ser avaliada.

O efeito citotóxico/ antiproliferativo de compostos isolados do extrato metanoico dos folíolos da espécie foi avaliado por Victor *et al.* (2017). As linhagens celulares utilizadas no estudo foram de câncer de cólon (HCT-116), próstata (PC-3) e leucemia (HL-60), sendo obtido resultados considerados de alta atividade. Desta forma, a pesquisa do efeito em novas linhagens celulares se torna interessante.

Constatando-se a carência de estudos sobre o tema, este trabalho visa o estudo químico dos óleos voláteis obtidos de folíolos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. coletada em Blumenau, Santa Catarina. Também foram realizados estudos sobre a morfoanatomia do folíolo, galho e fruto da espécie. Além disso, o perfil químico apresentado para extratos brutos de folíolos e galhos da espécie, bem como o potencial antimicrobiano e citotóxico foi avaliado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise morfoanatômica, a caracterização química do óleo volátil e as atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos de *Esenbeckia grandiflora* Mart.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise morfoanatômica de folíolos, galho e fruto de *E. grandiflora* por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo, além de análise microquímica;
- Otimizar as condições de análise de droga vegetal para análise de compostos voláteis por *headspace* estático;
- Realizar análise quantitativa e qualitativa dos óleos voláteis por meio das técnicas de Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), respectivamente, por meio de injeção direta;
- Realizar análise dos compostos voláteis presentes nos folíolos e galhos da droga vegetal, por meio de *headspace* estático acoplado a CG-EM;
- Obter o perfil cromatográfico de extratos brutos obtidos de folíolos e galhos da espécie por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto de folíolos e galhos de *E. grandiflora* frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e definir a concentração inibitória mínima (CIM) para cada microrganismo;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de folíolos da espécie frente às linhagens tumorais (HRT-18 e MDA-MB-231) e verificar se o efeito é seletivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

O Brasil é conhecido por possuir a maior biodiversidade do planeta. Até agosto de 2022, o país reconhecia como integrantes de sua flora 50.092 espécies de plantas, algas e fungos (JARDIM BOTÂNICO, [2020a]). Entretanto, o número de medicamentos desenvolvidos a partir de componentes ativos derivados da sua biodiversidade é muito modesto, representando menos de 5% do mercado mundial de fitoterapia (DUTRA *et al.*, 2016; BRAGA, 2021). Apesar disso, os medicamentos fitoterápicos renderam ao país aproximadamente R\$330 milhões em 2019 (ANVISA, 2021).

Newman e Cragg (2020) analisaram os medicamentos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) durante 1981-2019 e constataram que apenas 24,60% tinham origem totalmente sintética. Na classe terapêutica dos anticancerígenos, esse percentual se reduz para 15,7% (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Uma lista de fármacos com importância terapêutica obtidos de matérias-primas vegetais está apresentada no QUADRO 1.

QUADRO 1 - EXEMPLOS DE FÁRMACOS OBTIDOS DE MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS.

FÁRMACO	ESPÉCIE	USO TERAPEUTICO
artemisina	<i>Artemisia annua</i> L.	antimalárico
atropina	<i>Atropa bella-donna</i> L.	anticolinérgico
cafeína	<i>Coffea</i> spp.	estimulante central
capsaicina	<i>Capsicum</i> spp.	anestésico tópico
digoxina, digitoxina	<i>Digitalis purpurea</i> L.	cardiotônico
emetina	<i>Carapichea ipecacuanha</i> (Brot.) L.Andersson	amebicida
escopolamina	<i>Datura</i> spp.	antiparkinsoniano
fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.	antiglaucomatoso
hiosciamina	<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	anticolinérgico
reserpina	<i>Rauvolfia</i> spp.	anti-hipertensivo
vimblastina, vincristina	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	antineoplásicos

FONTE: Bernardes *et al.* (2017).

A morfina é um exemplo clássico de metabólito de planta aplicado diretamente como ativo farmacêutico em medicamento. O opioide é derivado da espécie *Papaver somniferum* L. e é utilizado como analgésico para dores crônicas e agudas. Outro exemplo é a quinina, alcaloide quinólico derivado da casca de *Cinchona* spp., conhecido para o tratamento da malária (ANWAR; TEO; TAN, 2019).

Outro exemplo da aplicação de constituintes obtidos de produtos naturais pode ser demonstrado pela obtenção de fármacos esteroidais, que foi facilitada após o uso da diosgenina (saponina esteroidal isolada de *Dioscorea mexicana* Scheidw. e *D. composita* Hemsl.) como precursora de síntese. Essa proposta viabilizou a obtenção de maiores quantidades de progesterona e outros esteroides de maneira rápida, simples e com menor custo, visto que a presença de vários centros esteroidais deixou de ser um desafio. De modo similar, a cocaína teve papel importante no desenvolvimento de novos fármacos. Isolado de folhas de *Erythroxylum coca* Lam., o alcaloide tropânico foi protótipo de anestésicos locais como a procaína, lidocaína e tetracaína, resultando em diferentes análogos que não apresentam efeito colateral relacionado a dependência química (BERNARDES *et al.*, 2017).

Muitas das substâncias vegetais de interesse científico são metabólitos secundários, que devido suas propriedades, são isolados e aplicados a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos contra doenças e infecções (ANWAR; TEO; TAN, 2019). Para Wagner (2012), a prioridade é desenvolver medicamentos que possam ser utilizados contra infecções que mostram resistência múltipla aos antibióticos e quimiosintéticos atualmente disponíveis.

A diversidade na biossíntese de metabólitos secundários em microrganismo e plantas permite o desenvolvimento de novas drogas, fornecendo uma fonte rica de moléculas bioativas e estruturalmente novas (NISBET; MOORE, 1997; KOROCH; JULIANI; ZYGADLO, 2007). Entretanto, a resistência generalizada as drogas em patógenos bacterianos anteriormente sensíveis e as questões econômicas e regulatórias em constante mudança, contribuem para que a pesquisa e o desenvolvimento de antibióticos não desperte interesse nas indústrias farmacêuticas (WRIGHT, 2017).

Além dos fármacos antimicrobianos, Wagner (2012) classifica como urgente o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos. Estima-se que a incidência do câncer aumente cerca de 70% nos próximos 20 anos, o que reforça a necessidade de pesquisar novas drogas nesta classe (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017). Compostos com potencial anticancerígeno incluem alcaloides, terpenoides, flavonoides, polifenóis e saponinas (BOUMENDJEL *et al.*, 2002; KITAGAWA, 2006; COREA *et al.* 2009; ALVAREZ *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2013; ABDALLAH *et al.*, 2015; AVATO *et al.*, 2017; JOSHI; VISHWAKARMA; BHARATE, 2017).

Até 2017, eram conhecidos cerca de 100.000 metabólitos especiais provenientes de plantas. Apesar disso, das espécies superiores já documentadas, apenas 15% tiveram seu perfil fitoquímico investigado (REIS; MARIOT; STEENBOOK, 2003; KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017). América do Sul, África, Ásia e Índia são exemplos de locais onde a medicina tradicional contém uma imensa reserva de espécies medicinais que ainda não foram avaliadas quimicamente e nem farmacologicamente (WAGNER, 2012).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

De acordo com Verpoorte (2000), esses metabólitos especiais são compostos que não se mostram diretamente necessários para a vida de uma célula (organismo), mas que desempenham uma importante função na interação entre o organismo e o ecossistema, garantindo sua sobrevivência. Como exemplo, cita-se a atração de insetos para a polinização ou animais para consumo de frutas, proteção UV, atividade antimicrobiana e inseticida (HELDT; HELDT, 1997; SANTOS, 2002; HADACEK, 2008; ANWAR; TEO; TAN, 2019).

A enorme diversidade química apresentada pelos metabólitos especiais permite que eles sejam encontrados como produtos de diferenciação de grupos taxonômicos, sendo biossintetizados a partir de uma ou mais substâncias gerais por uma variedade de vias metabólicas (BENNETT; BENTLEY, 1989).

Pode-se dizer que o perfil dos metabólitos secundários expressos por cada planta representa a relação dela com o ambiente, além de alterações mecânicas, interespecíficas e intraespecíficas. Logo, o acúmulo de metabólitos pode ser afetado por fatores, como: sazonalidade, ritmo circadiano, água, nutrição do solo, radiação, altitude, composição atmosférica, temperatura, estágio de desenvolvimento, estímulos mecânicos e ataque de patógenos. Essa variação pode ocorrer de forma restrita ao órgão danificado ou afetando a bioquímica da planta como um todo (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Segundo Santos (2002), as rotas metabólicas destes compostos só são ativadas em estágios particulares de desenvolvimento ou em períodos de estresse.

3.2.1 Óleos voláteis

O mercado mundial de óleos voláteis apresenta um crescimento anual estimado em 11%, movimentando em torno de 15 milhões de dólares ao ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Segundo a base de dados americana UNdate, o Brasil exportou quase 29 mil toneladas de óleo essencial de laranja em 2018. Esse valor representa cerca de mil toneladas a mais que o ano anterior e gira em torno de 258 milhões de dólares. No mesmo ano, os maiores importadores desse óleo volátil foram a Argentina (474,6 toneladas) e a Austrália (254,5 toneladas). Outros óleos voláteis exportados pelo Brasil são o óleo de limão (*Citrus x limon* (L.) Osbeck) e de hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) (UNDATE, 2022).

De janeiro a agosto de 2022, o Brasil já exportou um total de 37.540 toneladas referentes a categoria de óleos essenciais, materiais de perfume e sabor, rendendo cerca de 290 milhões de dólares. Os principais países importadores foram os Estados Unidos (28%), Holanda (12%) e a Alemanha (9,1%). Os estados que mais exportaram são, em ordem decrescente: São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Paraná (COMEX STAT, 2022).

A Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019) traz como definição para óleo volátil aqueles cuja obtenção ocorre por processos físicos e que se evaporam à temperatura ambiente sem deixar resíduos. Para a *International Organization for Standardization* (ISO) 9235 (2021), óleo essencial é o produto obtido por meio de matéria-prima natural de origem vegetal, podendo ser obtido por destilação a vapor ou a seco e por processos mecânicos de epicarpós, após separação da fase aquosa por processos físicos.

Considerado o grupo de substâncias responsáveis pelo aroma de diversas espécies, os óleos voláteis representam os primeiros constituintes ativos das plantas conhecidos pela propriedade de exalar odor, geralmente agradável (MATOS; MATOS, 1989). Os óleos voláteis estão presentes em células oleosas, dutos, cavidades secretoras ou em tricomas glandulares das plantas. Evidências indicam que os organismos produzem óleos em seu metabolismo secundário como forma de defesa e sinalização. Conseqüentemente, constituem uma importante fonte de produtos naturais (BAŞER; DEMIRCI, 2007). Algumas famílias são reconhecidas por serem ricas em óleos voláteis, sendo elas: Apiaceae Lindl., Asteraceae Bercht. & J.Presl,

Lamiaceae Martinov, Lauraceae Juss., Myrtaceae Juss., Piperaceae Giseke, Rutaceae e Zingiberaceae Martinov (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

Os óleos voláteis são formados por substâncias de baixa massa molecular, podem estar isolados ou em misturas, retificados, desterpenados ou concentrados (ANVISA, 2019). Em geral, eles constituem uma pequena fração da composição total da planta, representando menos de 5% da droga vegetal (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017; FALLEH *et al.*, 2020).

A composição dos óleos voláteis costuma variar de 20 a 200 substâncias. De acordo com a concentração em que se apresentam, podem ser classificados em constituintes majoritários (20 a 95%), secundários (1 a 20%) ou componentes-traços (menor que 1%). Ao todo, já são de conhecimento mais de três mil substâncias distintas em óleos. Em alguns casos, seus componentes são conhecidos por nomes que remetem sua planta de origem e não pela nomenclatura química, como o eucaliptol e o limoneno. Os metabólitos presentes nos óleos essenciais compreendem hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas. Quimicamente, os óleos voláteis são constituídos majoritariamente por derivados fenilpropanoides ou terpenoides (BAŞER; DEMIRCI, 2007; CARSON; HAMMER, 2011; HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

3.2.2 Biossíntese de óleos voláteis

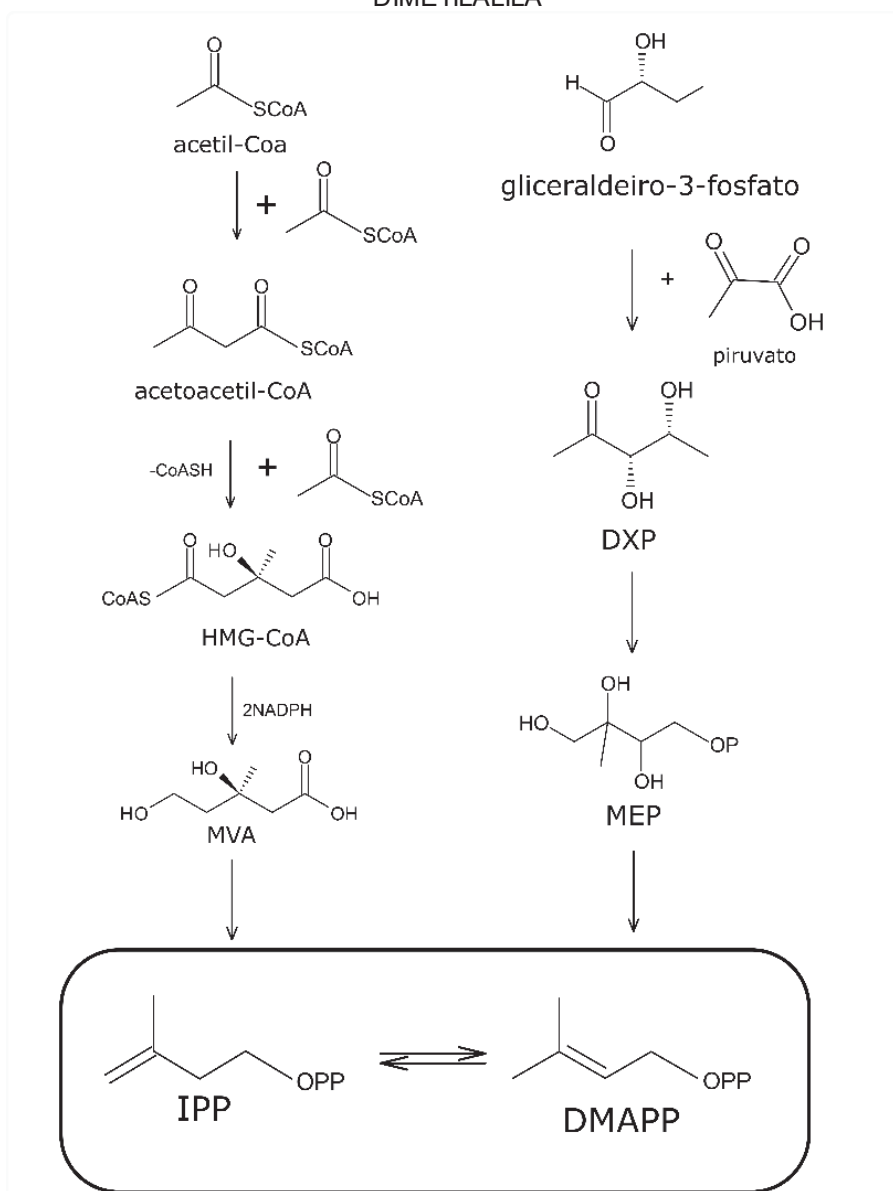
Com mais de trinta mil estruturas conhecidas, os terpenoides constituem o maior grupo de compostos naturais. São considerados polímeros de isopreno (C_5H_8), o que torna possível a formação de inúmeros compostos. Entretanto, sua biossíntese não se restringe a adição sucessiva de um isopreno (CARSON; HAMMER, 2011).

Para síntese de terpenoides em vegetais superiores existem duas rotas: a via do ácido mevalônico (MVA) e a do metileritritol-4-fosfato (MEP). A primeira descrita foi a MVA, que ocorre no citoplasma, retículo endoplasmático e mitocôndria. É responsável pela síntese de sesquiterpenos, esteróis e ubiquinonas. Em contrapartida, a MEP é amplamente responsável por hemiterpenos, monoterpenos e diterpenos, ocorrendo nos plastídios das células. Entretanto, não há uma distinção completa entre as duas rotas, podendo existir trocas de precursores entre ambas (CARSON; HAMMER, 2011; HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

Para a síntese dos terpenoides via MVA, ocorre a formação de unidades de isopreno por meio de duas moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) que se condensam e formam a acetoacetil-CoA. Em seguida, a incorporação de uma terceira molécula através de uma adição estereoespecífica forma a β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A redução em duas etapas do grupo tioéster a um álcool primário leva a conversão de HMG-CoA para ácido mevalônico. O MVA é transformado em unidades de isopreno fosforilado de cinco carbonos a partir de fosforilação do grupo alcoólico primário, descarboxilação e desidratação da molécula (DEWICK, 1997; BAŞER; DEMIRCI, 2007).

Na via do MEP, a biossíntese de isoprenos se inicia com a condensação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, formando o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Em seguida, ocorre a redução e rearranjo desse intermediário a MEP, a qual será convertida em pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP) (FIGURA 1) (DEWICK, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009).

FIGURA 1 - ORIGEM BIOSINTÉTICA DO DIFOSFATO DE ISOPENTENILA E DO DIFOSFATO DE DIMETILALILA

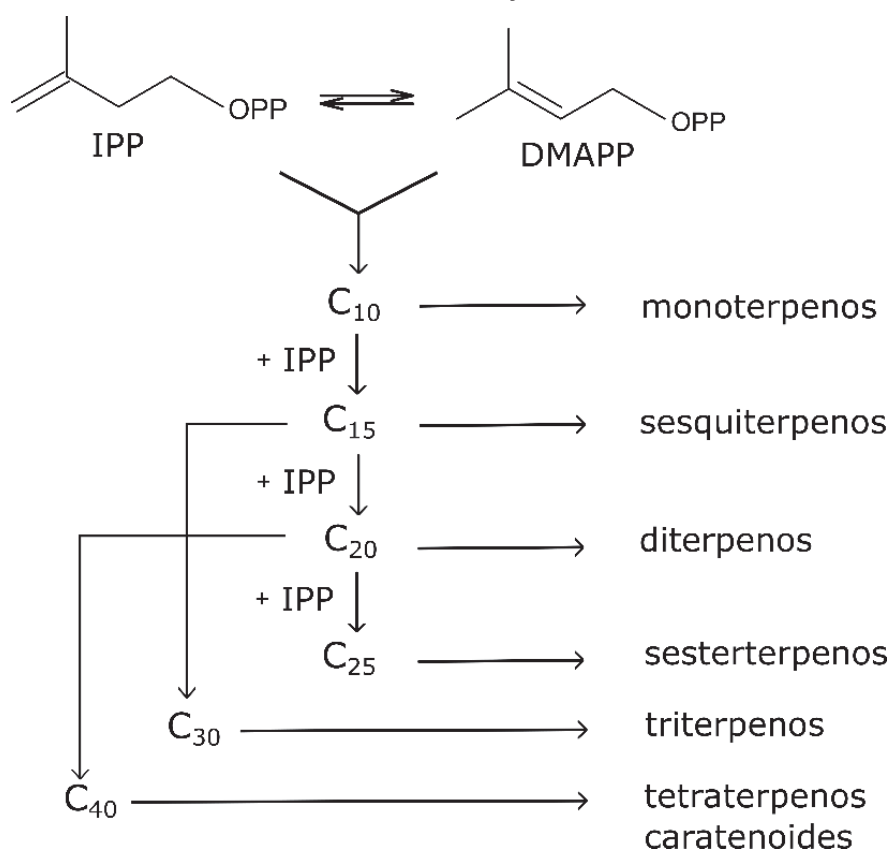


FONTE: Adaptado de Başer e Demirci (2007).

O IPP e DMAPP irão reagir e formar o geranyl difosfato (GPP), precursor imediato dos monoterpenos (C₁₀). A condensação de IPP e GPP leva ao farnesil difosfato (FPP), precursor direto dos sesquiterpenos (C₁₅). A adição de mais um IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀). Triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) são formados a partir da dimerização do FPP e GGPP, respectivamente (FIGURA 2) (TAIZ; ZEIGER, 2009; BAŞER; DEMIRCI, 2007).

A classe mais comum em óleos voláteis é a de monoterpenos, seguido dos sesquiterpenos (BAŞER; DEMIRCI, 2007; CARSON; HAMMER, 2011).

FIGURA 2 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DOS TERPENOIDES



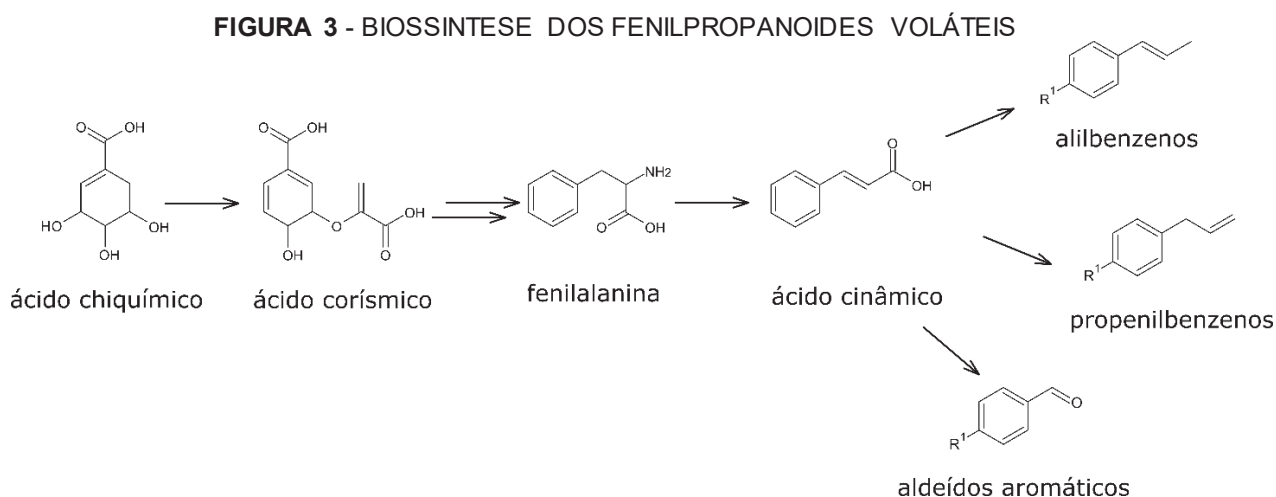
FONTE: Adaptado de Dewick (1997).

Os fenilpropanoides ocorrem com menor frequência em óleos voláteis quando comparados aos terpenoides, possuindo cerca de 50 substâncias descritas. Todavia, alguns óleos têm concentrações elevadas da classe, como, por exemplo, o eugenol no óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), presente em até 90%. Dentre as famílias em que os fenilpropanoides estão entre os constituintes majoritários dos óleos voláteis, cita-se Lamiaceae, Myrtaceae e Piperaceae (CARSON; HAMMER, 2011).

A estrutura química dos fenilpropanoides contém um fragmento C_6-C_3 , composto por um anel benzênico e uma cadeia lateral de três carbonos. Os constituintes dos óleos voláteis são fenilpropanoides simples, sendo alguns dos importantes o anetol, eugenol, aldeído cinâmico e vanilina (BAŞER; DEMIRCI, 2007).

A biossíntese dos fenilpropanoides ocorre através do ácido chiquímico, o qual é formado pela condensação aldólica do fosfoenolpiruvato e eritro-4-fosfato. Na sequência é metabolizado em ácido corísmico, o qual originará o ácido prefênico após um rearranjo intramolecular. A partir dele, é possível obter os aminoácidos fenilalanina e tirosina (SANTOS, 2002).

Por ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), a fenilalanina perde uma molécula de amônia e origina o ácido cinâmico. Reduções enzimáticas do ácido cinâmico sintetizam propenilbenzenos e/ ou alilbenzenos, enquanto os aldeídos aromáticos são gerados por meio de oxidações com degradação de cadeias laterais (FIGURA 3) (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).



FONTE: Adaptado de Başer e Demirci (2007).

3.2.3 Extração e análise de óleos voláteis

O método de escolha para a extração de um óleo volátil irá variar de acordo com sua finalidade, bem como sua localização na planta. Pode-se citar como os principais métodos de extração a enfloração, hidrodestilação, destilação por arraste por vapor d'água, espremedura e extração por fluído supercrítico, sendo que cada método pode apresentar rendimentos distintos (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

A hidrodestilação ocorre com uma massa conhecida da matéria-prima em contato direto com a água em ebulição. O sistema é aquecido e o vapor que carrega os compostos voláteis condensa, sendo recolhido em um tubo graduado que permite uma leitura direta da quantidade de óleo obtida (CLEVINGER, 1928). A Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019) preconiza o uso do Clevenger nos processos de destilação em escala laboratorial. Em contrapartida, a técnica de arraste a vapor ocorre sem que haja um contato direto da matéria-prima e a água fervente. O material vegetal permanece acima da fonte de vapor, o qual extrai o óleo volátil devido à pressão de

vapor mais elevada que a água. Este processo permite que haja o mínimo de água no destilado final (MASANGO, 2005; RASSEM; NOUR; YUNUS, 2016).

A enfloração é empregada principalmente na extração do óleo volátil de flores. Ela ocorre com a deposição de pétalas sobre uma camada de gordura, em temperatura ambiente e por tempo determinado. Em seguida, as pétalas esgotadas são substituídas por novas, até que haja uma saturação total da gordura, em que ela será tratada com álcool. Para a obtenção do óleo volátil, o álcool é destilado em baixa temperatura, alcançando um produto de alto valor comercial (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

O caráter hidrofóbico e apolar dos óleos voláteis permite a extração por solventes orgânicos, em que a planta é colocada em contato com o solvente a temperatura ambiente. O extrato obtido é então concentrado em baixas temperaturas, o que leva a perda de moléculas menores. Entretanto, é necessário um tempo maior para a execução desta técnica, tornando os óleos mais caros quando comparado a outros métodos. Além disso, o produto pode apresentar resíduos de solvente e subsequente risco toxicológico. Esta técnica pode ser associada a outras mais atuais, como a extração assistida por micro-ondas e ultrassom. Desta forma, torna-se possível um aumento do rendimento e uma redução de tempo e solvente (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; REYES-JURADO *et al.*, 2015; HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

A prensagem a frio ou expressão ocorre principalmente com frutos, em que as células de óleo presentes no pericarpo se rompem devido à prensagem ou abrasão. Os óleos voláteis extraídos formam uma emulsão aquosa que é separada por meio de decantação, centrifugação ou destilação fracionada. Ademais, o óleo obtido pode conter também cumarinas e pigmentos vegetais, o que exige uma etapa posterior de purificação quando o óleo puro é almejado. Este é um processo de baixa geração de calor, mas geralmente de menor rendimento (MUKHOPADHYAY, 2000; REYES-JURADO *et al.*, 2015).

A extração com fluídos supercríticos tem sido considerada um meio alternativo para extração dos óleos voláteis. De modo geral, os fluídos supercríticos são mais vantajosos que solventes orgânicos devido sua alta difusibilidade, baixa viscosidade, densidade e constante dielétrica ajustáveis. Essas características permitem uma fácil penetração no material botânico e proporcionam uma alta recuperação em um curto período. Atualmente, o CO₂ supercrítico é o mais desejável para extração de produtos

naturais, visto que é inerte, barato, insípido, de menor toxicidade e com baixo impacto ambiental. Além disso, possui temperatura crítica próxima à ambiente (31°C), tornando-se ideal para a extração de produtos naturais termolábeis. A extração se inicia com a compressão do fluido supercrítico que, ao ser liquefeito, alcança um quarto estado, no qual sua viscosidade se assemelha à de um gás. Após extração, o fluido retorna ao estado gasoso e é totalmente eliminado (MUKHOPADHYAY, 2000; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

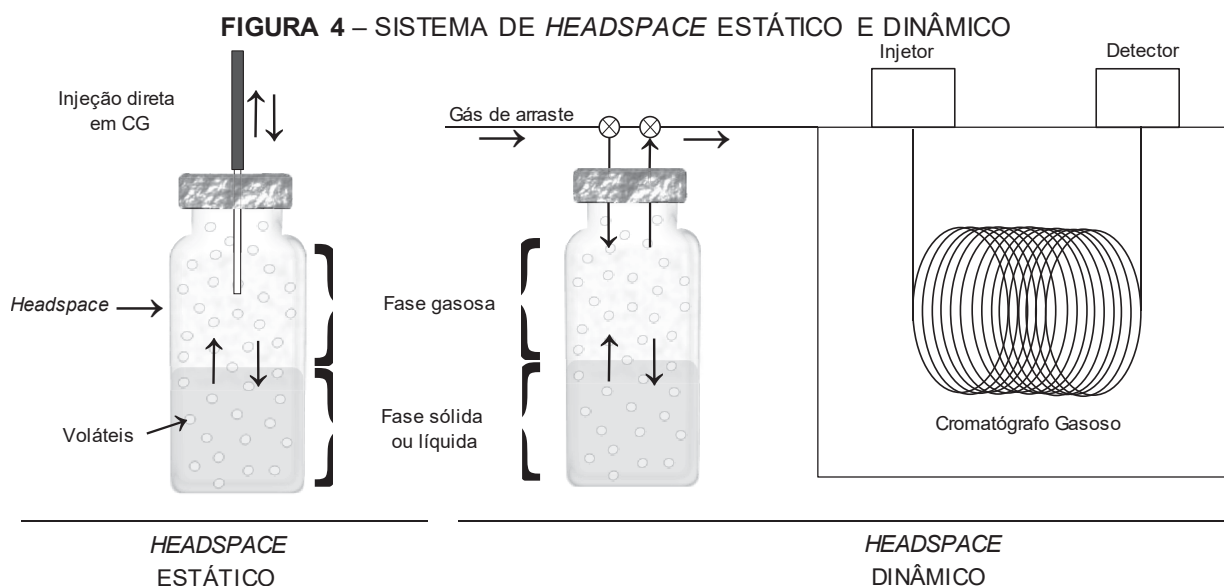
Usualmente, os óleos voláteis são analisados pela injeção direta de uma amostra líquida pela técnica de cromatografia gasosa (CG), em que uma alíquota é aquecida e o vapor é transferido para a coluna (KOLB; ETTRE, 2006). Os analitos são vaporizados e, de acordo com a diferença entre seus pontos de ebulição e suas interações com a fase estacionária, são eluídos através da coluna em diferentes tempos de retenção (DÍEZ, 2015).

Introduzido no final de 1950, a amostragem por *headspace* (HS) é uma técnica de preparação e limpeza de amostras que se desenvolveu paralelamente a cromatografia gasosa. O HS consiste em uma extração de compostos voláteis diretamente da fase gasosa, que fica acima da matriz em um *vial*. Ela permite que compostos voláteis presentes em quase qualquer matriz (sólida ou líquida) possam ser analisados sem a obrigatoriedade de extrações, dissoluções ou diluições de amostra. HS é um método simples, rápido, automatizado, de fácil acoplamento ao CG e que não exige o uso de solventes (BICCHI *et al.*, 2012; TRIAUX *et al.*, 2021).

O HS tem desempenhado um papel fundamental na identificação de compostos da fração volátil a nível de traços. Para isso, a amostra deve ser submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, para identificação de seus constituintes através de seus índices de retenção e espectros de massa (BRAITHWAITE; SMITH, 1996; BICCHI *et al.*, 2012). Com isso, o HS vem sendo utilizado na análise residual de solventes em alimentos e medicamentos e, também, na extração de compostos voláteis de alimentos e plantas (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2014; USP, 2020; TRIAUX *et al.*, 2021).

Quando é realizado a amostragem da fase gasosa em equilíbrio com uma matriz, nomeamos a técnica de *headspace* estático (S-HS) (FIGURA 4). Para isso, submetem-se a incubação amostras seladas em *vial* específico, em condições de tempo e temperatura constantes. Dessa forma, é possível avaliar os compostos voláteis presentes sem a interferência da fração não volátil. Uma segunda abordagem

possível é a amostragem por *headspace* dinâmico, a qual se baseia na remoção contínua dos componentes voláteis da matriz, por meio de um gás inerte que flui sobre ela. Desta forma, o equilíbrio nunca é atingido e, ao final, o conteúdo total dos analitos voláteis é removido da amostra (BRAITHWAITE; SMITH, 1996; KOLB; ETTRE, 2006).



Segundo Virgiliou e colaboradores (2021), o modo de injeção por HS possui sensibilidade o suficiente para fornecer uma visão mais global da fração volátil. Os autores também afirmam que o perfil dos compostos detectados por essa amostragem pode ser muito diferente da obtida pela fase líquida devido a relação com a concentração dos componentes na fase gasosa.

3.3 RUTACEAE Juss.

Rutaceae é uma família que inclui cerca de 158 gêneros e 2.208 espécies no mundo, sendo largamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (WFO, 2022; JANUÁRIO *et al.*, 2009). As áreas de maior abrangência desta família são nas Américas, sul da África e Austrália. No Brasil, existem 50 gêneros que incluem aproximadamente 240 espécies, presentes sobretudo na Mata Atlântica e na Amazônia (JARDIM BOTÂNICO, [2020b]; JANUÁRIO *et al.*, 2009).

É uma família constituída principalmente por árvores ou arbustos e poucas ervas. A presença de estruturas secretoras de óleo volátil em folhas, galhos e frutos é uma de suas características. A estrutura básica das folhas é frequentemente marcada

pela presença de cavidades secretoras, sendo às vezes substituídas ou acompanhadas por células secretoras. Tricomas glandulares peltados, estrelados e multicelulares também ocorrem (METCALFE; CHALK, 1957; FAHN, 1988).

A família se destaca por conter representantes de importância medicinal, ecológica e econômica. O gênero *Citrus* L. se sobressai devido aos frutos comestíveis (laranjas, tangerinas, limões e outros) e por ser fonte de óleos voláteis, junto com espécies dos gêneros *Ruta* L. e *Boronia* Sm. (GROPPO *et al.*, 2012; BURIL; THOMAS; ALVES, 2014). Além disso, é conhecida por sua grande variedade de metabólitos secundários, tendo destaque as classes dos alcaloides, cumarinas, lignanas, terpenos, flavonoides e limonoides (GROPPO *et al.*, 2008). Vários produtos com valor medicinal são obtidos nesta família, incluindo o alcaloide pilocarpina (*Pilocarpus* spp.) e o flavonoide rutina (*Ruta graveolens* L.) (FRANCO; SCHIMPL; MAZZAFERA, 2017; HAMAD, 2012). A madeira também se mostra economicamente importante, sendo utilizada na construção civil, em ferramentas e uso paisagístico. Como fonte de madeira, têm-se os gêneros de *Zanthoxylum* L., *Balfourodendron* Mello ex Oliv., *Flindersia* R. Br. e *Euxylophora* Huber (LORENZI, 1992; GROPPO *et al.*, 2012).

Rutaceae é conhecida por ser produtora de compostos bioativos, compreendendo espécies utilizadas no tratamento de doenças na medicina popular (CARVALHO; PIRANI; FERREIRA, 2022). Substâncias isoladas de espécies da família demonstraram o potencial de suas propriedades, como exemplo, inibição enzimática frente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (MORAES *et al.*, 2003), atividade imunomoduladora (COSTA *et al.*, 2010), ação anti-inflamatória (LIANG *et al.*, 2020), antimicrobiana (NOVAIS *et al.*, 2003), entre outras funções.

Carvalho, Pirani e Ferreira (2022) destacam o potencial do gênero *Esenbeckia* Kunth na produção de metabólitos bioativos. Alcaloides e terpenoides isolados do extrato etanólico de folhas e galhos de *E. alata* Triana & Planch. demonstraram potencial citotóxico e antimicrobiano, enquanto o óleo volátil de *E. yaaxhokob* Lundell (sin. *E. berlandieri* Baill.) atuou como agente alelopático e inibidor de fitocrescimento. Os constituintes presentes em *E. leiocarpa* Engl. apresentaram atividade anti-inflamatória, anticolinesterásica e antialimentar e o extrato etanólico e frações diclorometânica e acetato-etílica de *E. pumila* Pohl demonstram atividade inseticida. Os constituintes de *E. febrifuga* (A.St.-Hil.) A.Juss. ex Mart. e *E. grandiflora* Mart. apresentaram resultados positivos para tratamentos contra doenças transmitidas por vetores, como malária, dengue, febre amarela, leishmaniose e doença de Chagas

(SUÁREZ *et al.*, 2011; ÁLVAREZ-CABALLERO; CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA, 2019; DUARTE *et al.*, 2019; CARVALHO; PIRANI; FERREIRA, 2022).

3.3.1 *Esenbeckia grandiflora* Mart.

Popularmente conhecida como pau-de-cutia, canela-de-cutia e guaxupita, a espécie *E. grandiflora* (Rutaceae) (FIGURA 5) é uma árvore nativa brasileira, que ocorre principalmente na floresta latifoliada semidecídua. Seu tronco é tortuoso, as folhas são coriáceas de cor verde escura e opaca. Apesar de existirem poucos dados sobre o crescimento da espécie, sabe-se que seu desenvolvimento é lento, apresenta melhor desenvoltura sob à sombra e não resiste a temperaturas muito baixas, especialmente quando jovem (LORENZI, 1992; BURIL; THOMAS; ALVES, 2014; CARVALHO, 2014).

FIGURA 5 - *Esenbeckia grandiflora* Mart. EM CAMPO



FONTE: Montiel ([2011?]).

Devido sua resistência, a madeira desta espécie foi muito utilizada por índios para a confecção de arcos e flechas. Também foi usada na produção de carroças, raios de rodas, bengalas e cabos de ferramentas, como martelos e pás. Além disso, por ser de pequeno porte, permite que seja empregada com sucesso na arborização de ruas estreitas sob rede elétrica (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2014).

Franco e Albiero (2018) estudaram as estruturas secretoras de *E. grandiflora* e relataram a presença de tricomas glandulares multicelulares em folíolos e primórdios

foliares. Além disso, idioblastos oleíferos foram descritos próximos as cavidades secretoras nas folhas e galhos. Entretanto, os testes histoquímicos descreveram óleos apenas nas cavidades secretoras do galho. Existem ainda outros estudos sobre a morfoanatomia dos folíolos, frutos e sementes da espécie (SILVA; PAOLI, 2006; CRUZ *et al.*, 2017; PASCHOALINI *et al.*, 2022). Quanto ao pecíolo, encontrou-se na literatura a descrição de tricomas glandulares, cavidades secretoras e fibras perivasculares para a espécie (CRUZ *et al.*, 2017). Contudo, detalhes sobre as características da epiderme, córtex e cilindro vascular não estão descritos. Além disso, não foram localizados estudos acerca da morfoanatomia de galhos da espécie.

Documentos históricos sobre os guaranis relatam o uso da espécie, conhecida por eles como *Apotyguara*, como antitérmico. Também eram realizados preparos na forma de chá, compressas, banhos e emplastos e como alimento (NOELLI, 1998; PEREIRA *et al.*, 2016). Estudos descrevem a atividade citotóxica/ antiproliferativa, antimicrobiana, inseticida e larvicida dos extratos obtidos com frações de álcool etílico e álcool metílico da espécie (VICTOR *et al.*, 2017; NOVAIS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Além disso, Oliveira e colaboradores (2005) revelaram a presença da substância methoxsalen, justificando um potencial uso para o tratamento de psoríase (PARRISH *et al.*, 1974).

Carvalho, Pirani e Ferreira (2022) realizaram um estudo de revisão sobre os constituintes químicos e as atividades biológicas do gênero. Os autores reportam a presença de 44 substâncias diferentes em *E. grandiflora*, os quais estão dispostos na TABELA 1. As substâncias foram isoladas de extratos obtidos com éter de petróleo, hexano, álcool etílico e álcool metílico a partir de folíolos, galhos e raízes da espécie. Os constituintes obtidos podem ser classificados como alcaloides, cumarinas, flavonoides, esteroides e triterpenos.

TABELA 1 - METABÓLITOS ISOLADOS DE FOLÍOLOS, GALHOS E RAÍZES DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

		(continua)	
		COMPOSTO	PARTE DA PLANTA
Alcaloides		delbina	folíolo e raiz
		β e γ -fagarina	raiz
		flindersiamina	raiz
		kokusaginina	raiz
		maculina	raiz
		1-hidroxirutaecarpina	folíolo
		euxiloforicina D	raiz
		rutaecarpina	folíolo
		4-metoxi-1-metil-2-quinolona	raiz

TABELA 1 - METABÓLITOS ISOLADOS DE FOLÍOLOS, GALHOS E RAÍZES DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

		(conclusão)
	COMPOSTO	PARTE DA PLANTA
Cumarinas	7-[(<i>E</i>)-7'-hidroxi-3',7'-dimetilocta-2',5'-dieniloxi]-cumarina	folíolo e galho
	anisocumarina H	folíolo e galho
	aurapteno	folíolo
	dafinetin-7-metil-8-(3,3-dimetilalil)eter	raiz
	umbeliferona	folíolo
	3-(1',1'-dimetilalil)-columbianeti	raiz
	3,8-dimetoxifuro[3,2-g]cumarina	raiz
	5-(1'-hidroxi-isopentenil)-bergapteno	raiz
	5-senecioilxantotoxina	raiz
	(-)-heraclenol	folíolo e galho
	imperatorin	folíolo
	isopimpineline	raiz
	pimpineline	raiz e casca
	swietenocumarina B	raiz
xantotoxina	raiz	
Flavonoides	(-)-epigalocatequina	folíolo
	1-[3-[(<i>2E</i>)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-il]-2,4,6-trihidroxifenil]-3-(8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)-1-propanona	folíolo e galho
	3-[3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-1-[2,4,6-trihidroxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-1-propanona	folíolo e galho
	3-[3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil)fenil]-1-[3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-2,4,6-trihidroxifenil]-1-propanona	folíolo e galho
	diidrochalcona M-1 e M-2	folíolo
	afzelina	folíolo e galho
	quercitrina	folíolo e galho
Esteroides	campesterol	folíolo
	β -sitosterol	folíolo, galho e raiz
	sitostenona	raiz
	β -sitosteril glicosídeo	folíolo
	estigmasterol	folíolo
Triterpenoides	3- α -hidroxi-12,13-epoxi-oleanana	folíolo
	3- α -hidroxiursan-12-ona	folíolo
	α e β -amirenol	folíolo
	α e β -amirina	folíolo e galho

FONTE: Adaptado de Carvalho, Pirani e Ferreira (2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

A pesquisa foi realizada com partes aéreas de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (FIGURA 5), coletadas e identificadas pelo botânico prof. Dr. André Luís de Gasper em 9 de setembro de 2021, em Blumenau, Santa Catarina (26° 54' 25" S, 49° 4' 52" W). Uma exsicata (FURB68797) do material coletado foi depositada no herbário Dr. Roberto Miguel Klein da Universidade Regional de Blumenau. O acesso ao material botânico foi cadastrado sob o número A4430E8 pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SisGen).

Após a coleta, o material foi seco à temperatura ambiente e, em seguida, permaneceu em estufa à 40 °C até massa constante. Para a execução das análises, os folíolos, pecíolos, galhos e frutos foram separados.

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Os estudos morfoanatômicos foram desenvolvidos com folíolos, pecíolo, galho e frutos de *E. grandiflora* já secos. A descrição morfológica externa foi realizada de acordo com a classificação Hickey (1974). Também foram realizadas medições dos folíolos e pecíolos com paquímetro digital (Stainless Hardened®).

Os resultados apresentados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio de luz Olympus BX-40, acoplado à câmera Tucsen (TCA-1.31C) do laboratório de Farmacognosia da UFPR.

4.2.1 Índice estomático

O índice estomático foi determinado conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019). Para isso, seções de aproximadamente 0,25 cm² dos folíolos foram submersos em mistura de hidrato de cloral e água (5:2) e submetidos à ebulição até que o material ficasse transparente. Após isso, as seções foram observadas em microscópio óptico, em aumento de 10 vezes. As células epidérmicas e os estômatos que apareceram na área foram registrados e, em seguida, realizou-se o cálculo e a média de dez determinações. O índice foi calculado segundo a equação (1):

$$\text{Índice de estômatos} = \frac{100S}{(E+S)} \quad (1)$$

Em que:

S: número de estômatos em uma área determinada da superfície da folha e,

E: número de células epidérmicas, incluindo tricomas existentes no mesmo campo observado.

4.2.2 Lâminas semipermanentes

Confeccionaram-se secções transversais e longitudinais à mão livre do material vegetativo com auxílio de lâminas de barbear. A coloração foi realizada com azul de astra e fucsina básica (KRAUS *et al.*, 1998).

Secções paradérmicas foram clareadas com solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 48 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada e com solução de ácido acético 5%. Posteriormente, foram coradas com Safranina e Sudam III (SASS, 1951).

Montaram-se lâminas semipermanentes com solução de glicerina 50% (v/v), realizando a lutagem com esmalte incolor (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz.

4.2.3 Testes microquímicos

Os testes microquímicos foram realizados em secções transversais em que se realizou o corte à mão livre do material, utilizando-se os reativos de floroglucina clorídrica para verificação da lignina (FOSTER, 1949), cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e dicromato de potássio (GABE, 1968) para compostos fenólicos, Sudam III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), Wagner para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981), lugol para amido, azul de metileno para mucilagem (JOHANSEN, 1940) e ácido acético 6% para verificar a composição química dos cristais (ANVISA, 2019).

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG) e Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)

As análises foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para visualização detalhada da superfície de *E. grandiflora*, o material foi colocado em *stubs* de alumínio e foi recoberto por ouro em aparelho Sputter Coater SC7620. Em seguida, foi realizada a análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (Mira 3 Tescan – Oxford Instruments, Oxford, UK). Realizaram-se também análises qualitativas de raios X em cristais selecionados aleatoriamente nas secções observadas. Para isso, utilizou-se um detector EDS (Oxford ®) acoplado ao FEG, previamente descrito.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR HEADSPACE ESTÁTICO

Para a realização dos experimentos por S-HS, levantou-se na literatura as variáveis utilizadas para análise de compostos voláteis em drogas vegetais por *headspace* estático. Alguns autores realizaram a otimização das variáveis de incubação e injeção da amostra, com a finalidade de diminuir interferentes, sendo o desenho experimental um dos métodos aplicados para isso (FANG *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2018; TRIAUX *et al.*, 2021; VIRGILIOU *et al.*, 2021).

Para a realização da otimização das análises por S-HS, selecionou-se como variáveis o tempo e a temperatura de incubação e, realizou-se o planejamento fatorial 2^k com ponto central, em que 2 se refere ao número de níveis e k ao de fatores. Utilizou-se a condição de 2^2 , sendo que os pontos fatoriais foram realizados em duplicata e os pontos centrais em triplicata, totalizando 11 experimentos. As variáveis independentes deste estudo estão descritas em seus níveis na

TABELA 2 e, a matriz de planejamento fatorial é exposta na TABELA 3. O tratamento estatístico dos dados foi realizado em *software* Rstudio 4.0.2.

TABELA 2 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E SEUS NÍVEIS

VARIÁVEL INDEPENDENTE	NÍVEIS		
	-1	0	+1
A – temperatura (°C)	80	90	100
B – tempo (min)	15	20	25

FONTE: A autora (2022).

TABELA 3 – MATRIZ FATORIAL 2² COM PONTO CENTRAL

MÉTODO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)	TEMPO DE INCUBAÇÃO (min)
1	- 1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0

FONTE: A autora (2022).

Para a realização das análises dos compostos voláteis em folíolos e galhos de *E. grandiflora*, utilizou-se 0,50g de droga vegetal selada em *vial headspace*. As análises por SHS-GC-MS ocorreram no mesmo cromatógrafo utilizado com o óleo volátil do folíolo (*vide* seção 4.5). Os demais parâmetros utilizados estão descritos no QUADRO 2 (PAL SYSTEM, 2010).

A injeção de uma série homologa de hidrocarbonetos saturados também foi utilizada para a identificação dos constituintes, conforme descrito anteriormente. Para estas análises, utilizou-se 4 µL do padrão da mistura de hidrocarbonetos (1000 µg/mL), os quais foram submetidos a uma temperatura de incubação de 150 °C por 10 min.

QUADRO 2 – PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO UTILIZADOS EM ANÁLISE POR HS-GC-MS

PARÂMETRO	UTILIZADO
volume de amostra para injeção	500 µL
temperatura de incubação	conforme aplicação
tempo de incubação	conforme aplicação
velocidade de agitação	500 rpm
tempo de agitação ligado	5 s
tempo de agitação desligado	2 s
temperatura da seringa	tempo de incubação + 5 °C
velocidade de preenchimento da agulha	200 µL/s
velocidade de injeção	500 µL/s
fluxo da seringa	1 min

FONTE: Adaptado de PAL System (2010).

4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. grandiflora*

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia (UFPR). Folíolos secos (1700 µm – 355 µm) de *E. grandiflora* foram submetidos à hidrodestilação em aparelho Clevenger, em triplicata (WHO, 1998). A extração seguiu a proporção 1:10 de material vegetal: água destilada e foi realizada por 4 h (ANVISA, 2019). Em seguida, o hidrolato e o óleo volátil foram recolhidos e a extração do óleo volátil foi realizada por extração

líquido-líquido com diclorometano PA (Dinâmica®). Após a extração, o conteúdo foi seco com sulfato de sódio anidro (Alphatec®) e o solvente foi evaporado com auxílio de evaporador rotativo (IKA RV-10®) a 30 °C/70 RPM (WAJS-BONIKOWSKA *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 2009). As amostras permaneceram em *vials* no freezer (- 15 °C) até a análise. Os rendimentos dos óleos voláteis foram expressos em mg.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM, modelo GCMS-TQ8040 – Shimadzu®), equipado com detector de massas triplo quadrupolo (modelo TQ8040) com ionização por elétrons (70 eV, 200 °C), injetor automático (AOC-5000 Plus) e coluna capilar de sílica fundida Zebron ZB-5MsPlus (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Utilizou-se hélio como gás de arraste, em uma vazão de 1,02 mL/min. A temperatura da coluna foi programada de 60 a 250 °C, em uma taxa de aquecimento de 3 °C/min. As amostras foram diluídas a 0,1% (v/v) em diclorometano grau HPLC (Panreac) e 1,0 µL foi injetado, em razão de split 1:90 a 250 °C. As análises foram realizadas em modo *scan*, entre 40-415 *m/z*.

Para a identificação dos constituintes, injetou-se nas mesmas condições da amostra uma série homologa de hidrocarbonetos saturados, contendo de 7 a 40 átomos de carbono. O Índice Aritmético (IA) foi determinado pela equação (2) de Van den Dool e Kratz (1963) (ADAMS, 2017).

$$IA = 100z + 100 \frac{[t_R(x) - t_R(z)]}{[t_R(z+1) - t_R(z)]} \quad (2)$$

Sendo:

z: número de átomos de carbono do hidrocarboneto padrão;

$t_R(x)$: tempo de retenção do analito que se encontra entre $t_R(z)$ e $t_R(z+1)$;

$t_R(z)$: tempo de retenção do hidrocarboneto padrão com z átomos de carbono;

$t_R(z+1)$: tempo de retenção do hidrocarboneto padrão com z+1 átomos de carbono.

Realizou-se a caracterização química considerando os índices aritméticos, comparando o espectro de massas obtido com a biblioteca de dados NIST14 e a literatura Adams (2017), através de software GCMS *solution* (Version 4.20 – Shimadzu

®). Para *n*-hexanol, 2-etil-1-hexanol, 2,6-dimetil-ciclohexanol, 4,6-dimetil-dodecano, (+)-sativeno, β -maalieno, (-)-globulol, neofitadieno, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, α,α -dimetoxi- α -fenilacetofenona e adipato de dietilhexila, utilizou-se a base de dados NIST WebBook. A quantificação das amostras foi obtida pela injeção manual das amostras em CG-DIC (Agilent 7890^a) nas mesmas condições descritas acima, utilizando coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) e gás carreador hidrogênio a 1,5 mL/min. Os resultados foram expressos em concentração média (%) \pm desvio padrão e foram calculados de acordo com dados de triplicatas independentes, por meio da normalização das áreas dos picos, com auxílio do software OpenChrom ®.

4.6 PREPARO DOS EXTRATOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

Os extratos brutos de *E. grandiflora* foram preparados de acordo com a metodologia de preparo para extrato fluido (processo A) da Farmacopeia Brasileira, (ANVISA, 2019). Como solvente extrator, utilizou-se álcool etílico 70% (v/v). A droga vegetal pulverizada (1700 μ m – 355 μ m) (Bertel®) foi umedecida com solvente extrator, em um volume equivalente a 40% de sua massa. Em seguida, permaneceu em repouso por 4 h, até o entumescimento da droga vegetal. Posteriormente, transferiu-se para percolador, em que foi adicionado volume suficiente de álcool etílico 70% para que houvesse um excesso de líquido sobrenadante.

Após 24 h, iniciou-se a percolação em fluxo de até 1 mL/min e 85% do percolado foi recolhido. A extração foi realizada até que a droga vegetal fosse esgotada, o qual foi verificado por Cromatografia em Camada Delgada. Após a finalização, o percolado foi concentrado em evaporador rotativo (IKA®) com temperatura máxima de 60 °C, até redução do volume necessário para completar o extrato fluido (15%). Os extratos foram unidos e homogeneizados.

Posteriormente, realizou-se a evaporação da fase orgânica dos extratos e, em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização à -77 °C/ 8^{mT} (SP VirTis BenchTop Pro - SP SCIENTIFIC®).

4.6.1 Análise qualitativa dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após preparo dos extratos vegetais, realizou-se a pesquisa de grupos de metabólitos empregando Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Como fase

estacionária, utilizaram-se cromatoplasmas recobertas por gel de sílica 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄ e 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel®). Aplicou-se em forma de bandas individuais, 20 µL de uma solução etanólica (70% v/v) a 100 mg/mL de cada extrato. O cromatograma foi eluído na fase móvel: clorofórmio: acetato de etila: álcool metílico: água (53,6: 28,6: 10,7: 7,1). As cromatoplasmas foram secas ao ar e, em seguida, examinadas a olho nu e sob luz ultravioleta em 254 e 365 nm. Como reveladores, utilizou-se: ácido fosfomolibdico 20%, ácido sulfúrico 5%, hidróxido de potássio 5%, Dragendorff, anisaldeído sulfúrico e NP/PEG (difetilborato de aminoetanol/ polietilenoglicol-4000) (WAGNER; BLADT, 1996; ANVISA, 2019).

4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.7.1 Determinação de atividade antimicrobiana

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *E. grandiflora* frente a bactérias e levedura, foi realizada segundo Veiga e colaboradores (2019).

4.7.1.1 Microrganismos e preparo do inóculo

Os microrganismos utilizados neste experimento foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Candida albicans* (ATCC 10231). As cepas foram determinadas conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira (2019) para o teste de eficácia antimicrobiana. Os microrganismos liofilizados foram revitalizados e, em seguida, realizou-se a cultura por esgotamento.

Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, até que se atingisse à escala correspondente a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para o ajuste da turbidez, utilizou-se densitômetro para detecção de turbidez de suspensão da Biosan®, modelo DEN-1.

4.7.1.2 Preparo das amostras

Para a realização do teste, preparou-se soluções independentes a 100 mg/mL do extrato liofilizado do folíolo e do galho de *E. grandiflora*. Como diluente, utilizou-se dimetilsulfóxido 10% (DMSO) e Tween 80 a 4% (Sigma-Aldrich®).

4.7.1.3 Preparo dos controles

Soluções de cloranfenicol a 250 µg/mL e cetoconazol a 500 µg/mL foram preparados com água estéril e foram utilizadas como controle positivo de bactérias e da levedura, respectivamente. O controle negativo foi realizado com água estéril. Também se realizou o controle do diluente das amostras.

4.7.1.4 Preparo da solução de TTC

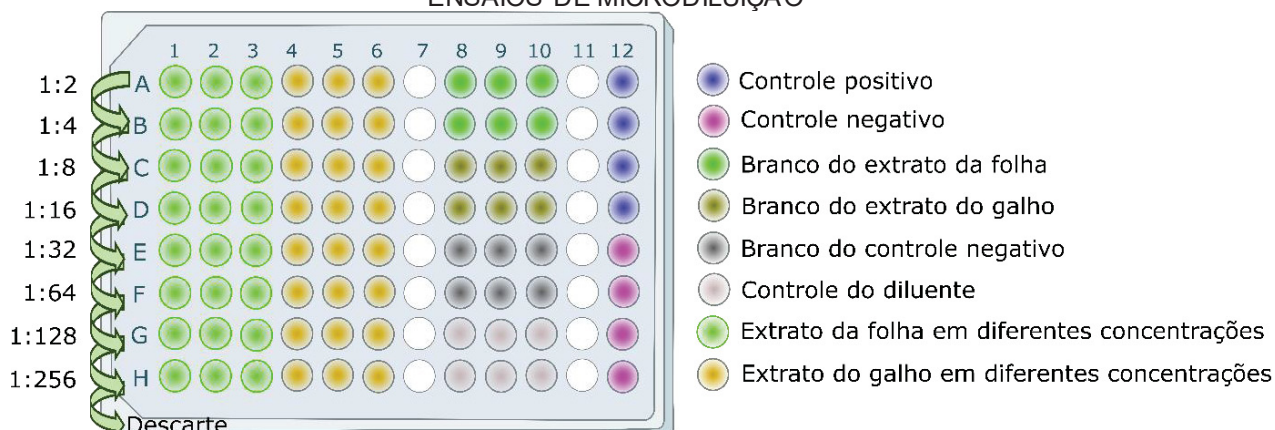
Preparou-se solução 0,125% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC – Neon®) em água estéril. Após completa dissolução, filtrou-se por membrana esterilizante (0,20 µm) e a solução foi armazenada sob refrigeração (2 a 8 °C).

4.7.1.5 Método de microdiluição

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo em “U”. É possível verificar a representação da microplaca utilizada nos ensaios de microdiluição na FIGURA 6.

Todos os poços utilizados receberam 100 µL de caldo. Para as bactérias, utilizou-se o caldo Mueller Hinton e para levedura o caldo Sabouraud Dextrose. Em seguida, adicionou-se a linha A, em triplicata, 100 µL da solução amostra (folíolo ou galho). Posteriormente, diluições seriadas foram realizadas, homogeneizando o conteúdo dos poços e passando alíquotas de 100 µL para a fileira seguinte. Ao chegar à linha H, 100 µL de cada orifício foi descartado. Desta forma, obteve-se as concentrações de 50; 25; 12,50; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,40 mg/mL. Na sequência, foram adicionados 10 µL da suspensão de microrganismos em cada orifício teste (A1-H6).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DE MICROPLACA E DILUIÇÃO UTILIZADA NOS ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO



FONTE: A autora (2022).

O controle positivo foi avaliado nas linhas de A-D da coluna 12, sendo preparado a partir do respectivo caldo e de solução antimicrobiana. Após, foi adicionado 10 μL do microrganismo. No controle negativo (E12-G12) foi utilizado água estéril para substituir o antimicrobiano.

Todas as microplacas foram incubadas à $35 \pm 0,5$ °C por 22 h. Após, adicionou-se 20 μL de solução de TTC 0,125% aos poços e, em seguida, as microplacas retornaram à incubação por mais 2 hs. Posteriormente, as microplacas foram observadas visualmente e se realizaram as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan FC – Thermo Fisher Scientific®) a 540 nm, Como branco, utilizou-se 100 μL de caldo correspondente, 100 μL de amostra ou diluente e 10 μL de salina.

4.7.1.6 Determinação da CIM dos extratos

Com os dados obtidos por meio das leituras em espectrofotômetro das microplacas, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM). Para converter a absorbância em UFC/mL, aplicou-se o valor médio da triplicata de cada fileira (A-H) na equação da linearidade padronizada por Veiga e colaboradores (2019), expressos na TABELA 4, em que “y” corresponde a absorbância e “x” é igual a UFC/mL. A CIM foi determinada pela concentração de amostra teste que levou a um valor de UFC/mL

negativo ou zero, que demonstram o não crescimento microbiano na presença do extrato em determinada concentração.

TABELA 4 – CORRELAÇÃO ENTRE AS LEITURAS NO ESPECTROFOTÔMETRO E AS CONTAGENS EM PLACAS

MICROORGANISMO	EQUAÇÃO
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	$y = 1E-08x + 0,0097$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	$y = 1E-08x + 0,024$
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	$y = 3E-09x + 0,0223$
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	$y = 5E-07x + 0,1264$

FONTE: VEIGA *et al.* (2019).

4.7.2 Determinação da citotoxicidade

4.7.2.1 Cultivo celular

Para a realização dos ensaios celulares, adquiriram-se linhagens tumorais HRT-18 (adenocarcinoma colorretal, código 86040306), MDA-MB-231 (carcinoma humano de mama – código 0392) no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – UFRJ). Além disso, células não tumorais da linhagem McCoy (fibroblasto murino – código 0160) foram obtidas comercialmente no instituto Adolfo Lutz.

O cultivo celular de ambas as células foi realizado em meio RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (GIBCO®) e solução de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente) (GIBCO®). As linhagens foram mantidas em estufa a temperatura e atmosfera controlada (37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade), em uma densidade de 1x10⁵ células/mL de meio.

4.7.2.2 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)

A viabilidade metabólica das linhagens celulares HRT-18, MCF-7 e McCoy foi avaliada após o tratamento com diferentes concentrações de extrato de folíolo de *E. grandiflora*. Para isso, utilizou-se o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) adaptado do método descrito por Mosmann (1983).

Para o tratamento, preparou-se de forma independente uma solução estoque (90.000 µg/mL) do extrato do folíolo, diluindo-o em álcool etílico 70% (v/v). Para o tratamento das células, realizou-se a diluição da solução estoque em meio de cultivo,

visando a obtenção de concentrações variadas do extrato (25 a 900 µg/mL). Nenhuma solução de tratamento ultrapassou a margem de 0,25% de álcool etílico por poço (ILIEVA *et al.*, 2021). Da mesma forma, o controle negativo foi preparado utilizando meio de cultivo e veículo de diluição dos extratos (álcool etílico 70%).

As células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços de fundo chato, utilizando meio de cultivo suplementado com SFB 10% e solução de antibióticos, conforme descrito anteriormente. Para garantir a adesão celular, as microplacas permaneceram em estufa (37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade) por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato, no qual permaneceram em contato durante 72 h. Após esse período, o tratamento foi retirado e se adicionou MTT (0,50 mg/mL) (Sigma-Aldrich®), seguido por incubação em estufa (37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade) por 2 h. Posteriormente, retirou-se o conteúdo dos poços e se adicionou DMSO (Cromoline Química Fina®) para solubilização dos cristais de formazan. As microplacas foram homogeneizadas e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan FC – Thermo Fisher Scientific®) a 570 nm.

A redução do sal MTT do controle negativo (CTRL) foi considerada como 100% de viabilidade metabólica. Os valores de concentração inibitória mínima (CI₅₀) foram determinados a partir do software GraphPad Prism 8.0.1. Executaram-se dois experimentos independentes.

A determinação da porcentagem de células viáveis foi calculada conforme equação (3) descrita por Ebada *et al.* 2008:

$$\% \text{ células viáveis} = 100 \times \frac{\text{Abs células tratadas} - \text{Abs meio cultura}}{\text{Abs células não tratadas} - \text{Abs meio cultura}} \quad (3)$$

Considerando o valor da concentração inibitória média (CI₅₀), também foi possível calcular o índice de seletividade (IS), conforme equação (4) (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021):

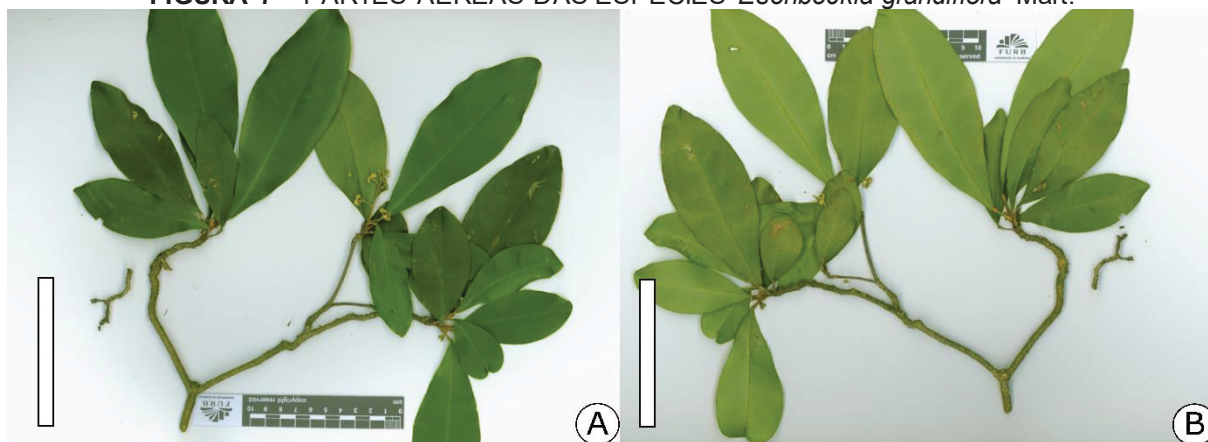
$$IS = \frac{CI_{50}^{\text{célula não tumoral}}}{CI_{50}^{\text{célula tumoral}}} \quad (4)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A espécie *E. grandiflora* (FIGURA 7) apresentou folíolos do tipo composto, com folíolos sésseis obovados a estreito-elípticos de 5,0-14,9 cm de comprimento e 2,5-5,1 cm de largura. O ápice dos folíolos variou entre obtuso e curtamente acuminado, de base cuneada, com margem revoluta e rígido cartáceo opaco. Sua nervação se apresentou como broquidódroma, com nervura mediana e laterais elevadas em ambas as faces. O pecíolo se mostrou cilíndrico, fissurado transversalmente, geniculado no ápice e com dimensões que variam de 0,7-1,8 cm de comprimento a 0,1-0,3 cm de largura. A cápsula do fruto tem formato subgloboso, de coloração castanha-escura. Exibe muitas projeções espiniformes em sua superfície externa e endocarpo amarelo. As características apresentadas vão de acordo com as descritas por Skorupa e Pirani (2002).

FIGURA 7 – PARTES AÉREAS DAS ESPÉCIES *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: Gasper (2021).

LEGENDA: A – Face adaxial; B – Face abaxial. Barra: 10 cm (A-B).

Em vista frontal, ambas as faces apresentam lâmina foliar com paredes anticlinais e células epidérmicas com formato poligonal. A face adaxial é estriada e, mostra-se glabra (FIGURA 8C e 8F) semelhante ao exposto por Buriil, Thomas e Alves (2014). Entretanto, o trabalho de Franco e Albiero (2018) descreve a presença de tricomas em ambas as faces do limbo da espécie. A face abaxial é de pubérula a glabrescente, apresentando tricomas tectores de cutícula estriada, formados de 1-5 células, que apresentaram reação positiva com o reativo de Sudam III (FIGURA 8A e

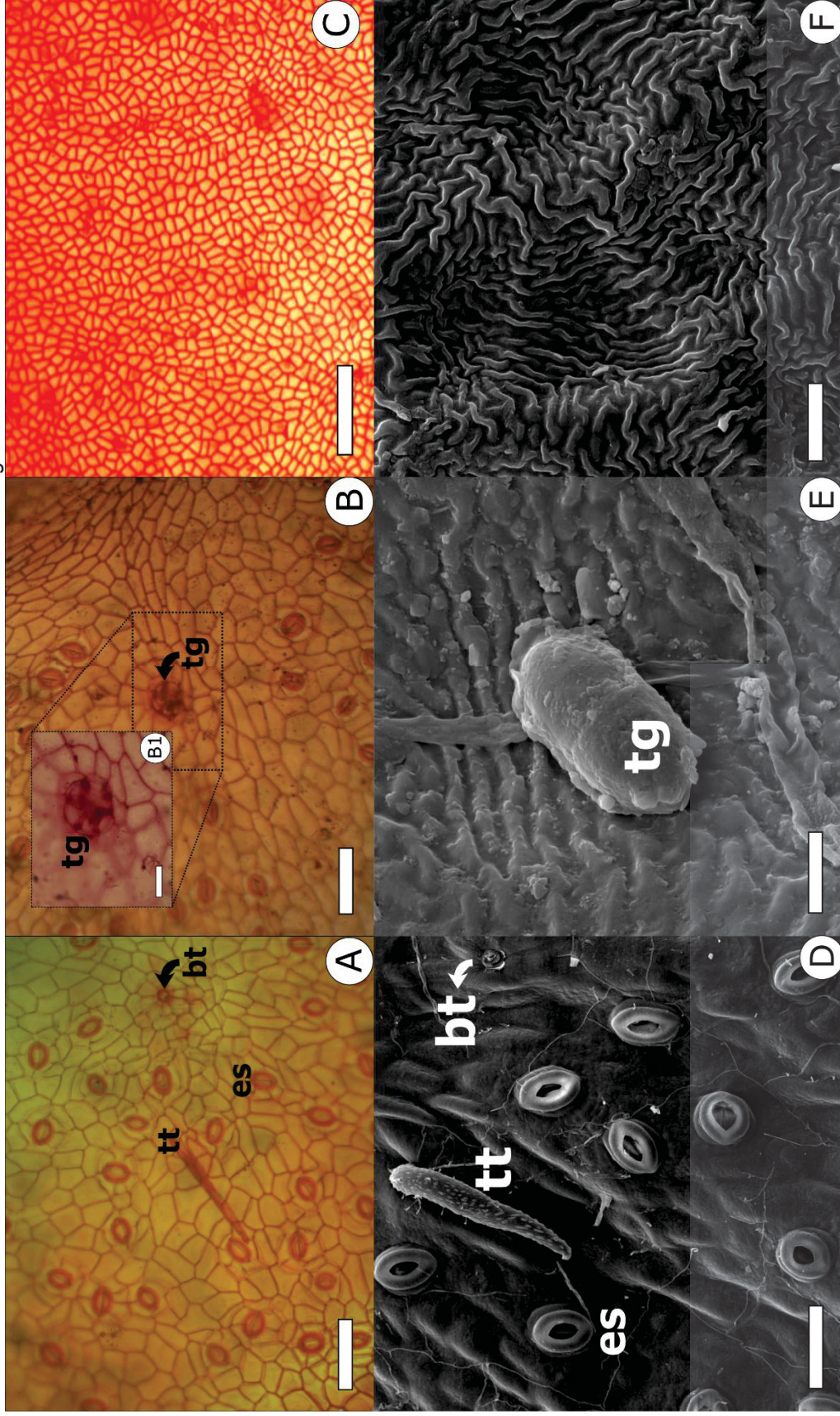
8D). Observados de forma rara, é possível notar na face abaxial do folíolo a presença de tricoma glandular do tipo capitado (FIGURA 8B e 8E), positivo ao Sudam III.

Franco e Albiero (2018) relatam a presença frequente de tricomas glandulares do tipo capitado em primórdios foliares. Entretanto, Cruz e colaboradores (2017) afirmam que a espécie possui apenas tricomas tectores. Apesar disso, é conhecida a presença de tricomas do tipo capitado em outras espécies do gênero, como *E. irwiniana* Kaastra, *E. leiocarpa*, *E. pilocarpoides* Kunth e *E. pumila* (CRUZ *et al.* 2017). *E. febrifuga* e *E. leiocarpa* apresentaram também tricomas do tipo peltado no limbo foliar (MUNTOREANU; CRUZ; MELO-de-PINNA, 2011; FRANCO; ALBIERO, 2018).

Os estômatos são do tipo anomocíticos e estão dispostos somente na face abaxial da lâmina foliar, caracterizando-a como hipoestomática (FIGURA 8A-C). É possível observar estômatos ligeiramente acima das células adjacentes (FIGURA 8D e FIGURA 9A) e as células-guarda com cristas cuticulares evidentes. O índice estomático apresentado foi de 5,97 e, as dimensões médias apresentadas pelas células-guarda foram de 37,15 x 25,91 μm e, para o ostíolo de 16,93 x 11,13 μm .

Cruz e colaboradores (2017) também relataram a presença de estômatos anomocíticos nas espécies *E. leiocarpa*, *E. pilocarpoides* e *E. pumila*, corroborando com os resultados encontrados.

FIGURA 8 – VISTA FRONTAL DE FOLIÓLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Microscopia óptica de luz corada com Sudam III (A e B) e safranina (C); microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (D-F).
 LEGENDA: A, D – Vista frontal da face abaxial, com ênfase em estômatos e tricoma tector de cutícula estriada; B, E – Vista frontal da face abaxial, evidenciando tricoma glandular capitado; C, F – Vista frontal da face adaxial evidenciando cutícula estriada. bt: base do tricoma; es: estômato; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector. Barra: 200 μm (A, B); 50 μm (D); 30 μm (B1) 10 μm (F); 5 μm (E)

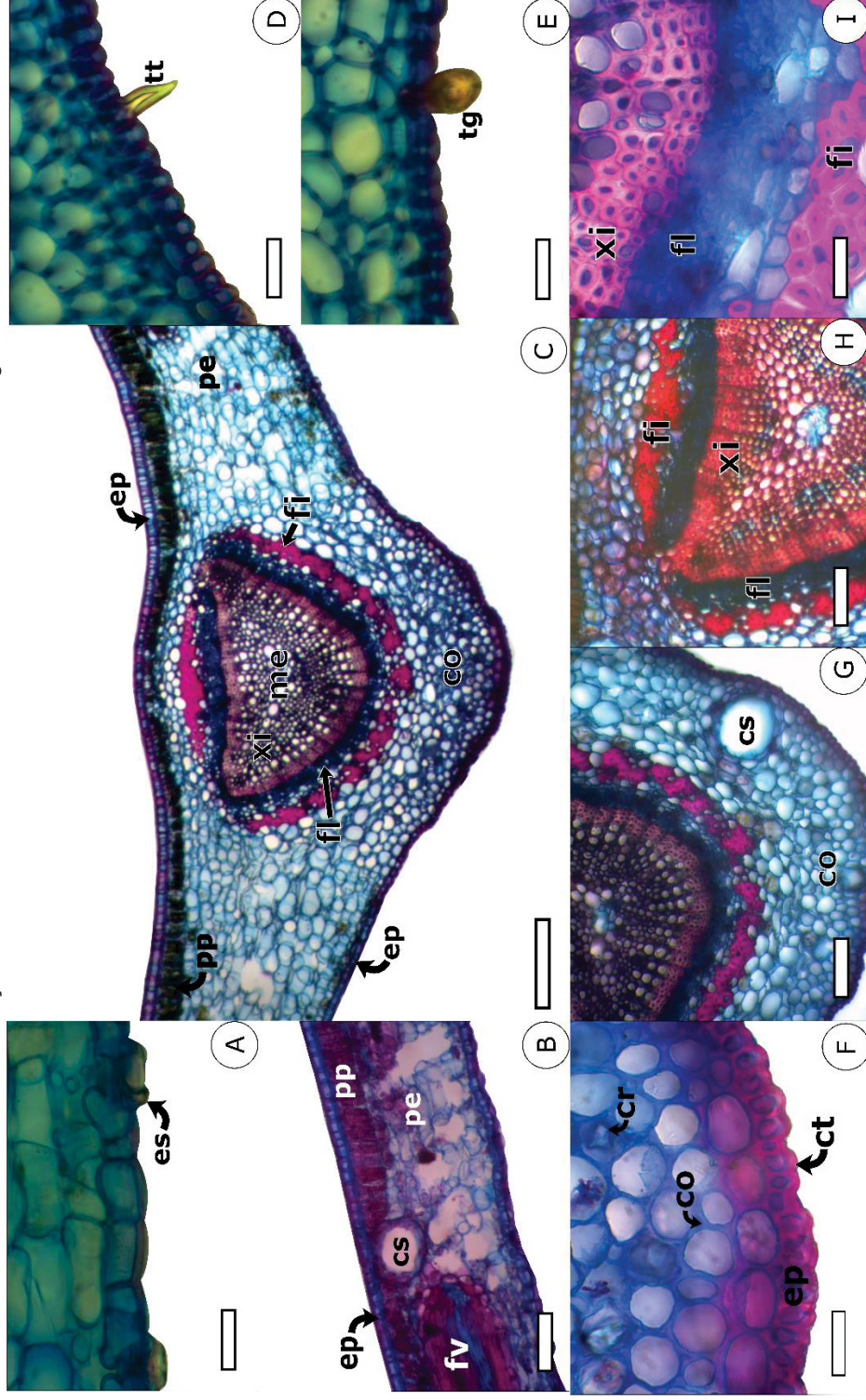
Em secção transversal, a epiderme foliar se mostra uniestratificada com células alongadas periclinamente e levemente maiores na face adaxial do que na face abaxial. Ambas as faces apresentam cutícula delgada, a qual apresentou resultado positivo para Sudam III. O mesofilo é do tipo dorsiventral, sendo formado por uma camada de parênquima paliçádico e cerca de 7-8 camadas de parênquima esponjoso (FIGURA 9C). Existem feixes vasculares colaterais de pequeno porte distribuídos pelo mesofilo, envoltos por uma endoderme e fibras de lignina justapostas ao floema (FIGURA 9B). Apresenta cavidades secretoras de contorno esférico a oval, preferentemente junto a face adaxial, em que o conteúdo apresentou resultado positivo ao Sudam III, demonstrando a possibilidade de produção de óleo volátil pela espécie.

A epiderme foliar se apresenta uniestratificada com cutícula levemente espessada formando flanges cuticulares (FIGURA 9F). O feixe central é único, tem contorno biconvexo com leve curvatura adaxial e apresenta feixe vascular do tipo colateral aberto (FIGURA 9H). O xilema se apresenta na parte interna e o floema voltado para fora em forma de C e um feixe dorsal. Justaposto ao floema, é possível observar grupos descontínuos de fibras de esclerênquima (FIGURA 9C), que apresentaram resultado positivo para floroglucina clorídrica. O colênquima é angular em ambas as faces (FIGURA 9F E 9G) e o parênquima fundamental em torno do feixe é semelhante ao descrito para o limbo foliar. Foi observada presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio (FIGURA 9F).

Observou-se a presença de compostos alcaloídicos e fenólicos no feixe vascular e no mesofilo dos folíolos após reação positiva aos reagentes de Wagner, cloreto férrico e dicromato de potássio, respectivamente. Além disso, grãos de amido foram evidenciados, o que não foi observado no estudo de Franco e Albiero (2018) na nervura central e no mesofilo foliar.

Alcaloides e compostos fenólicos já foram identificados em *E. grandiflora* (OLIVEIRA *et al.*, 1996, 2004; 2005; TRANI *et al.*, 1997, 2004; NUNES *et al.*, 2005; JANUÁRIO *et al.*, 2009).

FIGURA 9 - SECÇÕES TRANSVERSAIS DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Microscopia óptica de luz; dupla coloração com azul de astrá e fucsina básica.

LEGENDA: A – Detalhe para estômatos ligeiramente acima de células adjacentes; B – Região do tricoma glandular; C – Região do mesofilo indicando feixe vascular de pequeno porte; D – Nervura central e lâmina foliar; E – Detalhe do tricoma tector; F – Detalhe da região do colênquima, cutícula e cristal de oxalato de cálcio; G – Região do feixe vascular e colênquima, com detalhe de cavidade secretora; H – Destaque para feixe vascular do tipo colateral aberto; I – Detalhe para floema e xilema. co: colênquima; cr: cristal prismático de oxalato de cálcio; cs: cavidade secretora; ct: cutícula; ep: epiderme; es: estômatos; fi: fibras; fi: floema; fv: feixe vascular; me: medula; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; xi: xilema.

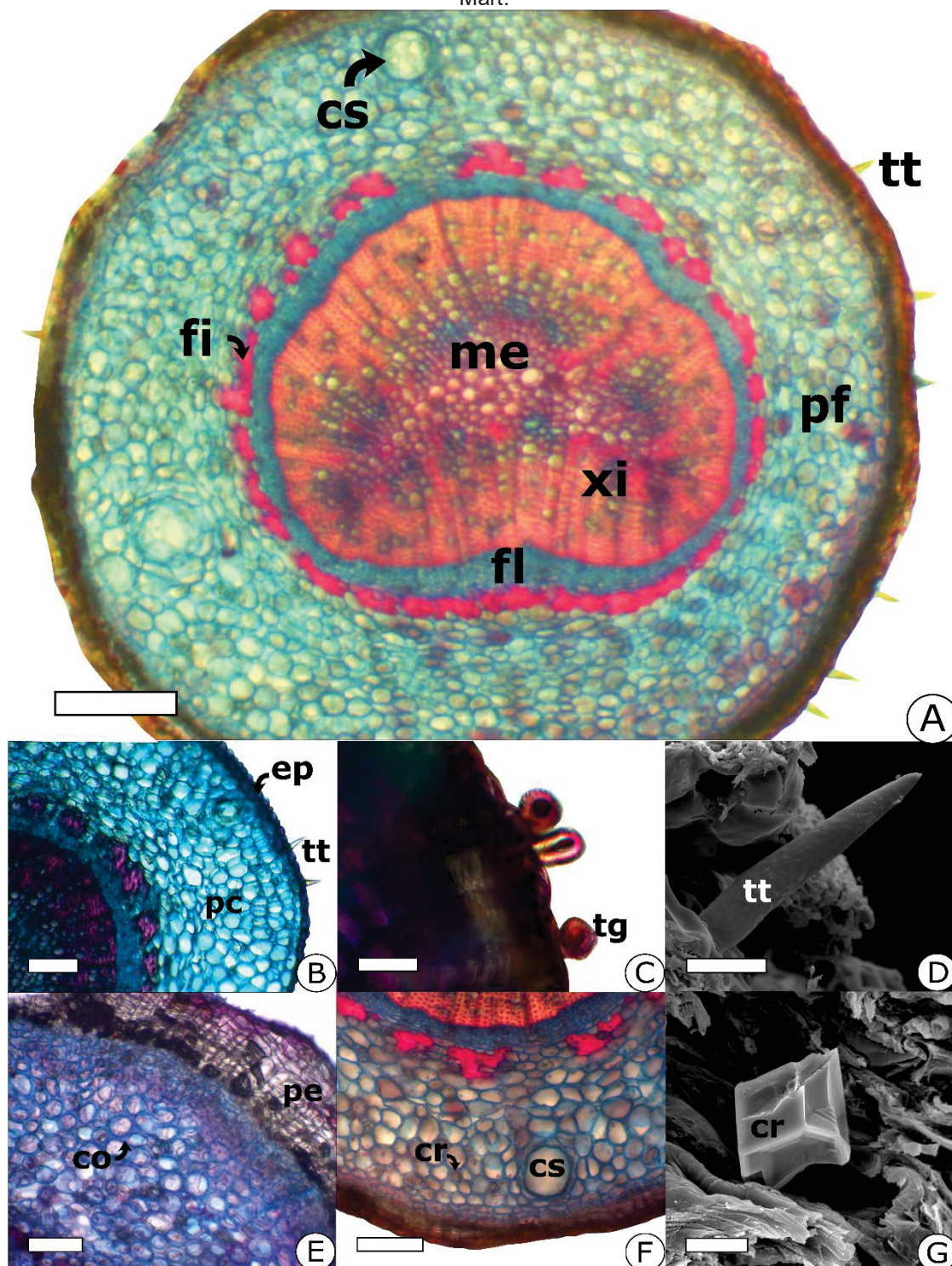
O pecíolo apresenta estrutura rígida e, em secção transversal, observou-se formato circular, com presença de poucos tricomas tectores e glandulares, estes com cutícula de aspecto rugoso (FIGURA 10C). No estudo de Cruz *et al.* (2017), também se observou para esta espécie (e outras espécies do gênero, como *E. irwiniana*, *E. leiocarpa*, *E. pilocarpoides* e *E. pumila*) a presença dos dois tipos de tricomas no pecíolo.

Algumas das secções transversais do pecíolo apresentaram crescimento secundário com periderme, sendo ele constituído por súber pluriestratificado composto por cerca de seis a oito camadas de células tabulares (FIGURA 10E). Entretanto, algumas secções apresentam apenas epiderme e parênquima cortical, caracterizando uma estrutura primária (FIGURA 10B). De acordo com Cruz e colaboradores (2015), o pecíolo de *E. grandiflora* é diferenciado de outras espécies do gênero por apresentar uma distensão em sua parte distal. Isso ocorre devido a proliferação de tecido cortical, justificando a presença de periderme na estrutura.

O córtex apresenta numerosas camadas de parênquima cortical com células arredondadas, cavidades secretoras de formato arredondado e colênquima angular (FIGURA 10B). O cilindro vascular consiste em floema externo e xilema interno, finamente dividido por raios parenquimáticos e presença de parênquima medular. É observado um sistema vascular único, envolto por cerca de três camadas de fibras perivasculares de esclerênquima circundando o floema, que se encontram em grupos (FIGURA 10A). De acordo com Cruz *et al.* (2017), *E. irwiniana*, *E. pilocarpoides* e *E. pumila* também apresentam fibras perivasculares.

Distribuídos no parênquima cortical, cristais prismáticos foram observados raramente (FIGURA 10G). Por meio da energia dispersiva de raios X (EDS), verificou-se a presença de picos de cálcio (Ca, 35,44%), oxigênio (O, 45,16%) e carbono (C, 19,40%). Desta forma, os cristais presentes mostraram serem formados por oxalato de cálcio (FIGURA 11). A presença de fibras de esclerênquima em torno do floema; cavidades secretoras com conteúdo lipídico; amiloplastos e compostos alcaloídicos no parênquima e xilema, e compostos fenólicos no parênquima e feixe vascular foram evidenciados após os testes microquímicos.

FIGURA 10 - SECÇÕES TRANSVERSAIS E LATERAIS DO PECÍOLO DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

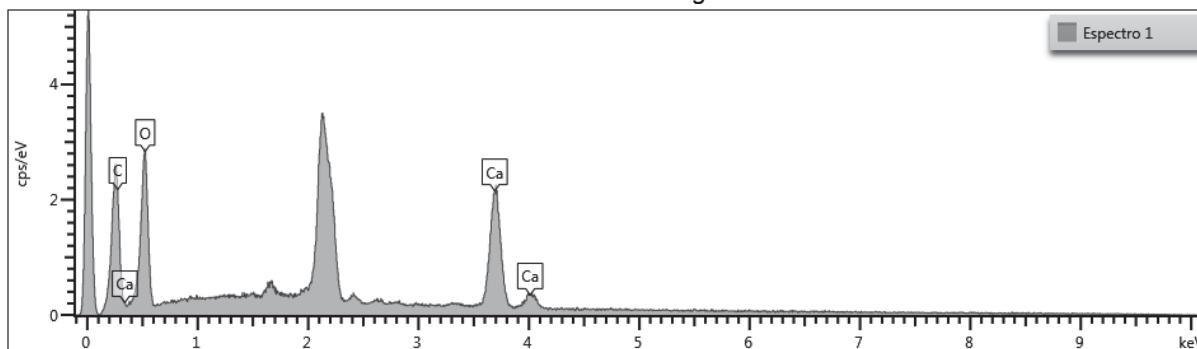


FONTE: A autora (2021).

NOTA: Microscopia óptica de luz; dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (A-C; E-F); microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (D e G).

LEGENDA: A – Aspecto geral do pecíolo; B – Detalhe de parênquima cortical; C – Detalhe de tricoma glandular; D – Detalhe de tricoma tector; E – Parênquima cortical com detalhe para periderme em crescimento secundário; F – Detalhe para cavidade secretora; G – Cristal prismático de oxalato de cálcio. co: colênquima; cr: cristal prismático de oxalato de cálcio; cs: cavidade secretora; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; me: medula; pc: parênquima cortical; pe: periderme; pf: parênquima fundamental; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; xi: xilema. Barra: 200 μ m (A); 100 μ m (B, E e F); 30 μ m (C); 20 μ m (D); 5 μ m (G).

FIGURA 11 - ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS) DOS CRISTAIS DO PECÍOLO EM *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: Complexo de Laboratórios Multiusuários (2022).

NOTA: Os picos não identificados se referem ao elemento ouro utilizado no preparo da amostra. C: 19,40%; O: 45,16% e Ca: 35,44%.

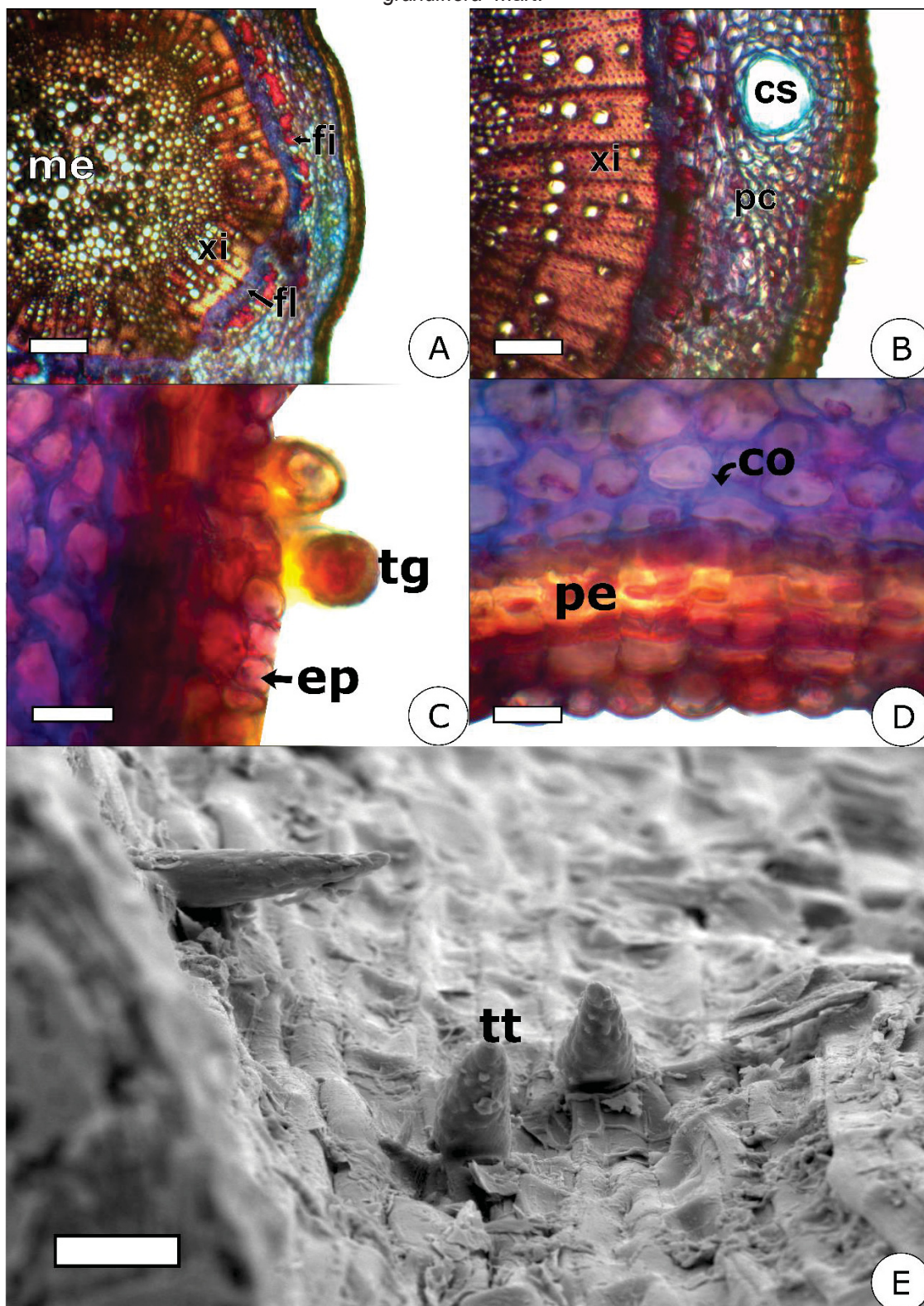
LEGENDA: C – Carbono; Ca – Cálcio; O – Oxigênio.

O galho apresenta formato circular, com presença de raros tricomas tectores e glandulares (FIGURA 12C e 12E). Em estrutura secundária, é possível visualizar epiderme seguida de súber e uma camada de braquiesclereides. Foi evidenciada presença de colênquima angular, seguido de parênquima cortical (FIGURA 12B e 12E). O córtex é formado por cerca de oito camadas de células parenquimáticas ovais e apresenta algumas cavidades secretoras de contorno esférico a oval e conteúdo lipídico, de acordo com resposta positiva com Sudam III.

O feixe vascular do galho se apresenta contínuo e entre o floema e xilema aparece uma discreta faixa do câmbio, sendo o xilema percorrido por raios parenquimáticos estreitos (FIGURA 12A e 12B). É possível observar conjuntos de fibras de tamanho variado em torno do sistema vascular e parênquima medular de forma semelhante ao apresentado pelo pecíolo (FIGURA 12A). Em testes microquímicos, apresentou numerosos amiloplastos e compostos alcaloídicos no parênquima e xilema, e compostos fenólicos no parênquima cortical e medular. Também foi observado a presença de raros prismas de oxalato de cálcio.

Fibras distribuídas tangencialmente ao floema e cristais prismáticos de oxalato de cálcio em células corticais também foram observadas em *E. febrifuga* (SOMAVILLA; FAGG; BRANDÃO, 2018).

FIGURA 12 – SECÇÕES TRANSVERSAIS E VISTA FRONTAL DO GALHO DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



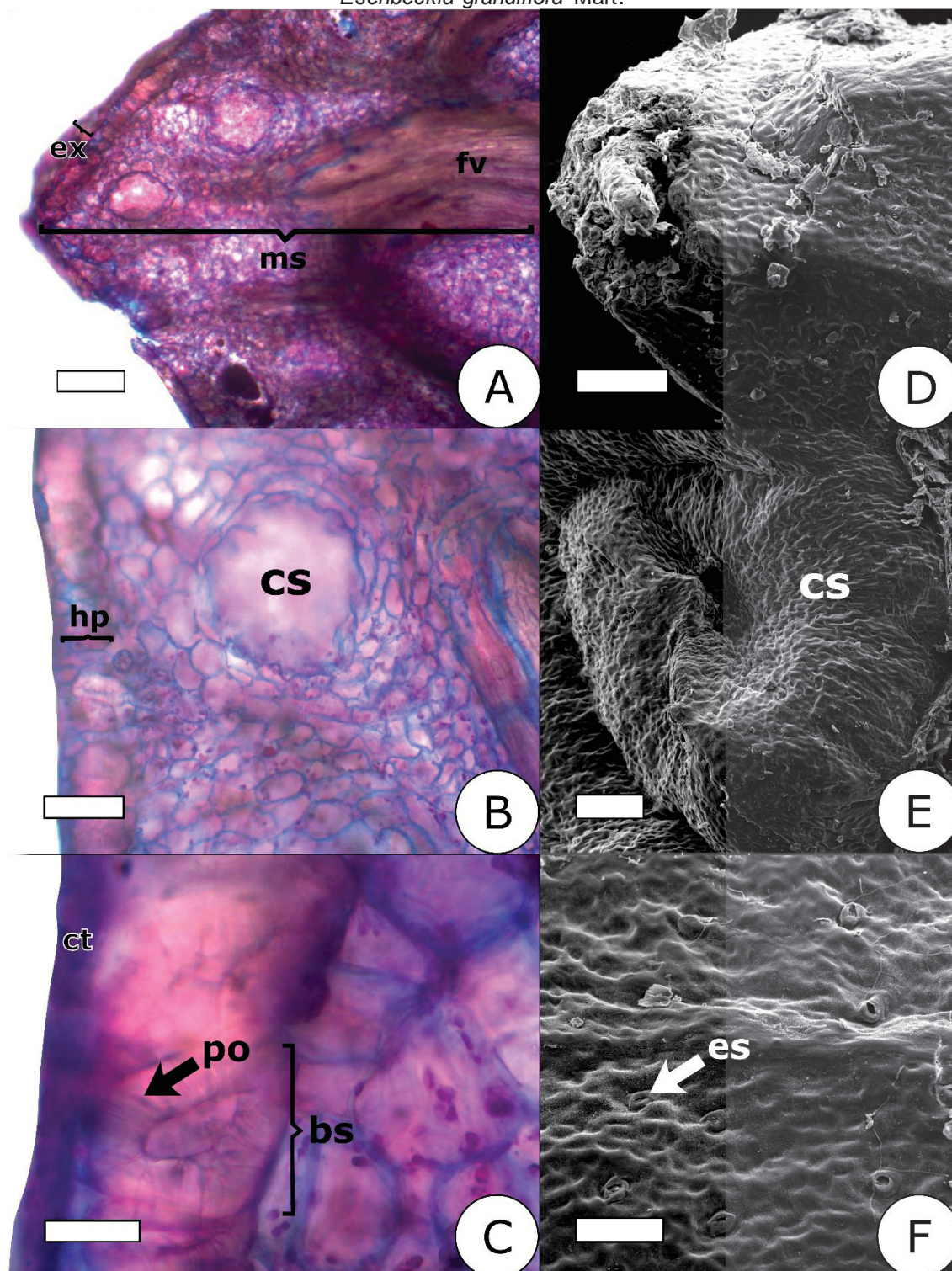
FONTE: A autora (2021).

NOTA: Microscopia óptica de luz; dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (A-D); microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (E).

LEGENDA: A – Aspecto geral do galho; B – Parênquima cortical e feixe vascular; C – Detalhe de tricoma glandular; D – Periderme; E – Tricomas tectores. co: colênquima; cs: cavidade secretora; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; me: medula; pc: parênquima cortical; pe: periderme; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; xi: xilema. Barra: 200 μ m (A); 100 μ m (B); 30 μ m (C e D); 20 μ m (E).

Na análise morfoanatômica dos frutos, verificou-se a presença de oito carpelos. O exocarpo do fruto maduro se apresenta uniestratificado, revestido por cutícula delgada. Semelhante ao descrito por Paschoalini e colaboradores (2022), demonstra hipoderme com grande incidência de braquiesclereídes em que são observadas pontoações simples (FIGURA 13C). O mesocarpo apresenta cerca de 30-35 camadas de células predominantemente parenquimáticas e cavidades secretoras próximas a superfície adaxial (FIGURA 13A, 13B e 13E). Além disso, existem feixes vasculares que se distribuem por todo o mesocarpo. É possível observar estômatos nas projeções da cápsula, em secção paradérmica (FIGURA 13F). Em testes histoquímicos, observa-se a presença de amiloplastos, compostos fenólicos e alcaloídicos no parênquima. Assim como em demais estruturas, não foi observada a presença de mucilagem.

FIGURA 13 – SECÇÕES TRANSVERSAIS (A-C, E) E PARADERMICAS (D e F) DO FRUTO DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Microscopia óptica de luz; dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (A-C);
microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (D-F).

LEGENDA: A – Aspecto geral do fruto; B – Mesocarpo com detalhe para cavidade secretora; C –
Detalhe de braquiescleríde; D – Projeções espiniformes em secção paradermica; E – Detalhe para
cavidade secretora; F – Face adaxial de secção paradermica. bs: braquiescleríde; cs: cavidade
secretora; ct: cutícula; ep: epiderme; es: estômato; ex: exocarpo; fv: feixes vasculares; hp: hipoderme;
ms: mesocarpo; po: pontoação simples de braquiescleríde. Barra: 200 µm (A, D-E); 100 µm (B, F);
30 µm (C).

Para todas as estruturas analisadas (folíolo, pecíolo, galho e fruto), realizaram-se ensaios microquímicos conforme descrito na seção 4.2.3. Observaram-se a presença de compostos fenólicos e alcaloídicos no parênquima do mesocarpo do fruto, após reação positiva aos reagentes de Wagner, cloreto férrico e dicromato de potássio. Os mesmos compostos também foram observados no parênquima, na nervura central e no feixe vascular do folíolo, pecíolo e galho.

Reações com Sudam III evidenciaram o conteúdo lipídico nas cavidades secretoras, bem como em tricomas glandulares e cutículas presentes em todas as estruturas estudadas. Não foram obtidas reações positivas frente ao azul de metileno. Grãos de amido foram evidenciados na nervura central e nos feixes vasculares, bem como no parênquima de todas as estruturas. Observou-se reação positiva frente à floroglucina clorídrica das fibras justapostas ao floema no folíolo, pecíolo e galho. Já no fruto, a reação positiva se deu nos feixes dispostos no mesocarpo e em braquiesclereídes presentes na hipoderme. Por fim, o comportamento insolúvel dos cristais frente ao ácido acético 6% é indicativo de composição de cristais de oxalato de cálcio, sendo observado em todos os ensaios realizados (TABELA 5).

TABELA 5 - TESTES MICROQUÍMICOS APLICADOS ÀS SECÇÕES TRANSVERSAIS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

REAGENTE	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	FOLILOLO	PECÍOLO	GALHO	FRUTO
azul de metileno	mucilagens	-	-	-	-
cloreto férrico	compostos fenólicos	+	+	+	+
dicromato de potássio	compostos fenólicos	+	+	+	+
floroglucina clorídrica	ligninas	+	+	+	+
Iugol	amidos	+	+	+	+
reagente de Wagner	alcaloides	+	+	+	+
Sudam III	lipídeos	+	+	+	+
ácido acético 6%	cristais de oxalato de cálcio	+	+	+	+

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: (+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR HEADSPACE ESTÁTICO

Para a realização das análises por S-HS, realizou-se levantamento na literatura dos parâmetros para a análise e desta forma, prosseguiu-se com a otimização das condições de análise utilizando como variáveis o tempo e temperatura de incubação da amostra.

Neste sentido, realizou-se o planejamento experimental 2² para a otimização do processo de amostragem de compostos voláteis em droga vegetal por HS estático.

A condição utilizada foi selecionada considerando o maior número de picos no cromatograma obtido. A TABELA 6 mostra a matriz do planejamento de experimentos, e os resultados com o número de picos cromatográficos obtidos em cada análise.

TABELA 6 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COM PONTO CENTRAL

MÉTODO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)	NÚMERO DE PICOS CROMATOGRÁFICOS
1a	80	15	67
1b	80	15	69
2a	100	15	73
2b	100	15	65
3a	80	25	56
3b	80	25	57
4a	100	25	88
4b	100	25	90
5a	90	20	74
5b	90	20	64
5c	90	20	72

FONTE: A autora (2022).

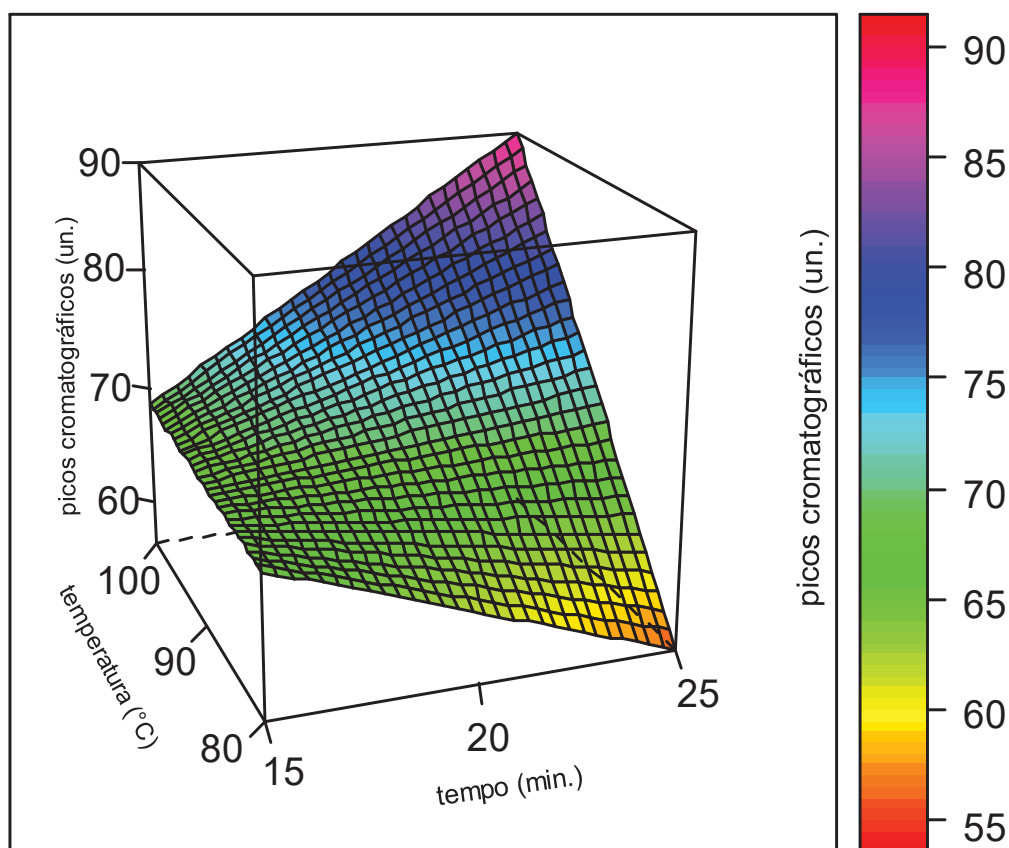
NOTA: a, b e c se referem à replicata.

Os resultados demonstram que o maior número de picos foi obtido no método 4. O valor dos efeitos indica o quanto cada fator contribuiu na obtenção dos picos cromatográficos. A variável tempo apresentou um efeito principal de 4,25, enquanto para temperatura se mostrou igual a 16,75. O efeito de interação entre os fatores também foi avaliado, apresentando um valor de 15,75. Todos os efeitos exerceram um efeito positivo sobre a resposta, o que significa que ao passar do nível baixo para o alto, o número de picos esperado aumenta.

A avaliação da significância dos efeitos foi realizada empregando o teste ANOVA, a um nível de significância de 90%. A temperatura mostrou influenciar os resultados obtidos ($p\text{-valor} = 0,0872$, $\alpha = 0,10$), o que também foi observado com o efeito de interação entre as variáveis ($p\text{-valor} = 0,0968$, $\alpha = 0,10$). A variável tempo não se mostrou significativa ($p\text{-valor} = 0,5062$, $\alpha = 0,10$), o que indica que não possui influência sobre a resposta esperada. Virgiliou *et al.* (2021) também observaram um efeito não significativo para este fator ao otimizar metodologia para análise do óleo volátil comercial de lavanda.

A curvatura do modelo foi avaliada ao incorporarmos a soma dos quadrados da curvatura ($MS_E = 28$) a ANOVA, podendo ser realizada a comparação com o quadrado médio do erro ($SS_{\text{curvatura}} = 0,6696$). Com um $p\text{-valor} = 0,8913$ ($\alpha = 0,05$), têm-se que H_0 é verdadeira e, portanto, não existe falta de ajuste no modelo.

GRÁFICO 1 - SUPERFÍCIE RESPOSTA PARA O EFEITO DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPO E TEMPERATURA SOBRE O NÚMERO DE PICOS CROMATOGRÁFICOS



FONTE: A autora (2022).

Conforme observado no

GRÁFICO 1, referente a superfície resposta para a amostragem por HS, observa-se que o maior número de picos é alcançado com incubação da amostra em 100 °C. Esta temperatura também foi selecionada em otimização de metodologia realizada por Fang *et al.* (2006) para análise de raízes e rizomas de *Curcuma wenyujin* Y.H.Chen & C.Ling (sin. *Curcuma aromática* Salisb.). Estes pesquisadores afirmam que temperaturas superiores tendem a reduzir os analitos de interesse. Zhu e colaboradores (2018) definiram como ponto ótimo uma incubação à 95 °C, entretanto, este foi o maior nível testado em seus experimentos. Triaux e colaboradores (2021) avaliaram esta variável em níveis de 80-140 °C, observando efeito negativo em temperaturas maiores que 125 °C. Os autores relatam que um nível maior de temperatura tem potencial para minimizar a recuperação de compostos terpenoides.

Apesar de não mostrar efeito direto sobre o resultado, o tempo é capaz de afetar o número de picos ao interagir com a temperatura. Desta forma, selecionou-se o tempo de 25 min para a incubação da droga vegetal. Zhu *et al.* (2018) relataram um aumento na degradação de compostos em períodos maiores que 20 min. Entretanto,

no trabalho de Triaux *et al.* (2021), este efeito foi observado somente após 30 min. Virgiliou e colaboradores (2021) relataram efeitos não significativos desta variável. Apesar disso, o tempo de equilíbrio prolongado se mostra positivo para uma melhor difusão e transferência de massa durante a extração (ZHU *et al.*, 2018). Outra variável descrita na literatura como não significativa é a velocidade de agitação do processo (TRIAUX *et al.*, 2021; VIRGILIOU *et al.*, 2021), entretanto, esta variável não foi otimizada.

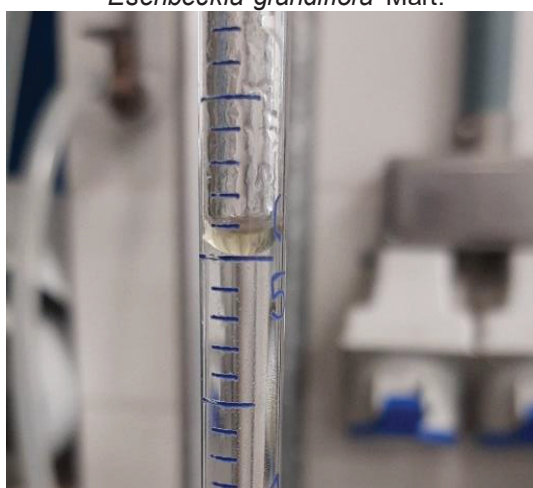
Após a estabelecer as condições de análise de HS, realizou-se a análise da fração volátil de folíolos e galhos secos de *E. grandiflora* com uma incubação em 100 °C/25 min.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM *Esenbeckia grandiflora*

5.3.1 Óleo volátil de folíolos

A hidrodestilação realizada com os folíolos de *E. grandiflora* e apresentou rendimento médio de 47,95 mg (FIGURA 14).

FIGURA 14 - ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO PELA HIDRODESTILAÇÃO DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



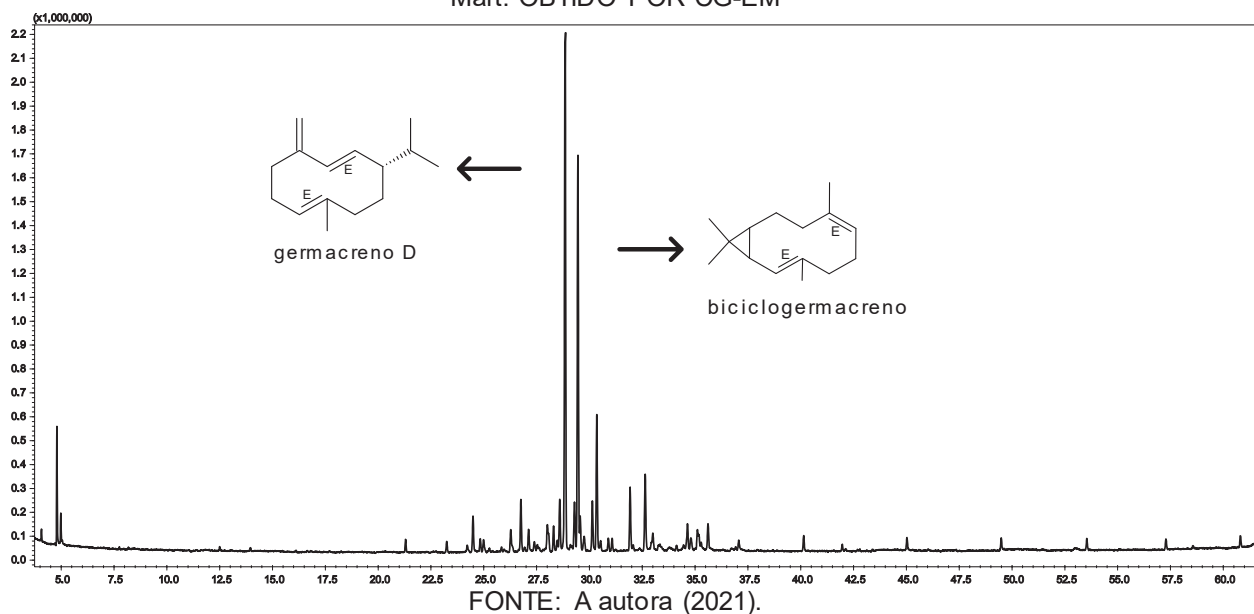
FONTE: A autora (2021).

Embora já tenha sido descrita na literatura estruturas celulares que possam indicar a presença de óleos voláteis nesta espécie, não foram localizados estudos acerca da caracterização química do óleo essencial e da fração volátil de folíolos e galhos de *E. grandiflora*.

A análise por CG-EM e CG-DIC do óleo volátil obtido por hidrodestilação apresentou um total de 49 constituintes identificados, representando 90,94% dos constituintes do óleo essencial. O perfil cromatográfico obtido com o óleo volátil (FIGURA 15), revelou-se constituído principalmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (71,98%). Além disso, observou-se a presença de sesquiterpenos oxigenados (15,47%) e monoterpene oxigenado (0,20%). Outros 3,29% são representados por álcoois, cetonas, ácido carboxílico, éster e diterpeno (TABELA 7, p. 77).

Outras espécies da família Rutaceae apresentaram na sua composição química majoritariamente hidrocarbonetos sesquiterpênicos. O óleo volátil obtido das folhas de *Cedrelopsis grevei* Baill. & Courchet (Rutaceae) é um exemplo, visto que este é constituído em sua maior parte por hidrocarbonetos sesquiterpênicos e com pequena fração de monoterpene oxigenados (AFOULOUS *et al.*, 2013).

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. OBTIDO POR CG-EM



Por meio da caracterização química do óleo volátil dos folíolos de *E. grandiflora*, observou-se que ambos os constituintes majoritários são hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo eles: germacreno D (28,32%) e biciclogermacreno (20,97%).

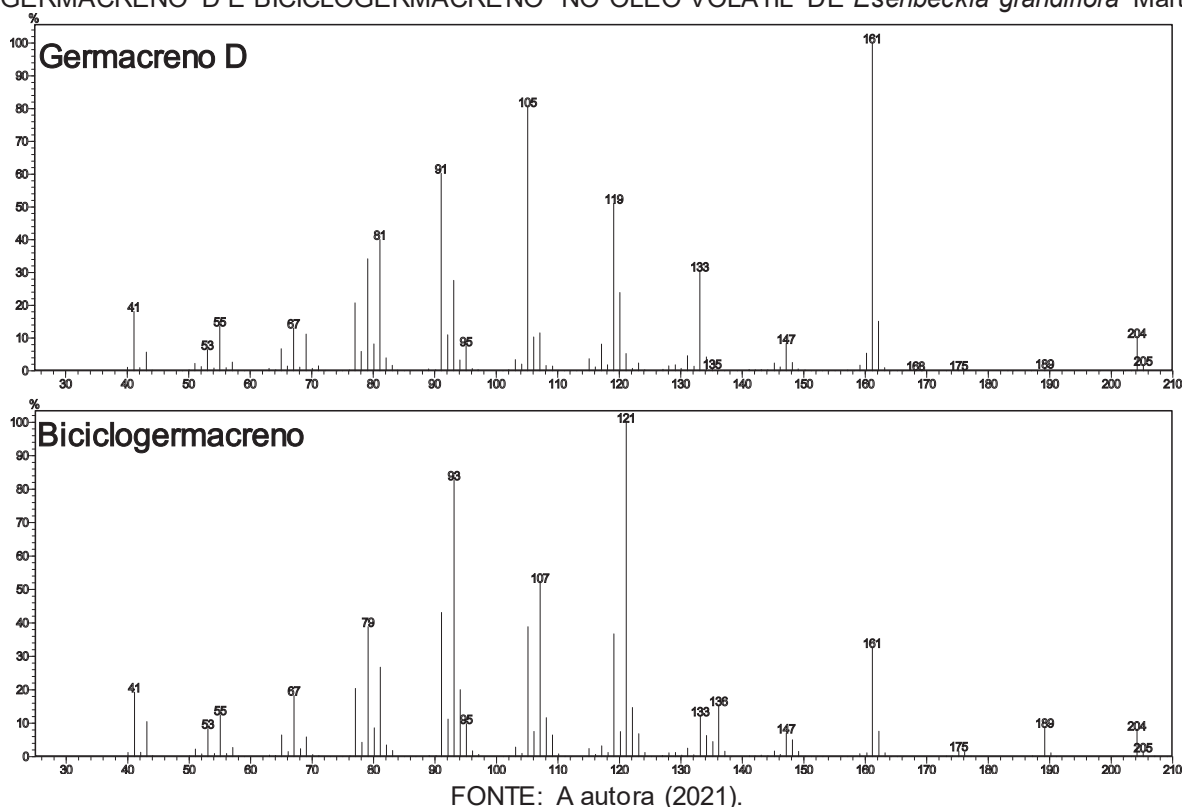
Outras duas espécies do gênero *Esenbeckia* tiveram seus óleos voláteis analisados. Para o óleo volátil das folhas de *E. almawillia* Kaastra, o constituinte presente em maior porcentagem foi o sesquiterpeno β -cariofileno, enquanto o óleo essencial obtido de suas cascas foi constituído majoritariamente pelo fenilpropanoide

safrol (BARROS-FILHO *et al.*, 2004). O óleo volátil obtido de folhas de *E. yaaxhokob* (sin. *E. berlandieri*) é descrito por Mata e colaboradores (1998) como sendo composto em 84% por 2-tridecanona.

Além disso, óleos voláteis de outras espécies da família Rutaceae como *Lunasia amara* Blanco, *Brombya platynema* F.Muell., *Flindersia acuminata* C.T.White e *Zanthoxylum rugosum* A.St.-Hill. & Tul. (sin. *Zanthoxylum caribaeum* subsp. *rugosum* (A.St.-Hil. & Tul.) Reynel) também apresentam como constituintes majoritários o germacreno D e o biciclogermacreno (BROPHY *et al.*, 1997; BROPHY; GOLDSACK; FORSTER, 2004; 2005; MOURA *et al.*, 2006).

Os espectros de massas obtidos para os constituintes caracterizados como germacreno D e biciclogermacreno podem ser visualizados na FIGURA 16.

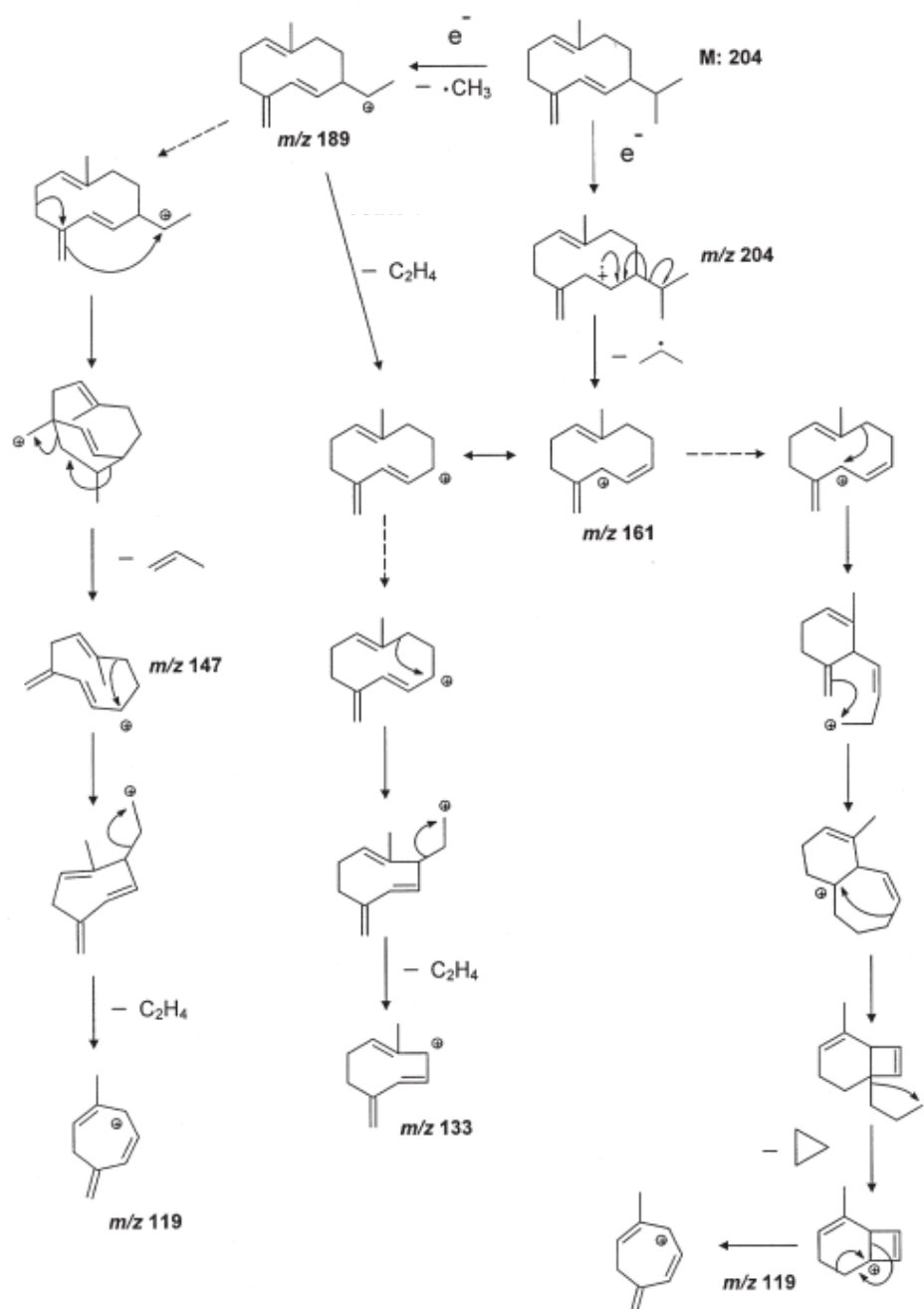
FIGURA 16 - ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO GERMACRENO D E BICICLOGERMACRENO NO ÓLEO VOLATIL DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



De acordo com Steliopoulos e Mosandl (2001), o pico base do germacreno D de razão m/z 161 é gerado por uma clivagem alfa do íon molecular (m/z 204), levando a perda de um radical isopropílico. Uma clivagem neutra envolvendo a perda de C_2H_4 em 161 formará o fragmento m/z 133 que, ao se decompor, irá gerar íons abundantes

em m/z 105 e 91 (perda de C_2H_4 e C_3H_6 , respectivamente). Demais vias de fragmentação propostas pelos autores podem ser visualizadas na FIGURA 17.

FIGURA 17 - PROPOSTAS DE VIAS DE FRAGMENTAÇÃO PARA O GERMACRENO D



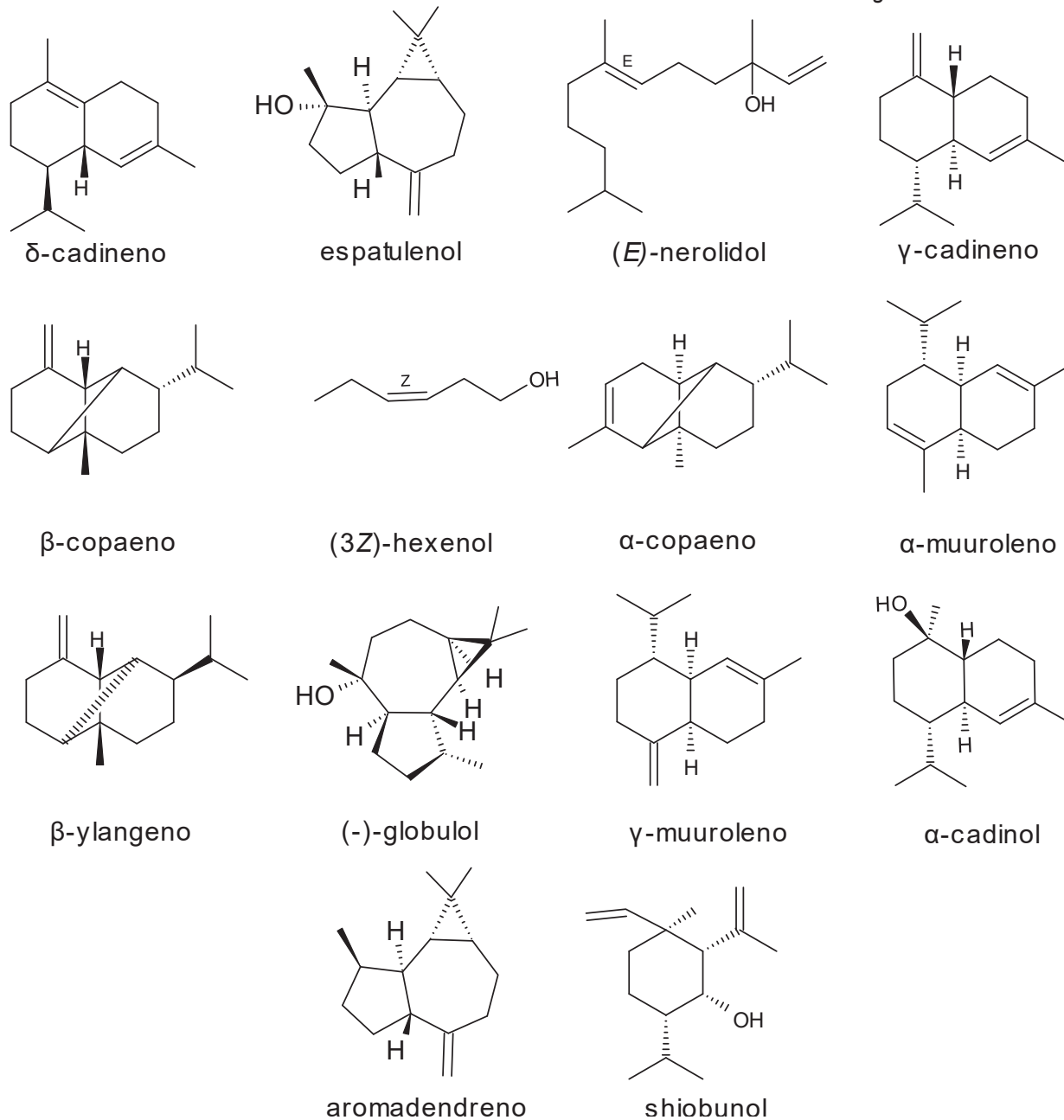
FONTE: Steliopoulos; Mosandl (2001).

Estudos mostram que o germacreno D é um importante intermediário na biossíntese de outros compostos. Sua isomerização em condições ácidas torna possível a obtenção de sesquiterpenos do tipo cadinano, muurolano, amorfano e bourbonano (YOSHIRA *et al.*, 1969; BÜLOW; KÖNIG, 2000). De forma semelhante,

o biciclogermacreno pode intermediar a síntese de compostos como ledeno, viridiflorol e espatulenol (TRAN; CRAMER, 2014).

Como constituintes secundários, destacam-se no óleo volátil dos folíolos, em ordem decrescente: δ -cadineno, espatulenol, (*E*)-nerolidol, γ -cadineno, β -copaeno, (3*Z*)-hexenol, α -copaeno, α -muuroleno, β -ylangeno, (-)-globulol, γ -muuroleno, α -cadinol, aromadendreno e shiobunol. As estruturas das substâncias estão representadas na FIGURA 18.

FIGURA 18 - CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

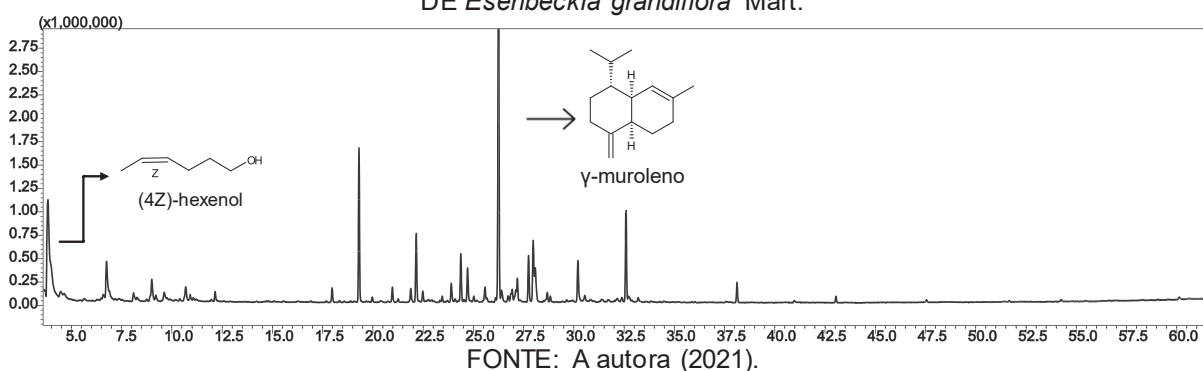


FONTE: A autora (2022).

5.3.2 Frações voláteis de folíolos e galhos

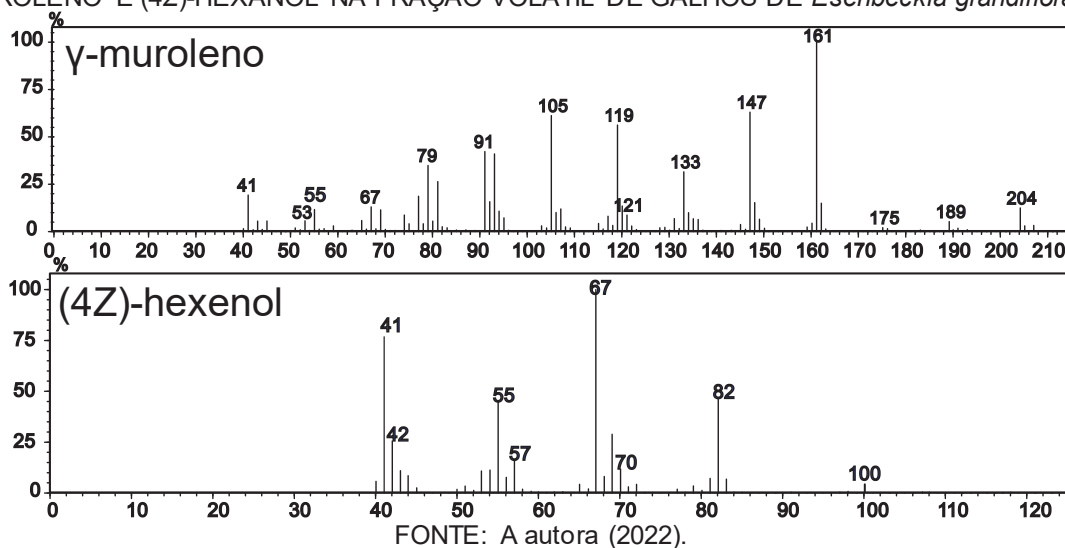
A composição química dos compostos voláteis dos folíolos, resultou na identificação de 53 substâncias (89,80%), sendo que o perfil obtido por S-HS-GC-EM (FIGURA 19) foi constituído majoritariamente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (59,14%). Observou-se ainda a presença de 6,55% de sesquiterpenos oxigenados e 0,87% de monoterpenos oxigenados. Além disso, 23,24% dos compostos voláteis eram constituídos por substâncias de outras classes, sendo destes, 17,84% álcoois (TABELA 7, p. 77).

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR SHS-GC-MS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



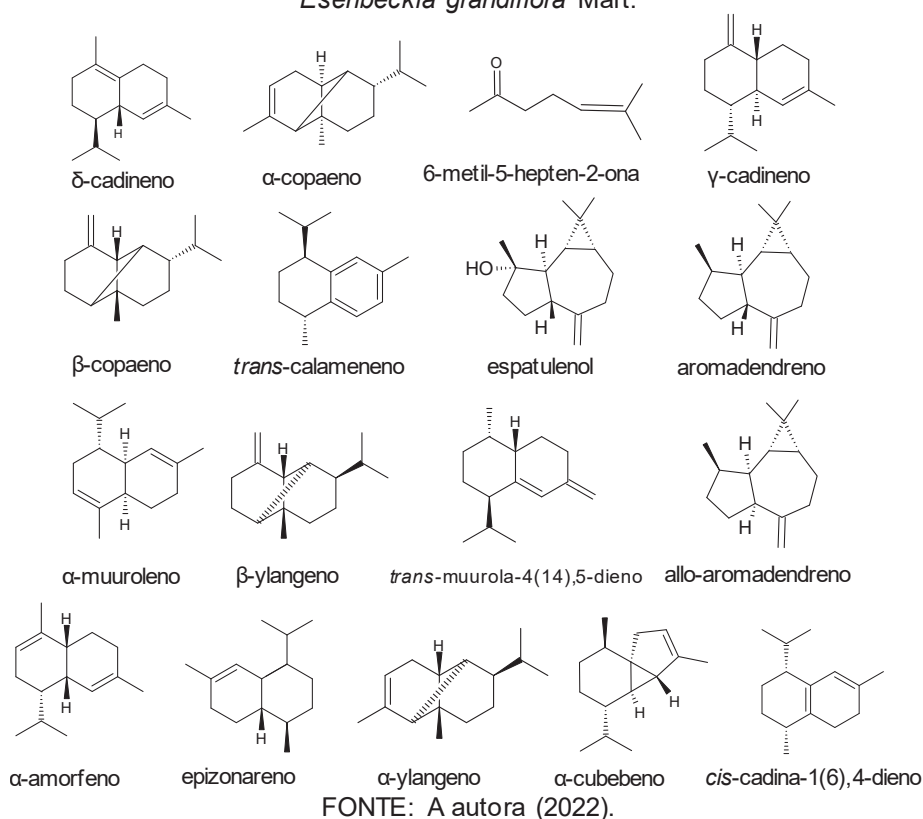
Na fração volátil dos folíolos, obteve-se como constituintes de maior concentração o hidrocarboneto sesquiterpênico γ -muroleno (18,04%) e o álcool (4Z)-hexanol (16,71%) (FIGURA 20). É importante salientar que houve uma coeluição de um componente da coluna cromatográfica (siloxano) com o pico referente ao γ -muroleno. Verificou-se que esta mesma substância estava presente na leitura dos brancos de amostra. Desta forma, para se calcular a área referente ao pico γ -muroleno, desconsiderou-se a área média deste componente no branco de amostra.

FIGURA 20 - ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO γ -MUUOLENO E (4Z)-HEXANOL NA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



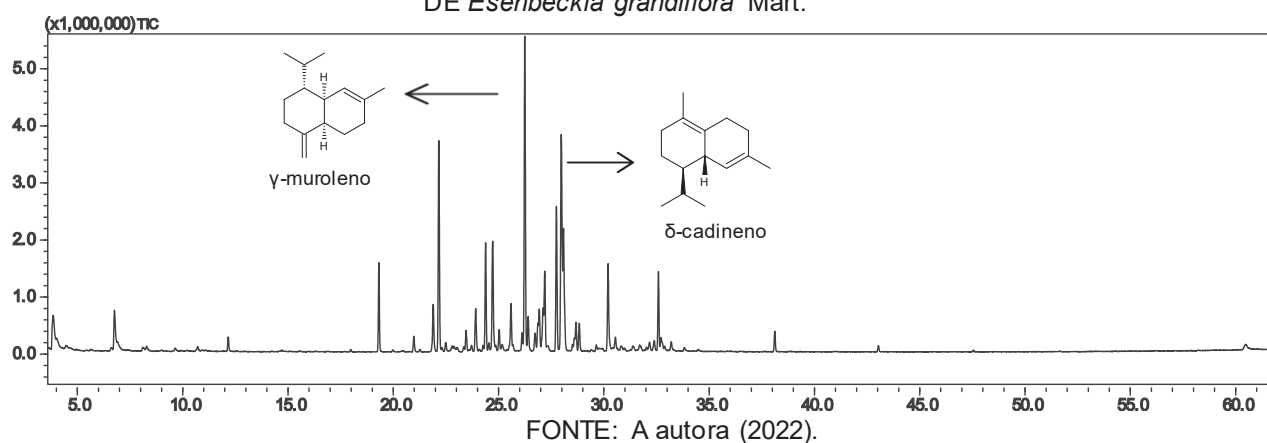
Como constituintes secundários dos folíolos (FIGURA 21), têm-se em ordem decrescente: δ -cadineno, α -copaeno; 6-metil-5-hepten-2-ona; γ -cadineno; β -copaeno; *trans*-calameneno; espatulenol; aromadendreno; α -muuroleño; β -ylangeno; *trans*-muuroleño-4(14),5-dieno; *allo*-aromadendreno; α -amorfenol; epizonareno; α -ylangeno; α -cubebeno; *cis*-cadina-1(6),4-dieno.

FIGURA 21 - CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLIÓLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



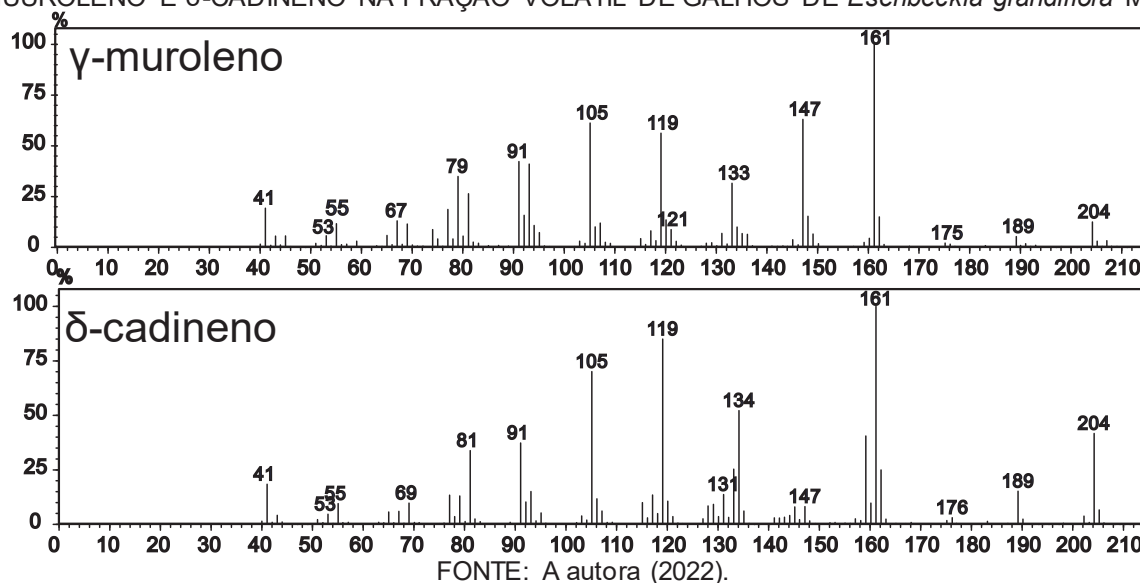
O perfil cromatográfico (FIGURA 22) obtido por S-HS com os galhos de *E. grandiflora* permitiu a identificação de 53 constituintes (93,31%). Semelhante ao obtido para fração volátil dos folíolos, a maioria de seus compostos são hidrocarbonetos sesquiterpênicos (78,48%). Também estão presentes sesquiterpenos oxigenados com concentração de 8,24% e monoterpenos oxigenados representando 0,50%. Outras classes representam 6,01% da fração volátil, sendo destes 3,53% álcoois (TABELA 7, p. 77).

FIGURA 22 - CROMATOGRAMA OBTIDO POR S-HS-GC-MS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



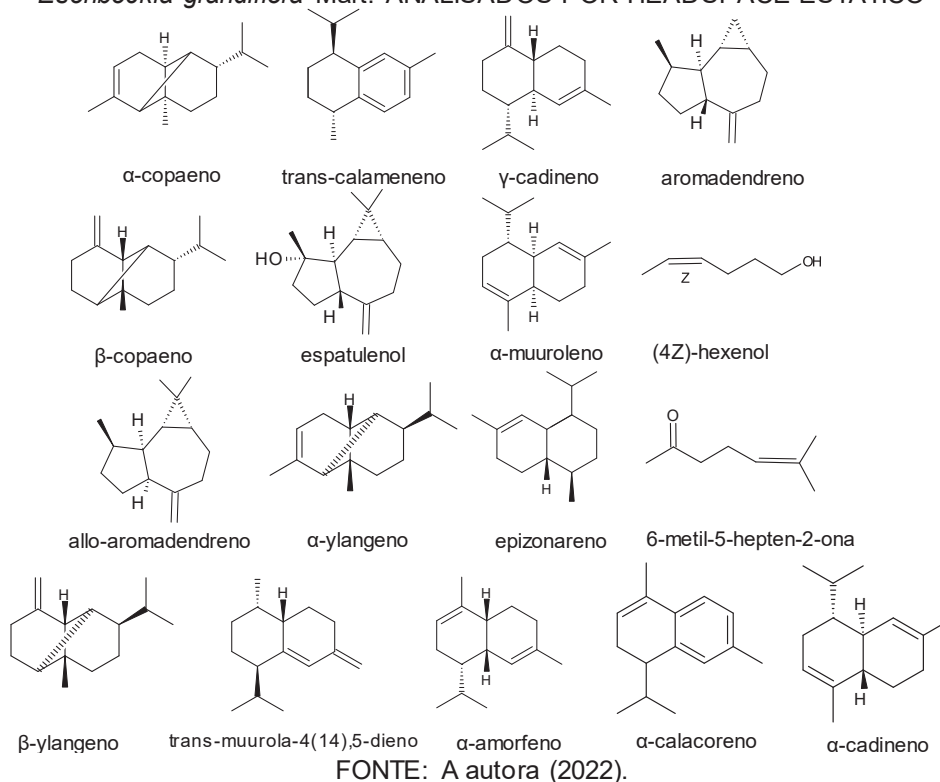
Na análise da fração volátil dos galhos, os dois constituintes presentes em maior concentração foram o γ -muroleno (13,25%) e o δ -cadineno (10,52%), ambos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (FIGURA 23). O pico cromatográfico referente ao γ -muroleno também apresentou coeluição com substância da coluna cromatográfica. Novamente, desconsiderou-se a área média desta substância no branco de amostra para se obter o valor da área referente ao γ -muroleno.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS CARACTERIZADOS COMO γ -MUUROLENO E δ -CADINENO NA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



Os demais compostos secundários dos galhos são, em ordem decrescente: α -copaeno, *trans*-calameneno, γ -cadineno, aromadendreno, β -copaeno, espatulenol, α -muuroleno, (4*Z*)-hexenol, *allo*-aromadendreno, α -ylangeno, epizonareno, 6-metil-5-hepten-2-ona, β -ylangeno, *trans*-muurolo-4(14),5-dieno, α -amorfenol, α -calacoreno e α -cadineno (FIGURA 24).

FIGURA 24 - CONSTITUINTES SECUNDÁRIOS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. ANALISADOS POR HEADSPACE ESTÁTICO

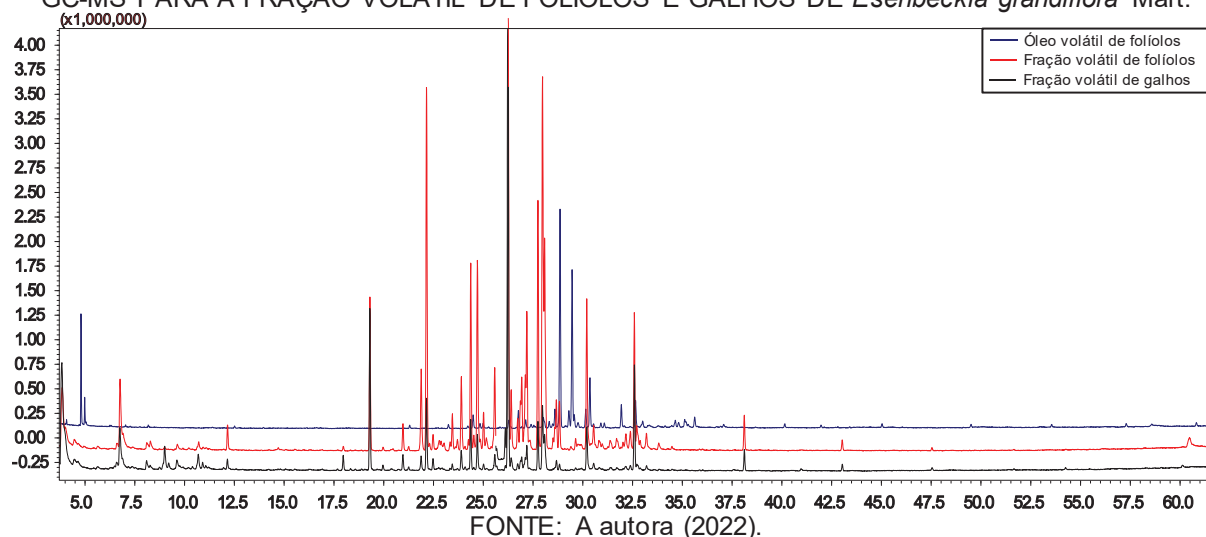


Por meio da comparação do perfil obtido para os compostos voláteis de folhas e galhos de *E. grandiflora* por S-HS observa-se que ambos se diferem entre si em 13 constituintes. O folíolo apresenta dehidroxi-*cis*-óxido de linalool, 2,6-dimetil-ciclohexanol, β -ciclocitral, 4,6-dimetil-dodecano, β -cubebeno, β -elemeno, (*E*)- α -ionona, 6,9-guaiadieno, *cis*-muuro-la-4(14),5-dieno, β -vetispireno, (*E*)-nerolidol, globulol e α,α -dimetoxi- α -fenilacetofenona. Enquanto que o galho possui *n*-hexanol, *trans*-óxido de linalool, linalool, safranal, δ -elemeno, isoleveno, sativeno, β -maalieno, *cis*-muuro-la-3,5-dieno, α -humuleno, *trans*-cicloisolongifol-5-ol, α -corocaleno e eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol.

A maior diferença observada entre as duas frações analisadas por S-HS se deve a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, em que a fração os galhos apresenta 78,47% enquanto os folíolos apresentam 59,14%. Observou-se também que os folíolos possui 17,84% de álcoois e os galhos 3,53%.

Ao realizarmos uma análise comparativa do óleo volátil do folíolo com os constituintes voláteis dos folíolos e galhos, observam-se que 26 substâncias em comum. Destas, têm-se 16 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 9 sesquiterpenos oxigenados e uma cetona. O perfil cromatográfico obtido para as três análises é comparado na FIGURA 25.

FIGURA 25 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CG-EM PARA O ÓLEO VOLÁTIL E SHS-GC-MS PARA A FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.



Ao comparar os compostos do óleo volátil com as substâncias da fração volátil dos folíolos da espécie, observa-se que um total de 29 constituintes foram

identificados por ambas as técnicas, sendo em sua maioria caracterizados como hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Na análise do óleo volátil, 17 substâncias foram encontradas apenas no óleo volátil, representado 57,98% (FIGURA 26). Dentre eles, destacam-se os componentes majoritários: germacreno D e biciclogermacreno, que totalizam 49,29%. Triaux e colaboradores (2021) afirmam que diferenças químicas são esperadas ao se comparar HS com injeções diretas, visto que o HS depende de um equilíbrio sólido/gás.

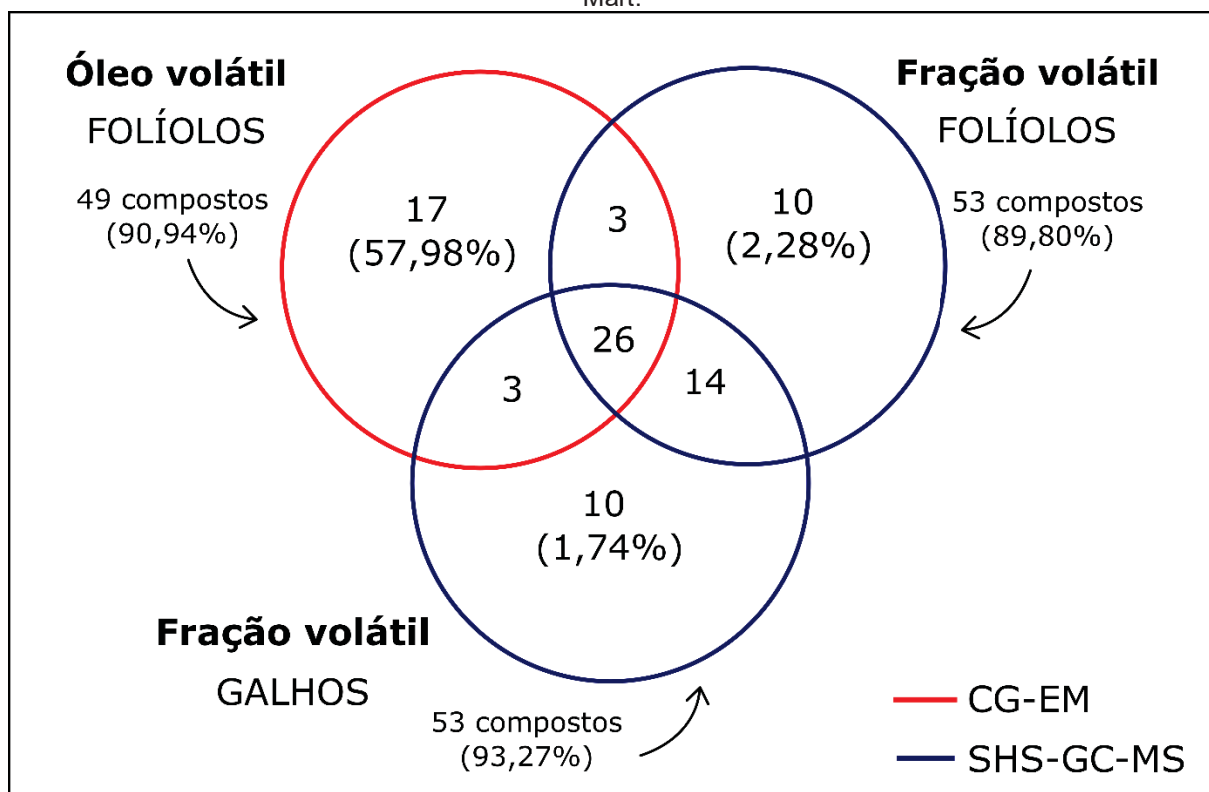
Entre os constituintes identificados nas frações voláteis dos folíolos, 10 foram identificados apenas na análise por esta técnica, totalizando 2,28%. Dentre eles, citam-se dois monoterpenos (dehidroxi-cis-óxido de linalool e β -ciclocitral) e três outros compostos (2,6-dimetil-ciclohexanol, 4,6-dimetil-dodecano e α,α -dimetoxi- α -fenilacetofenona).

A fração volátil dos galhos também apresentou 10 constituintes identificados apenas por esta técnica (1,74%), sendo destes, cinco hidrocarbonetos sesquiterpênicos (δ -elemeno, isoleлено, sativeno, β -maalieno e *trans*-cicloisolongifol-5-ol). De modo geral, a fração volátil dos galhos se diferenciou da fração volátil dos folíolos pela presença de 13 substâncias, sendo sete hidrocarbonetos sesquiterpênicos, três monoterpenos oxigenados, dois sesquiterpenos oxigenados e um álcool.

Triaux *et al.* (2021) afirmam que moléculas com baixo ponto de ebulição tendem a ter uma sensibilidade maior ao HS do que para injeção a líquido. Outros estudos também relatam uma maior concentração de monoterpenos em frações de HS do que em óleos voláteis (ICKOVSKI; STEPIĆ; STOJANOVIĆ, 2020; UŠJAK *et al.*, 2022). Estes dados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, sendo que para a fração volátil dos folíolos se obteve 0,87% de monoterpenos oxigenados e, para o óleo volátil, obteve-se 0,20%.

Triaux e colaboradores (2021) compararam a eficiência da hidrodestilação, extração líquida pressurizada e HS estático e ressaltaram que cada constituinte responde de formas diferentes aos métodos. Apesar da análise quantitativa por S-HS ainda não ter sido realizada, um maior número de compostos foi identificado a partir desta técnica. Além disso, percebe-se uma maior concentração frente aos compostos de menor massa, como os monoterpenos oxigenados.

FIGURA 26 – DIAGRAMA DE VENN DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS EM *Esenbeckia grandiflora* Mart.



FONTE: A autora (2022).

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL E DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. (continua)

COMPOSTO	IR teórico ^a	IR calculado ^c	IR calculado ^d	IR calculado ^e	CONCENTRAÇÃO		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (%)	
					ÓLEO VOLÁTIL	FV. FOLÍOLO	FV. FOLÍOLO	FV. GALHO
(3E)-hexenol	844	845	-	-	0,01 ± 0,01	-	-	-
(3Z)-hexenol	850	850	-	-	1,78 ± 2,22	-	-	-
(2Z)-hexenol	859	860	-	-	0,72 ± 0,86	-	-	-
n-hexanol	863	869	-	-	0,001 ± 0,001	-	-	-
(4Z)-hexenol	871	-	880	880	-	16,71 ± 1,48	2,52 ± 0,29	0,74 ± 0,18
n-hexanol	880 ^b	-	-	885	-	-	-	1,97 ± 0,34
6-metil-5-hepten-2-ona	981	985	983	983	0,04 ± 0,05	4,14 ± 1,00	0,60 ± 0,18	0,27 ± 0,02
2-pentil-furano	984	-	988	989	-	0,80 ± 0,54	0,26 ± 0,04	-
dehidroxi-cis- óxido de linalool	1006	-	1006	-	-	0,34 ± 0,09	-	-
2-etil-1-hexanol	1025 ^b	-	1026	1026	-	0,82 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,01 ± 0,01
1,8-cineol	1026	-	1031	1031	-	0,43 ± 0,03	0,20 ± 0,04	-
trans-óxido de linalool	1084	-	-	1086	-	-	-	-
linalool	1095	1099	-	1100	0,20 ± 0,05	-	0,31 ± 0,03	0,03 ± 0,02
2,6-dimetil-ciclohexanol	1110 ^b	-	1109	-	-	-	-	-
(3E)-butanoato de hexila	1184	1186	-	-	0,02 ± 0,02	-	-	-
safranal	1197	-	-	1198	-	-	-	-
β- ciclocitral	1217	-	1217	-	-	0,10 ± 0,08	-	-
4,6-dimetil-dodecano	1325 ^b	-	1321	-	-	0,37 ± 0,05	-	-
δ- elemeno	1335	-	-	1333	-	-	0,04 ± 0,03	-
α-cubebeno	1348	1345	1344	1344	0,39 ± 0,04	1,05 ± 0,04	0,62 ± 0,02	-
α-ylangeno	1370	1366	1366	1366	0,22 ± 0,04	1,12 ± 0,19	2,14 ± 0,07	-
α-copaeno	1374	-	1372	1372	-	4,97 ± 0,64	8,51 ± 0,14	-
isoleveno	1374	-	-	1376	-	-	0,19 ± 0,02	-
α-copaeno	1374	1370	-	-	1,55 ± 0,09	-	-	-
β-bourboneno	1387	1378	1380	1380	0,50 ± 0,02	0,83 ± 0,14	0,43 ± 0,02	-
β-cubebeno	1387	1385	1384	-	0,47 ± 0,02	0,06 ± 0,07	-	-

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL E DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.
(continuação)

COMPOSTO	IR teórico ^a	IR calculado ^c	IR calculado ^d	IR calculado ^e	CONCENTRAÇÃO		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (%)	
					ÓLEO VOLÁTIL	FV. FOLIOLO	FV. FOLIOLO	FV. GALHO
β-elemene	1389	-	1387	-	-	0,19 ± 0,17	-	-
sativeno	1390	-	-	1387	-	-	-	0,36 ± 0,02
(+)-sativeno	1396 ^b	-	1393	1393	-	0,13 ± 0,01	-	0,25 ± 0,02
α-gurjuneno	1409	1403	1403	1403	0,19 ± 0,04	0,44 ± 0,03	-	0,90 ± 0,04
β-maalleno	1414 ^b	-	-	1407	-	-	-	0,08 ± 0,04
β-ylangeno	1419	1412	1414	1414	1,46 ± 0,04	1,54 ± 0,23	-	1,89 ± 0,03
(E)-α-ionona	1428	-	1419	-	-	0,33 ± 0,03	-	-
β-copaeno	1430	1422	1426	1426	1,92 ± 1,48	3,62 ± 0,73	-	4,28 ± 0,05
β-gurjuneno	1431	1426	1426	-	0,05 ± 0,01	-	-	-
aromadendreno	1439	1431	1434	1434	1,17 ± 0,06	2,87 ± 0,66	-	4,99 ± 0,37
6,9-guaiadieno	1442	1436	1445	-	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,03	-	-
miltail-4(12)-eno	1445	-	1441	1441	-	0,58 ± 0,07	-	0,99 ± 0,04
cis-muurolo-3,5-dieno	1448	1440	-	1445	0,11 ± 0,05	-	-	0,49 ± 0,03
α-humuleno	1452	1446	-	1451	0,13 ± 0,01	-	-	0,06 ± 0,05
allo-aromadendreno	1458	-	1455	1455	-	1,43 ± 0,23	-	2,33 ± 0,06
cis-cadina-1(6),4-dieno	1461	-	1468	1468	-	0,38 ± 0,02	-	0,80 ± 0,06
cis-muurolo-4(14),5-dieno	1465	-	1457	-	-	0,34 ± 0,03	-	-
dauca-5,8-dieno	1471	1467	-	-	0,28 ± 0,07	-	-	-
γ-muuroloeno	1478	1471	1472	1471	1,41 ± 0,14	18,04 ± 0,45	-	13,25 ± 0,91
germacreno D	1480	1474	-	-	28,32 ± 0,85	-	-	-
α-amorfeno	1483	-	1475	1475	-	1,32 ± 0,16	-	1,61 ± 0,15
δ-selineno	1492	1481	1483	1483	0,14 ± 0,01	0,69 ± 0,06	-	0,87 ± 0,11
trans-muurolo-4(14),5-dieno	1493	1484	1488	1488	0,55 ± 0,04	1,44 ± 0,51	-	1,84 ± 0,02
β-vetispireno	1493	-	1497	-	-	0,16 ± 0,17	-	-
α-muuroloeno	1500	-	1494	1494	-	1,93 ± 0,37	-	3,49 ± 0,18
biciclogermacreno	1500	1489	-	-	20,97 ± 0,82	-	-	-

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL E DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart.

COMPOSTO	IR teórico ^a	IR calculado ^c	IR calculado ^d	IR calculado ^e	CONCENTRAÇÃO		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (%)	
					ÓLEO VOLÁTIL	FV. FOLÍOLO	FV. FOLÍOLO	FV. GALHO
α -muuroleno	1500	1494	-	-	1,51 ± 0,09	-	-	-
epizonareno	1501	-	1492	1492	-	1,17 ± 0,39	2,12 ± 0,08	-
<i>trans</i> - β -guaieno	1502	1501	-	-	0,50 ± 0,08	-	-	-
<i>trans</i> -cicloisolongifol-5-ol	1513	-	-	1497	-	-	0,12 ± 0,21	-
γ -cadineno	1513	1507	1508	1508	2,51 ± 0,17	3,71 ± 0,70	5,95 ± 0,14	-
<i>trans</i> -calameneno	1521	1525	1517	1517	0,15 ± 0,23	3,33 ± 0,88	6,33 ± 0,43	-
δ -cadineno	1522	1518	1514	1514	6,33 ± 0,29	5,55 ± 0,64	10,52 ± 0,24	-
Zonareno	1528	1531	-	-	0,52 ± 0,01	-	-	-
<i>trans</i> -cadinina-1,4-dieno	1533	1535	1528	1528	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,15	0,18 ± 0,16	-
α -cadineno	1537	1547	1532	1532	0,27 ± 0,04	0,84 ± 0,23	1,28 ± 0,02	-
α -calacoreno	1544	1551	1536	1536	0,11 ± 0,01	0,59 ± 0,09	1,33 ± 0,22	-
(<i>E</i>)-nerolidol	1561	1561	1561	-	4,92 ± 0,33	0,05 ± 0,08	-	-
espatulenol	1577	1569	1571	1571	4,96 ± 0,39	3,30 ± 0,31	3,84 ± 0,28	-
(-)-globulol	1580 ^b	1574	1580	1580	1,43 ± 0,06	0,73 ± 0,06	0,88 ± 0,05	-
globulol	1590	-	1588	-	-	0,05 ± 0,09	-	-
salvia-4(14)-en-1-ona	1594	1585	1587	1587	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,08	0,37 ± 0,01	-
cubeban-11-ol	1595	1603	1591	1591	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,07	0,22 ± 0,05	-
rosifoliol	1600	-	1601	1601	-	0,20 ± 0,05	0,39 ± 0,05	-
1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	1618	1614	1610	1610	0,21 ± 0,06	0,32 ± 0,12	0,45 ± 0,15	-
α -corocaleno	1622	-	-	1611	-	-	0,06 ± 0,10	-
1- <i>epi</i> -cubenol	1627	1620	1622	1622	0,13 ± 0,20	0,50 ± 0,11	0,54 ± 0,02	-
<i>epi</i> - α -cadinol	1638	1630	1637	1637	0,59 ± 0,12	0,48 ± 0,22	0,69 ± 0,34	-
α -muurolol	1644	1639	1642	1642	0,45 ± 0,03	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,11	-
α -cadinol	1652	1646	1650	1650	1,26 ± 0,05	0,37 ± 0,09	0,50 ± 0,06	-
cadaleno	1675	-	1667	1667	-	0,10 ± 0,08	0,23 ± 0,06	-
eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	1687	-	-	1684	-	-	0,11 ± 0,04	-

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL E DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. (conclusão)

COMPOSTO	IR teórico ^a	IR calculado ^c	IR calculado ^d	IR calculado ^e	CONCENTRAÇÃO		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (%)
					ÓLEO VOLÁTIL	FV. FOLIOLO	
shibunol	1688	1679	-	-	1,02 ± 0,09	-	-
neofitadieno	1840 ^b	1843	-	-	0,16 ± 0,01	-	-
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1847 ^b	1855	-	-	0,14 ± 0,03	-	-
α,α-dimetoxi-α-fenilacetofenona	1874 ^b	-	1870	-	-	0,09 ± 0,08	-
adipato de dietilhexila	2398 ^b	2396	-	-	0,43 ± 0,13	-	-
Monoterpeno oxigenado							
					0,20 ± 0,06	0,87 ± 0,11	0,50 ± 0,21
Hydrocarboneto sesquiterpênico							
					71,98 ± 4,21	59,14 ± 6,97	78,47 ± 1,77
Sesquiterpeno oxigenado							
					15,47 ± 1,41	6,55 ± 1,03	8,24 ± 0,26
Outros							
					3,29 ± 3,44	23,24 ± 2,62	6,10 ± 0,82
Total							
					90,94 ± 1,93	89,80 ± 3,53	93,31 ± 0,73

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: FV – Fração volátil.

NOTA: ^aÍndice aritmético baseado na literatura Adams (2017) e ^bNIST WebBook. ^cÍndice aritmético médio calculado a partir das triplicatas dos valores apresentados pela injeção direta do óleo volátil de folíolos da espécie. ^dÍndice aritmético médio calculado a partir das triplicatas dos valores obtidos pela análise por *headspace* estático da fração volátil de folíolos da espécie. ^eÍndice aritmético médio calculado a partir das triplicatas dos valores obtidos pela análise por *headspace* estático da fração volátil de galhos da espécie. A concentração média do óleo volátil foi calculada a partir dos dados obtidos CG-DIC enquanto que as concentrações das frações voláteis foram calculadas pelos dados obtidos por SHS-GC-MS.

5.4 EXTRATOS BRUTOS DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *E. grandiflora*

Sabe-se que álcoois alifáticos de até três átomos de carbonos, como o álcool etílico, são os solventes com o maior poder extrativo para substâncias naturais como alcaloides, saponinas e flavonoides. Estes são amplamente utilizados na preparação de extratos de plantas em que os metabólitos especiais não são bem conhecidos (BOMBARDELLI, 1991). Além disso, sabe-se que solventes alcoólicos aumentam a permeabilidade da parede celular, facilitando a extração de constituintes polares e de média a baixa polaridade (SEIDEL, 2006).

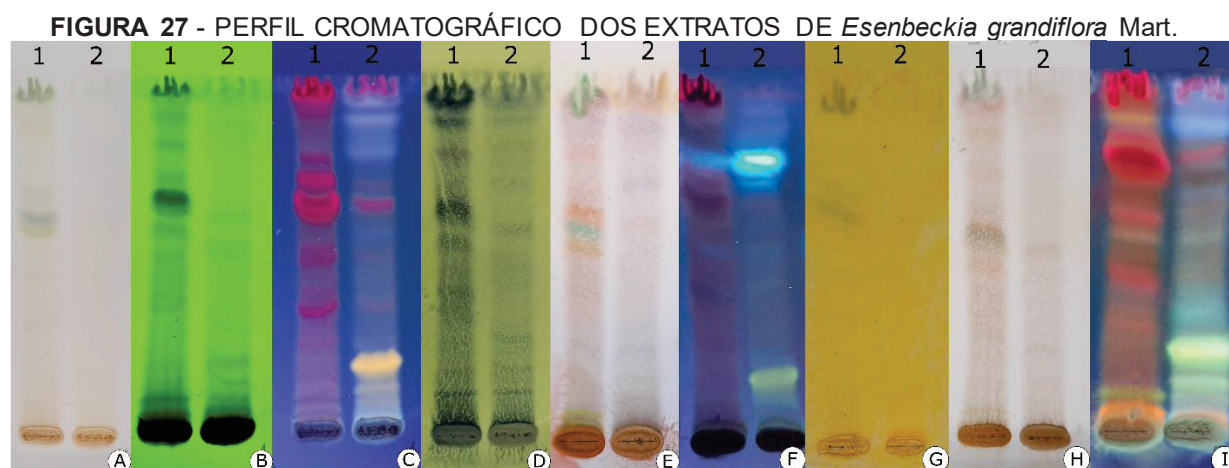
Estudos indicam que o álcool etílico 70% (v/v) está dentro da faixa utilizada para extrações visando a obtenção mais ampla de metabólitos especiais (NORIEGA *et al.*, 2012; JACOTET-NAVARRO *et al.*, 2018; VONGSAK *et al.*, 2013; BONDAR *et al.*, 2020). Além disso, não foram recuperados na literatura estudos acerca de extratos de *E. grandiflora* obtidos com álcool etílico 70%. Desta forma, selecionou-se o álcool etílico 70% como solvente para produção dos extratos de folíolos e galhos de *E. grandiflora*, visando a obtenção do maior número possível de compostos. Após o processo de liofilização, o extrato do folíolo apresentou um rendimento de 15,7946 g e, o de galho 4,3913 g.

Uma forma de se investigar a qualidade de espécies vegetais, extratos ou preparações é estudar o perfil químico de seus constituintes e compará-lo com demais amostras que sejam submetidas ao mesmo tratamento. Este perfil químico é dado pelas substâncias marcadoras e são específicas para cada vegetal ou grupo taxonômico. Para isso, técnicas espectroscópicas, eletroforéticas, de cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada podem ser aplicadas, possibilitando que seja determinado sua “impressão digital” (BAUER; TITTEL, 1996; GAD *et al.*, 2012).

5.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para realizar a análise cromatográfica por CCD foram testados diferentes sistemas de fases móveis, utilizando em diferentes combinações e proporções os solventes: água, ácido fórmico, ácido acético glacial, álcool metílico, álcool isopropílico, *n*-butanol, etilmetilcetona, acetato de etila, éter etílico, clorofórmio, diclorometano, ciclohexano, *n*-hexano.

Dentre os sistemas analisados, o que apresentou melhor resolução do perfil cromatográfico foi: clorofórmio: acetato de etila: álcool metílico: água (53,6: 28,6: 10,7: 7,1), o qual foi utilizado para registrar o perfil cromatográfico apresentado pelo extrato dos folíolos (1) e galhos (2). Além disso, analisou-se as principais classes de metabólitos secundários presentes por meio da utilização de seis reveladores distintos. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 27.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: 1 – Perfil cromatográfico obtido com extrato dos folíolos; 2 - Perfil cromatográfico obtido com extrato dos galhos; A – UV-visível/ olho nu; B – Luz ultravioleta 254 nm; C – Luz ultravioleta 365 nm; D- Ácido fosfomolíbldico 20%; E – Anisaldeído sulfúrico; F – Hidróxido de potássio 5%, UV-365 nm; G – Dragendorff; H – Ácido sulfúrico 5%; I – NP/PEG, UV-365 nm.

Na CCD revelada com o ácido fosfomolíbldico, foi possível verificar a presença de bandas nos dois extratos (folíolos e galhos), sendo que no extrato dos folíolos eles aparecem em maior intensidade de coloração. O ácido fosfomolíbldico é capaz de fornecer produtos intensamente coloridos a partir da reação com substâncias que são incolores à luz UV-visível. Seu princípio de aplicação é baseado na capacidade de muitas substâncias formarem óxidos mistos intensamente azuis, nos quais o molibdênio (VI) inicial é reduzido a molibdênio (IV). Seu uso permite a detecção de terpenos, sesquiterpenos, lactonas e fitoesteroides (JORK *et al.*, 1990; ZARZYCKI; BARTOSZUK; RADZIOW, 2006). Segundo Wagnere Bladt (1996), grande parte dos constituintes dos óleos essenciais irá aparecer na forma de zonas azuis ao ser revelada com ácido fosfomolíbldico.

Na placa cromatográfica revelada com o anisaldeído sulfúrico, uma maior variedade de colorações foi observada nas bandas referente aos folíolos e houve um predomínio de bandas azuis-arroxeadas no perfil do galho. A interação com

compostos de óleos essenciais com o anisaldeído sulfúrico pode exibir uma coloração azul, verde, vermelha e marrom. Triterpenos apresentam zonas azuis-arroxeadas e vermelho/roxa-avermelhada e saponinas mostram coloração violeta e azul (WAGNER; BLADT, 1996). O mecanismo de revelação ocorre devido a condensação do grupamento aldeído com cátions presentes no substrato (JORK *et al.*, 1990). Considerando a presença de óleo volátil na espécie (seção 5.3) e, o relato de triterpenos em partes aéreas da espécie (NUNES *et al.*, 2005; JANUÁRIO *et al.*, 2009) o observado nas FIGURA 27D e 28E, está de acordo com o esperado.

Conforme observado na FIGURA 27F, verificou-se a presença de bandas de coloração azul e amarelo fluorescente no extrato do galho de *E. grandiflora*. De acordo com Wagner e Bladt (1996), a solução de hidróxido de potássio 5% promove a reação de Bornträger, permitindo a visualização de zonas com antraquinonas (vermelho, luz visível), antronas (amarelas, UV-365 nm) e cumarinas (azul, UV-365 nm). Não existem relatos prévios da presença de antronas na espécie, mas cumarinas já foram isoladas de folíolos e galhos (TRANI *et al.*, 1997; JANUÁRIO *et al.* 2009). Apesar disso, não foram observadas zonas de fluorescência no extrato dos folíolos.

O revelador dragendorff possui a capacidade de reagir com compostos que contenham nitrogênio heterocíclico, gerando zonas laranjas, marrom-alaranjadas ou castanho-avermelhadas (WAGNER; BLADT 1996). Apesar de existirem relatos de alcaloides em *E. grandiflora* na literatura (CARVALHO; PIRANI; FERREIRA, 2021), não foram eluidas bandas com essas características ao longo da CCD. Entretanto, é possível verificar um leve tom alaranjado nas zonas de aplicação da amostra (FIGURA 27G). Considerando que os alcaloides são substâncias de caráter básico e que o silanol da fase estacionária tem caráter ácido, a eluição destes é dificultada devido à forte interação entre amostra e fase estacionária. Essa interação poderia ser reduzida pela adição de um composto de caráter básico na fase móvel, de forma que haveria uma diminuição da retenção desses metabólitos (McCALLEY, 2002).

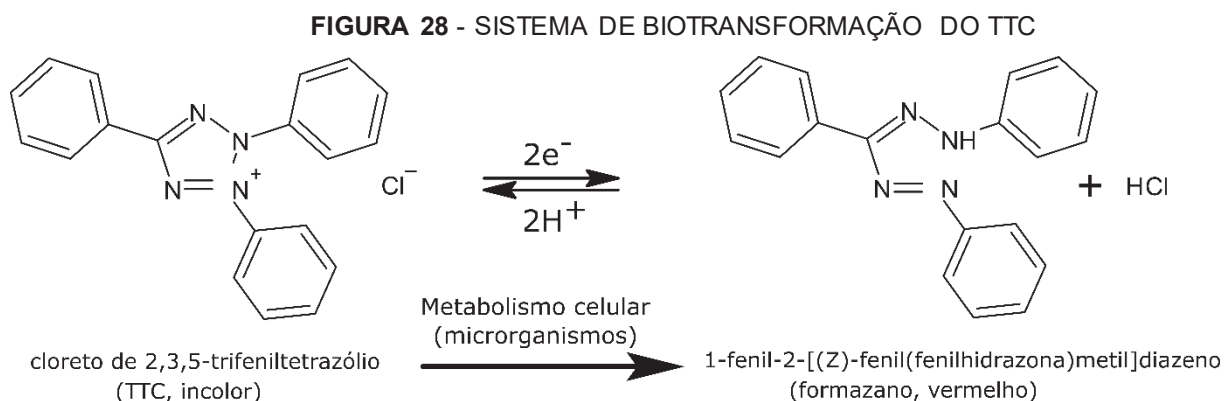
Na FIGURA 27H, observa-se a presença de bandas de coloração marrom em ambos os extratos. O ácido sulfúrico é um reagente universal que quase todas as classes de substâncias podem ser detectadas por meio de carbonização a elevadas temperaturas (150-180 °C). Em luz ultravioleta em 365 nm, é capaz de exibir zonas de coloração azul, verde, marrom e amarelo fluorescente. Após sua revelação, as mesmas zonas aparecem com tonalidade marrom (JORK *et al.*, 1990; WAGNER; BLADT, 1996).

De acordo com Wagner e Bladt (1996), o reativo NP/PEG confere uma intensa fluorescência em 365 nm produzida por antronas e antranóis (amarelo), flavonoides (amarelo, laranja e verde), flavonóis (amarelo-alaranjadas e verde-amareladas), flavonas (laranja e verde-alaranjado) e ácidos carboxílicos fenólicos (azul ou verde-azulado). Além disso, ele é capaz de intensificar e estabilizar a fluorescência existente de cumarinas. Considerando isso, observa-se que o perfil cromatográfico obtido para o extrato dos folíolos (FIGURA 27I) é compatível com a presença de flavonoides, enquanto as bandas apresentadas pelo extrato do galho demonstram a presença de ácidos carboxílicos fenólicos. Os dados obtidos estão de acordo com o descrito por Carvalho, Pirani e Ferreira (2021), os quais reportaram a presença de diversos derivados fenólicos nas partes aéreas da espécie, estando entre eles cumarinas, flavonóis, catequinas e chalconas,

5.4.2 Determinação da atividade antimicrobiana

Determinou-se as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos dos folíolos e galhos de *E. grandiflora* na faixa de concentração de 50 a 0,40 mg/mL, pelo método de microdiluição, para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*.

As CIM foram determinadas por meio de leituras visuais, sendo considerada a turvação do poço e o desenvolvimento de coloração vermelha devido a redução do TTC. De acordo com Moussa e colaboradores (2013), quando o TTC é reduzido a formazano, ele adquire coloração vermelha de intensidade diretamente proporcional às células ativas viáveis. A reação ocorre devido o par tetrazólio/ formazano formar um sistema redox capaz de atuar como aceptor de prótons ou como agente oxidante (FIGURA 28).



FONTE: Adaptado de MATTSON; JENSEN; DUTCHER (1947); MOUSSA *et al.* (2013).

As leituras espectrofotométricas obtidas foram convertidas em UFC/mL, de acordo com o estabelecido por Veiga e colaboradores (2019) e, posteriormente, comparadas com os resultados obtidos visualmente para definição da CIM.

A FIGURA 29 expõe os ensaios de microdiluição. Para o extrato bruto dos folíolos não foi observada atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados. Para o extrato bruto dos galhos de *E. grandiflora*, obtiveram-se CIM de 50,00 mg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Apesar da coloração vermelha não se mostrar tão evidente para *C. albicans*, foi possível observar turvação com presença de botão no fundo do poço em todas as concentrações testadas, indicando o crescimento da levedura. Esse decaimento da capacidade de conversão do TTC/formazano por fungos já foi previamente descrita por Kumar e Tarafdar (2003).

Para que um extrato seja considerado promissor para atividade antimicrobiana, a CIM deve ser menor que 100 µg/mL. CIM entre 100 e 500 µg/mL é considerada atividade antimicrobiana moderada, enquanto CIM na faixa de 500 a 1000 µg/mL é considerada atividade antimicrobiana fraca. CIM superiores a 1000 µg/mL são considerados inativos (PESSINI *et al.*, 2003; AYRES *et al.*, 2008; SIMONETTI *et al.*, 2016). Dessa forma, considera-se o extrato de folíolo e de galho inativos frente aos microrganismos testados.

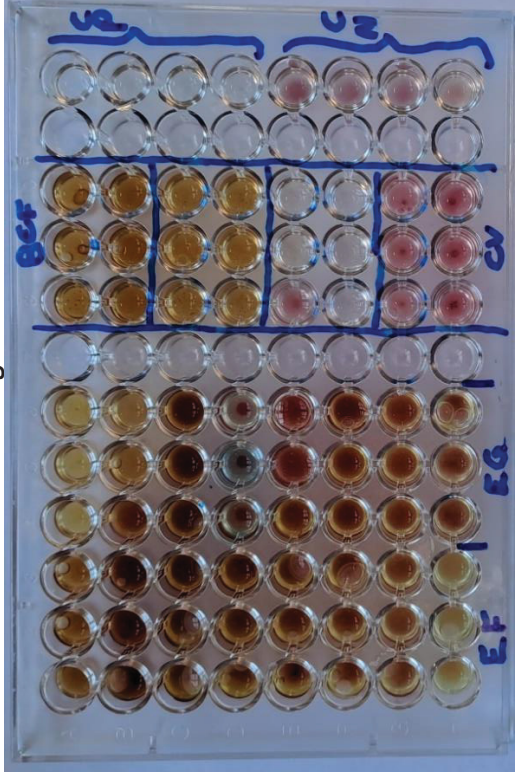
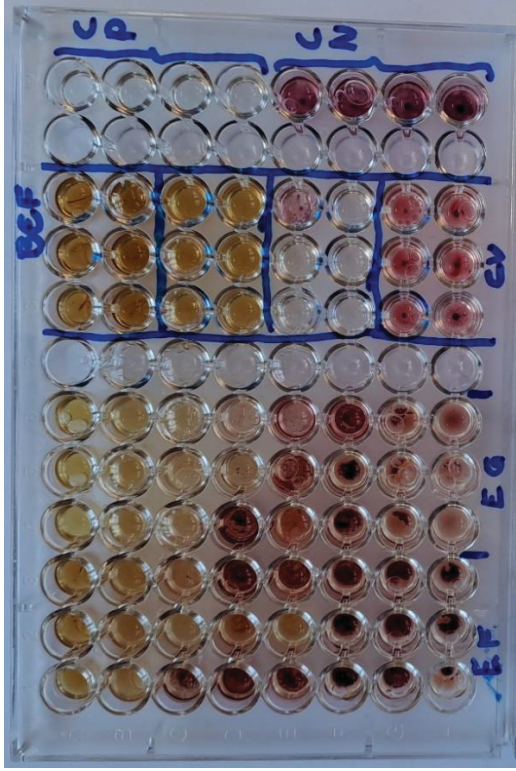
No estudo de Novais *et al.* (2003), frações obtidas com clorofórmio (CHCl₃) e acetato de etila (AcOEt) do extrato metanólico dos folíolos desta espécie também não apresentaram atividade antibacteriana frente a *E. coli*. Os autores relataram uma atividade antibacteriana frente à *S. aureus*, em ambas as frações, entretanto, apenas em 10 mg/mL. Em contrapartida, Costa e colaboradores (2010) observaram uma

atividade antimicrobiana fraca de frações de AcOEt do extrato de partes aéreas de *E. grandiflora*, apresentando uma CIM de 1,0 mg/mL frente à está mesma bactéria.

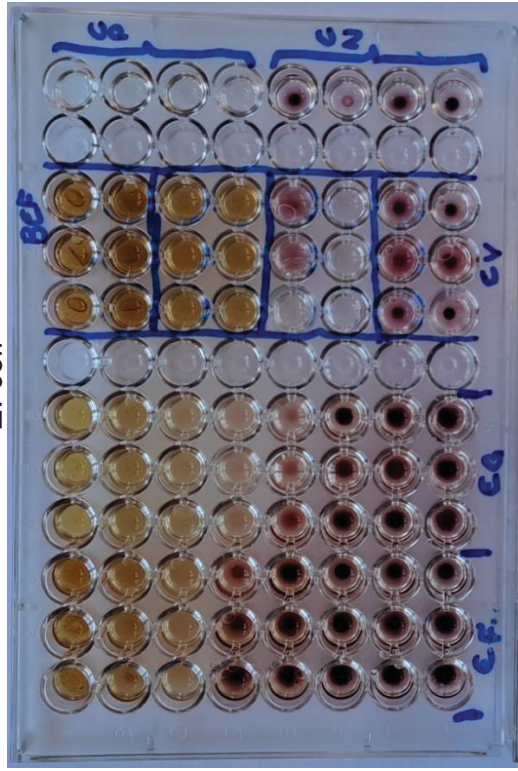
Outras espécies do gênero já foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano. Suárez e colaboradores (2011) isolaram terpenoides e alcaloides do extrato etanólico e frações obtidas com CHCl₃ e AcOEt de cascas de *E. alata*. Os constituintes isolados foram avaliados mediante o crescimento bacteriano pelo método de difusão em ágar, sendo que algumas tendências foram observadas. Para os autores, alcaloides quinólicos isolados da espécie possuem preferência de inibição frente a cepas Gram-negativas. Entretanto, sugere-se que o acréscimo de um grupo metoxila aos anéis quinólicos torne os compostos seletivos para *Enterococcus faecalis*. Triterpenos pentacíclicos originados do extrato etanólico e da fração obtida com acetato de etila não se mostraram ativos frente a *Salmonella tiphymurium*, *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* (SUÁREZ *et al.*, 2011).

O extrato de acetona de folhas de *E. yaaxhokob* Lundell (sin. *E. berlandieri*), mostrou atividade contra *S. aureus* e *S. faecalis* (AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004). Os autores isolaram a flindersiamina, a qual apresentou CIM de 50 µg/mL frente a *S. aureus* e de e 100 µg/mL para *S. faecalis*. Além disso, o espatulenol isolado do mesmo extrato apresentou atividade moderada para *S. aureus*, com CIM de 200 µg/mL.

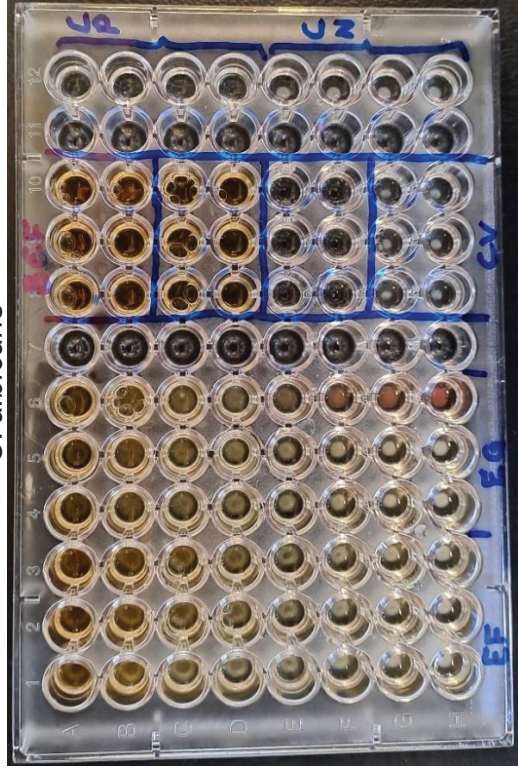
FIGURA 29 - ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO A PARTIR DE EXTRATOS BRUTOS DE FOLÍOLOS E GALHOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. *P. aeruginosa*



E. coli



C. albicans



FONTE: A autora (2022).

5.4.3 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)

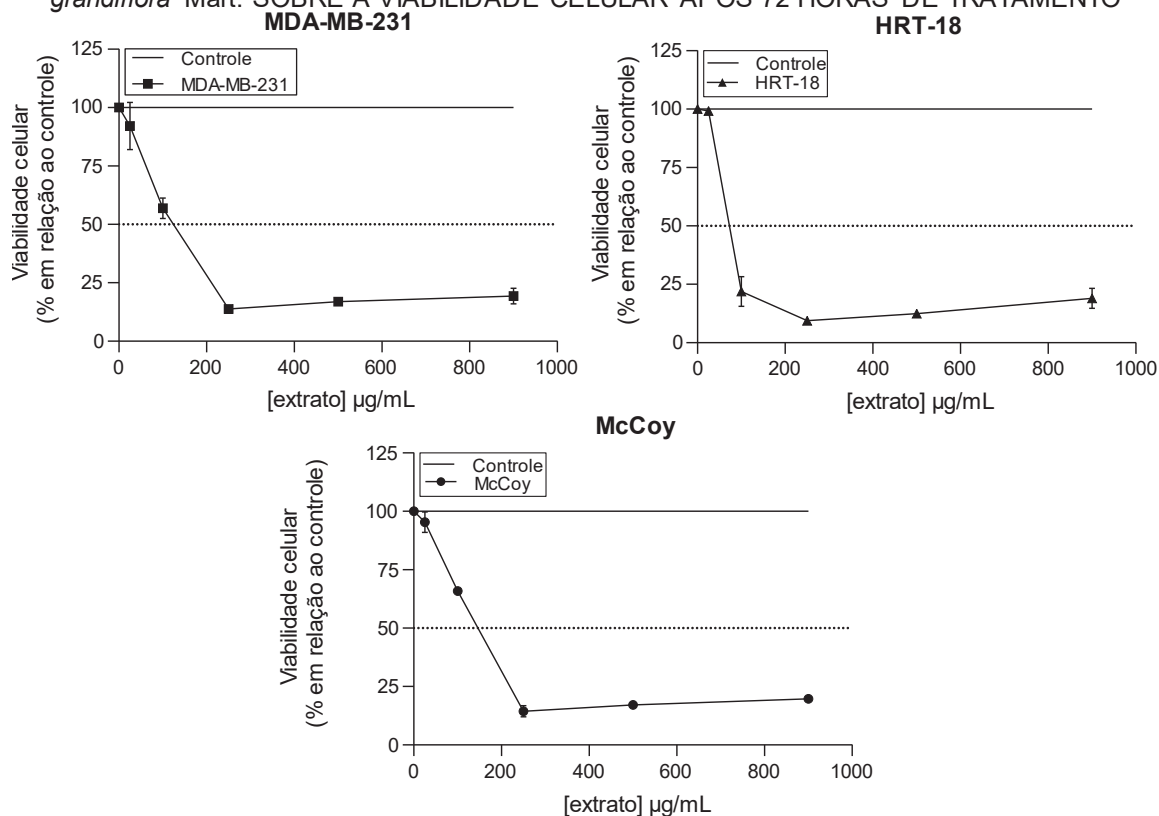
Os resultados obtidos por meio do ensaio de MTT nas linhagens MyCoy, MDA-MB-231 e HRT-18 estão descritos na TABELA 8. A FIGURA 30 exibe a redução da viabilidade celular das linhagens estudadas frente a diferentes concentrações do extrato dos folíolos de *E. grandiflora*. Ressalta-se que a exposição a um agente tumoral pode diminuir a viabilidade celular provocando a morte celular direta ou reduzindo a taxa de proliferação celular (BOYD, 1997).

TABELA 8 - Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) DETERMINADOS PARA O EXTRATO DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. EM LINHAGENS TUMORAIS TRATADAS POR 72 HORAS

	McCoy	MDA-MB-231	HRT-18
Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	131,40	110,00	66,71
	135,10	116,50	71,61
MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO	133,25 \pm 2,62	113,25 \pm 4,60	69,16 \pm 3,47

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 30 - EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO EXTRATO BRUTO DE FOLÍOLOS DE *Esenbeckia grandiflora* Mart. SOBRE A VIABILIDADE CELULAR APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO



FONTE: A autora (2022).

Uma amostra pode ter sua atividade citotóxica classificada como muito forte ($Cl_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), forte ($10 < Cl_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), moderada ($100 < Cl_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$)

ou inativa ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008). Observando esses critérios, uma vez que os valores de CI_{50} variaram entre $69,16 \pm 3,47 \mu\text{g/mL}$ em células HRT-18, considera-se que o extrato dos folíolos tem ação citotóxica/ antiproliferativa forte frente a linhagem. Enquanto isso, para as células MDA-MB-231, a amostra apresentou atividade moderada ($CI_{50} = 113,25 \pm 4,60 \mu\text{g/mL}$).

De acordo com Fatmasari e colaboradores (2022), agentes anticancerígenos são considerados ideais quando são seguros para linhagens celulares normais e, apresentam-se tóxicos para células cancerígenas. O índice de seletividade (IS) é o parâmetro que descreve a atividade anticancerígena seletiva. Um $IS > 1$ é considerado favorável para uso com eficácia contra células tumorais (KRZYWIK *et al.*, 2020). Desta forma, o extrato se mostrou mais promissor frente as células HRT-18 ($IS = 1,93$) comparadas à MDA-MB-231 ($IS = 1,18$).

Victor e colaboradores (2017) isolaram α e β -amirina do extrato metanólico de folíolos de *E. grandiflora* e avaliaram a capacidade antitumoral frente a linhagens celulares de câncer de cólon (HCT-116), de próstata (PC-3) e leucemia promielocítica aguda (HL-60). Outros seis compostos sintetizados a partir de α e β -amirina foram incluídos no estudo e ambos foram avaliados na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$ por 72 h. A linhagem HL-60 apresentou percentuais de redução de viabilidade celular considerados de alta atividade para dois dos compostos testados e, outros quatro com média atividade. Enquanto isso, HCT-16 e PC-3 apresentaram três e duas substâncias, respectivamente, de média atividade.

Outras espécies do gênero como *E. almawillia* e *E. alata* também foram estudadas quanto suas propriedades citotóxicas/ antiproliferativa. Nunes *et al.* (2006) avaliaram frações do extrato metanólico de raízes e da madeira de *E. almawillia* frente cinco linhagens celulares (MCF-7 - câncer de mama; HCT-8 - câncer de cólon; B16 - melanoma murino e; HL60 e CEM - leucemia). O extrato hexânico foi o mais ativo e, o menos ativo foi o obtido com acetato de etila para ambas as partes vegetais.

O extrato etanólico obtidos de folhas de *E. alata* foi estudado em células cancerígenas (U251 - sistema nervoso central; PC-3 - próstata; HCT-15 - cólon; MCF-7 - mama; SKLU-1 - pulmão e; K562 - leucemia). O extrato apresentou atividade para K562, PC-3, MCF-7 e SKLU-1, com destaque para forte atividade em K562 (97%) (ÁLVAREZ-CABALLERO; CUCA-SUÁREZ; COY-BARRERA, 2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao investigar diferentes aspectos da espécie *E. grandiflora*, este trabalho descreveu aspectos morfoanatômicos do folíolo, pecíolo, galho e fruto, caracterizou o óleo volátil e fração volátil de folíolos e galhos, apresentou o perfil cromatográfico e analisou a atividade antimicrobiana dos extratos de folíolos e galhos, além da avaliação da citotoxicidade do extrato dos folíolos frente a linhagens tumorais.

Quanto as características morfoanatômicas, o folíolo se mostrou hipoestomático, de mesofilo dorsivental, com feixe central único, de contomo biconvexo com leve curvatura adaxial e feixe vascular do tipo colateral aberto. O pecíolo se difere de outras espécies por uma proliferação exacerbada do tecido cortical que proporciona uma distensão em sua parte distal, justificando a presença de periderme nesta região. Cavidades secretoras e tricomas tectores são estruturas observadas em folíolos, pecíolo e galho da espécie bem como tricomas glandulares capitados, entretanto, estes estão presentes de forma rara. O fruto maduro se apresenta uniestratificado, de cutícula delgada e com hipoderme com grande incidência de braquiesclereides em que são observadas pontoações simples.

A caracterização química do óleo volátil dos folíolos por CG-EM resultou na identificação de 49 componentes, sendo os majoritários os sesquiterpenos germacreno D e biciclogermacreno. Além disso, observou-se a presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, monoterpeno oxigenado e outros.

Para a fração volátil do folíolo por SHS-GC-MS, foram identificados 53 constituintes, sendo os compostos identificados em maiores concentrações o γ -muuroleno e o (4Z)-hexanol. Também foram observados hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, monoterpeno oxigenado, álcoois e outros.

Para a fração volátil dos galhos por SHS-GC-MS, identificaram-se 53 substâncias, dentre elas: hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, monoterpeno oxigenado, álcoois e outros. Os componentes presentes em maiores concentrações foram o γ -muuroleno e o δ -cadineno.

As análises antimicrobianas com o extrato bruto dos galhos demonstraram um CIM = 50,00 mg/mL considerado inativo frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*,

enquanto para *C. albicans* não mostrou atividade. O extrato bruto dos folíolos não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos microrganismos avaliados.

Quanto a atividade citotóxica, o extrato dos folíolos quando analisados frente a linhagem celular HRT-18, apresentou ação citotóxica/ antiproliferativa forte. Em células MDA-MB-231, a atividade observada foi moderada.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Após o desenvolvimento deste trabalho, algumas propostas são incentivadas para dar continuidade a investigação da espécie, como:

- Realizar análise quantitativa dos compostos voláteis presentes nos folíolos e galhos da droga vegetal, por meio de *headspace* estático acoplado a CG-DIC;
- Investigar a presença de compostos voláteis no fruto e em botões florais de *E. grandiflora*, realizando a análise por meio de SHS-GC-MS e SHS-GC-FID;
- Obter o perfil cromatográfico e identificar os metabólitos presentes em extratos brutos de folíolos e galhos da espécie por meio de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (CL-EM/EM);
- Dar continuidade a investigação da atividade antitumoral frente outras linhagens celulares, bem como realizar a pesquisa da citotoxicidade com o extrato dos galhos da espécie;
- Identificar se os extratos possuem atividade citotóxica ou antiproliferativa.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. M.; *et al.* P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 45-62, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.008>. Acesso em: 01 dez. 2022.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4.1 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2017.
- AFOULOUS, S. *et al.* Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 252-262, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.00>. Acesso em: 30 set. 2022.
- AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; RIOS, M. Y. Geranyl N-Dimethylallylanthranilate, a New Compound from *Esenbeckia yaaxhokob*. **Planta Med**, v. 70, p. 85-86, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2004-815465>. Acesso em: 24 ago. 2022.
- ALI, B. *et al.* Essential Oils Used In Aromatherapy: A Systemic Review. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601–611, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>. Acesso em: 22 set. 2020.
- ALVAREZ, A.; *et al.* Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 598-617. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.21851>. Acesso em: 01 dez. 2022.
- ÁLVAREZ-CABALLERO, J. M.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; COY-BARRERA, E. Bio-Guided Fractionation of Ethanol Extract of Leaves of *Esenbeckia alata* Kunt (Rutaceae) Led to the Isolation of Two Cytotoxic Quinoline Alkaloids: Evidence of Selectivity Against Leukemia Cells. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 585-596, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9100585>. Acesso em: 23 set. 2022.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anuário estatístico do mercado farmacêutico 2019/20**. Brasília: Secretaria Executiva da Câmara de Regulamentação do Mercado de Medicamentos, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmmed/informes/anuario-estatistico-2019-versao-final.pdf>. Acesso em: 03 set. 2022.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 6ª ed. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 15 set. 2020.
- ANWAR, N.; TEO, Y. K.; TAN, J. B. L. The Role of Plant Metabolites in Drug Discovery: Current Challenges and Future Perspectives. *In*: SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S. **Natural Bio-active Compounds**. v. 2, Singapura: Springer, 2019. p. 25-51.

AVATO, P.; *et al.* Activity of saponins from *Medicago* species against HeLa and MCF-7 cell lines and their capacity to potentiate cisplatin effect. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1508-1518, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520617666170727152805>. Acesso em: 30 nov. 2022

AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p.90-97, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100017>. Acesso em: 23 set. 2022.

BARROS-FILHO, B. A. *et al.* Volatile constituents from *Esenbeckia almawillia* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 817-821, 2004. Disponível em: <https://10.1016/j.bse.2004.02.003>. Acesso em: 22 ago. 2022.

BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. *In*: BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. 1 ed. Berlin: Springer, 2007.

BAUER, R.; TITTEL, R. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80041-9](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80041-9). Acesso em: 03 out. 2022.

BENNET, J. W.; BENTLEY, R. What's in a Name? Microbial Secondary Metabolism. *In*: NEIDLEMAN, L. **Advances in Applied Microbiology**. 1 ed. Massachusetts: Academic Press, 1989. p. 1-28.

BRAGA, F. C. Paving New Roads Towards Biodiversity-Based Drug Development in Brazil: Lessons from the Past and Future Perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, p. 505-518, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00181-2>. Acesso em: 12 set. 2022.

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

BERNARDES, L. S. C. *et al.* Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 107-128.

BICCHI, C. *et al.* Headspace Sampling in Flavor and Fragrance Field. *In*: PAWLISZYN, J. *et al.* **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. 1 ed., v. 4, *Amsterdã*: Academic Press, 2012, p. 1–25. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381373-2.00125-3>. Acesso em: 15 set. 2022.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a05v32n3.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2020.

BOMBARDELLI, E. Technologies for the processing of medicinal plants. *In*: WIJESEKERA, R. O. B. **The medicinal plant industry**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 85-98.

BONDAR, A. *et al.* Technological aspects of obtaining liquid extracts of black poplar buds and determining the strategy for their standardization at the pharmaceutical development stage. **Scientific Journal**, v. 23, n. 1, p. 10—16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.197270>. Acesso em: 06 jan. 2022.

BOUMENDJEL, A.; *et al.* Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 5, p. 429-529, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.10015>. Acesso em: 01 dez. 2022.

BOYD, M. R. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. *In*: TEICHER, B. A. **Anticancer Drug Development Guide**. New York: Springer Science, 1997. p. 23-42.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**. 15 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996.

BROPHY, J. J. *et al.* Leaf Essential Oils of *Lunasia amara* var. *amara* and *Sarcomelicope simplicifolia* subsp. *simplicifolia* (Rutaceae) from Australia. **Journal of Essential oil Research**, v. 9, p. 141-144, 1997. Disponível em: [https://1041-2905/97/0002-0141\\$04.00](https://1041-2905/97/0002-0141$04.00). Acesso em: 26 ago. 2022.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FORSTER, P. I. Leaf Oils of the Genus *Brombya* (Rutaceae). **Journal of Essential oil Research**, v. 16, p. 402-404, 2004. Disponível em: [https://doi.org/1041-2905/04/0005-0402\\$6.00/0](https://doi.org/1041-2905/04/0005-0402$6.00/0). Acesso em: 26 ago. 2022.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FORSTER, P. I. The Leaf Oils of the Australian Species of *Flindersia* (Rutaceae). **Journal of Essential oil Research**, v. 17, p. 388-395, 2005. Disponível em: [https://1041-2905/05/0004-0388\\$6.00/0](https://1041-2905/05/0004-0388$6.00/0). Acesso em: 26 ago. 2022.

BÜLOW, N.; KÖNIG W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, p. 141-168, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11065290/>. Acesso em: 26 ago. 2022.

BURIL, M. T.; THOMAS, W. W.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 701-710, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667408>. Acesso em: 30 jun. 2020.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, sup. 3, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>. Acesso em: 13 set. 2022.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. *In*: THORMAR, H. **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**. 1 ed. United

Kingdom: John Wiley & Sons, 2011. p. 203-238. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470976623>. Acesso em: 29 set. 2020.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. v. 5. Brasília: Embrapa, 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/publicacoes/especies-arboreas-brasileiras>. Acesso em: 03 jan. 2022.

CARVALHO, J. C. S.; PIRANI, J.; FERREIRA, M. J. P. *Esenbeckia* (Pilocarpinae, Rutaceae): chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Botany**, v. 45, p. 41-65, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00747-3> Acesso em: 13 jan. 2022.

COMEX STAT. Estatísticas de Comércio Exterior. **Produtos - óleos essenciais, matérias de perfume e sabor**, 2022. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>. Acesso em: 05 de set. de 2022.

COSTA, J. F. O. *et al.* Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400007>. Acesso em: 28 maio 2020.

CLEVENGER, J. F. Apparatus for the determination of volatile oil. **American Pharmaceutical Association**, v. 17, n. 4, 1928. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.3080170407>. Acesso em: 24 set. 2020.

COREA, G.; *et al.* Modified jatrophone diterpenes as modulators of multidrug resistance from *Euphorbia dendroides* L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 5221-5227, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.08.013>. Acesso em: 01 dez. 2022.

CRUZ, R. *et al.* Development of leaves and shoot apex protection in *Metrodorea* and related species (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 267-282, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/boj.12281>. Acesso em: 20 maio 2022.

CRUZ, R. *et al.* Phylogenetic analysis and evolution of morphological characters in *Metrodorea* and related species in Rutoideae (Rutaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, p. 927-943, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1423-x>. Acesso em: 18 maio 2022.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1997.

DÍEZ, L. M. **Fundamentos de cromatografia**. 1 ed. Madrid: Dextra Editorial, 2015.

DUARTE, G. K. G. F. *et al.* Toxicity of *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae) on *Artemia salina* and *Atta sexdens rubropilosa*. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 101-112, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252019v32n111rc>. Acesso em: 23 set. 2022.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>. Acesso em: 12 set. 2022.

EBADA, S. S. *et al.* Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature protocols**, v. 3, n. 12, p. 1820-1831, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18989260/>. Acesso em: 20 jul. 2022.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 8 ed. Nördlingen: Druckerei C. H. Beck, 2014.

FAHN, A. Tansley Review N. 14 Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist.**, v. 108, p. 229-257, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04159.x>. Acesso em: 29 set. 2020.

FALLEH, H. *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food chemistry**, v. 330, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>. Acesso em: 01 out. 2020.

FANG, F. *et al.* Comparative Analysis of the Volatile Components in the Fresh Roots and Rhizomes of Curcuma wenyujin by Static Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1346-1351, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cjoc.200690251>. Acesso em: 08 nov. 2021.

FARIAS, K. S *et al.* Nectandra as a renewable source for (+)- α -bisabolol, an antibiofilm and anti-*Trichomonas vaginalis* compound. **Fitoterapia**, v. 136, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104179>. Acesso em: 29 jun. 2020.

FATMASARI, N. *et al.* Synthesis and in vitro assay of hydroxyxanthones as antioxidant and anticancer agentes. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1535, p. 1-8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05573-5>. Acesso em 03 set. 2022.

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

FRANCO, M. C.; SCHIMPL, F. C.; MAZZAFERA, P. Reference genes for quantitative RT-PCR of the pilocarpine producer *Pilocarpus microphyllus* and two other *Pilocarpus* species. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, p. 51-59, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40626-016-0080-8>. Acesso em: 29 set. 2020.

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, n° 3, p. 468-483, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-75/2017>. Acesso em: 08 jul. 2020.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**. v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50014a002>. Acesso em: 15 dez. 2021.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie, 1968.

GAD, H. A. *et al.* Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 1-24, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pca.2378>. Acesso em: 03 set. 2022.

GASPER, A. L. de. **Esenbeckia grandiflora**. 2021. 2 fotografias, color., 10 x 15 cm.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. Acesso em: 08 set. 2022.

GOMES, M. C. A. R. *et al.* Toxicity of plant extracts from Bahia, Brazil, to *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 770-776, 2016. Disponível em: <http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/view/936>. Acesso em: 28 maio 2020.

GROPPO, M. *et al.* Chilean Pitavia more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the Family. **PhytoKeys**, v. 19, p. 9-29, 2012. Disponível em: <https://phytokeys.pensoft.net/articles.php?id=1452>. Acesso em: 29 set. 2020.

GROPPO, M. *et al.* Phylogeny Of Rutaceae Based on Two Noncoding Regions From cpDNA. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 985–1005, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51183725_Phylogeny_of_Rutaceae_based_on_two_noncoding_regions_from_cpDNA. Acesso em: 08 jul. 2020.

HADACEK, F. Constitutive Secondary Plant Metabolites and Soil Fungi: Defense Against or Facilitation of Diversity. *In*: KARLOVSKY, P. **Soil Biology: Secondary Metabolites in Soil Ecology**. v. 14. Berlin: Springer, 2008. p. 207 – 239.

HAMAD, M. N. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale**, v. 4, n. 1, 2012. Disponível em: <https://search.proquest.com/docview/1019051157/fulltextPDF/35C3691D07AE49DAQ/1?accountid=146694>. Acesso em: 29 set. 2020.

HAQ, I. Safety of medicinal plants. **Pakistan Journal of Medical Research**, v. 43, n. 4, 2004. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.626.4808&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 01 out. 2020.

HELDT, W. H.; HELDT, F. **Plant Biochemistry & Molecular Biology**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1997.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. *In*: SIMÕES, C. M. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167-184.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. v. 16, n. 1-2, p.1-26, 1974. Disponível em: <http://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2018/09/1-26-Hickey-1974001.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2021.

ICKOVSKI, J. D.; STEPIĆ, K. D.; STOJANOVIĆ, G. S. Composition of essential oils and headspace constituents of *Artemisia annua* L. and *A. scoparia* Waldst. et Kit. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 85, n. 12, p. 1565-1575, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2298/JSC200727061I>. Acesso em: 01 set. 2022.

ILIEVA, Y. *et al.* Cytotoxicity and Microbicidal Activity of Commonly Used Organic Solvents: A Comparative Study and Application to a Standardized Extract from *Vaccinium macrocarpon*. **Toxics**, v. 9, n. 5, p. 92, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics9050092>. Acesso em: 09 maio 2022.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *In*: AL-MAJED, A. **Profile of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. 46 ed. Surabaya: Academic Press Inc., 2021. P. 1-35.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235: 2021**. 2021. This International Standard specifies the terms and definitions, in English and French, relating to aromatic natural raw materials. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en>. Acesso em: 05 jul. 2022.

JACOTET-NAVARRO, M. *et al.* What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. **Electrophoresis**, v. 39, p. 1946-1956, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.201700397>. Acesso em: 08 jan. 2022.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Alcaloides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2034-2038, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000800010>. Acesso em: 29 maio 2020.

JARDIM BOTÂNICO (Rio de Janeiro). **Flora e Funga do Brasil**. [2020a]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 12 set. 2022.

JARDIM BOTÂNICO (Rio de Janeiro). **Flora e Funga do Brasil**. Rutaceae. [2020b]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=2&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=212&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mo>

strarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaU
suario=&contexto=consulta-publica. Acesso em: 19 set. 2022.

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

JORK, H. *et al.* **Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods**. v. 1, Weinheim: VCH, 1990.

JOSHI, P.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 273-292, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.047>. Acesso em: 30 nov. 2022.

KITAGAWA, S. Inhibitory Effects of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 1n p. 1-6, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1>. Acesso em: 01 dez. 2022.

KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice**. 2 ed. New Jersen: John Wiley & Sons, 2006.

KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R; ZYGADLO, J. A. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. *In*: BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. 1 ed. Berlin: Springer, 2007

KRAUS, J. E. *et al.* Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechninc & Histochemistry**. V. 73, n. 5, p. 235-243, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10520299809141117>. Acesso em: 15 dez. 2021.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. de. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto alegre: Artmed, 2017. p. 147-166.

KRZYWIK, J. *et al.* Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Docking Studies of Novel Doubly Modified Colchicine Amides and Sulfonamides as Anticancer Agents. **Molecules**, v. 25, n. 1789, p. 1-31, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25081789>. Acesso em: 13 set. 2022.

KUMAR, P.; TARAFDAR, J. C. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 186-189, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0600-y>. Acesso em: 07 jul. 2022.

LIANG, H. *et al.* Coumarin derivatives from the leaves and twigs of *Murraya exotica* L. and their anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 177, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112416>. Acesso em: 29 set. 2020.

LIRA, P. D. L. *et al.* Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. **Industrial Crops and Products**. v. 30, n. 2, p. 259-264, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.005>. Acesso em: 04 set. 2021.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. **Journal of Cleaner Production**, v. 13, p. 833-839, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>. Acesso em: 24 set. 2020.

MATA, R. *et al.* Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 441-449, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00110-1). Acesso em: 23 ago. 2022.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico-prático**. Fortaleza: EUFC, 1989.

MATTSON, A. M.; JENSEN, C. O.; DUTCHER, R. A. Triphenyltevezolium Chloride as a Dye for Vital Tissues. **Science**, v. 106, p.294-295, 1947. Disponível em: [10.1126/science.106.2752.294-a](https://doi.org/10.1126/science.106.2752.294-a). Acesso em: 09 maio 2022.

McCALLEY, D. V. Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 1-19, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01557-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01557-6). Acesso em: 24 ago. 2022.

MENDES, S. S. *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391–397, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.005>. Acesso em: 22 set. 2020.

METCALFE, C. F. CHALK, L. **Anatomy of The Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. 1 ed, v. 1. London: Oxford University Press, 1957. Disponível em: <https://archive.org/details/anatomyofthedico033552mbp/page/n376/mode/1up?q=ruta-ceae>. Acesso em: 29 set. 2020.

MONTIEL, O. M. **Stevens – 31325 – Paraguay**. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, [2011?]. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Image/100159801>. Acesso em: 04 ago. 2022.

MORAES, V. R. de S. *et al.* Enzymatic Inhibition Studies of Selected Flavonoids and Chemosystematic Significance of Polymethoxylated Flavonoids and Quinoline Alkaloids in Neoraputia (Rutaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 380-387, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000300007>. Acesso em: 29 set. 2020.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 09 maio 2022.

MOURA, N. F. de. *et al.* Composition of the Leaf Oils of Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill, *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St. Hill *et. Tul.* **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 627-628, 2006. Disponível em: [https://1041-2905/06/0006-0627\\$14.00/0](https://1041-2905/06/0006-0627$14.00/0). Acesso em: 26 ago. 2022.

MOUSSA, S. H. *et al.* Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. **Journal of Mycology**, v. 2013, 7 p., 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/753692>. Acesso em: 05 jul. 2022.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. 1 ed. Florida: CRC Press, 2000.

MUNTOREANU, T. G.; CRUZ, R. da S.; MELO-de-PINNA, G. F. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. **Plant Systematics and Evolution**, v. 296, p. 87-99, 2011. Disponível em: <https://10.1007/s00606-011-0478-3>. Acesso em: 11 jul. 2022

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020. Disponível em: <https://10.1021/acs.jnatprod.9b01285>. Acesso em: 17 nov. 2022.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 708-712, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80124-3). Acesso em: 01 out. 2020.

NIST. **NIST Livro de Química na Web, SRD 69**. Disponível em: <https://doi.org/10.18434/T4D303>. Acesso em 18 out. 2022.

NOELLI, F. S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas. **Diálogos DH/UEM**, v. 02, p. 177-199, 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/307844204_Multiplos_usos_de_especies_vegetais_pela_farmacologia_guarani_atraves_de_informacoes_historicas_Multiple_usos_of_vegetal_species_in_Guarani_pharmacology_through_historical_information. Acesso em: 08 jul. 2020.

NORIEGA, P. *et al.* Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1119-1129, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000036>. Acesso em: 06 jan. 2022.

NOVAIS, T. S. *et al.* Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, s. 2, p. 05-08, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13s2/a03v13s2.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2020.

NUNES, F. M. *et al.* ¹H and ¹³C NMR spectra of 3,8-dimethoxyfuro[3,2-g]coumarin and maculine from *Esenbeckia grandiflora* Martius (Rutaceae). **Magnetic Resonance in**

Chemistry, v. 43, p. 864–866, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrc.1621>. Acesso em: 29 maio 2020.

NUNES, F. M. *et al.* 3,3-Diisopentenyl-N-methyl-2,4-quinoldione from *Esenbeckia almawillia*: The Antitumor Activity of this Alkaloid and its Derivatives. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 4, p. 313-318, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X0600100409>. Acesso em: 29 out 2022.

OLIVEIRA, F. M. *et al.* Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 647-649, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00564-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00564-1). Acesso em: 28 maio 2020.

OLIVEIRA, P. E. S. de. *et al.* A pimpinellin monomer and dimer isolated from the roots of *Esenbeckia grandiflora*. **Acta Crystallographica**, v. 60, p. 900-902, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S0108270104023777>. Acesso em: 29 maio 2020.

OLIVEIRA, P. E. S. de; *et al.* Coumarin Derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 1, p. 53–57, 2005. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/13880200590903363>. Acesso em: 29 maio 2020.

PAL SYSTEM. **PAL User Manual Installation and Operation**: COMBI PAL/PAL LHX, PAL COMBI-xt/ PAL LHX-xt. 6 ed. Switzerland: CTC Analytics AG, 2010. Disponível em: <http://nanoqam.ca/wiki/lib/exe/fetch.php?media=combipalmanualedition6.pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.

PANDA, S. *et al.* Essential oils and their pharmacotherapeutics applications in human diseases. **Advances in Traditional Medicine**, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13596-020-00477-z>. Acesso em: 22 set. 2020.

PARRISH, J. A. *et al.* Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultravioleta light. **The New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 23, p. 1207-1211, 1974. Disponível em: www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM197412052912301. Acesso em: 08 jul. 2020.

PASCHOALINI, G. *et al.* Revisiting pericarp structure, dehiscence and seed dispersal in Galipeeae (Zanthoxyloideae, Rutaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 45, p. 415-429, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00779-9>. Acesso em: 11 jul. 2022.

PEREIRA, G. de S. *et al.* Ecologia histórica guarani: as plantas utilizadas no bioma Mata Atlântica do litoral sul de Santa Catarina, Brasil (parte 1). **Cadernos de Lepaarq**, v. 8, n. 26, p. 199-246, 2016. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/lepaarq/article/view/7608>. Acesso em: 08 jul. 2020.

PESSINI, G. L. *et al.* Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800025>. Acesso em: 23 set. 2022.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, p. 598-60, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.06.007>. Acesso em: 01 set. 2022.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107–109, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.02.001>. Acesso em: 22 set. 2020.

RASSEM, H. H. A.; NOUR, A. H.; YUNUS, R. M. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 117–127, 2016. Disponível em: https://moam.info/techniques-for-extraction-of-essential-oils-from-plants-a-review_5cad8ab8097c478b388b4594.html. Acesso em: 24 set. 2020.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. 1-12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187925>. Acesso em: 30 nov. 2022.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

REYES-JURADO, F. *et al.* Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. **Food Engineering Reviews**, v. 75, p. 275–297, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-014-9099-2>. Acesso em: 29 set. 2020.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ UFSC, 2002. p. 333 – 364.

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

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction. *In*: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural products isolations**. 2 ed., v.20. Humana Press: New Jersey, 2006. p. 27-46.

SILVA, F. F. A. da. *et al.* Chemical constituents of essential oil from *Murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Food Science and Technology**, v. 39, s. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.20218>. Acesso em: 27 jul. 2020.

SILVA, L. I. da. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of selected plants used by populations from juruena valley, legal Amazon, Brazil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 5, p. 179-191, 2017. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/315678707_ANTIMICROBIAL_AND_ANTI_OXIDANT_ACTIVITIES_OF_SELECTED_PLANTS_USED_BY_POPULATIONS_FROM_JURUENA_VALLEY_LEGAL_AMAZON_BRAZIL. Acesso em: 14 jul. 2020.

SILVA, L. L. da; PAOLI, A. A. S. Morfologia e anatomia da semente de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 01-06, 2006. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbs/a/mGxtRK8bg6btWfs9FygWgPr/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 27 out. 2021.

SIMONETTI, E. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 19, n. 1, p. 9-18, 2016. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_005. Acesso em: 23 set. 2022.

SKORUPA, L. A.; PIRANI, J.R. *Esenbeckia* Kunth. In: WANDERLEY, M.G.L. *et al.* **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica: São Paulo, v. 2, p. 281-308, 2002. Disponível em:

<https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2016/02/Rutaceae.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2021.

SOMAVILLA, N. S.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Morpho-anatomy of native species used as substitute of quina (*Cinchona* spp.) in Brazilian traditional medicine: *Esenbeckia febrifuga*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 223-227, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.002>. Acesso em: 07 dez. 2021.

SOUZA, J. G. de L. de. *et al.* Chemical Composition, Antimicrobial, Repellent and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Zanthoxylum caribaeum* Lam. **TEOP**, v. 22, n. 2, p. 380-390, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1571444>. Acesso em: 27 jul. 2020.

STELIOPOULOS, P.; MOSANDL, A. Electron impact-induced fragmentation of the sesquiterpene germacrene D. **J. Mass Spectrom**, v. 7, p. 503-508, 2001. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1255/ejms.466>. Acesso em: 19 ago. 2022.

SUÁREZ, L. E. C. *et al.* Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 45, n. 2, p. 275-282, 2011. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v45n2/far12211.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2022

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2009.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231-1249, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>. Acesso em: 24 set. 2020.

TRAN, D. N.; CRAMER, N. Biomimetic Synthesis of (+)-Ledene, (+)-Viridiflorol, (-)-Palustrol, (+)-Spathulenol, and Psiguadial A, C, and D via the Platform Terpene (+)-Bicyclogermacrene. **Chemistry: A European Journal**, v. 20, p. 1-7, 2014. Disponível em: <https://10.1002/chem.201403082>. Acesso em: 27 ago. 2022.

TRANI, M. *et al.* Chemistry of *Esenbeckia* genus. IV. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *grandiflora*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 127, p. 415-418, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chin.199823227>. Acesso em: 29 maio 2020.

TRANI, M. *et al.* Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *brevipetiolata*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 99-102, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ftote.2003.08.004>. Acesso em: 29 maio 2020.

TRIAUX, Z. *et al.* Comparison of Headspace, Hydrodistillation and Pressurized Liquid Extraction of Terpenes and Terpenoids from Food Matrices—Qualitative and Quantitative Analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 284-295, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1061934821030151>. Acesso em: 25 abr. 2022.

UNDATE. **Essential oils, perfumes, cosmetics, toileteries**. 2022. Disponível em: https://data.un.org/Data.aspx?q=essential+oil&d=ComTrade&f=_I1Code%3a34. Acesso em: 06 set. 2022.

UŠJAK, L. *et al.* Chemical composition and chemosystematic evaluation of the fruit and root headspace fractions of selected *Heracleum* taxa from Southeastern Europe. **Botanica Serbica**, v. 46, n. 1, p. 93-103, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2201093U>. Acesso em: 01 out. 2022.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States Pharmacopeia: The National Formulary**. 43 ed., v. 4. Rockville: United States, 2020.

VEIGA, A. *et al.* Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50-61, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>. Acesso em: 14 out. 2020.

VERPOORTE, R. Plant Secondary metabolismo. *In*: VERPOORT, R.; ALFERMANN, W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**, 1 ed. Berlim: Springer-Science Business Media, 2000. p.1-29.

VICTOR, M. M. *et al.* Synthesis and Evaluation of Cytotoxic Effects of Amino-ester Derivatives of Natural α,β -Amyrin Mixture. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2155-2162, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170064>. Acesso em: 28 maio 2020.

VIRGILIGOU, C. *et al.* Headspace gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lavender's essential oil: Optimization by response surface methodology. **Journal of Chromatography B**, v. 1179, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122852>. Acesso em: 14 abr. 2022.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>. Acesso em: 06 jan. 2022.

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

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. *In*: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 3 ed. Itajaí: Univali, 2012. p.37-51.

WAJS-BONIKOWSKA, A. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of *Abies alba* and *A. koreana* Seed and Cone Essential Oils and Characterization of Their Seed Hydrolates. **Chemistry & Biodiversity**. v. 12, p. 407-418, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400167>. Acesso em: 04 set. 2021.

WERKA, J. S.; BOEHME, A. K.; SETZER, W. N. Biological Activities of Essential Oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/282395329_Biological_activities_of_essential_oils_from_Monteverde_Costa_Rica. Acesso em: 29 jun. 2020.

WFO. WORLD FLORA ONLINE. **Rutaceae**. 2022. Disponível em: http://www.worldfloraonline.org/search?query=rutaceae&view=&limit=24&start=0&sort=&facet=taxon.taxonomic_status_s%3aAccepted&facet=taxon.taxon_rank_s%3aGENUS. Acesso em: 17 set. 2022.

WHO. World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: World Health Organization, 1998. cap. 10, p. 40-43. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/quality-control-methods-for-medicinal-plant-materials.pdf?sfvrsn=b451e7c6_0. Acesso em: 05 set. 2021.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 7, p. 694-701, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7np00019g> PMID: 28569300. Acesso em: 13 dez. 2022.

YAN, X.; *et al.* Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p 482-488, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.018>. Acesso em: 01 dez. 2022.

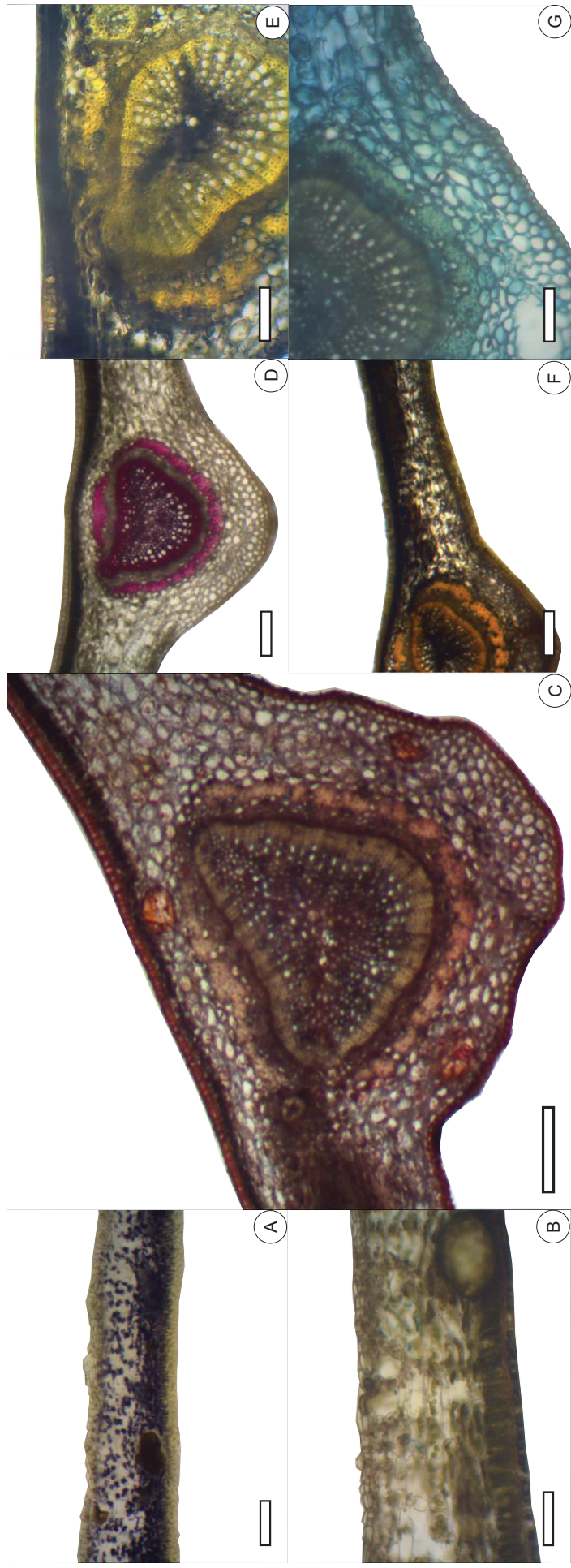
YOSHIRA, K. *et al.* Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 27, p. 2263-2264, 1969. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)88136-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)88136-3). Acesso em: 26 ago. 2022.

YUNES R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas Perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. *In*: YUNES R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 3 ed. Itajaí: Editora Univali, 2012. p. 11-36.

ZARZYCKI, P. K.; BARTOSZUK, M. A.; RADZIWON, A. I. Optimization of TLC Detection by Phosphomolybdic Acid Staining for Robust Quantification of Cholesterol and Bile Acids. **Journal of Planar Chromatography**, v. 19, p. 52-57, jan./fev., 2006. Disponível em: <https://10.1556/JPC.19.2006.1.9>. Acesso em: 16 ago. 2022.

ZHU, Y. *et al.* Rapid Differentiation of Three Lavender Varieties Grown in China by Static Headspace Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, p. 1423-1435, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1578698>. Acesso em: 25 abr. 2022.

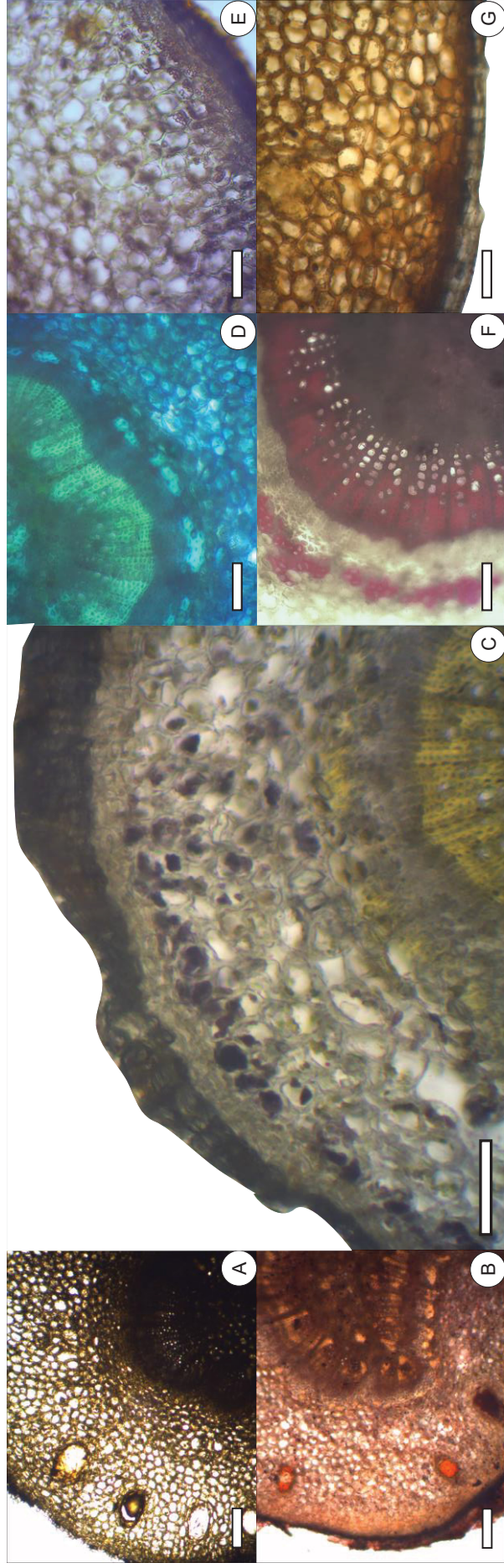
APÊNDICE 1 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO FOLÍOLO DE *E. grandiflora*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A - Lugol; B - Dicromato de potássio; C - Sudan III; D - Cloreto férrico; E - Floroglucina clorídica; F - Wagner; G - Azul de metileno. Barra: 200 µm (A, C, D, F); 100 µm (B, E, G).

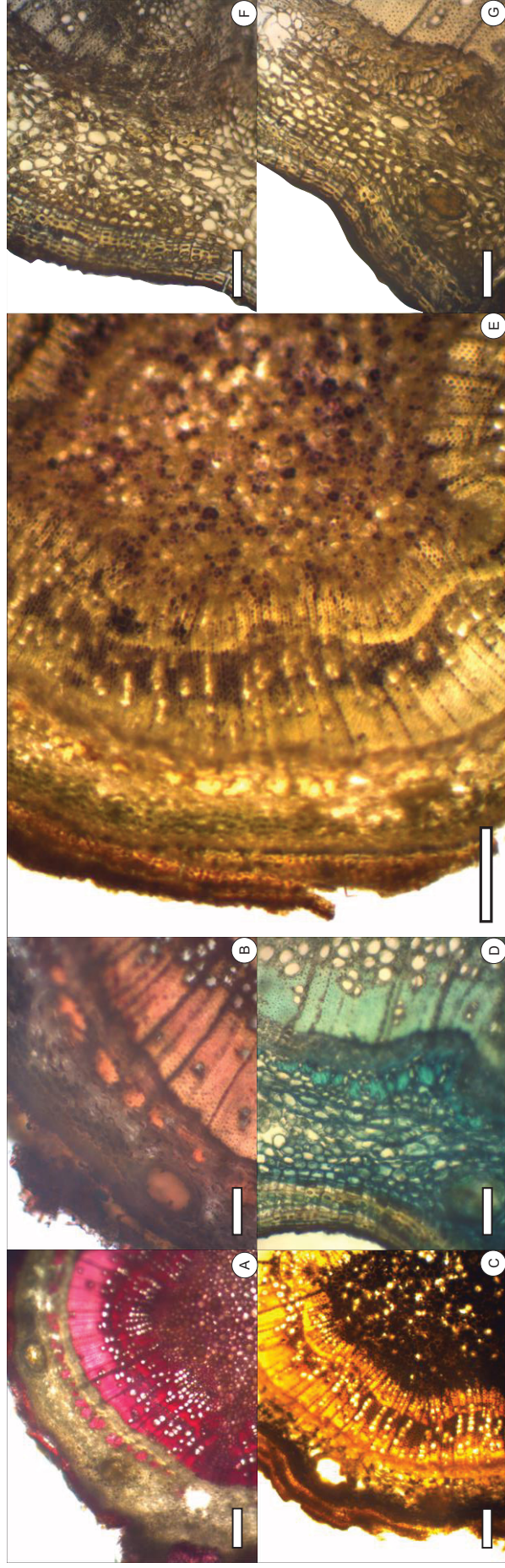
APÊNDICE 2 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO PECÍOLO DE *E. grandiflora*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A - Cloreto férrico; B – Sudan III; C – Wagner; D – Azul de metileno; E – Lugol; F - Floroglucina clorídrica; G - Dicromato de potássio. Barra: 200 μm (B); 100 μm (A, C-G).

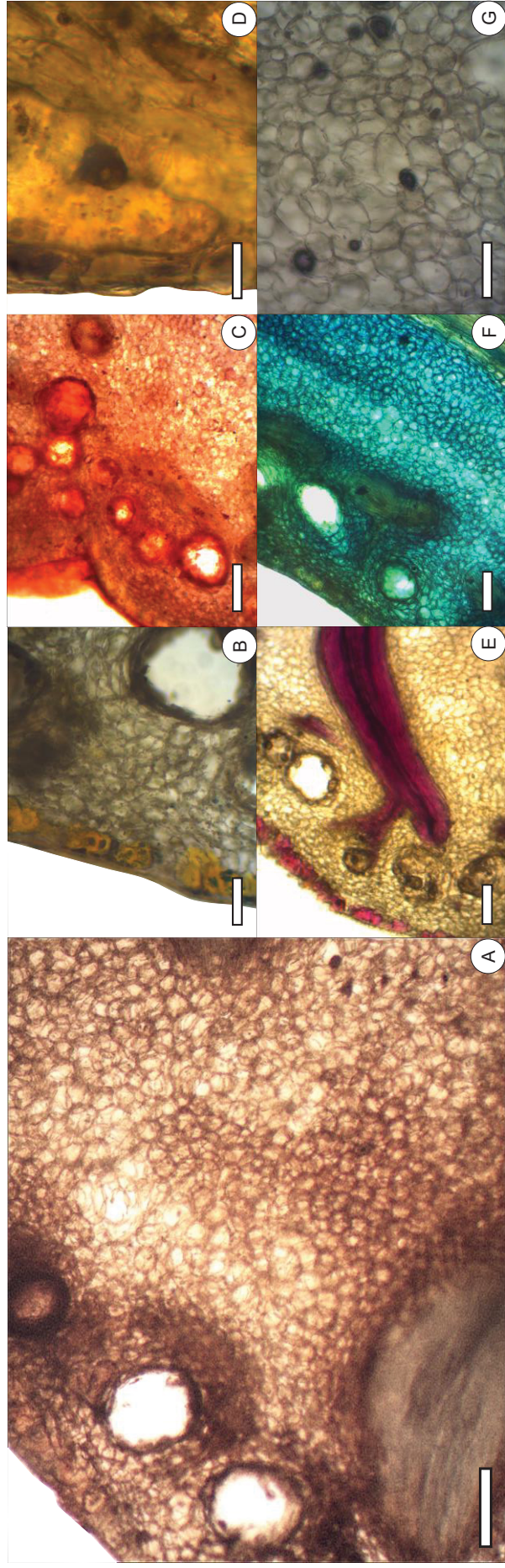
APÊNDICE 3 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO GALHO DE *E. grandiflora*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A - Floroglucina clorídrica; B – Sudam III; C – Wagner; D – Azul de metileno; E – Lugol; F - Dicromato de potássio; G - Cloreto férrico. Barra: 200 µm (A, C, E); 100 µm (B, D, F, G).

APÊNDICE 4 – REAÇÕES HISTOQUÍMICAS APRESENTADAS PELO FRUTO DE *E. grandiflora*



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: A - Dicromato de potássio; B - Wagner; C – Sudam III; D – Cloreto férrico; E - Floroglucina clorídrica; F - Azul de metileno; G - Lugol. Barra: 200 μm (A, E, F); 100 μm (B, C); 30 μm (D, G).

ANEXO I – CADASTRO DE ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO – 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 A4430E8

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: **A4430E8**
 Usuário: **Universidade Federal do Paraná**
 CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Esenbeckia grandiflora

Título da Atividade: **Esenbeckia grandiflora Mart: morfoanatomia, caracterização química e ensaio biológicos**

Equipe

Thalita Gilda Santos	Universidade Federal do Paraná
André Luis de Gasper	Universidade Regional de Blumenau
Fábio Seigi Murakami	Universidade Federal do Paraná
Lorene Armstrong	Universidade Federal do Paraná
Gabriela Colaço Silvestre	Universidade Federal do Paraná

Data do Cadastro: **15/09/2022 16:29:05**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:30** de **15/09/2022**.



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