

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA JUNQUEIRA GATTO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ESTUDO FARMACOLÓGICO, ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE *Myrcia hatschbachii* D.

Legrand, MYRTACEAE



CURITIBA

2020

LARISSA JUNQUEIRA GATTO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ESTUDO FARMACOLÓGICO, ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE *Myrcia hatschbachii* D.
Legrand, MYRTACEAE

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

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2020

Gatto, Larissa Junqueira

Caracterização fitoquímica, estudo farmacológico, atividades biológicas e propriedade antioxidante de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, Myrtaceae [recurso eletrônico] / Larissa Junqueira Gatto – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

1. Ácido elágico. 2. Antioxidante. 3. *Candida albicans*. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321



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 em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LARISSA JUNQUEIRA GATTO** intitulada: **Caracterização Fitoquímica, Estudo Farmacológico, Atividades Biológicas e Propriedade Antioxidante de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, Myrtaceae**, sob orientação da Profa. Dra. MARILIS DALLARMI MIGUEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 20 de Julho de 2020.

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 18:10:22.0

MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

14/08/2020 20:10:52.0

CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 23:25:53.0

YANNA DANTAS RATTMANN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 19:18:18.0

DEISE PREHS MONTRUCCHIO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 17:25:17.0

SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 49760

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 49760

AGRADECIMENTOS

A Deus pela realização deste sonho que eu nem sabia que tinha. Por me cercar de pessoas que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Por me presentear com uma espécie, *Myrcia hatschbachii*, que me trouxe muitas alegrias.

Ao querido Vini que esteve ao meu lado nos dias felizes, angustiantes e dramáticos da pós-graduação, por tudo que fez e faz por mim. Aos meus pais Mauro e Carmem, irmã Melissa e Vó Cida pelas orações, apoio e presença em todos os momentos.

À Profa. Marilis Dallarmi Miguel pelos anos de orientação e pela força que me proporcionou em um momento que eu precisava de muita. Provavelmente a senhora não tinha ideia do quanto a nossa conversa sobre o término do Doutorado me incentivou a enfrentar o que vinha pela frente.

Aos amigos de laboratório, especialmente Caroline Gribner, Elisiane Sartor, Gustavo Oliveira e Paula Nunes, os quais sinto um carinho muito grande e uma eterna gratidão. Sabemos que não foi fácil, mas tendo uns aos outros foi reconfortante. Também gostaria de agradecer algumas pessoas solícitas e queridas que me ajudaram em experimentos diversos: Alexandre do Nascimento, Aléxia Gasparin, Andressa Veiga, Carlos Jesus, Êmellie Alves, Gracinha Toledo, Katlin Rech, Mirna Clemente e Suelen Ávila.

Aos professores do nosso grupo de pesquisa Obdulio Miguel, Josiane Dias e Sandra Zanin pela convivência e contribuições em todos os momentos de dúvidas.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; à Profa. Joice Cunha pelo auxílio no estudo farmacológico, pelos ensinamentos, dedicação e disponibilização do laboratório e dos animais; ao Centro de RMN pelos espectros dos compostos isolados; à Central analítica pela realização das análises cromatográficas; ao Departamento de Nutrição pelo auxílio no teste antioxidante ABTS; ao Prof. Fábio Murakami e à Ângela de Souza pelo auxílio na avaliação da atividade microbiológica.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pelo auxílio nos testes enzimáticos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e Juliane Nadal pelo auxílio na análise térmica.

À Profa. Jane Manfron pela valiosa contribuição na escrita do artigo morfoanatômico.

Às professoras da banca examinadora, Cris Paula, Deise Montrucchio, Samanta Golin, Yanna Rattmann e Ana Flávia Duarte pela atenção e disponibilidade.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas habilidades”.

Alvo Dumbledore
(J. K. Rowling)

RESUMO

A espécie *Myrcia hatschbachii* é nativa e endêmica do Brasil e pertence à família Myrtaceae, a qual é reconhecida por inúmeras propriedades biológicas e vasta biodiversidade na flora brasileira. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica e avaliar as atividades farmacológicas, biológicas e propriedade antioxidante da espécie. Folhas e galhos foram coletados no Capão do Cifloma, Curitiba, Paraná, Brasil e extraídos por Soxhlet para a obtenção dos extratos brutos e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. O screening fitoquímico foi feito por cromatografia em camada delgada e mostrou a presença de taninos e flavonoides em todos os extratos e frações. O ácido elágico foi isolado das frações clorofórmio e acetato de etila e identificado por ressonância magnética nuclear tanto nas folhas quanto nos galhos. Já o ácido 3-O-metil elágico foi isolado da fração acetato de etila de galhos. A quantificação do ácido gálico na fração acetato de etila de folhas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e mostrou que 18% da composição da fração é atribuída a este metabólito. O doseamento de compostos fenólicos foi feito pelo método de Folin-Ciocalteu e indicou que todas as amostras, com exceção das frações hexano, apresentaram uma alta quantidade destes compostos. Os métodos de poder de redução do ferro e captura do radical ABTS reafirmaram a capacidade antioxidante exercida pelos extratos brutos e frações. As atividades antibacteriana e antifúngica foram testadas pelo método de microdiluição em caldo e apresentaram atividades frente a diferentes micro-organismos, especialmente a *Candida albicans*. Os resultados de inibição da atividade de α -glicosidase do extrato bruto e fração acetato de etila de folhas mostraram efeitos inibitórios superiores a acarbose. Estas amostras também inibiram a lipase pancreática, mas seus efeitos foram inferiores ao orlistate. No estudo farmacológico *in vivo*, o tratamento com extrato bruto de folhas nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg apresentou potencial anti-inflamatório, pois atenuou o edema da pata na 2ª e 3ª hora após a injeção de carragenina. Além disso, o extrato também mostrou efeito na segunda fase da nocicepção induzida por formalina nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg. De acordo com estes resultados, a espécie *Myrcia hatschbachii* se mostra promissora para o aprofundamento de estudos que possibilitem o desenvolvimento de futuros medicamentos.

Palavras-chave: Ácido elágico. Anti-inflamatório. Antioxidante. *Candida albicans*. α -glicosidase.

ABSTRACT

The *Myrcia hatschbachii* species is native and endemic to Brazil and belongs to the Myrtaceae family, which is recognized for numerous biological properties and vast biodiversity in the Brazilian flora. The aim of this work was to carry out phytochemical characterization and to evaluate the pharmacological, biological, and antioxidant properties of the species. Leaves and stems were collected in Cifloma Capon, Curitiba, Parana, Brazil and extracted by Soxhlet to obtain the crude extracts and hexane, chloroform, ethyl acetate, and remaining fractions. Phytochemical screening was carried out by thin layer chromatography and showed the presence of tannins and flavonoids in all extracts and fractions. The ellagic acid was isolated from the chloroform and ethyl acetate fractions and identified by nuclear magnetic resonance in leaves and stems. The 3-O-methyl ellagic acid was isolated from the ethyl acetate fraction of stems. The quantification of gallic acid in the ethyl acetate fraction of leaves was performed by high performance liquid chromatography and showed that 18% of the fraction composition is attributed to this metabolite. The determination of phenolic compounds was carried out by using the Folin-Ciocalteu method and indicated that all samples, excluding hexane fractions, presented a high amount of these compounds. The ferric reducing potential and the capture of the radical ABTS methods reaffirmed the antioxidant capacity exerted by crude extracts and fractions. The antibacterial and antifungal activities were tested by using the broth microdilution method and showed activities against different microorganisms, especially *Candida albicans*. The results of inhibition of α -glucosidase activity of crude extract and ethyl acetate fraction of leaves showed inhibitory effects superior to acarbose. These samples also inhibited pancreatic lipase, but their effects were lower than orlistat. In the *in vivo* pharmacological study, the treatment with crude extract of leaves at doses of 10, 30, and 100 mg/kg showed anti-inflammatory potential, as it attenuated paw edema in the 2nd and 3rd hours after the injection of carrageenan. In addition, the extract also showed an effect on the second phase of formalin-induced nociception at doses of 10, 30, 100, and 300 mg/kg. According to these results, the *Myrcia hatschbachii* species is promising for further studies that enable the development of herbal medicine.

Keywords: Ellagic acid. Anti-inflammatory. Antioxidant. *Candida albicans*. α -glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- EXEMPLAR DE <i>Myrcia hatschbachii</i> LOCALIZADO NO JARDIM BOTÂNICO DE CURITIBA.....	34
FIGURA 2	- ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO ISOLADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS.....	36
FIGURA 3	- FLUXOGRAMA DE PESQUISA DA ESPÉCIE <i>Myrcia hatschbachii</i>	43
FIGURA 4	- ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS NO TESTE DE FORMALINA.....	67
FIGURA 5	- PESQUISA DE TANINOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES COLETADOS EM 2016 (A) E 2018 (B).....	74
FIGURA 6	- DISPOSIÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO NAS MOLÉCULAS DE ÁCIDO 3-O-METIL ELÁGICO (A) E ÁCIDO ELÁGICO (B).....	76
FIGURA 7	- ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA FGA2016ppt.....	77
FIGURA 8	- MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA FGA2016ppt.....	77
FIGURA 9	- MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C HMBC DA AMOSTRA FGA2016ppt.....	78
FIGURA 10	- SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE ÁCIDO GÁLICO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS.....	80
FIGURA 11	- EFEITOS BACTERIOSTÁTICO (A) E BACTERICIDA (B) OBSERVADOS NO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS.....	94
FIGURA 12	- EDEMA DE PATA FORMADO APÓS INJEÇÃO DE CARRAGENINA.....	103

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EXPRESSO EM PORCENTAGEM.....	37
GRÁFICO 2	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH EXPRESSO EM IC ₅₀	38
GRÁFICO 3	- PERFIL DA ANÁLISE TÉRMICA DE FOLHAS E GALHOS.	70
GRÁFICO 4	- DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EXPRESSO EM PORCENTAGEM.....	82
GRÁFICO 5	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH EXPRESSO EM IC ₅₀	83
GRÁFICO 6	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EXPRESSO EM PORCENTAGEM.....	84
GRÁFICO 7	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO EXPRESSO EM μM DE SULFATO FERROSO/g.....	86
GRÁFICO 8	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO PELO MÉTODO DO RADICAL ABTS EXPRESSO EM mmol ET/mg.....	88
GRÁFICO 9	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α-GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO (A) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (B) DE FOLHAS EXPRESSA EM PORCENTAGEM.....	96

GRÁFICO 10	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS EXPRESSA EM IC ₅₀	97
GRÁFICO 11	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO (A) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (B) DE FOLHAS EXPRESSA EM PORCENTAGEM.....	98
GRÁFICO 12	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS EXPRESSA EM IC ₅₀	99
GRÁFICO 13	- ESPESSURA DA PATA MEDIDA ANTES E 1, 2 E 3 HORAS APÓS A INJEÇÃO DE CARRAGENINA OU SALINA.....	102
GRÁFICO 14	- EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NAS FASES I, QUIESCENTE E II.....	105
GRÁFICO 15	- EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NO DECORRER DE 60 MINUTOS.....	106

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELATADAS NO GÊNERO <i>Myrcia</i>	26
QUADRO 2	- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO <i>Myrcia</i>	28
QUADRO 3	- SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	49
QUADRO 4	- GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	52
QUADRO 5	- REAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	53
QUADRO 6	- REAÇÃO PARA MÉTODO DO RADICAL DPPH.....	55
QUADRO 7	- GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO TESTE DE EDEMA DE PATA.....	66
QUADRO 8	- GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO TESTE DE FORMALINA.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> OBTIDAS A PARTIR DA COLETA 2016.....	36
TABELA 2	- ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EXERCIDA PELOS ÁCIDOS ELÁGICO E 3-O-METIL ELÁGICO EXPRESSA EM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	42
TABELA 3	- ANÁLISES DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i>	69
TABELA 4	- ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i>	70
TABELA 5	- TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> .	71
TABELA 6	- RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i>	72
TABELA 7	- SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Myrcia hatschbachii</i> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	73
TABELA 8	- DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA O ÁCIDO 3-O-METIL ELÁGICO (AMOSTRA FGA2016ppt), EM DMSO- d_6 .	75
TABELA 9	- DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA O ÁCIDO ELÁGICO (AMOSTRA FGA2016ppt), EM DMSO- d_6	76
TABELA 10	- DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSO EM g EAG/g E EM PORCENTAGEM.....	81
TABELA 11	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSO EM μM DE SULFATO FERROSO/g.....	85
TABELA 12	- POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSO EM mmol DE ET/mg.....	87

TABELA 13	- CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE O DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E OS MÉTODOS ANTIOXIDANTES.....	89
TABELA 14	- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSA EM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	92
TABELA 15	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSA EM IC ₅₀	96
TABELA 16	- ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE <i>Myrcia hatschbachii</i> EXPRESSA EM IC ₅₀	98
TABELA 17	- CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E O DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E MÉTODOS ANTIOXIDANTES.....	100

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	-	Atividade antioxidante
AAR	-	Atividade antioxidante relativa
Abs	-	Absorbância
AE	-	Ácido elágico
AG	-	Ácido gálico
AINEs	-	Anti-inflamatórios não esteroidais
ATCC	-	American Type Culture Collection
ATM	-	Atmosfera de pressão
ATP	-	Adenosina trifosfato
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	-	Concentração letal 50%
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	-	Clinical Laboratory Standarts Institute
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	-	Equivalente em ácido gálico
EBF	-	Extrato bruto folha
EBG	-	Extrato bruto galho
EPM	-	Erro padrão da média
ET	-	Equivalente em trolox
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
FAA	-	Solução de formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%
FFA	-	Fração folha acetato de etila
FFC	-	Fração folha clorofórmio
FFH	-	Fração folha hexano
FFR	-	Fração folha remanescente
FGA	-	Fração galho acetato de etila
FGC	-	Fração galho clorofórmio
FGH	-	Fração galho hexano
FGR	-	Fração galho remanescente

FRAP	- Ferric Reducing Antioxidant Power
g	- Grama
IC ₅₀	- Concentração inibitória 50%
INPI	- Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IVG	- Índice de velocidade de germinação
k	- Quilo
L	- Litro
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
μ	- Micro
m	- Mili
M	- Molar
MHB	- Mueller Hinton Broth
MHz	- Mega-hertz
mm	- Milímetros
n°	- Número
N	- Normal
nm	- Nanômetros
OE	- Óleo essencial
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- Parte por milhão
RMN	- Ressonância magnética nuclear
TG	- Termogravimétrica
TMS	- Tetrametilsilano
TPTZ	- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TTC	- 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto
UFC	- Unidade formadora de colônia
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta
%	- Porcentagem
°C	- Escala Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE	24
2.2 GÊNERO <i>Myrcia</i> DC.....	25
2.2.1 Atividades biológicas de <i>Myrcia</i>	26
2.2.2 Constituintes químicos de <i>Myrcia</i>	28
2.3 ESPÉCIE <i>Myrcia hatschbachii</i> D. Legrand	34
2.3.1 Resultados preliminares da espécie	35
2.4 COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Myrcia hatschbachii</i>	39
2.4.1 Ácido elágico	39
2.4.2 Estudo comparativo entre os ácidos elágico e 3-O-metil elágico.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	44
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	45
3.2.1 Métodos gravimétricos.....	45
3.2.1.1 Umidade	45
3.2.1.2 Cinzas Totais.....	45
3.2.2 Método termogravimétrico	46
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	46
3.3.1 Extrato bruto	46
3.3.2 Teor de sólidos	47
3.3.3 Fracionamento.....	47
3.4 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	48
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	49
3.5.1 Amostra: FGA2016ppt	49
3.5.2 Amostra: FGC2016ppt.....	50
3.5.3 Amostra: FFA2016F11-144ppt	50
3.5.4 Amostra: FGA2016F109-135ppt.....	50
3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	51
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	51

3.8 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	53
3.9 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	54
3.9.1 Radical DPPH.....	54
3.9.2 Complexo Fosfomolibdênio	55
3.9.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro.....	56
3.9.4 Radical ABTS	58
3.10 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA	59
3.10.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial.....	59
3.10.2 Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados.	60
3.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	62
3.11.1 α -Glicosidase	62
3.11.2 Lipase pancreática.....	63
3.12 CORRELAÇÃO DE PEARSON	65
3.13 ESTUDO FARMACOLÓGICO	65
3.13.1 Animais.....	65
3.13.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina	66
3.13.3 Avaliação do efeito antinociceptivo no teste da formalina.....	67
3.13.4 Análise estatística.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	69
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	71
4.3 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	72
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	75
4.4.1 Amostra: FGA2016ppt.....	75
4.4.2 Amostra: FGC2016ppt.....	78
4.4.3 Amostra: FFA2016F11-144ppt	79
4.4.4 Amostra: FGA2016F109-135ppt.....	79
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	79
4.6 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	80
4.7 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	82
4.7.1 Radical DPPH.....	83
4.7.2 Complexo Fosfomolibdênio	84

4.7.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro.....	85
4.7.4 Radical ABTS	87
4.7.5 Correlação de Pearson.....	89
4.8 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	90
4.8.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial.....	91
4.8.2 Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados	91
4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	94
4.9.1 α -Glicosidase	95
4.9.2 Lipase pancreática.....	98
4.9.3 Correlação de Pearson	100
4.10 ESTUDO FARMACOLÓGICO	101
4.10.1 Avaliação do efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina	101
4.10.2 Avaliação do efeito antinociceptivo no teste da formalina.....	104
5 CONCLUSÃO	108
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO 1 - IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE PELO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL.....	126
ANEXO 2 - CERFIFICADO CEUA/BIO – UFPR N° 1322.....	127

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes de desenvolvimento de novos fármacos e insumos, e a diversidade química dos metabólitos secundários contribui para esse interesse científico contínuo. As propriedades medicinais das plantas têm sido o principal foco das pesquisas científicas. A biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um rico potencial em compostos biologicamente ativos que podem ser usados como modelos para a química medicinal e descoberta de drogas, devido ao número de espécies de plantas e vias biosintéticas capazes de produzir diversidade química (VALLI et al., 2018).

No século XIX, a busca por compostos ativos derivados de plantas medicinais resultou na descoberta de substâncias relevantes como a morfina, codeína, papaverina, a partir de *Papaver somniferum*, a atropina, obtida de *Atropa belladonna*, a cafeína, isolada de *Coffea arabica* e a digoxina, obtida a partir de *Digitalis lanata*. O marco histórico na indústria farmacêutica mundial foi a descoberta da salicina (analgésica e antipirética), em 1832, obtida de *Salix alba*. Nos anos seguintes, foi realizada a primeira modificação estrutural da molécula, originando o ácido salicílico. A partir deste composto, em 1897, foi sintetizado o ácido acetilsalicílico, o qual foi a primeira substância patenteada na área de medicamentos (DUTRA et al., 2016).

O uso de plantas medicinais é incentivado pela Organização Mundial da Saúde, já que 80% da população recorre à cultura popular para alívio e tratamento de doenças. Assim, muitos fatores têm colaborado no desenvolvimento de práticas de saúde utilizando plantas medicinais, incluindo econômicas e sociais (SILVA et al., 2016).

A pesquisa fitoquímica é crescente devido ao potencial uso de substâncias bioativas, especialmente os compostos fenólicos, com ações de proteção celular ou como drogas anticâncer. A importância da busca de antioxidantes naturais é destacada por sua propriedade em sequestrar ou suprimir a formação de espécies reativas de oxigênio. Estudos experimentais associaram o dano celular oxidativo decorrente de um desequilíbrio entre a geração de radicais livres como a principal causa de doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento (SANTOS et al., 2018).

Além disto, muitos produtos naturais mostram-se promissores no tratamento de doenças infecciosas, diabetes e apresentam propriedades antimicrobianas, antimutagênicas e anti-inflamatórias. Estes fitoquímicos derivados de plantas podem

ser utilizados como agente terapêutico único ou como formulações combinadas no desenvolvimento de fármacos (CHEW et al., 2011).

A família Myrtaceae e o gênero *Myrcia* são amplamente conhecidos por suas atividades biológicas, usos populares e obtenção de óleo essencial. Dentre as espécies desta família de importante interesse científico, destaca-se *Myrcia hatschbachii* D. Legrand. Estudos preliminares mostraram a presença do constituinte ácido gálico e das propriedades antioxidante e alelopática em seus extratos brutos e frações, além de moderada toxicidade no óleo essencial (GATTO, 2018). A continuidade da pesquisa desta espécie contribui na busca por compostos químicos a partir de plantas da biodiversidade brasileira pouco explorada. Além disso, possibilita a investigação de propriedades medicinais, as quais poderão ser aplicadas às ciências farmacêuticas, agronômicas e alimentícias.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização fitoquímica, estudo farmacológico, atividades biológicas e propriedade antioxidante de extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados da espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand (Myrtaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material vegetal e realizar as análises físico-químicas, utilizando métodos gravimétricos e termogravimétricos.
- Obter os extratos brutos e frações de folhas e galhos.
- Realizar o screening fitoquímico por cromatografia em camada delgada dos extratos brutos, frações e compostos isolados.
- Isolar e caracterizar os constituintes químicos presentes nas folhas e galhos por meio de ressonância magnética nuclear.
- Quantificar o ácido gálico na fração acetato de etila de folhas.
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos brutos e frações.
- Avaliar a propriedade antioxidante de compostos isolados pelos métodos do radical DPPH e complexo fosfomolibdênio.

- Avaliar a propriedade antioxidante de extratos brutos, frações e compostos isolados pelos métodos de FRAP e ABTS.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados.
- Avaliar a atividade inibitória do extrato bruto e fração acetato de etila de folhas sobre as enzimas α -glicosidase e lipase pancreática.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vivo* do extrato bruto de folhas sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.
- Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato bruto de folhas no modelo de nocicepção induzida por formalina em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é representada por árvores e arbustos distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, particularmente na América do Sul, Austrália e Ásia tropical. No mundo, apresenta 132 gêneros e 5671 espécies, já no Brasil são encontrados 23 gêneros e 1034 espécies, com ocorrência em todas as regiões e formações geográficas do país (RAPOSO et al., 2018).

Dentre as plantas do cerrado brasileiro, Myrtaceae é uma das famílias mais proeminentes e representativas, devido a sua elevada diversidade de gêneros e espécies. Várias delas são usadas para fins ornamentais, madeireiros e alimentares (SA et al., 2017). A madeira de *Eucalyptus* spp. é empregada para a produção de papel e carvão vegetal; o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é utilizado como especiaria; já os frutos de *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* e *Syzygium cumini* (goiaba, pitanga, jaboticaba, jamelão, respectivamente) são consumidos *in natura* e utilizados em sucos ou geleias, e as folhas são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças (CASCAES et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Além disto, as Mirtáceas são muito estudadas devido às suas características químicas, potencial medicinal e presença de metabólitos secundários (LEMOS et al., 2018). A família é quimicamente muito diversa, embora seja destacada pela presença de compostos fenólicos (especialmente flavonoides e taninos) (RODRIGUES et al., 2016). A ocorrência de flavonoides C-metilados é um diferencial presente nos seus exemplares, pois estes tipos de compostos são raros em outras espécies vegetais, portanto passaram a ser uma característica química da família (SILVA, 2012).

Em relação às propriedades medicinais, a família tem uma diversidade de plantas estudadas com ações diurética, anti-hemorrágica, adstringente, hipoglicêmica e anti-hipertensiva (RODRIGUES et al., 2016). Além disso, são empregadas na medicina popular principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos (CRUZ; KAPLAN, 2004).

Os frutos comestíveis nativos produzidos pelas espécies da família Myrtaceae possuem importância ecológica na flora brasileira. Como a maioria destes frutos

crecem sob condições ambientais adversas, como seca, inundação, luz solar e calor, eles representam uma fonte de metabólitos secundários, especialmente os polifenóis, e estão envolvidos na defesa de plantas (DONADO-PESTANA et al., 2018).

Além dos frutos, os óleos essenciais produzidos por seus exemplares são ecologicamente importantes, pois contribuem para a proteção das espécies, repelindo insetos e atraindo dispersores de pólen e sementes. Os óleos também são de interesse comercial para a indústria farmacêutica, devido a sua ação terapêutica e efeito larvicida sobre o *Aedes aegypti* L., um dos principais vetores de patógenos humanos (MENDES et al., 2018).

A bioatividade dos óleos essenciais pode ser exercida por diferentes constituintes, especialmente monoterpenos ou sesquiterpenos. Entre as famílias que concentram esses compostos, Myrtaceae tem sido reconhecida não apenas por investigações da atividade biológica do grupo, mas também pela presença de óleos essenciais (SANTANA et al., 2018).

2.2 GÊNERO *Myrcia* DC.

O gênero *Myrcia* inclui aproximadamente 350 espécies. No Brasil, há um grande número de espécies nativas que são tipicamente encontradas na região do cerrado. Estes exemplares são utilizados na medicina popular como adstringentes, diuréticos, anticoagulantes, hipoglicemiantes, hipotensores e no tratamento de úlceras gástricas (SERPELONI et al., 2015; ALVES et al., 2016).

Uma característica relevante do gênero é a produção de óleo essencial em um número expressivo de espécies os quais apresentam propriedades biológicas diversas (RAPOSO et al., 2018). Composto majoritariamente por sesquiterpenos, os óleos podem ser obtidos das folhas, galhos, frutos e flores (CASCAES et al., 2015).

Dentre as atividades descritas para o óleo essencial, destaca-se a antimicrobiana, a qual foi encontrada em diversas espécies do gênero: *Myrcia fallax* (ALARCÓN et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2012; SCALVENZI et al., 2017), *Myrcia lundiana* (ALVES et al., 2016), *Myrcia ovata* (CÂNDIDO et al., 2010; JESUS et al., 2016), *Myrcia aff fosteri* (TENORIO et al., 2011), *Myrcia myrtifolia* (CERQUEIRA et al., 2007), *Myrcia cucullata* (CORREA-ROYERO et al., 2010), *Myrcia oblongata* (SANTANA et al., 2018), *Myrcia alagoensis* (SILVA et al., 2013), *Myrcia hatschbachii* (GATTO et al., 2020a), *Myrcia guianensis* e *Myrcia rostrata* (SILVA, 2010).

2.2.1 Atividades biológicas de *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é conhecido quanto ao seu uso popular no tratamento da diabetes, sendo um grupo de plantas denominado no Brasil de "pedra-hume-caá" ou "insulina vegetal". Devido a esta propriedade, estudos *in vitro* e *in vivo* vem sendo publicados com as espécies do gênero mostrando diferentes mecanismos da avaliação de inibição de atividades enzimáticas (α -amilase, α -glicosidase e aldose redutase) e ação hipoglicemiante a partir da administração de extratos e frações em animais (SACCOL et al., 2018).

Os potenciais anti-inflamatório e antinociceptivo *in vivo* de algumas espécies de *Myrcia*, como extrato de *Myrcia bella* (NUNES, 2012) e óleo essencial de *Myrcia ovata* (SANTOS et al., 2014), *Myrcia publiflora* (ANDRADE et al., 2012) e *Myrcia rostrata* (SILVA et al., 2018), também já foram demonstrados anteriormente em testes como o edema induzido por carragenina, o qual é um modelo de inflamação aguda, e pela nocicepção induzida por formalina.

Além destas propriedades, as atividades biológicas, farmacológicas e antioxidantes do gênero encontradas na literatura estão resumidas no QUADRO 1.

QUADRO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELATADAS NO GÊNERO *Myrcia*

(continua)

ATIVIDADE RELACIONADA	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Alelopática/ Fitotóxica	<i>M. splendens</i> ¹	Folhas	IMATOMI et al., 2015
	<i>M. guianensis</i>	Folhas	SOUZA et al., 2006; FRANCO et al., 2015
		Óleo essencial	SOUZA et al., 2006
	<i>M. hatschbachii</i>	Óleo essencial	GATTO et al., 2020a
	<i>M. multiflora</i>	Folhas	IMATOMI et al., 2015
	<i>M. tomentosa</i>	Composto isolado	IMATOMI et al., 2013
Folhas		IMATOMI et al., 2015	
Anestésica	<i>M. sylvatica</i>	Óleo essencial	SACCOL et al., 2017
Antibacteriana/ Antifúngica	<i>M. aff fosteri</i>	Óleo essencial	TENORIO et al., 2011
	<i>M. alagoensis</i>	Óleo essencial	SILVA et al., 2013
	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. cucullata</i>	Óleo essencial	CORREA-ROYERO et al., 2010
	<i>M. fallax</i> ¹	Óleo essencial	ALARCÓN et al., 2009
	<i>M. fallax</i> ¹	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. guianensis</i>	Óleo essencial	SILVA, 2010
	<i>M. hatschbachii</i>	Óleo essencial, Galhos	GATTO et al., 2020a, 2020b
	<i>M. lajeana</i>	Óleo essencial	LIMBERGER et al., 1998
	<i>M. lundiana</i>	Óleo essencial	ALVES et al., 2016
	<i>M. myrtifolia</i>	Óleo essencial	CERQUEIRA et al., 2007
	<i>M. oblongata</i>	Óleo essencial	SANTANA et al. 2018

QUADRO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELATADAS NO GÊNERO *Myrcia*

(conclusão)

ATIVIDADE RELACIONADA	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Antibacteriana/ Antifúngica	<i>M. olighanta</i>	Óleo essencial	LIMBERGER et al., 1998
	<i>M. ovata</i>	Óleo essencial	CÂNDIDO et al., 2010; JESUS, et al., 2016; SAMPAIO et al., 2016; FRAZÃO et al., 2017
	<i>M. rostrata</i> ¹	Óleo essencial	LIMBERGER et al., 1998; SILVA, 2010
	<i>M. splendens</i> ¹	Óleo essencial	JIMÉNEZ et al., 2012; SCALVENZI et al., 2017
	<i>M. tomentosa</i>	Composto isolado Folhas	SA et al., 2017 SA et al., 2017
Anti-hemorrágica	<i>M. guianensis</i>	Folhas	SOUSA et al., 2013
Anti-inflamatória/ Antinociceptiva	<i>M. bella</i>	Folhas	NUNES, 2012
	<i>M. ovata</i>	Óleo essencial	SANTOS et al., 2014
	<i>M. pubiflora</i>	Óleo essencial	ANDRADE et al., 2012.
	<i>M. rostrata</i>	Óleo essencial	SILVA et al., 2018
Antioxidante	<i>M. amazonica</i>	Óleo essencial	CALAO, 2014
	<i>M. bella</i>	Folhas	TAKAO et al., 2015; SANTOS et al., 2018
	<i>M. fallax</i> ¹	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. hatschbachii</i>	Galhos	GATTO et al., 2020b
	<i>M. laruotteana</i>	Folhas	SALVADOR et al., 2011
	<i>M. lingua</i>	Folhas	TAKAO et al., 2015
	<i>M. oblecta</i>	Folhas	SALVADOR et al., 2011
	<i>M. palustris</i>	Folhas	MORESCO et al., 2014
	<i>M. splendens</i> ¹	Folhas	MORESCO et al., 2014; TAKAO et al., 2015; PONTES et al., 2018
<i>M. tomentosa</i>	Folhas	TAKAO et al., 2015	
Citotóxica/ Anticancerígena	<i>M. bella</i>	Folhas	SERPELONI et al., 2015; SANTOS et al., 2018
	<i>M. fallax</i> ¹	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	<i>M. laruotteana</i>	Óleo essencial	STEFANELLO et al., 2011
	<i>M. splendens</i> ¹	Óleo essencial	SCALVENZI et al., 2017
Hepatoprotetora	<i>M. multiflora</i>	Composto isolado	FERREIRA et al., 2010
Hipoglicemiante/ Antidiabética	<i>M. bella</i>	Folha	VAREDA et al., 2014
	<i>M. multiflora</i>	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998; OLIVEIRA, PEREIRA, 2015; GONZÁLEZ et al., 2016
	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
	<i>M. speciosa</i>	Folhas	MIURA et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2016
	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	<i>M. uniflora</i>	Folhas	PEPATO et al., 1993
Hipolipidêmica	<i>M. multiflora</i>	Composto isolado	FERREIRA et al., 2011
Larvicida	<i>M. ovata</i>	Óleo essencial	LIMA et al., 2011
Sedativo	<i>M. sylvatica</i>	Óleo essencial	SACCOL et al., 2018
Tóxica	<i>M. myrtifolia</i>	Óleo essencial	CERQUEIRA et al., 2007
	<i>M. sylvatica</i>	Óleo essencial	ROSA et al., 2016

FONTE: O autor (2020).

NOTA: ¹ Sinônimos - *Myrcia splendens* (Sw.) DC. = *Myrcia rostrata* DC. = *Myrcia fallax* (Rich.).

2.2.2 Constituintes químicos de *Myrcia*

Os compostos não voláteis isolados dos extratos de *Myrcia* são geralmente flavonoides, taninos, derivados de acetofenonas e triterpenos, os quais podem ser responsáveis pelas atividades antioxidante e hipoglicemiante descritas no gênero (SANTOS et al., 2018). O QUADRO 2 traz um levantamento dos compostos isolados do gênero descritos na literatura, no qual pode-se destacar a diversa variedade de substâncias, especialmente flavonoides e taninos. Com raras exceções, a obtenção destes compostos foi realizada a partir das folhas das espécies.

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continua)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Acetofenona	2',4',6'-trihidroxiacetofenona	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998; FERREIRA et al., 2011
	Myrciafenona A	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998; FERREIRA et al., 2011
	Myrciafenona B	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998; FERREIRA et al., 2011
Ácidos orgânicos	Ácido 3-O-metil elágico	<i>M. hatschbachii</i>	Galhos	GATTO et al., 2020b
	Ácido 3,4-metilenodioxo-3'-O-metil elágico	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Ácido 3,4,3'-tri-O-metil elágico	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Ácido 4,5-cafeoilquínico	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Ácido cafeico	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
	Ácido cinâmico	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Ácido elágico	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. hatschbachii</i>	Galhos	GATTO et al., 2020b
	Ácido gálico	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SOUZA et al., 2006
		<i>M. hatschbachii</i>	Folhas	GATTO, 2018
		<i>M. splendens</i> ²	Folhas	GULDBRANDSEN et al., 2014
	Ácido gincólico	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
	Ácido protocatecuico	<i>M. guianensis</i>	Folhas	SOUZA et al., 2006
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Ácido quínico	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018
<i>M. fallax</i> ²		Folhas	SANTOS et al., 2018	
<i>M. guianensis</i>		Folhas	SANTOS et al., 2018	
<i>M. rubella</i>		Folhas	LIMA et al., 2018	
Galato de etila derivado	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continuação)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Alcaloide	Éster nicotínico mirciaine	<i>M. blanchetiana</i>	Folhas e galhos	CERQUEIRA et al., 2013
Chalcona	2',3',4'-tri-hidróxi-5'-metil-6'-metoxichalcona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	2',4'-di-hidroxi-3', 5'-dimetil-4,6'-dimetoxichalcona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	2',6'-di-hidroxi-3',5'-dimetil-4'-metoxichalcona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
Flavonoide	(+)-catequina	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	1-desmantina	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	2,7-di-hidroxi-6,8-dimetil-5-metoxiflavanona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	5-hidroxi-6,8-dimetil-7-metoxiflavanona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	5,4'-di-hidroxi-6,8-dimetil-7,3'-dimetoxiflavona	<i>M. guianensis</i>	-	FEHLBERG, 2006
	6,8-dimetil-5,7-dimetoxiflavanona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	7-hidroxi-6,8-dimetil-5-metoxi-isoflavona	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Astragalin	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Avicularina	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	IMATOMI et al., 2013; SA et al., 2017
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Eucaliptina	<i>M. citrifolia</i>	Folhas	GOTTLIEB et al., 1972
	Guaijaverina	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
		<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Isorhamnetina-3-O-glicosídeo	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
	Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
	Isorquercitrina	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Isoquercitrina-6"-galato	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Juglanina	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	IMATOMI et al., 2013; SA et al., 2017
	Kaempferol	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
	Kaempferol-3-ramnosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Kaempferol 3-O-rutinosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
Kaempferol-3-O-desoxihexósido	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continuação)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Flavonoide	Kaempferol-3-O-hexósido	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
	Kaempferol-3-O-(6"-galoil)- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Kaempferol-3-O- α -L-ramnosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Kaempferol-3-O- β -D-galactopiranosídeo	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Kaempferol-3-O- β -D-glicoronídeo -6"-metilester	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Miricetina	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
		<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. splendens</i> ²	Folhas	GULDBRANDSEN et al., 2014
	Miricetina-3-O-arabinofuranosídeo	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Miricetina-3-O-ramnosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
	Miricetina-3-O-(6"-[3,4-dihidroxibenzoil])- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Miricetina-3-O-(6"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo	<i>M. splendens</i> ²	Folhas	GULDBRANDSEN et al., 2014
	Miricetina-(6"-galoil)-3-O- β -D-galactopiranosídeo	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Miricetina-3-O- α -arabinofuranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
	Miricetina-3-O- β -xilopiranosídeo	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Miricetina-3-O- β -glicosídeo	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
		<i>M. splendens</i> ²	Folhas	GULDBRANDSEN et al., 2014
Miricetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018	
Miricetina-3-O-(O-galoil)-arabinosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018	
	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018	
Miricetina-3-O-(O-galoil)-hexosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continuação)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Flavonoide	Miricetina galoil galactosídeo	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Miricetina galoil ramnopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Miricetina ramnopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Miricitrina	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
		<i>M. palustris</i>	Folhas galhos ^e	MORESCO et al., 2014
		<i>M. splendens</i> ²	Folhas galhos ^e	GULDBRANDSEN et al., 2014; MORESCO et al., 2014
	Mearnsitrina	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
		<i>M. uniflora</i>	-	FERREIRA et al., 2006
	Myrciacitrina I	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
	Myrciacitrina II	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998
	Myrciacitrina III	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	MATSUDA et al., 2002
	Myrciacitrina IV	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	MATSUDA et al., 2002
	Myrciacitrina V	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	MATSUDA et al., 2002
	Quercetina	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
		<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-(2''-(E)-sinapoyl)-O-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-galactosídeo	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
		<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016
<i>M. sphaerocarpa</i> ¹		Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
Quercetina-3-O-galoil deoxipentose	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018	
Quercetina-3-O-glicosídeo	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
	<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
	<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
Quercetina-3-O-ramnosídeo	<i>M. salicifolia</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
	<i>M. speciosa</i>	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	
	<i>M. sphaerocarpa</i> ¹	Folhas	GONZÁLEZ et al., 2016	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continuação)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Flavonoide	Quercetina-3-O-(6"-galoil)- β -galactopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-(6"- (E)-feruloil)- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-(6"-malonil)-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-(6"- (trans-p-cumaroil))- β -D-galactopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-(6"- (trans-p-cumaroil))- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
		<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O-(α -L-ramnopiranosil-(1-6))- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O- β -dxilofuranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
	Quercetina-3-O- β -ramnosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O- β -D-glicoronídeo	<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
<i>M. palustris</i>		Folhas	WUBSHET et al., 2015	
Quercetina-3-O-(O-galoil)-pentosídeo	<i>M. bella</i>	Folhas	SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018	
	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018	
Quercitrina	<i>M. multiflora</i> ¹	Folhas	YOSHIKAWA et al., 1998	
	<i>M. splendens</i> ²	Folhas	GULDBRANDSEN et al., 2014	
Hidrocarbeto	n-pentacosano	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
	n-tetracosano	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
Taninos	Ácido 4-O-(2",3"-O-diacetil- α -L-ramnopiranosil) - elágico	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Ácido 4-O-(2",3",4"-O-triacetil- α -L-ramnopiranosil) - elágico	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(continuação)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Taninos	Ácido 4-O-(2",4"-O-diacetil- α -L-ramnopiranosil) elágico	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Ácido 4-O-(3",4"-O-diacetil- α -L-ramnopiranosil) - elágico	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Ácido 4-O-(4"-O-acetil- α -L-ramnopiranosil) - elágico	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
	Casuarinina	<i>M. palustris</i>	Folhas	WUBSHET et al., 2015
Terpenos e Esteroides	2 α , 3 β , 21 α -Trihidroxi-28,20 β -hidroxitaraxastanolídeo	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	α -bisabolol	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
	α -cadinol	<i>M. tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
	α -tocoferol	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	β -amirina	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Acetato de geranilgeranil	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Ácido arjunólico	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
		<i>M. rubella</i>	Folhas	LIMA et al., 2018
	Ácido betulínico	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
		<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Ácido betulônico	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Ácido monogaloilquinico	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Ácido oleanólico	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Ácido ursólico	<i>M. guianensis</i>	-	FEHLBERG, 2006
		<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Betulinaldeído	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Betulona	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Casuarinina	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Esqualeno	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Estigmasterol	<i>M. myrtillifolia</i>	Folhas	SILVA, 2012
		<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Eucalbanina A	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Daucosterol	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Digaloil glicose	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. guianensis</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Eudesm-4-(15)-en-7 α ,11-diol	<i>M. hiemalis</i>	Folhas	SILVA, 2012
	Friedelina	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Hexahidroxidifênico glicose	<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
	Lupeol	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Lupenona	<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002
	Monogaloil glicose	<i>M. bella</i>	Folhas	SANTOS et al., 2018
		<i>M. fallax</i> ²	Folhas	SANTOS et al., 2018
<i>M. guianensis</i>		Folhas	SANTOS et al., 2018	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Myrcia*

(conclusão)

METABÓLITO	COMPOSTO QUÍMICO	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	REFERÊNCIA
Terpenos e Esteroides	Óxido de α -bisabolol	<i>M.tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
	Sitosterol	<i>M.tomentosa</i>	Folhas	SA et al., 2017
		<i>M. rotundifolia</i>	Galhos	CERQUEIRA, 2002

FONTE: O autor (2020).

NOTA: ¹ *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. = *Myrcia sphaerocarpa* DC.² *Myrcia splendens* (Sw.) DC. = *Myrcia rostrata* DC. = *Myrcia fallax* (Rich.)

2.3 ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand

A espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand é uma árvore (FIGURA 1), nativa e endêmica do Brasil, presente nos estados da região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). A espécie possui domínio fitogeográfico na Floresta Atlântica, é conhecida popularmente como Caingá e não apresenta sinônimos descritos na literatura (BFG, 2018). As inflorescências ocorrem em dezembro, já os frutos, globosos e vermelhos, em fevereiro (SOBRAL, 2003).

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE *Myrcia hatschbachii* LOCALIZADO NO JARDIM BOTÂNICO DE CURITIBA

FONTE: O autor (2020).

2.3.1 Resultados preliminares da espécie

Os resultados preliminares (GATTO, 2018) obtidos na pesquisa de *Myrcia hatschbachii* estão descritos resumidamente.

No estudo morfoanatômico, folhas e galhos frescos da espécie foram coletados, fixados em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 70% 0,5:0,5:9,0) e estocados em etanol 70% até o preparo das lâminas utilizadas para as análises de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As principais características morfoanatômicas observadas nas folhas foram: paredes anticliniais das células epidérmicas delgadas e sinuosas na face abaxial e delgadas e ondedas na face adaxial; presença de estômatos paracíticos, drusas de oxalato de cálcio, tricomas tectores unicelulares, compostos fenólicos e amido; mesofilo dorsiventral e nervura central com formato côncavo-convexo. O pecíolo apresentou formato côncavo-convexo e o caule mostrou formato ovalado. Em ambos, também notou-se a presença de tricomas tectores, cavidades secretoras, drusas de oxalato de cálcio e compostos fenólicos.

O método de screening fitoquímico foi realizado com o objetivo de avaliar o grupo de metabólitos secundários e substâncias majoritárias da espécie. Para elaboração destes testes colorimétricos ou de precipitação, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003). A partir do material vegetal seco, foram obtidos os extratos hidroalcolico e aquoso, tanto para folhas quanto para galhos. Nos extratos hidroalcolicos, notou-se a presença de leucoantocianidinas, cumarinas e esteroides/triterpenos. Já nos aquosos, ocorreram reações positivas para taninos, ácidos fixos e amino grupos.

O óleo essencial das folhas de *Myrcia hatschbachii* foi extraído por hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger modificado por Wasicky (1963), baseando-se na técnica descrita na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). O rendimento obtido foi de 0,17%. A caracterização dos componentes foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e mostrou a presença de 40 compostos, sendo 34 identificados (91,06%), com predominância de sesquiterpenos. Os compostos majoritários foram trans-calameneno (19,10%), E-cariofileno (10,96%) e espatulenol (5,03%).

Os extratos brutos foram obtidos através do aparelho Soxhlet modificado por Carvalho et al. (2009), utilizando etanol 96°GL como solvente extrator. Para o extrato

a partir das folhas, o rendimento encontrado foi de 12,79% e o extrato a partir de galhos foi de 2,69%. A partição líquido-líquido das frações também foi realizada em Soxhlet, após o preparo dos extratos brutos. Os solventes utilizados para a obtenção das frações foram de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Os rendimentos estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E GALHOS DE *Myrcia hatschbachii* OBTIDAS A PARTIR DA COLETA 2016

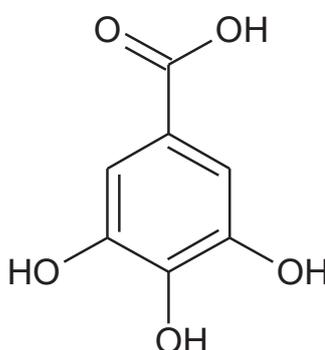
FRAÇÃO	RENDIMENTO (%)	
	FOLHAS	GALHOS
Hexano	4,57	0,84
Clorofórmio	2,23	0,80
Acetato de etila	0,93	0,39
Hidroalcóolica remanescente	5,31	1,05

FONTE: GATTO (2018).

A investigação fitoquímica da fração acetato de etila de folhas foi realizada por uma purificação em coluna e resultou no isolamento de um polifenol, no solvente de eluição hexano:acetato de etila (35:65), identificado como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico) (FIGURA 2).

A identificação do cristal isolado foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), difratometria de raios X de monocristal, ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO ISOLADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS



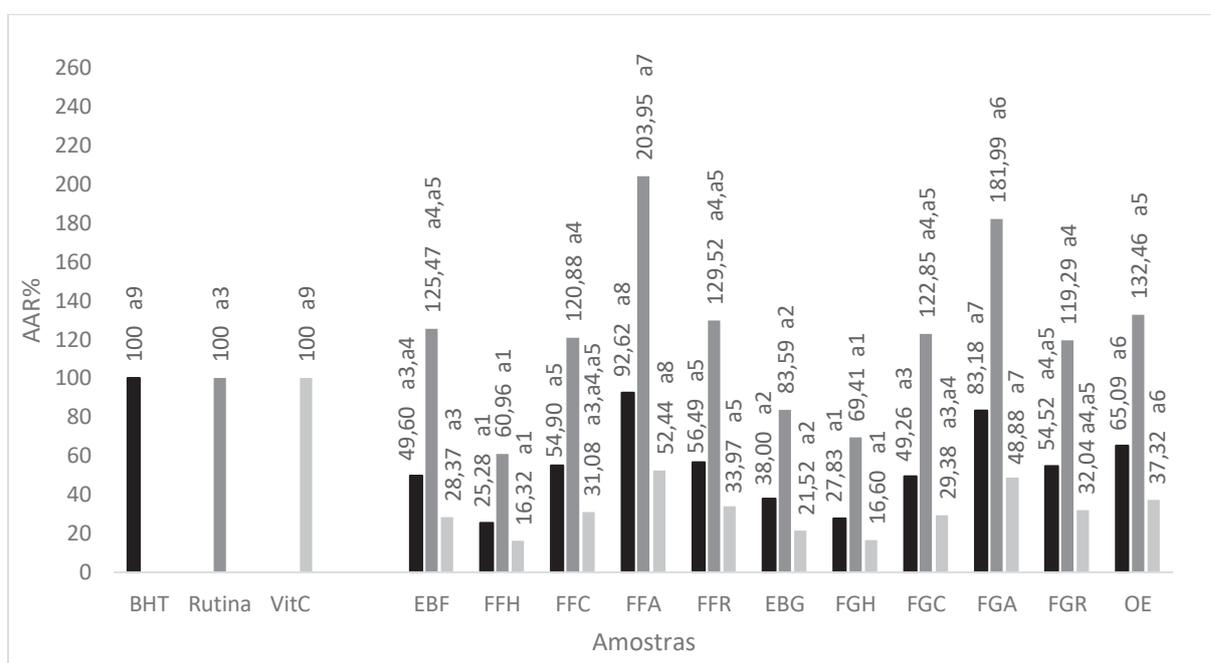
FONTE: GATTO (2018).

A propriedade antioxidante foi avaliada por dois métodos. Em ambos, foram testados extratos brutos, frações e óleo essencial e como controles positivos BHT

(hidroxitolueno butilado), rutina e ácido ascórbico. As análises estatísticas foram feitas por Anova e Tukey.

A avaliação pela formação de complexo fosfomolibdênio foi baseado na técnica descrita por Prieto et al. (1999), e é fundamentada na capacidade da amostra antioxidante em reduzir o molibdênio (VI) a molibdênio (V), permitindo a avaliação de compostos lipofílicos e hidrofílicos. Os resultados obtidos estão apresentados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EXPRESSO EM PORCENTAGEM



FONTE: GATTO (2018).

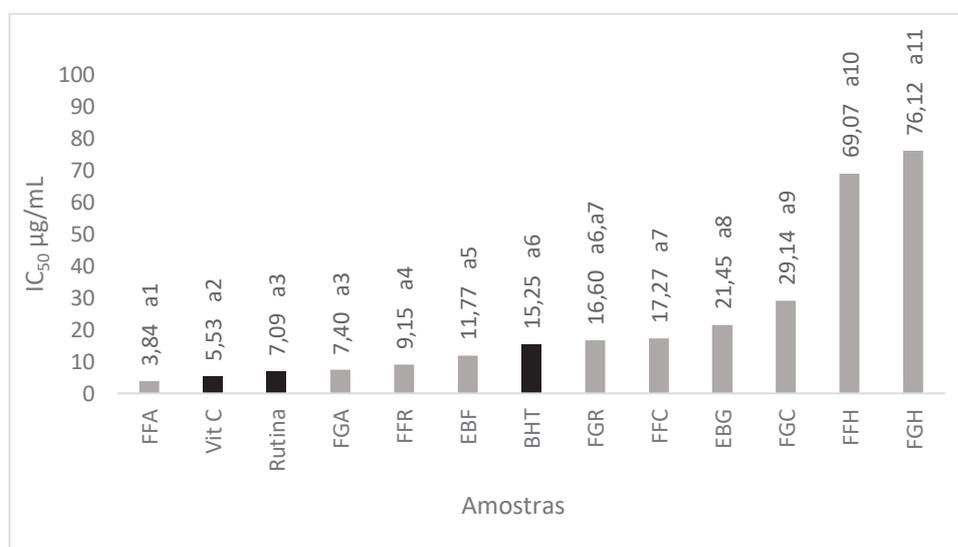
NOTA 1: Ácido ascórbico/Vitamina C (Vit C), Atividade Antioxidante Relativa (AAR%), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

Como observado no GRÁFICO 1 todas as amostras demonstraram propriedade antioxidante, especialmente as frações acetato de etila. Os resultados mais significativos foram frente à rutina, sendo que, exceto pelo extrato bruto de galhos e frações hexano de folhas e galhos, as demais amostras apresentaram resultados de atividade superiores a 100%.

A propriedade antioxidante também foi testada pela redução do radical DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, a qual é uma técnica fundamentada na quantificação da capacidade da amostra em reduzir radicais livres. O método de referência foi baseado em Mensor et al. (2001). Os resultados (GRÁFICO 2) foram expressos em IC₅₀ (concentração necessária para exercer 50% de atividade antioxidante), calculados por regressão linear.

GRÁFICO 2 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH EXPRESSO EM IC₅₀



FONTE: GATTO (2018).

NOTA 1: Ácido ascórbico/Vitamina C (Vit C), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

A fração acetato de etila de folhas foi a que apresentou menor resultado de IC₅₀ (3,84 µg/mL), ou seja, em uma baixa concentração a fração foi capaz de reduzir 50% do radical DPPH do meio reacional. Este resultado foi inferior aos obtidos pelos três padrões, evidenciando sua significativa propriedade.

A atividade alelopática investigou a capacidade da espécie em influenciar a germinação e crescimento de *Lactuca sativa*. O método de referência foi baseado em Macias et al. (2000) para extratos brutos e frações e Silva et al. (2014) para o óleo essencial. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Scott Knott.

Na germinação, a fração clorofórmio de galhos na concentração de 1000 µg/mL foi a que mais se distanciou estatisticamente dos controles água e metanol,

inibindo a germinação de *Lactuca sativa*. Já a fração hexano de galhos 500 µg/mL foi a que mais influenciou negativamente o índice de velocidade de germinação (IVG). No óleo essencial, as concentrações de amostras testadas não apresentaram diferença estatística comparadas aos controles água e polisorbato 1% em água. Já em relação ao IVG, apenas a amostra na concentração de 1% foi capaz de interferir negativamente na velocidade de germinação.

Ao avaliar o crescimento, o extrato bruto de galhos, frações: hexano e clorofórmio de folhas, hexano de galhos, e óleo essencial inibiram o hipocótilo de *Lactuca sativa*, em todas as concentrações testadas, assim como os extratos brutos e frações clorofórmio, tanto de folhas quanto de galhos, inibiram o crescimento da radícula.

A toxicidade *in vitro* foi testada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, segundo método baseado em Meyer et al. (1982). Foram testados extratos brutos, frações e óleo essencial, como controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina e a análise estatística foi feita por Probitos. Apenas o óleo essencial apresentou toxicidade, com concentração letal capaz de matar 50% dos microcrustáceos (CL₅₀) de 409,92 µg/mL. Segundo a classificação de Amarante et al. (2011), o óleo foi considerado moderadamente tóxico.

2.4 COMPOSTOS ISOLADOS DE *Myrcia hatschbachii*

Os compostos fenólicos, ácido elágico e ácido 3-O-metil elágico, foram identificados no presente estudo (4.4) da espécie *Myrcia hatschbachii* e apresentam propriedades biológicas conhecidas na literatura.

2.4.1 Ácido elágico

O ácido elágico (AE) é um composto polifenólico, derivado do ácido tânico e encontrado naturalmente em nozes, frutas (romãs, uvas) e vegetais. É um componente de moléculas poliméricas chamadas de elagitaninos (BUSTO et al., 2018). Como todos os polifenóis, AE é um antioxidante com muitos efeitos celulares, incluindo a inibição da proliferação de células cancerígenas (BOEHNING et al., 2018; GUPTA et al., 2019). Além disso, propriedades biológicas foram relatadas em modelos

experimentais, como atividades anti-inflamatória (ROSILLO et al., 2011; FIKRY et al., 2019) e antimicrobiana (NOUNDOU et al., 2018).

Apesar de apresentar tais propriedades, o composto possui solubilidade baixa em meio aquoso, o que limita sua absorção na administração oral e, portanto, suas aplicações clínicas. A caracterização farmacocinética do ácido elágico mostra baixa concentração sanguínea, tempo de meia vida curto, rápida absorção no trato intestinal e rápida eliminação após administração oral (RANADE et al., 2015). Uma maneira de melhorar sua solubilidade em água é reduzir o tamanho das partículas para aumentar sua biodisponibilidade e atividade biológica e alguns estudos vem sendo realizados neste sentido (MONTES et al., 2016; ZHENG et al., 2019).

A estrutura molecular do AE é composta por quatro anéis fundidos com quatro grupos hidroxila e dois anéis de lactona representando a parte hidrofílica (FIGURA 6B), sendo assim uma forma dimérica do ácido gálico. A atividade antioxidante desses compostos está relacionada à sua estrutura molecular, particularmente à presença e ao número de grupos hidroxila, aos efeitos de conjugação, ressonância e também à capacidade de melhorar a estabilidade de seus radicais fenoxila (DÁVALOS et al., 2019).

Os vários efeitos biológicos e protetores do AE resultam de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O AE elimina diretamente as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, radicais peroxila e peroxinitrito. O AE também evita o estresse oxidativo, ativando os sistemas de enzimas antioxidantes celulares e é capaz de formar um complexo com íons ferro, o que contribui para a redução da formação de radicais livres (MEHRZADI et al., 2018).

Visto isso, estudos epidemiológicos e experimentais apoiam um papel benéfico dos polifenóis na dieta em várias doenças gastrointestinais, incluindo a doença inflamatória intestinal. Os polifenóis poderiam contribuir como abordagens complementares às estratégias terapêuticas convencionais já existentes (anti-inflamatórios não esteroidais) (ROSILLO et al., 2011).

Além disto, a suplementação destes agentes pode ser útil para a prevenção ou atenuação da cardiomiopatia diabética. Os resultados encontrados por Chao et al. (2009) sustentam que os ácidos elágico e cafeico forneceram proteção anticoagulatória, antioxidativa e anti-inflamatória no tecido cardíaco de camundongos diabéticos.

Um estudo investigou o papel protetor do ácido elágico, como antioxidante natural, contra a toxicidade testicular provocada pelo arsênico, um indutor do estresse oxidativo e uma das principais causas da infertilidade masculina. Verificou-se que o tratamento com AE em ratos reduziu o acúmulo de arsênico testicular e os parâmetros de estresse oxidativo. Além disso, o AE aumentou o nível sérico de testosterona, marcadores antioxidantes testiculares e parâmetros histológicos. Assim, este composto pode surgir como uma opção terapêutica promissora através da redução do estresse oxidativo e das respostas inflamatórias (MEHRZADI et al., 2018).

Em relação aos efeitos antiproliferativos e apoptóticos em células cancerígenas, o ácido elágico causa despolarização mitocondrial nos cânceres de pâncreas, células B, neuroblastoma e bexiga pela ativação de vias apoptóticas. Na leucemia linfocítica crônica das células B, tem efeitos diretos nas mitocôndrias, resultando na liberação de fatores pró-apoptóticos. Há também evidências de que o AE pode afetar a produção de ATP celular e inibir o fluxo glicolítico nas células cancerígenas do endométrio. No linfoma de células T, o AE pode inibir a atividade da lactato desidrogenase para diminuir a glicólise (BOEHNING et al., 2018).

O ácido elágico também apresenta aplicações na área cosmética. Em um estudo foi observado uma diminuição no nível de melanina em pacientes com melasma tratados com AE sintético e em pacientes que usaram extrato vegetal contendo este composto. A diferença entre os níveis pré e pós-tratamento de melanina foi estatisticamente significativa e mostra que, embora o ácido elágico não seja utilizado comercialmente nesta condição dermatológica, ele também pode ser considerado como uma alternativa eficaz (ERTAM et al., 2008).

2.4.2 Estudo comparativo entre os ácidos elágico e 3-O-metil elágico

Um único estudo foi encontrado na literatura relatando propriedades biológicas do ácido 3-O-metil elágico. Neste estudo, o composto foi isolado a partir do extrato metanólico de galhos de *Alchornea laxiflora* (Euphorbiaceae) e testado frente as atividades anti-HIV, citotóxica e antibacteriana. O ácido elágico também foi obtido nesta espécie e testado de forma semelhante (NOUNDOU et al., 2018).

Nos resultados encontrados por Noundou et al. (2018), a citotoxicidade foi testada frente a células Hela (adenocarcinoma cervical humano), e ambos os compostos não apresentaram toxicidade devido às baixas inibições observadas.

A propriedade anti-HIV foi avaliada na integrase do subtipo C. O ácido 3-O-metil elágico inibiu a atividade de integrase anti-HIV-1 com valor de IC₅₀ superior a 100 µM (concentração da amostra que inibe 50% da atividade de enzimas integrase). Já o ácido elágico apresentou melhor atividade de inibição com valor de IC₅₀ de 90,23 µM, sugerindo que ele possa ser um agente potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o HIV-1.

A atividade antibacteriana foi testada frente as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305) e bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 23246) e *Proteus mirabilis* (ATCC 43071). Os resultados mostraram atividade contra todos os micro-organismos testados e os valores obtidos de concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EXERCIDA PELOS ÁCIDOS ELÁGICO E 3-O-METIL ELÁGICO EXPRESSA EM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

PATÓGENO	MICRO-ORGANISMO	Ácido elágico CIM (µg/mL)	Ácido 3-O-metil elágico CIM (µg/mL)
Gastrointestinal	<i>B. cereus</i>	125	125
	<i>E. faecalis</i>	63	63
	<i>E. coli</i>	63	63
Cutânea	<i>S. aureus</i>	125	125
Respiratório	<i>K. pneumoniae</i>	16	31
	<i>M. catarrhalis</i>	125	250
Urinário	<i>P. mirabilis</i>	125	250
	<i>S. saprophyticus</i>	31	16

FONTE: NOUNDOU et al., 2018.

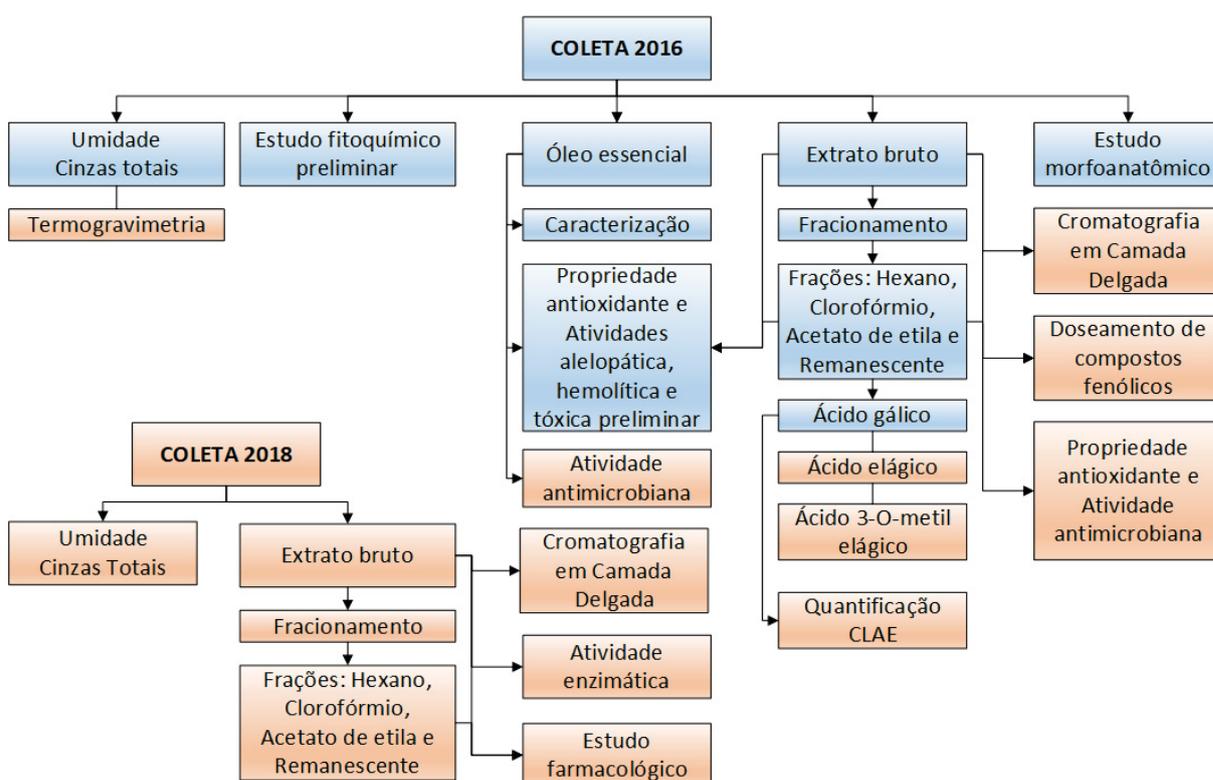
NOTA: Concentração inibitória mínima (CIM).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos brutos, frações e óleo essencial, provenientes da coleta realizada em 2016 (GATTO, 2018) armazenados em frascos de vidro, protegidos de calor, luz e umidade, foram utilizados para a continuidade da pesquisa. Uma nova coleta foi realizada em 2018, obtendo-se extratos brutos e frações.

As etapas de trabalho mostrando os testes realizados nos extratos/frações/óleo essencial, assim como o ano das coletas de obtenção dessas amostras vegetais podem ser visualizadas no fluxograma da FIGURA 3.

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DE PESQUISA DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Atividades desenvolvidas no mestrado (GATTO, 2018): preenchimento azul.
Atividades desenvolvidas no doutorado: preenchimento vermelho.

Assim, no presente estudo foram utilizadas amostras de ambas as coletas. A partir do material vegetal coletado em **2016**, foram feitas a análise termogravimétrica de folhas e galhos; a atividade antimicrobiana do óleo essencial; a identificação de ácido elágico e ácido 3-O-metil elágico nas frações acetato de etila e clorofórmio; a quantificação de ácido gálico na fração acetato de etila; e o screening

fitoquímico, doseamento de compostos fenólicos, avaliação da propriedade antioxidante e a atividade antimicrobiana nos extratos e frações.

A partir do material vegetal coletado em **2018**, foram feitas as análises gravimétricas nas folhas e galhos; a obtenção dos extratos brutos e frações; o screening fitoquímico, a atividade enzimática e o estudo farmacológico de extratos e frações.

Além disso, alguns testes, como o screening fitoquímico e avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana, foram realizados com os compostos identificados: o ácido gálico utilizado foi o comercial (lote DCBC0894, pureza mínimo 98%), já a amostra FGC2016ppt foi proveniente de uma precipitação da fração clorofórmio (3.5.2).

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado a partir de indivíduos dispersos pelo Capão do Cifloma, localizado no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba (coordenadas geográficas 25°26'52"S e 49°14'25"W). A coleta ocorreu no mesmo local e período (entre os meses de abril e maio) que a realizada em 2016.

A espécie foi anteriormente identificada por comparação (GATTO, 2018) com o exemplar de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand tombado no Herbário Museu Botânico Municipal, sob o número 72379. Esta determinação taxonômica foi realizada pelo curador José Tadeu Weidlich Motta (ANEXO 1).

O uso da espécie pesquisada possui autorização de acesso ao patrimônio genético através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais”, processo de nº 02001.001165/2013-47, concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número AEE0D2F.

O material vegetal fresco coletado continha aproximadamente 4,88 kg de folhas e 2,73 kg de galhos. Este material foi seco em local com sombra e circulação de ar, sob temperatura ambiente, por um período de 26 dias.

A fragmentação do material seco foi realizada por moinho de facas e martelos resultando em 2439,7 g de folhas e 1485,2 g de galhos. Estas quantidades foram

utilizadas na realização das análises físico-químicas (métodos gravimétricos) e obtenção dos extratos brutos.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.2.1 Métodos gravimétricos

3.2.1.1 Umidade

O método para determinação de umidade foi realizado conforme a Farmacopeia Brasileira VI (BRASIL, 2019) e objetiva a quantificação de substância volátil eliminada.

Cerca de 3 g de material vegetal seco (P3) foram adicionados em cadinhos previamente dessecados. Os cadinhos contendo as amostras foram pesados (P2) e levados a estufa por 2 horas em temperatura de 100°C. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados (P1) até observação de peso constante. A análise foi realizada em sextuplicata e o cálculo da porcentagem de umidade foi realizado através da fórmula (1):

$$(1) \% \text{ de umidade} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

3.2.1.2 Cinzas Totais

O método para determinação de cinzas totais foi realizado conforme a Farmacopeia Brasileira VI (BRASIL, 2019) e objetiva a quantificação de substância inorgânica não volátil.

Cerca de 3 g de material vegetal seco (P3) foram adicionados em cadinhos previamente dessecados e pesados (P1). Os cadinhos foram levados à mufla por 6 horas, com aumento gradativo de temperatura até $600 \pm 25^\circ\text{C}$, para a incineração. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos contendo as cinzas foram novamente pesados (P2). A análise foi realizada em sextuplicata e o cálculo da porcentagem de cinzas totais foi realizado através da fórmula (2):

$$(2) \% \text{ de cinzas totais} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

3.2.2 Método termogravimétrico

O objetivo desse estudo foi avaliar a degradação térmica de folhas e galhos por meio das análises termogravimétricas (TG), estabelecendo suas relações com a degradação vegetal. As curvas de TG foram obtidas a partir de 10 mg de amostras de folhas e galhos secos, aquecidas a uma taxa constante de 10°C/min, sendo obtidas no intervalo de temperatura entre 20 e 550°C, sob fluxo de argônio (50 mL/min), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Whaltam, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando Índio (In; PF: 156,6°C; ΔH fusão: 28,54 J/g) como padrão. O estudo foi realizado utilizando o programa Origin 9.0 e conduzido na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

3.3.1 Extrato bruto

Os extratos brutos foram extraídos utilizando Soxhlet, modificado por Carvalho et al. (2009). Este equipamento possui patente de modelo industrial no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o nº 0601703-7 A2.

A extração por Soxhlet apresenta melhor rendimento e rapidez comparada a outros processos e é considerada termoestável para o isolamento de substâncias químicas, utilizados para fins analíticos e farmacotécnicos (CARVALHO et al., 2009).

A extração das folhas ocorreu em duas etapas, com pesagens de 1364,8 g na primeira e 1036,2 g na segunda, totalizando 2401 g de planta seca extraída. Em cada etapa, o material vegetal juntamente com 7 litros de solvente extrator etanol 96°GL, foram colocados no Soxhlet, o qual estava acoplado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato. Este sistema foi colocado sobre uma manta de aquecimento e deixado em refluxo por aproximadamente 8 períodos de 8 horas.

A extração dos galhos ocorreu em uma etapa única. O material vegetal, cerca de 1449 g, juntamente com 7 litros de solvente extrator etanol 96°GL, foram colocados no Soxhlet, o qual estava acoplado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato. Este sistema foi colocado sobre uma manta de aquecimento e deixado em refluxo por aproximadamente 7 períodos de 5 horas.

Os extratos etanólicos obtidos foram utilizados para as análises de teor de sólidos, fracionamento e atividades biológicas.

3.3.2 Teor de sólidos

Esta análise quantifica os sólidos presentes nos extratos brutos. Após dessecação, placas de Petri foram pesadas anteriormente à adição de 10 mL de extrato bruto. As placas foram levadas a estufa a 100°C até a observação de peso constante, baseado na total eliminação da fase líquida. A diferença entre o peso da placa contendo o resíduo sólido e a placa vazia forneceu o teor de sólidos em 10 mL do extrato (BRASIL, 2019). A análise foi realizada em triplicata.

Com os dados de teor de sólidos, foi possível calcular o rendimento dos extratos brutos em relação a planta seca (3):

$$(3) \text{ Rendimento extrato bruto (\%)} = [(\text{Volume EB} \times \text{Teor de sólidos \%}) / \text{Planta seca}]$$

Onde:

Volume EB = Volume (mL) de extrato bruto obtido após extração em Soxhlet.

Planta seca = Quantidade (g) de planta seca utilizada no preparo do extrato bruto.

3.3.3 Fracionamento

A partir do preparo dos extratos brutos foram retiradas alíquotas para o teor de sólidos e atividades biológicas, e o restante foi destinado ao fracionamento.

Os extratos brutos de folhas e galhos foram concentrados e adicionados no Soxhlet modificado (INPI nº 0601703-7 A2) para a partição líquido-líquido, a qual auxilia no isolamento e identificação de metabólitos que possuem afinidades diferentes dependendo da polaridade dos solventes.

O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato. Utilizaram-se solventes de polaridade crescente, iniciando pelo hexano (característica apolar). Este sistema foi levado à refluxo para adequada extração. Após o término, o mesmo processo foi repetido com clorofórmio e em seguida, com acetato de etila. O extrato remanescente ao fracionamento foi guardado e também

utilizado nos testes biológicos. O rendimento das frações foi calculado conforme fórmula (4):

$$(4) \text{ Rendimento fração (\%)} = [\text{Fração seca} / \text{Planta seca}] \times 100$$

Onde:

Fração seca: Quantidade (g) de fração obtida após extração no Soxhlet e concentração em banho-maria (evaporação total do solvente).

Planta seca: Quantidade (g) de planta coletada e seca destinada ao fracionamento.

Com isto, totalizaram-se dez amostras para utilização nos ensaios biológicos provenientes desta coleta. Para cada material vegetal (folhas e galhos), obteve-se um extrato bruto etanólico e quatro frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente).

3.4 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com o objetivo de identificar as principais classes de metabólitos na espécie, avaliados nos extratos brutos, frações e compostos isolados.

As amostras foram preparadas em metanol e aplicadas em placa de sílica UV254 (marca Whatman®). As fases móveis e reveladores utilizados para cada classe de composto podem ser visualizada no QUADRO 3.

QUADRO 3 – SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

METABÓLITO	FASE MÓVEL	REVELADOR	RESULTADO	MÉTODO
Esteroides/ Triterpenos	Tolueno:Acetato de etila (93:7)	Vanilina Sulfúrica 1%	Presença de banda azul- violácea e/ou verde. Presença de banda marrom escura (polifenóis).	WAGNER, 1996
Flavonoides	Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial:Água (100:11:11:26)	Reativo de NEU	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente e/ou castanha. (luz UV – 254 nm)	WAGNER, 1996
Taninos/ Polifenóis	Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial:Água (100:11:11:26)	Cloreto férrico 5% em etanol	Presença de banda azul (taninos hidrolisáveis) e/ou verde escura (taninos condensados). Presença de banda castanha escura a preta (polifenóis).	WAGNER, 1996
Alcaloides	Clorofórmio: Metanol (95:5) Saturação com amônia	Dragendorff	Presença de banda de coloração tijolo.	VALENTE et.al, 2006
Cumarinas	Tolueno:Acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm) que se intensifica com a adição de Hidróxido de sódio	MIGUEL, 2003

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Reativo de NEU- Difenilboriloxietilamina a 1% em metanol; Dragendorff- tetraiodeto bismuto de potássio.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

3.5.1 Amostra: FGA2016ppt

Após a extração da fração acetato de etila de galhos, esta foi concentrada e seca em banho-maria. Neste momento, houve uma precipitação na parte superior do frasco, a qual foi recolhida e pesada, totalizando 1,019 g e inicialmente chamada de FGA2016ppt. O precipitado foi monitorado por CCD utilizando reações colorimétricas conforme screening (QUADRO 3) e identificado por RMN.

3.5.2 Amostra: FGC2016ppt

Na extração da fração clorofórmio de galhos, observou-se a presença de uma precipitação na parte inferior do balão de fundo redondo. Assim, retirou-se uma alíquota da fração líquida para a centrifugação. O precipitado (0,2354 g), inicialmente chamado de FGC2016ppt, foi purificado com metanol (solvente insolúvel) e monitorado por CCD utilizando reações colorimétricas conforme screening (QUADRO 3). Posteriormente, foi parcialmente identificado por RMN.

3.5.3 Amostra: FFA2016F11-144ppt

Foi realizado uma coluna da fração acetato de etila de folhas a partir de 3,6 g da fração solubilizada em metanol e incorporada em sílica-gel 60 para a formação de uma pastilha. Por esta pastilha, ocorreu a eluição da amostra através da passagem de solventes com ordem de polaridade crescente, com aumento gradativo da porcentagem em 5%, iniciando em hexano:acetato de etila (50:50), passando por acetato de etila (100), acetato de etila:metanol (95:5), até acetato de etila:metanol (50:50). Os solventes foram recolhidos em frascos de 10 mL.

Após a evaporação das fases móveis, CCDs (screening para flavonoide do QUADRO 3) foram realizadas para a reunião dos frascos da coluna que apresentaram bandas com características semelhantes. Dentre estes, reuniu-se os frascos de 11 a 114 [fase móvel de eluição hexano:acetato de etila (35:65) à acetato de etila:metanol (85:15)].

Ao reunir estes frascos com metanol, houve a precipitação de um pó amarelo, o qual foi decantado, recolhido e seco, totalizando 52 mg. O precipitado, inicialmente chamado de FFA2016F11-144ppt, foi monitorado por CCD e identificado por RMN.

3.5.4 Amostra: FGA2016F109-135ppt

Foi realizado uma coluna da fração acetato de etila de galhos a partir de 3,2 g da fração solubilizada em metanol e incorporada em sílica-gel 60 para a formação de uma pastilha. Por esta pastilha, ocorreu a eluição da amostra através da passagem de solventes com ordem de polaridade crescente, com aumento gradativo da porcentagem em 5%, iniciando em hexano:acetato de etila (50:50), passando por

acetato de etila (100), acetato de etila:metanol (95:5), metanol (100), metanol:água (95:5) até metanol:água (50:50). Os solventes foram recolhidos em frascos de 10 mL.

Após a evaporação das fases móveis, CCDs (screening para flavonoide do QUADRO 3) foram realizadas para a reunião dos frascos da coluna que apresentaram bandas com características semelhantes. Dentre estes, reuniu-se os frascos de 109 a 135 [fase móvel acetato de etila (100) à acetato de etila:metanol (85:15)].

Ao reunir estes frascos com metanol, houve a precipitação de um pó branco, o qual foi centrifugado, recolhido e seco, totalizando 50 mg. O precipitado, inicialmente chamado de FGA2016F109-135ppt, foi monitorado por CCD e identificado por RMN.

3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas no Centro de RMN da UFPR.

As amostras obtidas a partir de *Myrcia hatschbachii*, foram submetidas a análises espectrométricas para a determinação estrutural dos compostos. Os espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, e experimentos bidimensionais de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC e correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC, foram adquiridos a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) em dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) contendo 0,1% (v/v) de TMS (tetrametilsilano) em espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III 400, operado a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C nas frequências de 400,1 e 100,6 MHz, respectivamente. O equipamento foi equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta (X-núcleo e ^1H) de 5 mm e com gradiente de campo no eixo z.

Os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do TMS, como referência interna, em 0,00 ppm. Os dados obtidos foram comparados com os dados de literatura.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, a quantificação do ácido gálico (GATTO, 2018) foi avaliada na fração acetato de etila de folhas, da qual foi obtido este composto. Para esta análise, foi preparada uma curva de sete concentrações de ácido gálico, em metanol, e uma concentração da amostra correspondendo ao ponto médio da curva de calibração do padrão.

A análise cromatográfica foi baseada no método de compostos fenólicos desenvolvido e validado por Carvalho (2008), com pequenos ajustes. Foram utilizados cromatógrafo modelo SYS-LC-240-E, marca Varian, e uma coluna analítica Zorbax Eclipse® C18 (4,6 mm x 250 mm, partícula 5 µm). A injeção das amostras foi feita manualmente no volume de 20 µL, em triplicata, e o fluxo utilizado foi de 1,10 mL/minuto, sob uma temperatura de 23°C. As corridas apresentaram um tempo total de 27 minutos e pressão de trabalho inicial de 151 atm. A detecção ocorreu por um detector de arranjo de diodo, por varredura de espectro (200 a 400 nm), com comprimentos de onda monitorados em 223 e 277 nm. A eluição ocorreu por gradiente de concentração conforme o QUADRO 4.

QUADRO 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Tempo	Fase ácida	Metanol	Acetonitrila:Água (9:1)
0	98	1	1
5	80	18	2
10	70	27	3
15	40	50	10
27	72	23	5

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Fase ácida - 0,1M ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01M.

Após o término das corridas, as áreas correspondentes ao pico do padrão ácido gálico foram integradas, utilizando o software Workstation, assim como a área de ácido gálico presente na fração acetato de etila de folhas, sendo o pico na amostra identificado por análise espectral.

Por regressão linear, foi plotado um gráfico do padrão, onde a abscissa representa a concentração de ácido gálico em µg/mL e a ordenada é a área (mAU). A área obtida na amostra foi substituída pela variável “y” da equação de reta na curva de ácido gálico, obtendo a concentração final de equivalentes de ácido gálico (EAG) em µg/mL pela concentração utilizada de amostra. Partindo desta concentração, foi possível o cálculo da quantidade em grama de EAG por g de fração.

3.8 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O doseamento de compostos fenólicos foi realizado segundo método descrito por Singleton et al. (1999), com modificações. As amostras testadas nesta análise foram extratos brutos e frações.

O método é fundamentado na reação dos compostos fenólicos com o reativo Folin-Ciocalteu, que é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Ao reagir com os compostos fenólicos em meio básico, ocorre a formação do ânion fenolato, o qual reduz o Folin de mobilidato a óxido de molibdênio, e conseqüentemente, há a formação de um complexo molibdênio-tungstênio (SINGLETON et al., 1999).

Soluções mães de extratos brutos, frações e padrão ácido gálico foram preparadas em metanol. A partir destas soluções, foram feitas diluições obtendo-se uma curva de seis pontos para o padrão e cinco pontos para as amostras. As concentrações foram testadas e definidas de modo que a absorbância (Abs) não ultrapassasse a leitura de 1,0.

Além das amostras e padrão, foram preparados um controle negativo para avaliar a interferência do solvente de diluição, um branco para descontar a coloração das amostras e uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 10%, a qual foi utilizada para basificar a reação. O reativo Folin-Ciocalteu 2N foi obtido comercialmente. A reação foi realizada em triplicata conforme o QUADRO 5.

QUADRO 5 – REAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

REAÇÃO	AMOSTRA/PADRÃO	CONTROLE	BRANCO
Água destilada	2 mL	2 mL	3,8 mL
Amostra/Padrão	200 μL	-	200 μL
Metanol	-	200 μL	-
Folin-Ciocalteu 2N	200 μL	200 μL	-
Repouso por 10 minutos			
Na_2CO_3 10%	400 μL	400 μL	-
Água destilada	1,2 mL	1,2 mL	-
Repouso ao abrigo da luz por 30 minutos			

FONTE: O autor (2020).

Decorrido o tempo de reação, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu® a 760 nm, utilizando metanol para zerar o equipamento.

Com as leituras do padrão ácido gálico foi plotado um gráfico, por regressão linear, onde a abscissa representa a concentração de ácido gálico em $\mu\text{g/mL}$ e a ordenada é a absorbância (Abs). A partir das absorbâncias obtidas na leitura das amostras foi descontada a Abs do controle negativo. A Abs resultante foi substituída pela variável “y” na curva de ácido gálico, obtendo a concentração final de equivalentes de ácido gálico em $\mu\text{g/mL}$ pela concentração utilizada de amostra. Partindo desta concentração, foi possível o cálculo da quantidade em grama de EAG por g de amostra. Assim, os resultados foram expressados em g EAG/g e em %.

Os estudos estatísticos foram feitos através do software Sisvar versão 5.6, sendo realizados a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey, no qual verifica a diferença estatística entre os resultados obtidos (valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos).

3.9 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

3.9.1 Radical DPPH

A avaliação da propriedade antioxidante pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada segundo descrito por Mensor et al. (2001), com modificações. As amostras testadas nesta análise foram os compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância, que age como doador de átomos de hidrogênio, em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Esta reação pode ser observada com a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Foram preparadas soluções mães de ácido gálico (0,5 mg/mL) e FGC2016ppt (1,0 mg/mL, com adição de uma gota de DMSO para auxiliar na solubilização) em metanol e a partir destas, foram realizadas 5 diluições com concentrações entre 1,5 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a uma curva, na qual estava presente a IC_{50} (concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante). O reativo DPPH foi preparado em metanol na concentração de 0,3 mM.

A reação em triplicata foi realizada em microplaca (fundo chato de 96 poços), conforme QUADRO 6, ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 30 minutos.

QUADRO 6 – REAÇÃO PARA MÉTODO DO RADICAL DPPH

REAÇÃO	SOLUÇÃO DILUÍDA	METANOL	DPPH
Solução diluída	142 µL	-	58 µL
Branco	142 µL	58 µL	-
Controle	-	142 µL	58 µL

FONTE: O autor (2020).

Decorrido o tempo de reação, as amostras, brancos e controle foram lidos a 540 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta Multiscan FC, Thermo Scientific®. O cálculo da atividade em porcentagem foi realizado conforme fórmula (5):

$$(5) \text{ AA\%} = 100 - \frac{[(\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}) \times 100]}{(\text{Absorbância controle})}$$

Para o cálculo da IC₅₀, utilizou-se a equação de reta $y = ax + b$, a partir da plotagem de um gráfico, em que abscissa representa a concentração da amostra (µg/mL) e a ordenada é a média da atividade antioxidante (AA%) das amostras de cada concentração.

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente. Para a realização de ANOVA e teste de Tukey, foram inseridos os resultados dos compostos isolados, das frações de origem (GATTO, 2018) e padrões (ácido ascórbico, rutina e BHT), atribuindo uma nomenclatura de grupo estatístico de acordo com o software Sisvar 5.6, sendo que $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.9.2 Complexo Fosfomolibdênio

O método de avaliação da propriedade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio foi realizada segundo Prieto et al. (1999), com modificações. A técnica espectrométrica é fundamentada na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) e formação de um complexo fosfatomolibdênio (V), o qual apresenta uma coloração verde em pH ácido quando utilizada uma amostra com capacidade antioxidante (PRIETO et al., 1999). As amostras testadas nesta análise foram os compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt).

Os compostos isolados e padrões (ácido ascórbico, BHT e rutina) foram preparados na concentração de 1 mg/mL em metanol, com adição de uma gota de

DMSO na amostra FGC2016ppt para auxílio na solubilização. A partir destas soluções mães, as amostras foram diluídas na concentração de 200 µg/mL, as quais foram utilizadas na reação.

Para cada amostra e padrão, em triplicata, foi pipetado em um tubo de ensaio, uma alíquota de 0,3 mL, e adicionado 3 mL de reativo que consiste de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,6 mol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L e molibdato de amônio 4 mmol/L, preparado no momento do uso. Uma solução branco também foi preparada contendo metanol e reativo.

Após as pipetagens, os tubos foram levemente fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos para ocorrer a reação. Decorrido o tempo, foi realizada a leitura das absorbâncias a 690 nm em microplacas com fundo chato de 96 poços, em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific®, após as amostras atingirem temperatura ambiente.

O cálculo da atividade antioxidante relativa foi feito conforme a fórmula (6), considerando os padrões com atividade 100%. O estudo estatístico foi realizado pelo software Sisvar versão 5.6, através de análise de variância ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$ foi considerado significativo), comparando os compostos isolados, frações de origem (GATTO, 2018) e padrões (ácido ascórbico, rutina e BHT).

$$(6) \text{ AAR\%} = \frac{[\text{Concentração Padrão mg/mL} \times (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})] \times 100}{[\text{Concentração Amostra mg/mL} \times (\text{Abs padrão} - \text{Abs branco})]}$$

3.9.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro

O ensaio antioxidante de poder de redução do íon ferro (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power) está fundamentado na redução do íon Fe^{+3} (forma férrica), presente no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ), para Fe^{+2} (forma ferrosa). Nesta reação é observada a mudança de coloração de roxo claro para roxo intenso, a qual pode ser lida no espectrômetro. Quanto maior a absorbância, maior será a intensidade da coloração e, conseqüentemente, maior o potencial antioxidante (URREA-VICTORIA et al., 2016).

A avaliação desta propriedade foi realizada segundo método descrito por Rufino et al. (2006), com modificações, e as amostras testadas foram os extratos brutos, frações e compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt).

Foi preparada uma solução mãe de Sulfato ferroso 2000 μM em água, e a partir desta, foram realizadas diluições obtendo-se uma curva de calibração de oito pontos com concentrações entre 100 e 1800 μM . As soluções mães de extratos brutos, frações, compostos isolados e controles positivos (rutina, ácido ascórbico e BHT) foram diluídas em metanol para cinco concentrações, de modo que as absorvâncias estivessem contidas na curva do sulfato ferroso. Na solução mãe da amostra FGC2016ppt foi adicionada uma gota de DMSO para auxílio na solubilização.

A solução reagente FRAP foi preparada no momento do uso e era composta de 25 mL de tampão acetato 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM preparada em ácido clorídrico 40 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

Na reação, foram pipetados em microplacas com fundo chato de 96 poços, 30 μL de água, 10 μL da respectiva solução diluída e 300 μL de reagente FRAP. Foi preparado um branco da mesma forma, apenas substituindo a solução amostra por metanol (solvente de preparo). A reação foi realizada em triplicata. A microplaca foi incubada a 37°C no espectrofotômetro de luz ultravioleta Multiscan FC, Thermo Scientific® e após 30 minutos foi realizada a leitura das absorvâncias a 570 nm.

Um gráfico de regressão linear foi plotado para o padrão sulfato ferroso, gerando uma equação de reta $y = ax + b$, onde o eixo “x” representa a concentração (μM) e o “y” é a respectiva absorvância. A partir desta equação de reta, foi calculada a absorvância (y_1) referente a 1000 μM (x_1) de sulfato ferroso.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições das amostras, também foi plotado um gráfico para cada uma, conforme realizado no padrão. A equação de reta foi calculada, sendo abscissa representada pela concentração (mg/L) e a ordenada pela absorvância.

Para o cálculo da atividade, foi substituída na equação de reta de cada amostra, a absorvância (y_1) equivalente a 1000 μM do padrão sulfato ferroso, obtendo-se a concentração da amostra (mg/L) equivalente a 1000 μM de sulfato ferroso. Partindo desta concentração, foi possível o cálculo da quantidade em μM sulfato ferroso/g de amostra.

Os estudos estatísticos foram realizados pelo software Sisvar versão 5.6, onde foram feitos a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0,05$ foram considerados significativos).

3.9.4 Radical ABTS

A técnica para a geração de ABTS envolve a produção direta do cromóforo ABTS (azul/verde) através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. A adição de antioxidantes ao cátion radical pré-formado reduz o ABTS, em certa medida e em uma escala de tempo, dependendo da atividade e concentração do antioxidante e da duração da reação. Assim, a extensão da descoloração como inibição do ABTS é calculada em relação à reatividade do trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) como padrão, nas mesmas condições. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos alimentares (RE et al., 1999).

O procedimento descrito foi baseado em Re et al. (1999) com modificações e testado nos extratos brutos, frações, composto isolado (ácido gálico) e controles (BHT, rutina e ácido ascórbico).

Foi preparada uma solução mãe de trolox 1,6 mmol/mL em metanol 50% em água, e a partir desta, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se uma curva de calibração de cinco pontos com concentrações entre 0,0016 e 0,0002 mmol/mL. As soluções mães de extratos brutos, frações, ácido gálico e controles foram diluídas em metanol 50% obtendo-se as concentrações a serem testadas, de modo que as absorvâncias estivessem contidas na curva do trolox.

O radical ABTS foi preparado a partir de 5 mL de solução aquosa de ABTS 7mM com 88 μ L de solução aquosa de persulfato de potássio 140 mM. Esta mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente por 16 horas. No momento do uso, foi diluído quantidade deste reagente em água até obter uma absorvância desejada a 690 nm.

A reação em quadruplicata foi realizada a partir de 10 μ L da respectiva solução amostra/padrão diluída e 300 μ L de reagente ABTS. A microplaca foi deixada sob repouso por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e lida à 690 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta Multiscan FC, Thermo Scientific®.

Com as leituras do padrão trolox foi plotado um gráfico, por regressão linear, onde a ordenada representa a concentração de trolox em mmol/mL e a abscissa é a absorvância. As absorvâncias obtidas nas leituras das amostras foi substituída pela variável "x" na curva de trolox, obtendo a concentração final de equivalentes de trolox

(ET) em mmol pela concentração utilizada de amostra. Partindo desta concentração, foi possível o cálculo da quantidade em mmol de ET por mg de amostra.

Os estudos estatísticos foram realizados pelo software Sisvar versão 5.6, onde foram feitos a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0,05$ foram considerados significativos).

3.10 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

3.10.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial

Na avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial (GATTO, 2018), foi determinada a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo, conforme CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

O óleo foi testado frente as cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25913, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Suspensões bacterianas foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL em solução salina, correspondendo ao tubo 0,5 da escala de McFarland, e inoculadas nas microplacas (5 μ L), apresentando concentração final de 10^4 UFC/mL. As amostras de óleo essencial foram testadas nas concentrações de 3,9-1000 μ g/mL, preparadas em polisorbato 5%.

O controle negativo do diluente foi preparado a partir de 100 μ L de solução de polisorbato 5% em 100 μ L de caldo Mueller-Hinton (MHB) e 5 μ L dos inóculos bacterianos. O controle positivo era composto de 100 μ L de MHB e 5 μ L dos inóculos bacterianos. No controle de esterilidade foram utilizados 100 μ L de MHB e 100 μ L de óleo essencial.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 16 a 20 horas. Após este período, foram colocados 20 μ L de solução aquosa de 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto (TTC) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por 3 horas. Os resultados obtidos de CIM foram interpretados como uma boa atividade antibacteriana (até 100 μ g/mL), moderada atividade (entre 100-500 μ g/mL), fraca atividade (entre 500-1000 μ g/mL) e inativos (maiores que 1000 μ g/mL) (TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

3.10.2 Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados

A atividade microbiológica das amostras foi determinada pela concentração inibitória mínima através do método de microdiluição em caldo, conforme CLSI e padronizado e validado por Veiga et al. (2019).

Extratos brutos, frações e compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt) foram testados frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8738 e *Candida albicans* ATCC 10231. Estes micro-organismos são descritos na Farmacopeia Brasileira para testes de eficácia antimicrobiana. O óleo essencial foi testado apenas frente a *Candida albicans*, já que em um momento anterior (3.10.1), fora testado frente as cepas bacterianas mencionadas.

Foram preparados os meios de cultura e materiais a serem esterilizados previamente a execução do teste. Soluções mães das amostras foram preparadas a 2 mg/mL utilizando 10% de metanol e completando o volume com água estéril, exceto na fração hexano de folhas em que foi utilizado 20% de metanol e no óleo essencial que foi utilizado 10% de DMSO.

Os micro-organismos foram inoculados por esgotamento em placas, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 10 µL, em TSA (bactérias) e ágar sabouraud (levedura) e incubados à 33-35°C/18–22 horas. Após a incubação, parte das colônias isoladas foram transferidas, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 1 µL, para tubos contendo solução salina (0,9%). Os tubos foram agitados e a turbidez foi ajustada para 0,5 da Escala de McFarland com o auxílio de um densímetro.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo em “U”. Em cada placa foram testadas até três amostras e um micro-organismo, para evitar contaminação cruzada.

Foram adicionados 100 µL de caldo (MHB para as bactérias e sabouraud dextrose para a levedura) em todos os poços da placa. Em seguida, foram adicionados em triplicata aos orifícios da linha A, 100 µL das amostras com concentração conhecida a serem testadas. A partir destas, realizaram-se diluições seriadas, homogeneizando o conteúdo dos pocinhos com o auxílio de pipetadora multicanal e passando alíquotas de 100 µL para a linha seguinte (A→B; B→C; C→D; D→E; E→F; F→G; G→H). Ao chegar na fileira H, 100 µL de cada orifício foi descartado, mantendo

o volume final em todos os poços de 100 μL . Com isto, a diluição das amostras manteve as seguintes proporções e concentrações: A (1:2) 1000 $\mu\text{g/mL}$, B(1:4) 500 $\mu\text{g/mL}$, C (1:8) 250 $\mu\text{g/mL}$, D (1:16) 125 $\mu\text{g/mL}$, E (1:32) 62,5 $\mu\text{g/mL}$, F (1:64) 31,2 $\mu\text{g/mL}$, G (1:128) 15,6 $\mu\text{g/mL}$ e H (1:256) 7,8 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada microplaca testada, foi preparada uma triplicata de controles positivos Cloranfenicol 250 $\mu\text{g/mL}$ para bactérias e Cetoconazol 500 $\mu\text{g/mL}$ para a levedura (100 μL de caldo + 100 μL de solução antimicrobiano) e controle negativo (100 μL de caldo + 100 μL de solução diluente). O controle negativo foi realizado para demonstrar que a atividade antimicrobiana é proveniente do composto, e não do diluente. O branco era constituído de 100 μL de caldo e 100 μL de amostra testada. Os poços dos controles e branco foram homogeneizados e 100 μL foram descartados para que todos os orifícios da placa apresentassem o mesmo volume.

Foram adicionados 10 μL de suspensão de micro-organismos em cada orifício das amostras e controles e 10 μL de salina nos orifícios correspondentes ao branco. As microplacas foram incubadas à 33-35°C/20-22 horas.

Após a incubação, 20 μL de solução reveladora de cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio 0,125% foram adicionados em todos os orifícios. O TTC é utilizado como indicador da viabilidade celular, e é reduzido pelo metabolismo dos micro-organismos, tornando-se um formazano com coloração rósea à púrpura. Ou seja, onde não houver crescimento, não haverá desenvolvimento da coloração rósea. As placas foram reincubadas por 2 horas à 33-35°C.

Os resultados foram interpretados por leituras visuais, observando-se o desenvolvimento de coloração rósea para as bactérias e o depósito de células (botão branco à rósea para a levedura). A concentração inibitória mínima foi a última concentração na qual não houve o desenvolvimento de coloração.

As concentrações de amostras que inibiram o crescimento microbiano foram avaliadas quanto a sua ação bactericida/fungicida ou bacteriostática/fungistática. Para isto, as amostras da microplaca foram semeadas em duplicata para placas de petri contendo ágar TSA (bactérias) e sabouraud (levedura) e incubadas à 33-35°C/18 horas (SANTURIO et al., 2007). O crescimento microbiológico no ágar demonstra a ação bacteriostática ou fungistática e o não crescimento mostra a ação bactericida ou fungicida dos extratos, frações, óleo essencial e compostos isolados.

3.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.11.1 α -Glicosidase

A inibição *in vitro* da atividade enzimática da α -glicosidase foi avaliada nas amostras foliares: extrato bruto e fração acetato de etila, escolhidas de acordo com os resultados dos métodos antioxidantes. Utilizou-se método espectrofotométrico na região do visível (PEREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2014; TONG et al., 2014; SHAN et al., 2016) com pequenas modificações, conduzido na Universidade Federal de Juiz de Fora.

O ensaio foi realizado em triplicata com 6 concentrações em DMSO 4%. Em microtubo, foram adicionados 150 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8 (contendo NaCl 0,0335 M), 150 μ L de glutatona reduzida 0,0005 M (em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8) para favorecer a reação, 150 μ L de cada concentração testada e 150 μ L da solução de α -glicosidase (0,2 unidades/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8). A mistura foi incubada em estufa à 37°C por 15 minutos.

Após esse período, foram adicionados 150 μ L da solução de substrato *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo 0,85 mM (em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8) e novamente incubado em estufa à 37°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, a reação foi paralisada com 300 μ L de solução de carbonato de sódio 0,2 M, agitada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu® no comprimento de onda de 400 nm.

Foi preparado também o controle da reação, composto de diluente, enzima e substrato; o branco controle da reação, composto de diluente, substrato e tampão; e para cada concentração testada, o branco amostra, composto de amostra, substrato e tampão. A acarbose foi utilizada como controle positivo nas mesmas condições do ensaio para as amostras e o seu branco era composto de acarbose, substrato e tampão.

Construiu-se um gráfico porcentagem de inibição *versus* log da concentração em μ g/mL. Os percentuais de inibição (%) foram calculados de acordo com a fórmula (7):

$$(7) \%I = \frac{[(\text{Abs controle reação} - \text{Abs branco}) - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})]}{(\text{Abs controle reação} - \text{Abs branco})} \times 100$$

Os resultados da inibição da atividade enzimática foram expressos como a média da concentração inibitória 50% (IC₅₀), calculada a partir da equação da reta da regressão linear de cada amostra.

Para a acarbose foram realizadas três curvas analíticas em três dias diferentes, as quais foram submetidas à análise de covariância para comprovar a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas, utilizando o programa GraphPad Prism.

Os estudos estatísticos foram realizados pelo software Sisvar versão 5.6 a partir da comparação dos resultados obtidos para extrato, fração e acarbose através de ANOVA e teste de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.11.2 Lipase pancreática

A inibição *in vitro* da atividade enzimática da lipase pancreática foi avaliada nas amostras foliares: extrato bruto e fração acetato de etila, escolhidas de acordo com os resultados dos métodos antioxidantes. Utilizou-se método espectrofotométrico na região do visível (NAKAI et al., 2005; SAIFUDDIN; RAZIAH, 2008; SOUZA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015) com pequenas modificações, conduzido na Universidade Federal de Juiz de Fora.

O ensaio foi realizado em triplicata com 7 concentrações em DMSO 5%. Em microtubo, foram adicionados 100 μL de cada concentração testada e 100 μL da suspensão de lipase pancreática 20 mg/mL (em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo NaCl 25 mM e CaCl_2 10 mM, sendo que estes sais auxiliam na solubilidade da enzima). A mistura foi incubada em estufa à 37°C por 15 minutos.

Após esse período, foram adicionados 100 μL da solução de substrato p-nitrofenolpalmitato 8 mM (em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 10% de álcool isopropílico, 0,1% goma arábica e 0,5% Triton-x 100, os quais auxiliam na solubilidade do substrato) e novamente incubado em estufa à 37°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, a reação foi paralisada em banho quente (85°C) por 10 minutos e logo em seguida foram acrescentados 800 μL de solução tampão Tris-HCl pH 8,0. A mistura

resfriou por 10 minutos e foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu® no comprimento de onda de 410 nm.

Foi preparado também o controle da reação, composto de diluente, enzima e substrato; o branco enzima, composto de diluente, substrato e tampão; o branco substrato, composto de diluente, enzima e tampão. Este branco substrato foi realizado pois, como o substrato é um ácido graxo, é instável em meio aquoso. Para cada concentração testada, também foi preparado o branco amostra, composto de amostra, substrato e tampão. O orlistate foi utilizado como controle positivo nas mesmas condições de ensaio das amostras e o seu branco era composto de orlistate, substrato e tampão.

Construiu-se um gráfico porcentagem de inibição *versus* log da concentração em µg/mL e os percentuais de inibição (%I) foram calculados de acordo com a fórmula (8):

$$(8) \%I = \frac{[(Abs\ C - Abs\ BE - Abs\ BS) - (Abs\ A - Abs\ BA)]}{(Abs\ C - Abs\ BE - Abs\ BS)} \times 100$$

Onde:

Abs C: Absorbância Controle reação

Abs BE: Absorbância Branco Enzima

Abs BS: Absorbância Branco Substrato

Abs A: Absorbância Amostra

Abs BA: Absorbância Branco Amostra

Os resultados da inibição da atividade enzimática foram expressos como a média da concentração inibitória 50% (IC₅₀), calculada a partir da equação da reta da regressão linear de cada amostra.

Para o orlistate foram realizadas três curvas analíticas em três dias diferentes, as quais foram submetidas à análise de covariância para comprovar a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas, utilizando o programa GraphPad Prism.

Os estudos estatísticos foram realizados pelo software Sisvar versão 5.6 a partir da comparação dos resultados obtidos para extrato, fração e orlistate através de

ANOVA e teste de Tukey, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.12 CORRELAÇÃO DE PEARSON

A determinação do coeficiente de correlação de Pearson é uma medida de associação linear entre variáveis. Quanto mais perto de 1, maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009).

A correlação foi avaliada entre a quantificação de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$ EAG) e os métodos antioxidantes: DPPH (% Atividade antioxidante), FRAP (μM de Sulfato Ferroso/Concentração de amostra testada) e ABTS (mmol/mL ET). Além disso, a correlação também foi determinada entre a inibição da atividade enzimática (% Inibição) e o conteúdo de compostos fenólicos e métodos antioxidantes.

3.13 ESTUDO FARMACOLÓGICO

O estudo farmacológico foi certificado pelo Comitê Institucional de Uso Ético dos Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO-UFPR; autorização número 1322, aprovado em 22 de outubro de 2019 – ANEXO 2) e realizado seguindo o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

3.13.1 Animais

O experimento foi realizado utilizando ratos machos (pesando de 220 a 250g), linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da UFPR. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas (41 x 32 x 16,5 cm) em grupos de no máximo 5 animais por caixa, com acesso à água e ração *ad libitum*.

Por pelo menos 3 dias antes dos experimentos comportamentais, os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de iluminação (12 h claro/escuro, luzes ligadas às 7h) no biotério do Laboratório de Dor do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Além disso, os animais foram habituados à sala experimental por pelo menos 1 hora antes

do teste, o qual foi realizado no ciclo claro (das 8h às 17h). As salas de experimentação apresentavam exaustão própria bem como controle de temperatura e luminosidade. Os animais foram utilizados somente uma vez e imediatamente eutanasiados por overdose de tiopental (100 mg/kg) ao fim do experimento.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais, bem como o sofrimento, seguindo o princípio de redução recomendado por Russell e Burch (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

3.13.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação do potencial anti-inflamatório foi utilizado o teste de edema de pata induzido por carragenina descrito por Pacheco et al. (2019). Após um jejum de 12h, o veículo (solução salina NaCl 0,9%) ou extrato bruto de folhas, solubilizado em solução salina, foram administrados por via oral (gavagem) e a dexametasona (1 mg/kg) por via subcutânea em grupos experimentais conforme o QUADRO 7. As injeções subplantares de carragenina (200 µg/pata em 100 µL de salina) ou salina (100 µL), utilizada como controle, foram realizadas após uma hora dos tratamentos.

QUADRO 7 - GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO TESTE DE EDEMA DE PATA

TRATAMENTO	INJEÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS
Veículo	Salina	9
Veículo	Carragenina	8
EBF 10 mg/kg	Carragenina	9
EBF 30 mg/kg	Carragenina	8
EBF 100 mg/kg	Carragenina	9
Dexametasona 1 mg/kg	Carragenina	9

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Extrato bruto folha (EBF).

As espessuras das patas foram mensuradas com auxílio de um paquímetro digital em milímetros (mm) antes da administração de carragenina ou salina (medidas basais, tempo 0) e novamente após a injeção de carragenina ou salina nos intervalos de 1, 2 e 3 horas. A inflamação foi avaliada como o aumento na espessura da pata (edema) em cada intervalo de tempo em relação à medida basal.

3.13.3 Avaliação do efeito antinociceptivo no teste da formalina

O teste de formalina foi realizado segundo Pacheco et al. (2019). Após um jejum de 12h, o veículo ou extrato bruto de folhas, solubilizado em solução salina, foram administrados por via oral (gavagem) em grupos experimentais conforme o QUADRO 8, verificando a resposta antinociceptiva em doses baixas (10 e 30 mg/kg), intermediária (100 mg/kg) e alta (300 mg/kg). Após 45 minutos do tratamento, os ratos foram aclimatados por 15 minutos no aparato do teste de formalina (funil de vidro invertido: 290 mm de largura e 410 mm de altura) com espelho ao fundo para facilitar a visualização do animal (FIGURA 4).

QUADRO 8 - GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO TESTE DE FORMALINA

GRUPO	TRATAMENTO	NÚMERO DE ANIMAIS
Veículo	Salina	9
Dose 1	EBF 10 mg/kg	8
Dose 2	EBF 30 mg/kg	10
Dose 3	EBF 100 mg/kg	8
Dose 4	EBF 300 mg/kg	8

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Extrato bruto folha (EBF).

FIGURA 4 - ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS NO TESTE DE FORMALINA



FONTE: O autor (2020).

Em seguida, os animais receberam a injeção de formalina 2,5% (50 µL/animal) na superfície intraplantar de uma das patas traseiras. Os comportamentos nociceptivos dos ratos de chacoalhar a pata ipsilateral foram chamados de “*flinches*” e ocorreram imediatamente após a administração do agente algogênico.

Assim, os *flinches* foram contados pelo decorrer de 60 minutos, divididos em períodos de 5 minutos com fases definidas nos seguintes intervalos de tempo: fase I (0 a 5 minutos), fase quiescente (6 a 15 minutos) e fase II (16 a 60 minutos). Os resultados foram expressos como a soma do total de *flinches* em cada fase do teste (gráfico de barras) e o número acumulado de *flinches* a cada 5 minutos durante os 60 minutos do teste (gráfico xy).

O controle farmacológico positivo com fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou opioides não foi realizado para este experimento comportamental, uma vez que seus efeitos antinociceptivos foram amplamente observados em estudos prévios (VENÂNCIO et al., 2011; ANDRADE et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2018).

3.13.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de $n= 8-10$ animais por grupo experimental. Os dados foram comparados usando ANOVA de duas vias em que os fatores independentes utilizados foram tratamento e tempo, seguida de *post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados de determinação de umidade e cinzas totais pelos métodos gravimétricos estão apresentados na TABELA 3 e atendem aos critérios farmacopeicos. Estas análises são importantes como parâmetros de controle de qualidade do material vegetal, podendo constatar uma possível adulteração ou contaminação. Além disto, as análises físico-químicas mostram que o método de secagem foi eficaz.

TABELA 3 – ANÁLISES DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS DE FOLHAS E GALHOS DE *Myrcia hatschbachii*

MATERIAL VEGETAL	UMIDADE % ± DP	CINZAS TOTAIS % ± DP
Folhas	13,37 ± 0,40	7,76 ± 0,22
Galhos	10,62 ± 0,39	4,24 ± 0,21

FONTE: O autor (2020).
Nota: Desvio Padrão (DP).

A análise térmica consiste de técnicas em que é medida a propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação em função da temperatura e/ou do tempo. Esta substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera específica, em que são observadas as variações de massa, através da utilização de uma termobalança de elevada sensibilidade e reprodutibilidade. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado (SILVA et al., 2007).

Os resultados para esta análise mostrando as temperaturas iniciais e finais de cada etapa e o percentual de massa degradada podem ser observados na TABELA 4 e no GRÁFICO 3.

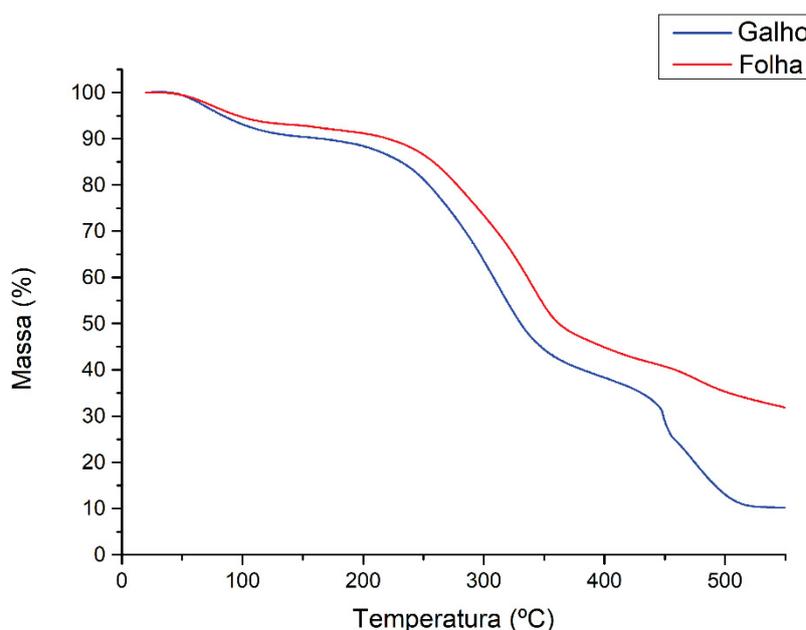
TABELA 4 – ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE FOLHAS E GALHOS DE *Myrcia hatschbachii*

ETAPAS	TEMPERATURA			MASSA (%)	
	°C	Folha	Galho	Folha	Galho
1 Umidade	T _I	20	20	6,6	9,6
	T _F	130	134		
2 Decomposição de metabólicos secundários	T _I	124	134	46	50,5
	T _F	402	383		
3 Decomposição lenta de resíduos carbonados e polímeros	T _I	405	383	15,4	20,2
	T _F	550	550		
4 Resíduo carbonífero	T _I	550	550	32	10,1
	T _F	-	-		

FONTE: O autor (2020).

Nota: T_I - Temperatura inicial da etapa, T_F - Temperatura final da etapa, % - percentual de massa degradada em cada etapa.

GRÁFICO 3 – PERFIL DA ANÁLISE TÉRMICA DE FOLHAS E GALHOS



FONTE: O autor (2020).

O perfil de degradação térmica das folhas e galhos de *Myrcia hatschbachii* apresentaram um comportamento semelhante, com quatro perdas de massa em atmosfera de argônio.

Na etapa 1, foi observado que a perda de água iniciou em 20°C (temperatura inicial do experimento) até aproximadamente 130°C para folhas e 134°C para galhos. Na amostra de galho houve uma pequena diferença entre a umidade pelo método gravimétrico convencional em estufa e o termogravimétrico. Já para a amostra de folha, a diferença de resultados foi mais significativa, sendo a perda de massa do método gravimétrico superior à obtida pelo termogravimétrico.

Na etapa 2, foi avaliada a decomposição de metabólitos secundários como flavonoides, taninos e terpenos. Pela análise térmica, constatou-se que folhas apresentaram boa estabilidade térmica até 124°C, e galhos até 134°C, o que garante confiabilidade térmica nos processos de extração à quente, como em aparelhos de Soxhlet.

Na etapa 3 ocorreu a decomposição lenta de resíduos carbonados e polímeros e a etapa 4 correspondeu ao resíduo carbonífero. Caso tivesse sido utilizado fluxo de ar sintético na análise termogravimétrica, o resíduo da etapa 4 seria chamado de cinzas. Como a análise foi feita em argônio, o resíduo foi chamado de carbonífero, pois nem todo o carbono foi degradado.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

Após extração em Soxhlet, os extratos brutos etanólicos foram homogeneizados, obtendo-se um volume de 9120 mL de extrato bruto de folhas, a partir de 2401 g de material seco e tempo de extração de aproximadamente 65 horas (em cada etapa de extração). Já para o extrato bruto etanólico de galhos, partiu-se de 1449 g de material seco, o qual foi extraído por aproximadamente 37 horas, resultando em um volume de 5080 mL.

Os extratos brutos foram filtrados à vácuo e alíquotas foram retiradas para a determinação de sólidos. A partir do teor de sólidos, também foi possível o cálculo do rendimento dos extratos. Os resultados destas análises estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E GALHOS DE *Myrcia hatschbachii*

PARTE AÉREA	TEOR DE SÓLIDOS (g) em 10 mL ± DP	RENDIMENTO (%)
Folhas	0,264 ± 0,0035	10,03
Galhos	0,091 ± 0,0012	3,19

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Desvio Padrão (DP).

Concluída esta etapa, parte dos extratos brutos (aproximadamente 100 g para o extrato bruto de folhas e 6 g para o extrato bruto de galhos) foram secos em banho-

maria para a realização dos ensaios biológicos e a outra parte foi destinada ao fracionamento.

A partição líquido-líquido, realizada também por Soxhlet, foi conduzida com solventes de diferentes polaridades: hexano, clorofórmio e acetato de etila para folhas e galhos. Devido à grande quantidade de material vegetal, a fração hexano de folhas foi obtida em quatro etapas e a fração acetato de etila de galhos em duas; as demais foram provenientes de uma única etapa.

Na TABELA 6 está apresentado o rendimento das frações em relação à quantidade de planta seca (2299,36 g de folhas e 1442,72 g de galhos) utilizada no extrato bruto que foi destinada ao fracionamento. Além disso, está apresentada a massa de fração após evaporação dos solventes em banho-maria.

TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E GALHOS DE *Myrcia hatschbachii*

PARTE AÉREA	FRAÇÃO	RENDIMENTO (%)	MASSA DE FRAÇÃO SECA (g)
Folhas	Hexano	2,13	48,9874
	Clorofórmio	1,07	24,6874
	Acetato de etila	0,46	10,5995
	Remanescente	1,83	42,1210
Galhos	Hexano	0,84	12,1752
	Clorofórmio	0,06	0,9252
	Acetato de etila	0,16	2,3752
	Remanescente	0,79	11,3701

FONTE: O autor (2020).

4.3 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

O screening fitoquímico por CCD foi realizado nos extratos brutos, frações e precipitados com o intuito de identificar os principais metabólitos da espécie. Os resultados obtidos estão sumarizados na TABELA 7.

TABELA 7 - SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

COLETA	AMOSTRA	ESTEROIDE/ TRITERPENO	FLAVONOIDE	TANINO	ALCALOIDE	CUMARINA
2016	EBF	+	+	+	-	+
	FFH	+	+	+	-	+
	FFC	+	+	+	-	+
	FFA	-	+	+	-	+
	FFR	-	+	+	-	-
	EBG	+	+	+	-	+
	FGH	+	+	+	-	+
	FGC	+	+	+	-	+
	FGA	+	+	+	-	-
	FGR	-	+	+	-	+
	FGC2016ppt	-	+	+	-	+
	FGA2016ppt	-	+	+	-	+
2018	EBF	+	+	+	-	+
	FFH	+	+	+	-	+
	FFC	+	+	+	-	+
	FFA	-	+	+	-	-
	FFR	-	+	+	-	-
	EBG	+	+	+	-	+
	FGH	+	+	+	-	+
	FGC	-	+	+	-	+
	FGA	-	+	+	-	+
	FGR	-	+	+	-	-

FONTE: O autor (2020).

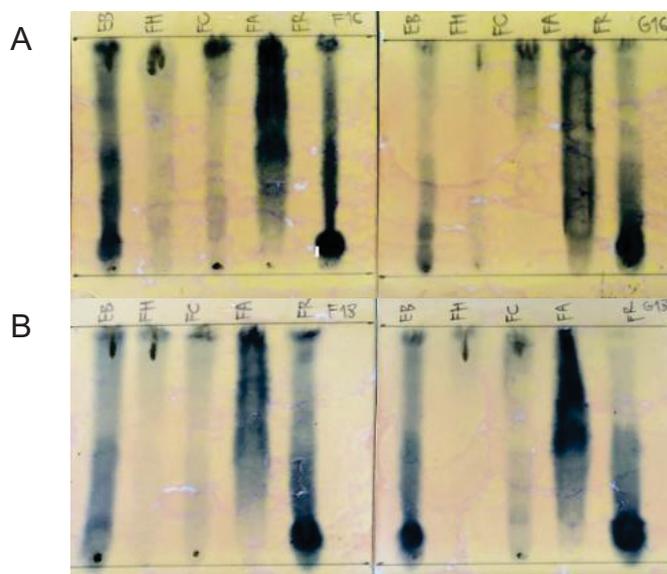
NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt), Fração galho acetato de etila precipitado (FGA2016ppt).

LEGENDA: (-) ausente; (+) presente.

Os esteroides e/ou triterpenos foram positivos para as amostras foliares de extrato bruto e frações hexano e clorofórmio, tanto da coleta 2016 quanto da 2018, com o aparecimento de bandas verde e azul. As amostras de galhos da coleta 2018 foram positivas para o extrato bruto (banda verde) e fração hexano (bandas verde e azul), já as amostras referentes a coleta de 2016 foram positivas para o extrato bruto, frações hexano e clorofórmio (bandas verde e azul) e fração acetato de etila (banda azul). Não houve aparecimento de banda nos precipitados (FGC2016ppt e FGA2016ppt).

Em relação aos flavonoides, houve o aparecimento de banda amarela em todas as amostras testadas, assim como para taninos, com o aparecimento de banda azul, indicando taninos hidrolisáveis (FIGURA 5). A pesquisa de alcaloides foi negativa para os extratos brutos, frações e precipitados.

FIGURA 5 - PESQUISA DE TANINOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES COLETADOS EM 2016 (A) E 2018 (B)



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Folhas coleta 2016 (F16), Galhos coleta 2016 (G16), Folhas coleta 2018 (F18), Galhos coleta 2018 (G18), Extrato bruto (EB), Fração hexano (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FA), Fração remanescente (FR).

As cumarinas foram positivas com o aparecimento de banda azul nas amostras foliares coletadas em 2018: extrato bruto, frações hexano e clorofórmio; amostras de galhos coletadas em 2018: extrato bruto, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila; amostras foliares coletadas em 2016: extrato bruto, frações hexano, clorofórmio e acetato de etila; amostras de galhos coletadas em 2016: extrato bruto, frações hexano, clorofórmio e remanescente; assim como nos precipitados.

De forma geral, a presença dos metabólitos foi semelhante entre as coletas e quando comparado à marcha fitoquímica clássica (GATTO, 2018), demonstrando a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo. Além disso, em ambas as coletas, foi observada a presença de flavonoides e taninos em todas as amostras, o que corrobora com os metabólitos mais encontrados na família e no gênero. A família Myrtaceae é caracterizada pela presença de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) (RODRIGUES et al., 2016), bem como estudos no gênero *Myrcia* também mostraram a presença de taninos, ácidos orgânicos e flavonoides (CASCAES et al. 2015).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

4.4.1 Amostra: FGA2016ppt

A elucidação do precipitado obtido da fração acetato de etila de galhos foi realizada por RMN, conforme análise dos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC e a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC. A TABELA 8 e a TABELA 9 apresentam os dados destes estudos comparados aos obtidos experimentalmente e a FIGURA 6 traz a disposição dos átomos de carbono para a elucidação das moléculas identificadas: ácido 3-O-metil elágico (A) e ácido elágico (B).

TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA O ÁCIDO 3-O-METIL ELÁGICO (AMOSTRA FGA2016ppt), EM DMSO-d_6

POSIÇÃO	δ_{C}		δ_{H}	
	EXPERIMENTAL ^{ab}	LITERATURA ^c	EXPERIMENTAL ^a	LITERATURA ^c
1'				
2'				
3'				
4'	148,3	148,9		
5'	110,6	110,6	7,51 s	7,51 s
6'				
7'	159,0	159,3		
1				
2				
3	140,5	140,2		
4				
5	110,6	110,6	7,45 s	7,46 s
6				
7	159,4	159,8		
3-OCH ₃	61,2	61,3	4,05 s	4,04 s

FONTE: O autor (2020).

NOTA: ^a Experimento de RMN realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em DMSO-d_6 utilizando o TMS como referência em δ 0,00. ^b Valores determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura Wyrepkowski et al. (2014) (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75,5 MHz, DMSO-d_6). (δ) Deslocamento químico em ppm.

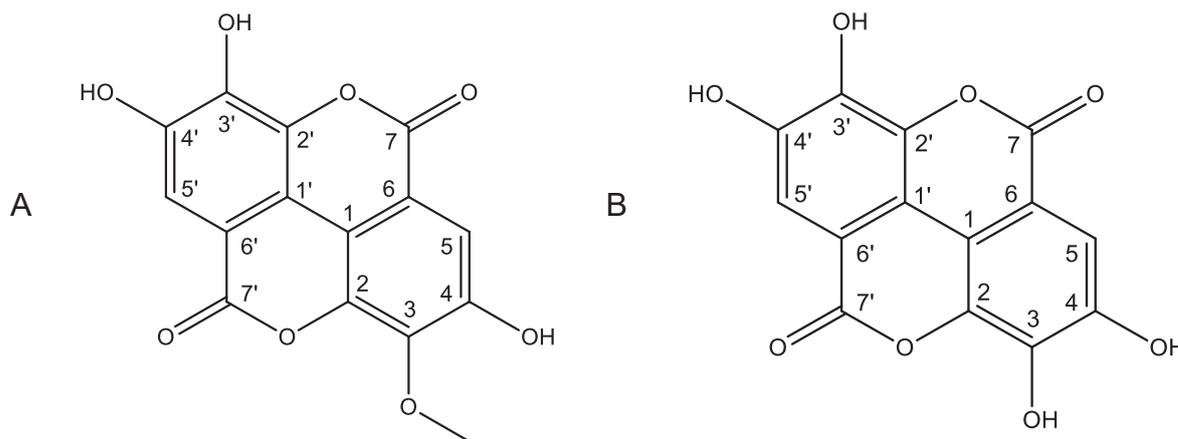
TABELA 9 - DADOS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA O ÁCIDO ELÁGICO (AMOSTRA FGA2016ppt), EM DMSO-d_6

POSIÇÃO	δ_{C}		δ_{H}	
	EXPERIMENTAL ^{ab}	LITERATURA ^c	EXPERIMENTAL ^a	LITERATURA ^c
1 e 1'	112,3	112,3	7,46 s	7,45 s
2 e 2'	136,1	136,5		
3 e 3'	139,6	139,6		
4 e 4'	148,2	148,1		
5 e 5'	110,3	110,2		
6 e 6'	107,2	107,6		
7 e 7'	159,1	159,1		

FONTE: O autor (2020).

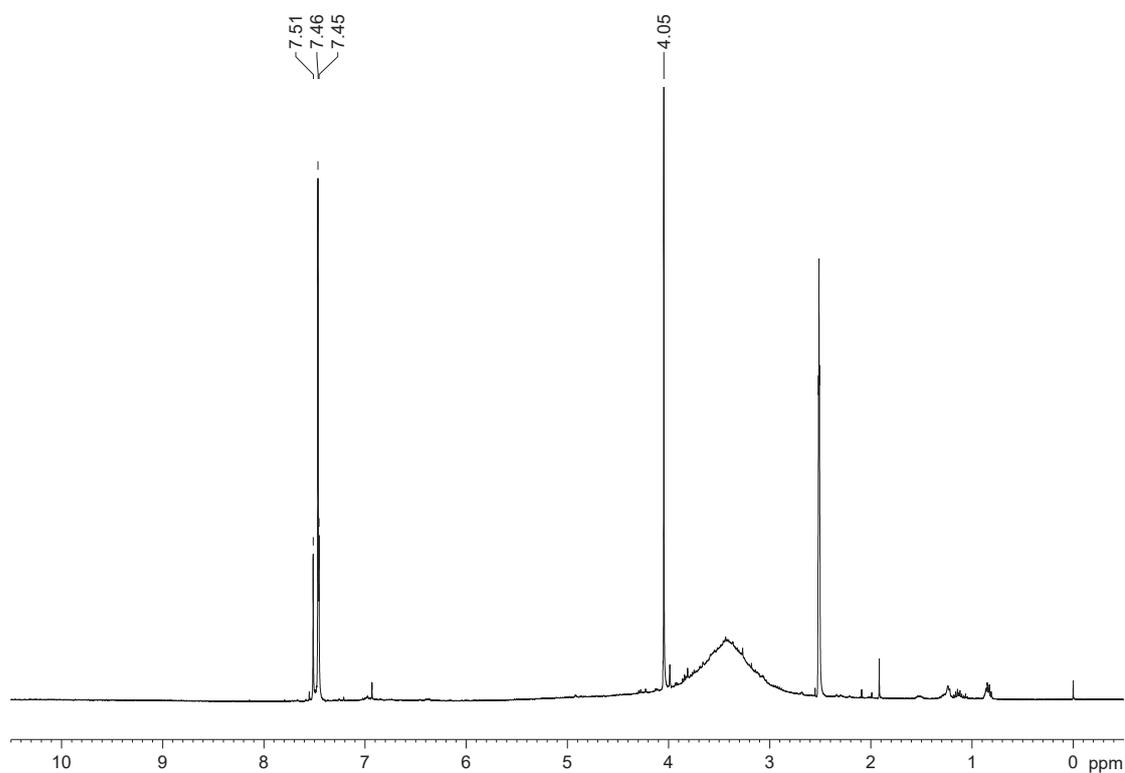
NOTA: ^a Experimento de RMN realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em DMSO-d_6 utilizando o TMS como referência em δ 0,00. ^b Valores determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura Goriparti et al. (2013) (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, DMSO-d_6). (δ) Deslocamento químico em ppm.

FIGURA 6 - DISPOSIÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO NAS MOLÉCULAS DE ÁCIDO 3-O-METIL ELÁGICO (A) E ÁCIDO ELÁGICO (B)

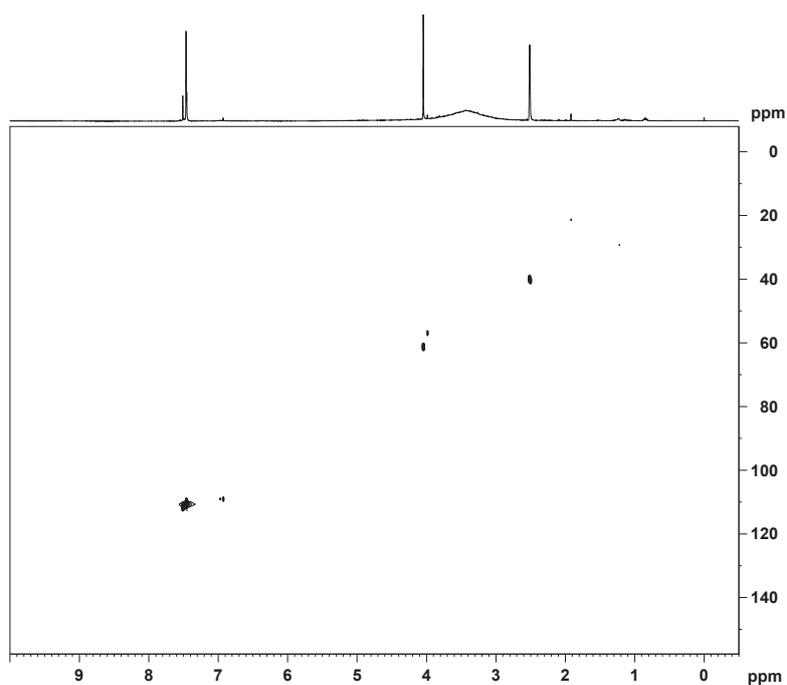


FONTE: O autor (2020).

O espectro de ^1H e mapas de correlação HSQC e HMBC podem ser observados na FIGURA 7, FIGURA 8 e FIGURA 9, respectivamente.

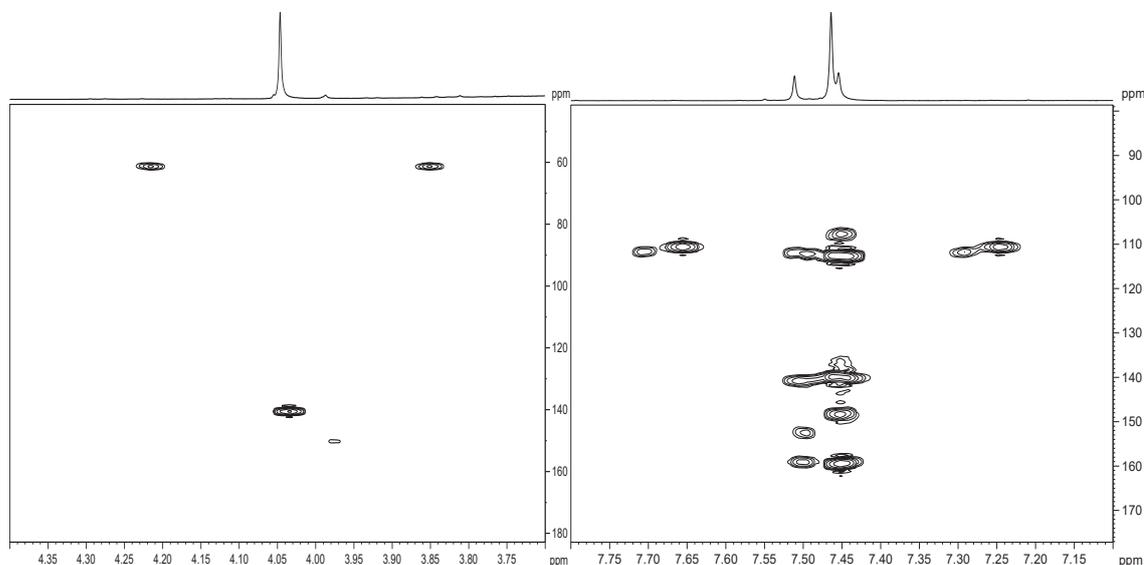
FIGURA 7 - ESPECTRO DE ^1H DA AMOSTRA FGA2016ppt

FONTE: O autor (2020).
NOTA: ^1H : 400 MHz, DMSO-d_6 .

FIGURA 8 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA FGA2016ppt

FONTE: O autor (2020).
NOTA: ^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, DMSO-d_6 .

FIGURA 9 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C HMBC DA AMOSTRA FGA2016ppt



FONTE: O autor (2020).

NOTA: ^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, DMSO- d_6 .

O ácido elágico é um composto fenólico isolado pela primeira vez na espécie *Myrcia hatschbachii*, assim como o ácido gálico encontrado anteriormente (GATTO, 2018). Sua presença foi identificada em outras espécies do gênero, como nos extratos foliares de *Myrcia bella* e *Myrcia fallax* (SANTOS et al., 2018). A identificação desta substância corrobora com a presença de taninos hidrolisáveis encontrados no screening fitoquímico, a expressiva propriedade antioxidante da espécie, além do alto conteúdo de compostos fenólicos doseados pelo método de Folin-Ciocalteu. Não foram encontrados na literatura relatos do ácido 3-O-metil elágico no gênero *Myrcia*, embora já tenha sido descrita na família Myrtaceae, como no estudo realizado por Neves et al. (2018), que identificou a substância em extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia* spp.).

4.4.2 Amostra: FGC2016ppt

A elucidação do precipitado obtido da fração clorofórmio de galhos foi realizada por RMN, conforme análise dos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC e a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC. Os dados obtidos estavam de acordo com o ácido elágico (TABELA 9). Além do ácido elágico, uma segunda molécula estava presente nesta amostra, a qual não foi completamente

elucidada, mas conforme análises preliminares, tratava-se possivelmente de um composto formado a partir da fusão do ácido elágico com o ácido gálico.

4.4.3 Amostra: FFA2016F11-144ppt

A elucidação do precipitado obtido da reunião dos frascos 11 a 114 da coluna realizada com a fração acetato de etila de folhas foi feita por RMN, conforme análise dos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC e a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC. Os dados obtidos estavam de acordo o ácido elágico, conforme TABELA 9.

4.4.4 Amostra: FGA2016F109-135ppt

A elucidação do precipitado obtido da reunião dos frascos 109 a 135 da coluna realizada com a fração acetato de etila de galhos foi feita por RMN, conforme análise dos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC e a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC. Os dados de RMN obtidos estavam de acordo com o ácido 3-O-metil elágico e ácido elágico, conforme a TABELA 8 e a TABELA 9, respectivamente.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO

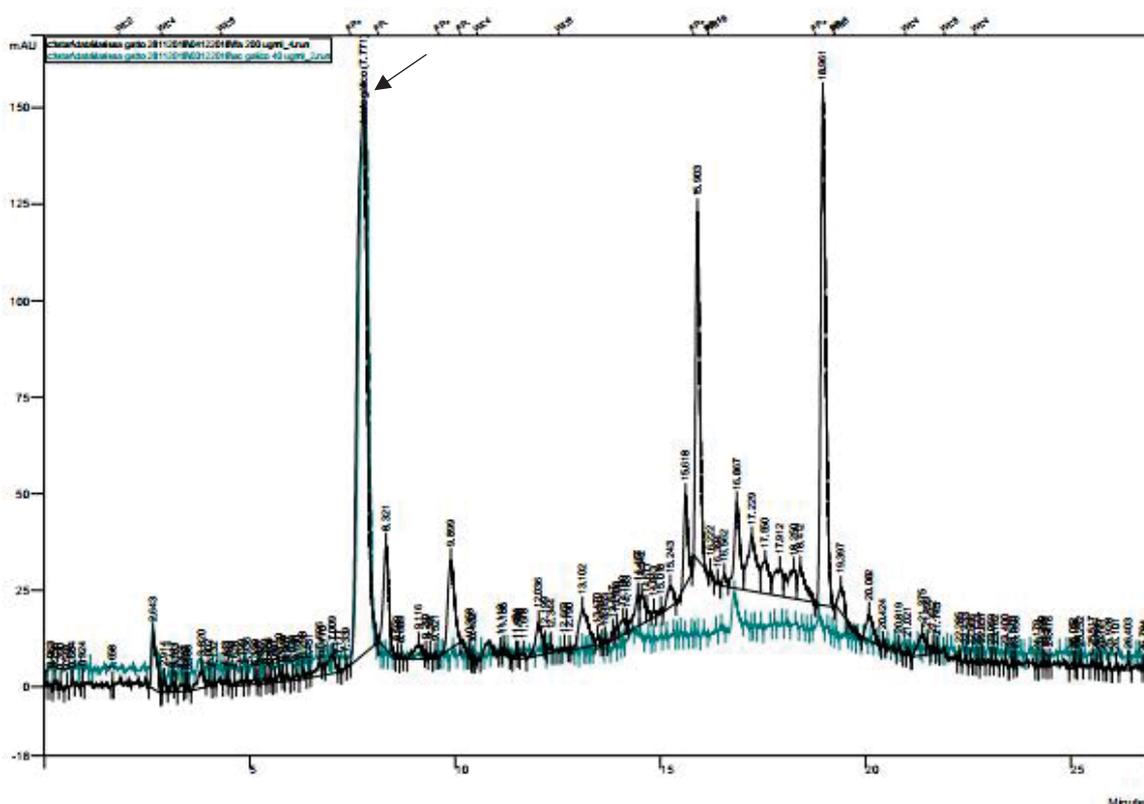
A quantificação de ácido gálico na fração acetato de etila de folhas, da qual foi isolado este composto, foi realizada utilizando CLAE.

Uma curva de sete concentrações (20,6 – 82,4 $\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico foi preparada e por regressão linear, foi plotado um gráfico que originou a seguinte equação de reta $y = 625155x - 1\text{E}+06$ ($R^2 = 0,9956$), onde a abscissa representa a concentração de ácido gálico em $\mu\text{g/mL}$ e a ordenada é a área (mAU).

A área obtida pela fração acetato de etila foi substituída pela variável “y” da equação de reta na curva de ácido gálico, obtendo a concentração final de equivalentes de ácido gálico em $\mu\text{g/mL}$ pela concentração utilizada de amostra. Partindo desta concentração, foi possível obter o resultado da quantidade em grama de EAG por g de fração: 0,1831 g EAG/g \pm 0,0058.

Com esta análise, concluiu-se que 18% da composição da fração acetato de etila de *Myrcia hatschbachii* é atribuída ao ácido gálico. A FIGURA 10 traz a sobreposição dos cromatogramas do padrão e amostra, onde foi observado que os picos correspondentes ao ácido gálico apresentaram o mesmo tempo de retenção (7,8 minutos).

FIGURA 10 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE ÁCIDO GÁLICO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Cromatograma da amostra: cor preta. Cromatograma do ácido gálico: cor azul.

4.6 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são os metabólitos mais abundantes nas plantas, e também podem ser encontrados em frutas, legumes, especiarias e cereais. Estes compostos possuem uma estrutura química comum com a presença de um anel aromático e hidroxilas como substituintes. Os principais grupos incluem flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e lignanas. Muitos estudos relatam seus efeitos como antioxidantes, antimicrobianos, anti-carcinogênicos, anti-inflamatórios, além de

também serem explorados no desenvolvimento de cosméticos, nutracêuticos ou alimentos funcionais (CONG-CONG et al., 2017).

Os resultados de doseamento dos extratos brutos e frações de *Myrcia hatschbachii* foram expressos em porcentagem e em grama EAG/g e estão demonstrados na TABELA 10.

TABELA 10 – DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSO EM g EAG/g E EM PORCENTAGEM

AMOSTRA	COMPOSTOS FENÓLICOS		
	g EAG/g ± DP	%	Teste de Tukey
FGH	0,0359 ± 0,0008	3,59	a1
FFH	0,0422 ± 0,0015	4,22	a1
FFC	0,1620 ± 0,0040	16,20	a2
FGC	0,1782 ± 0,0053	17,82	a3
EBG	0,1819 ± 0,0035	18,19	a3, a4
FGR	0,1932 ± 0,0031	19,32	a4
EBF	0,2538 ± 0,0049	25,38	a5
FFR	0,2641 ± 0,0053	26,41	a5
FGA	0,4061 ± 0,0058	40,61	a6
FFA	0,7538 ± 0,0297	75,38	a7

FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: Gramas de equivalente em ácido gálico por grama de amostra (g EAG/g), Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

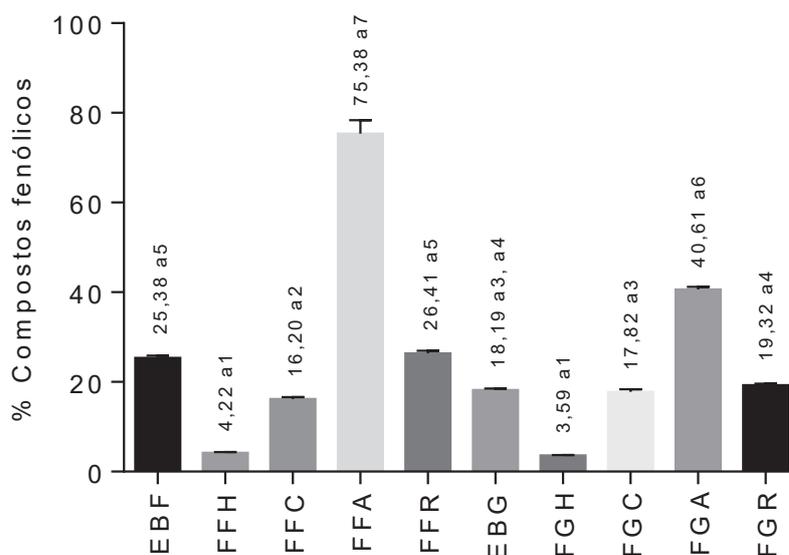
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

A quantidade de fenólicos pode ser classificada como alta ($> 0,05$ g EAG/g), média alta (0,03 a 0,05 g EAG/g), média (0,01 a 0,03 g EAG/g) e baixa ($< 0,01$ g EAG/g) (CHEW et al., 2011). Segundo esta classificação, todas as amostras, com exceção das frações hexano, apresentaram uma alta quantidade de compostos.

Extratos etanólicos de folhas de *Myrcia guianensis* apresentaram resultados de doseamento de compostos fenólicos de 0,0715 g EAG/g, já os resultados de *Myrcia fallax* e *Myrcia bella* foram de 0,2182 g EAG/g e 0,2154 g EAG/g, respectivamente (SANTOS et al., 2018), sendo bem próximos ao obtido no extrato bruto de folhas de *Myrcia hatschbachii* (0,2538 g EAG/g). Um outro estudo realizado com extratos de folhas apresentaram resultados de 0,4637 g EAG/g para *Myrcia tomentosa* e 0,3189 g EAG/g para *Myrcia lingua* (TAKAO et al., 2015).

Como observado no GRÁFICO 4, a fração acetato de etila de folhas destacou-se das demais, apresentando 75% de fenólicos na sua composição. Estudos utilizando frações do mesmo solvente mostraram resultados em torno de 8,6% para *Myrcia splendens* e 11,1% para *Myrcia palustris* (MORESCO et al., 2014), evidenciando o relevante resultado obtido pela espécie pesquisada.

GRÁFICO 4 – DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES EXPRESSO EM PORCENTAGEM



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

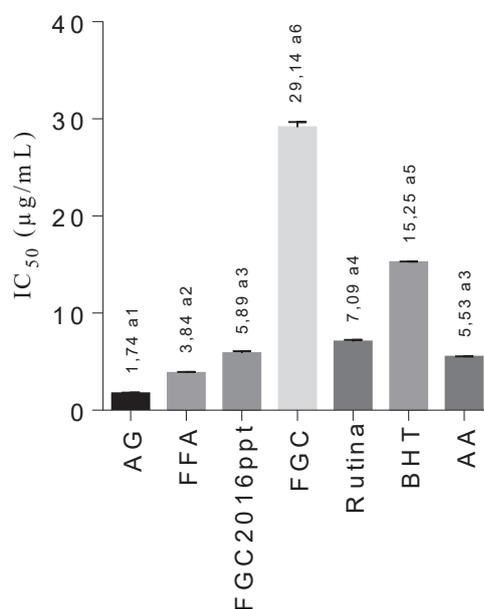
4.7 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

A propriedade antioxidante avaliada pelos métodos de radical DPPH e complexo fosfomolibdênio foi testada com os compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt) para avaliar o possível sinergismo entre essas substâncias e os resultados apresentados por suas frações de origem (GATTO, 2018). Já os métodos de FRAP e ABTS foram testados com os extratos brutos, frações, padrões e compostos isolados.

4.7.1 Radical DPPH

A IC_{50} (concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ou reduzir 50% da concentração inicial de radical DPPH) dos compostos isolados foi de 1,74 $\mu\text{g/mL}$ (grupo estatístico a1) para o ácido gálico e 5,89 $\mu\text{g/mL}$ (a3) para FGC2016ppt (GRÁFICO 5). Ambos os compostos apresentaram maior potencial antioxidante do que suas frações de origem: acetato de etila de folhas (3,84 $\mu\text{g/mL}$, a2) e clorofórmio de galhos (29,14 $\mu\text{g/mL}$, a6) (GATTO, 2018), respectivamente, mostrando que a capacidade antioxidante destas amostras de origem possivelmente está relacionada à presença dos respectivos isolados contidos nelas. Além disso, é observado que o ácido gálico e FGC2016ppt apresentaram potencial antioxidante superior ou igual aos padrões rutina (7,09 $\mu\text{g/mL}$, a4), BHT (15,25 $\mu\text{g/mL}$, a5) e ácido ascórbico (5,53 $\mu\text{g/mL}$, a3).

GRÁFICO 5 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH EXPRESSO EM IC_{50}



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}), Ácido ascórbico (AA), Ácido gálico (AG), Hidroxitolueno butilado (BHT), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt).

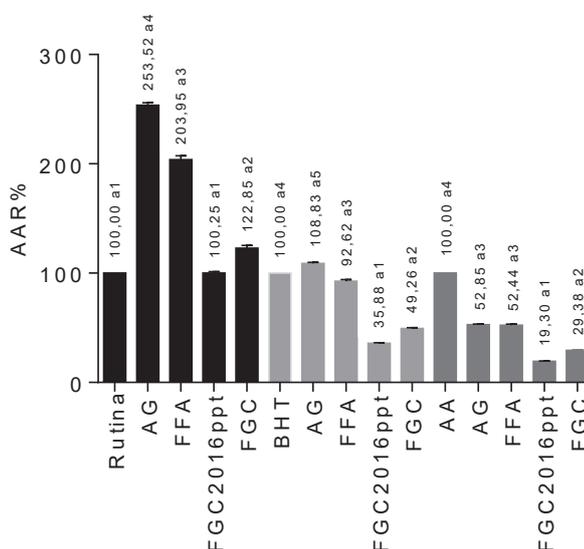
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

4.7.2 Complexo Fosfomolibdênio

Os resultados do potencial antioxidante dos compostos isolados ácido gálico e FGC2016ppt pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio podem ser observados no GRÁFICO 6.

Considerando os resultados frente a rotina (AAR: 100%, grupo estatístico a1), o ácido gálico apresentou média de atividade de 253,52% (a4), e se diferiu estatisticamente da fração acetato de etila de folhas, em que a capacidade antioxidante foi de 203,95% (a3) (GATTO, 2018). Frente ao BHT (AAR: 100%, a4), os resultados do ácido gálico (AAR: 108,83%, a5) foram estatisticamente superiores ao padrão e a sua fração de origem (AAR: 92,62%, a3) (GATTO, 2018). Já em relação ao ácido ascórbico (AAR: 100%, a9), o ácido gálico apresentou média de propriedade antioxidante de 52,85% (grupo a8), sendo este resultado bem próximo ao da fração acetato de etila de folhas (52,44%, a8) (GATTO, 2018), não apresentando diferença estatística entre eles.

GRÁFICO 6 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO EXPRESSO EM PORCENTAGEM



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Atividade antioxidante relativa (AAR%), Ácido ascórbico (AA), Ácido gálico (AG), Hidroxitolueno butilado (BHT), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

O precipitado FGC2016ppt apresentou atividade estatisticamente inferior a fração clorofórmio de galhos, da qual foi obtido este composto, frente aos três padrões

analisados. Em relação à atividade dos controles, comparado à rotina (AAR: 100%, a1), FGC2016ppt apresentou resultado de 100,25% (a1), não se diferenciando estatisticamente deste padrão. Frente ao BHT (AAR: 100%, a4), o resultado de FGC2016ppt (AAR: 35,88%, a1) foi estatisticamente inferior ao controle, assim como em relação ao ácido ascórbico (AAR: 100%, a4), em que FGC2016ppt apresentou média de propriedade antioxidante de 19,30% (a1).

4.7.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro

Os resultados do poder antioxidante de redução do ferro avaliado nos extratos brutos, frações e compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt) estão apresentados na TABELA 11 e no GRÁFICO 7.

TABELA 11 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSO EM μM DE SULFATO FERROSO/g

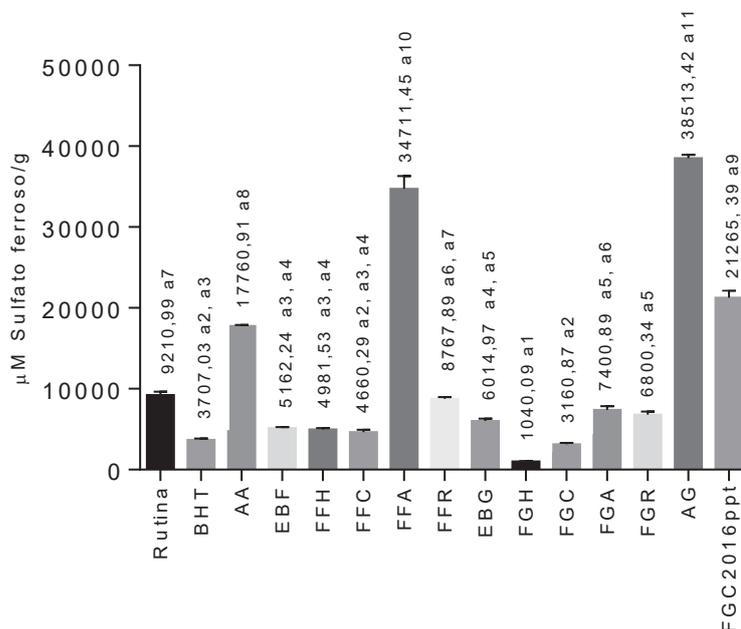
AMOSTRA	μM SF/g \pm DP	Teste de Tukey
FGH	1040,09 \pm 3,83	a1
FGC	3160,87 \pm 148,45	a2
BHT	3707,03 \pm 140,65	a2 a3
FFC	4660,29 \pm 270,35	a2 a3 a4
FFH	4981,53 \pm 158,02	a3 a4
EBF	5162,24 \pm 96,58	a3 a4
EBG	6014,97 \pm 307,42	a4 a5
FGR	6800,34 \pm 399,47	a5
FGA	7400,89 \pm 441,24	a5 a6
FFR	8767,89 \pm 199,74	a6 a7
Rutina	9210,99 \pm 439,74	a7
Ácido ascórbico	17760,91 \pm 128,32	a8
FGC2016ppt	21265,39 \pm 885,98	a9
FFA	34711,45 \pm 1599,38	a10
Ácido gálico	38513,42 \pm 413,02	a11

FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: μM Sulfato ferroso/grama de amostra (μM SF/g), Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

GRÁFICO 7 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO EXPRESSO EM μM DE SULFATO FERROSO/g



FONTE: O autor (2020).

NOTA: μM Sulfato ferroso/grama de amostra (μM SF/g), Ácido ascórbico (AA), Ácido gálico (AG), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

As amostras extrato bruto de folhas e frações clorofórmio de galhos e folhas e hexano de folhas não apresentaram diferença estatística em relação ao BHT. As demais amostras apresentaram maior potencial antioxidante do que este controle, exceto pela fração hexano de galhos, a qual a concentração em μM de sulfato ferroso foi estatisticamente inferior.

Em relação a rutina, a única amostra que se apresentou no mesmo grupo estatístico foi a fração remanescente de folhas. As demais amostras apresentaram-se em grupos estatísticos inferiores, exceto pela fração acetato de etila de folhas, a qual mostrou maior potencial antioxidante. Um perfil semelhante ocorreu quando comparados ao ácido ascórbico, todas as amostras apresentaram-se em grupos estatísticos inferiores, exceto pela fração acetato de etila de folhas.

A fração acetato de etila de folhas obtém promissores resultados quando testada frente a métodos antioxidantes. Neste método de redução do ferro não foi diferente. A amostra se mostrou mais eficaz que os controles (resultados 1,95 vezes

mais altos que o ácido ascórbico, 9,36 vezes o BHT e 3,77 vezes a rutina) e com um valor próximo ao ácido gálico, o qual apresenta uma propriedade antioxidante conhecida na literatura. Além disso, o ácido gálico foi isolado nesta fração e com isto podemos demonstrar seu sinergismo, além de apontá-lo como uma das possíveis substâncias responsáveis por esta ação antioxidante.

Para fins de comparação de resultados, este método não foi reportado na literatura para outras espécies do gênero.

4.7.4 Radical ABTS

Na TABELA 12 e GRÁFICO 8 estão apresentados os dados obtidos para extratos brutos, frações, composto isolado (ácido gálico) e controles (BHT, rutina e ácido ascórbico) conforme o método de captura do radical ABTS.

TABELA 12 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSO EM mmol DE ET/mg

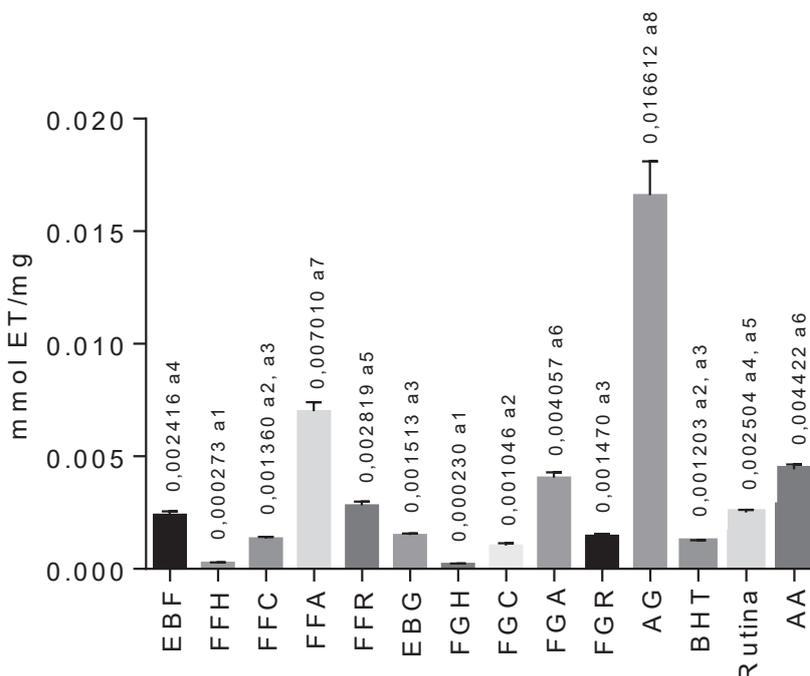
AMOSTRA	mmol ET/mg ± DP	Teste de Tukey
FGH	0,000230 ± 0,000010	a1
FFH	0,000273 ± 0,000013	a1
FGC	0,001046 ± 0,000089	a2
BHT	0,001203 ± 0,000064	a2 a3
FFC	0,001360 ± 0,000068	a2 a3
FGR	0,001470 ± 0,000081	a3
EBG	0,001513 ± 0,000064	a3
EBF	0,002416 ± 0,000143	a4
Rutina	0,002504 ± 0,000124	a4 a5
FFR	0,002819 ± 0,000167	a5
FGA	0,004057 ± 0,000239	a6
Ácido ascórbico	0,004422 ± 0,000226	a6
FFA	0,007010 ± 0,000401	a7
Ácido gálico	0,016612 ± 0,001491	a8

FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: mmol Equivalente trolox/miligramma de amostra (mmol ET/mg), Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

GRÁFICO 8 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E COMPOSTO ISOLADO PELO MÉTODO DO RADICAL ABTS EXPRESSO EM mmol ET/mg



FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: mmol Equivalente trolox/miligrama de amostra (mmol ET/mg), Ácido ascórbico (AA), Ácido gálico (AG), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
 NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

Como já esperado, a fração acetato de etila de folhas foi a que revelou maior potencial antioxidante pela captura do radical cátion (0,007010 mmol ET/mg) dentre as amostras e os controles testados (resultados 1,59 vezes mais altos que o ácido ascórbico, 5,83 vezes o BHT e 2,80 vezes a rutina). Já o ácido gálico apresentou um resultado superior (0,016612 mmol ET/mg), demonstrando novamente que possivelmente é um dos responsáveis pela ação antioxidante da fração, já que esta contém ácido gálico em sua composição.

As frações remanescente de folhas e acetato de etila de galhos se mostraram estatisticamente superiores ao BHT e rutina. Por outro lado, como também já visto nos outros métodos testados, as frações hexano foram as que mais se distanciaram estatisticamente dos controles.

Um estudo realizado com a metodologia de mesma referência (RE et al., 1999) mostrou resultados de 290 $\mu\text{mol ET/g}$ de óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia amazonica*, o qual foi comparado ao α -Tocoferol: 1510 $\mu\text{mol ET/g}$ (CALAO,

2014). O extrato bruto de galhos de *Myrcia hatschbachii* mostrou um resultado semelhante (0,001513 mmol ET/mg ou 1513 $\mu\text{mol ET/g}$) ao α -Tocoferol encontrado no estudo realizado por Calao (2014), enquanto que o extrato bruto de folhas (2416 $\mu\text{mol ET/g}$), fração remanescente de folhas (2819 $\mu\text{mol ET/g}$) e frações acetato de etila de galhos (4057 $\mu\text{mol ET/g}$) e folhas (7010 $\mu\text{mol ET/g}$) foram mais promissores.

4.7.5 Correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi avaliado entre o conteúdo de compostos fenólicos e os métodos antioxidantes: DPPH, FRAP e ABTS. Os dados estatísticos obtidos podem ser observados na TABELA 13.

TABELA 13 – CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE O DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E OS MÉTODOS ANTIOXIDANTES

AMOSTRA	CORRELAÇÃO DE PEARSON COM DPPH (r)	CORRELAÇÃO DE PEARSON COM FRAP (r)	CORRELAÇÃO DE PEARSON COM ABTS (r)
EBF	0,9710	0,9685	0,9746
FFH	0,9692	0,9708	0,9263
FFC	0,9906	0,9757	0,9753
FFA	0,9897	0,9886	0,9975
FFR	0,9845	0,9830	0,9982
EBG	0,9878	0,9713	0,9699
FGH	0,9905	0,9976	0,8402
FGC	0,9795	0,9866	0,8765
FGA	0,9948	0,9721	0,9510
FGR	0,9863	0,9734	0,8065

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Coeficiente de correlação de Pearson (r), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).

O coeficiente de correlação de Pearson (r) varia de -1 a 1, sendo que o sinal indica a relação positiva ou negativa e o valor sugere a força entre as variáveis. Quanto mais próximo de zero, menor é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. Assim como, quanto mais perto de 1 (independente do sinal), maior é a força desta relação (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009).

Uma correlação altamente positiva ($r > 0,7$) (MUKAKA, 2012) foi mostrada na espécie entre os compostos fenólicos e a propriedade antioxidante, com destaque para as frações acetato de etila, as quais apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,9 em todos os métodos antioxidantes avaliados. Assim, estes resultados indicam que a alta quantidade de fenólicos encontradas na fração acetato de etila (75% para folhas e 40% para galhos) está fortemente correlacionada com seu destacado potencial antioxidante encontrado nos diferentes métodos. Além disso, a presença de constituintes fenólicos nestas frações, como ácidos gálico (GATTO, 2018) e elágico nas folhas e ácidos 3-O-metil elágico e elágico nos galhos possivelmente também contribuem com tal propriedade.

Compostos fenólicos são importantes grupos fitoquímicos encontrados de forma onipresente nas plantas. Eles são potentes antioxidantes e sequestradores de radicais livres, podendo atuar como doadores de hidrogênio, agentes redutores, quelantes de metais e inibidores de oxigênio singlete (CHEW et al., 2011).

4.8 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

As doenças infecciosas são uma das principais causas globais de morbimortalidade, principalmente devido aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos apresentados pelos micro-organismos. Pesquisas recorrentes são realizadas para desenvolver novos medicamentos para combater e controlar esses patógenos. Nesse sentido, à luz da diversidade da flora brasileira, produtos naturais, principalmente espécies vegetais, têm sido investigados como fonte de substâncias com essas propriedades (AYRES et al., 2008).

Os compostos antimicrobianos obtidos das plantas pertencem a uma variedade de classes, como alcaloides, terpenoides, peptídeos e fenólicos (KUETE et al., 2010). Alguns fenólicos são usados como terapia alternativa contra infecções resistentes ou como novos agentes antissépticos (SANTOS et al., 2018). Nesse contexto, a família Myrtaceae vem sendo estudada por suas propriedades antimicrobianas, uma vez que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas (CRUZ; KAPLAN, 2004).

4.8.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial

Os resultados de atividade antibacteriana mostraram que o óleo essencial (GATTO, 2018) de *Myrcia hatschbachii* foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* em uma concentração de 500 µg/mL e de *Staphylococcus aureus* em 1000 µg/mL. As atividades são consideradas como moderada e fraca, respectivamente, e estas bactérias são importantes patógenos de doenças transmitidas por alimentos (JESUS et al., 2016). Os demais micro-organismos testados apresentaram uma CIM superior a 1000 µg/mL.

O óleo essencial de outras espécies do gênero já foi amplamente descrito na literatura quanto as suas ações antibacterianas. Em *Myrcia alagoensis*, o óleo apresentou atividade contra as cepas de *S. aureus* (CIM: 0,35 – 1,41 µL/mL), *Bacillus cereus* (CIM: 0,70 – 1,41 µL/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM: 0,70 - 5,63 µL/mL) (SILVA et al., 2013). Em *Myrcia myrtifolia*, o óleo mostrou-se fortemente ativo contra *S. aureus* (CIM: 0,25%) (CERQUEIRA et al., 2007). Já o óleo essencial de *Myrcia ovata* foi efetivo para *E. faecalis* (CIM: 0,031%), *Salmonella choleraesuis* (CIM: 0,5%), *S. aureus* (CIM: 0,25%) e *Streptococcus pneumoniae* (CIM: 0,0625%) (CÂNDIDO et al., 2010).

O óleo essencial de *Myrcia fallax* apresentou atividade contra *S. aureus* (CIM: 50 µg/mL) e *E. faecalis* (CIM: 400 µg/mL) (ALARCÓN et al., 2009). Já o óleo de *Myrcia splendens* foi efetivo contra *S. aureus* (CIM: 8 µg/mL), *E. faecalis* (CIM: 64 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CIM: 4 µg/mL), *Escherichia coli* (CIM: 32 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (CIM: 32 µg/mL) e *Salmonella typhi* (CIM: 4 µg/mL) (JIMÉNEZ et al., 2012).

4.8.2 Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos, frações, óleo essencial e compostos isolados

As atividades antibacteriana e antifúngica foram testadas pelo método de microdiluição em caldo, de onde foi obtida a concentração inibitória mínima capaz de impedir o crescimento microbiano. Os resultados obtidos para os extratos brutos, frações, compostos isolados (ácido gálico e FGC2016ppt) e óleo essencial (testado para *Candida albicans*) estão sumarizados na TABELA 14.

TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSA EM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

AMOSTRAS	MICRO-ORGANISMOS			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 CIM (µg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 CIM (µg/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 CIM (µg/mL)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8738 CIM (µg/mL)
EBF	62,5	500	>1000	>1000
FFH	500	500	>1000	>1000
FFC	250	1000	>1000	>1000
FFA	62,5	500	1000	>1000
FFR	62,5	500	>1000	>1000
EBG	125	1000	>1000	>1000
FGH	1000	1000	>1000	>1000
FGC	250	>1000	>1000	>1000
FGA	15,6	500	>1000	>1000
FGR	31,2	1000	>1000	>1000
OE	>1000	NA	NA	NA
AG	>1000	1000	>1000	>1000
FGC2016ppt	250	>1000	>1000	>1000

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Concentração inibitória mínima (CIM), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE), Ácido gálico (AG), Fração galho clorofórmio precipitado (FGC2016ppt).

A espécie *Myrcia hatschbachii* apresentou significativo resultado para *Candida albicans*, com destaque para as frações acetato de etila (CIM: 15,6 µg/mL) e remanescente (CIM: 31,2 µg/mL) de galhos. Apenas o óleo essencial e ácido gálico foram inativos. Estudos anteriores mostraram que extratos e frações de *Myrcia tomentosa* foram eficazes frente a várias cepas e apresentou CIM de 4 - 256 µg/mL (SA et al., 2017), enquanto que extratos brutos de folhas de *Myrcia bella* e *Myrcia fallax* apresentaram-se inativos (SANTOS et al., 2018). Na família, extratos de *Syzygium cumini* (CIM: 125 µg/mL) (PEREIRA et al., 2016), *Eucalyptus intertexta* (CIM: 62,5 µg/mL), *Eucalyptus largiflorens* (CIM: 31,2 - 125 µg/mL) (SAFAEI-GHOMI; AHD, 2010) e *Eugenia caryophyllus* (CIM: 17,41 mg/mL) (THIRACH et al., 2003) também demonstraram atividade.

O efeito antimicrobiano do gênero *Myrcia* pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis. As ações anti-infecciosas dos taninos estão relacionadas a estimulação de células fagocíticas e atividade tumoral mediada pelo hospedeiro (SANTOS et al., 2018). Alguns isolados mostraram propriedades antifúngicas, como corilagina, pelargonina B e filantusina C (CIM: 500 µg/mL)

(LATTÉ; KOLODZIEJ, 2000). De uma forma geral, os compostos fenólicos estão associados à atividade antimicrobiana de plantas aromáticas, por induzir danos na membrana fúngica, com conseqüente aumento da permeabilidade celular (SA et al., 2017).

Essa perspectiva corrobora com os resultados obtidos para *Myrcia hatschbachii*, principalmente para a fração acetato de etila de galhos, que apresentou 40% de fenólicos em sua composição, potencial antioxidante em todos os métodos testados, a melhor resposta da atividade antifúngica (CIM: 15,6 µg/mL), além da presença de taninos hidrolisáveis na triagem fitoquímica e o isolamento de precursores desses compostos (ácido elágico e ácido 3-O-metil elágico).

O efeito frente a *S. aureus* foi observado em todas as amostras da espécie, excluindo apenas a fração clorofórmio de galhos e seu precipitado (FGC2016ppt). Amostras foliares de *Myrcia tomentosa* também mostraram atividade frente a mesma cepa. Comparando as duas espécies, *Myrcia hatschbachii* mostrou efeito moderado (CIM: 500 µg/mL) para extrato bruto e frações hexano e acetato de etila, já *Myrcia tomentosa* apresentou baixa atividade (CIM: 1000 µg/mL) para o extrato bruto e fração acetato de etila, e moderada (CIM: 250 µg/mL) para a fração hexano (SA et al., 2017). Os compostos isolados da espécie, ácido elágico e ácido 3-O-metil elágico, foram previamente estudados contra esta bactéria (NOUNDOU et al., 2018), apresentaram CIM de 125 µg/mL e possivelmente contribuíram para a propriedade da fração, uma vez que foram obtidos a partir dela.

Em relação a *P. aeruginosa*, a espécie apresentou-se inativa, exceto a fração acetato de etila de folhas que mostrou fraco efeito, com CIM de 1000 µg/mL. Estudos a partir de folhas de *Myrcia tomentosa* mostraram moderada atividade (CIM: 500 µg/mL) para o extrato bruto e fração acetato de etila e fraca atividade (CIM: 1000 µg/mL) para a fração hexano (SA et al., 2017). Na família, uma forte atividade foi observada em extratos aquosos de *Eucalyptus intertexta* e *Eucalyptus largiflorens* (CIM: 31,2 µg/mL) (SAFAEI-GHOMI; AHD, 2010).

A espécie também se mostrou inativa para *E. coli*, já os extratos foliares de *Myrcia bella* e *Myrcia fallax* demonstraram atividade moderada (CIM: 300 e 250 µg/mL, respectivamente) (SANTOS et al., 2018), assim como a fração clorofórmio de *Eucalyptus largiflorens* (CIM: 125 µg/mL) (SAFAEI-GHOMI; AHD, 2010).

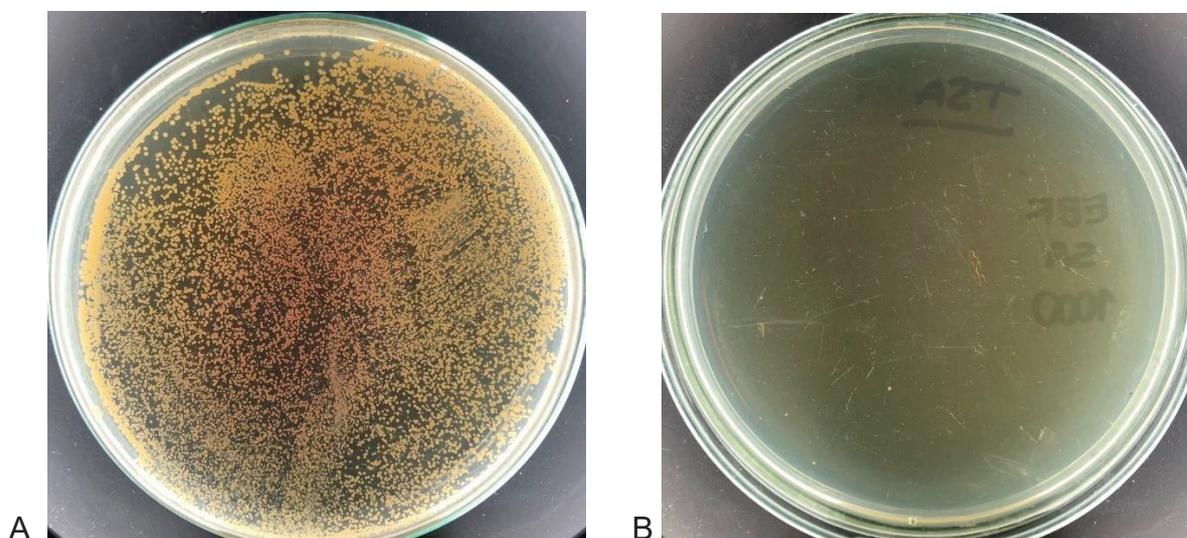
A ausência de atividade inibitória em bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) pode estar relacionada a diferenças estruturais, como presença de uma

membrana externa de peptidoglicano, presença de cápsula e porinas, entre essas bactérias e as Gram-positivas. Tais diferenças podem dificultar a ação de componentes bioativos (AYRES et al., 2008).

O teste de efeito bactericida/fungicida e bacteriostático/fungistático foi realizado para todas as concentrações de amostras em que houve inibição do crescimento microbiano. Para *C. albicans* e *P. aeruginosa* pode ser observada uma ação fungistática e bacteriostática em todas as amostras que apresentaram atividade.

A ação bacteriostática também foi observada frente ao *S. aureus* na concentração de 500 µg/mL do extrato bruto e fração acetato de etila de folhas, porém na concentração de 1000 µg/mL pode ser visualizado o efeito bactericida em ambas. Nas demais amostras testadas frente a este micro-organismo, todas as concentrações mostraram efeito bacteriostático. A FIGURA 11 demonstra o efeito bacteriostático observado na concentração de 500 µg/mL do extrato bruto e o bactericida observado na de 1000 µg/mL.

FIGURA 11 - EFEITOS BACTERIOSTÁTICO (A) E BACTERICIDA (B) OBSERVADOS NO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS



FONTE: O autor (2020).

4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados do presente estudo forneceram evidências do efeito inibitório do extrato bruto e fração acetato de etila de folhas nas atividades da α -glicosidase e lipase pancreática. Eles foram capazes de inibir ambas as enzimas em uma resposta

dose-dependente. Como medida da potência inibidora das amostras testadas, os valores de IC_{50} foram calculados a partir da atividade enzimática. Acarbose e orlistate são inibidores comerciais da α -glicosidase e lipase pancreática, respectivamente, e foram utilizados como controles positivos.

A acarbose é uma das abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento do diabetes, a qual reduz a hiperglicemia pós-prandial, inibindo as enzimas hidrolisantes (α -glicosidase) envolvidas na degradação dos carboidratos (VADIVELAN et al., 2019). Além disso, a redução da absorção de glicose também auxilia na prevenção da obesidade (LES et al., 2018). No tratamento da obesidade, o orlistate é usado como um inibidor potente e seletivo que se liga covalentemente ao local ativo das lipases gástricas e pancreáticas, reduzindo a absorção de gordura dos alimentos ingeridos (JOYCE et al., 2019). No entanto, o uso contínuo dessas drogas sintéticas está associado a efeitos colaterais, como dor abdominal, flatulência e diarreia para acarbose (LORDAN et al., 2013; PENG et al., 2016; LIMA et al., 2018) e manchas oleosas e evacuação severa para o orlistate (GONZÁLEZ et al., 2017).

Esforços têm sido direcionados para a descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais devido ao seu baixo custo, segurança relativa, probabilidade de alta conformidade e baixa incidência de efeitos colaterais indesejáveis (GONZÁLEZ et al., 2016). Produtos naturais de grande diversidade estrutural são considerados uma boa fonte para a busca de inibidores enzimáticos.

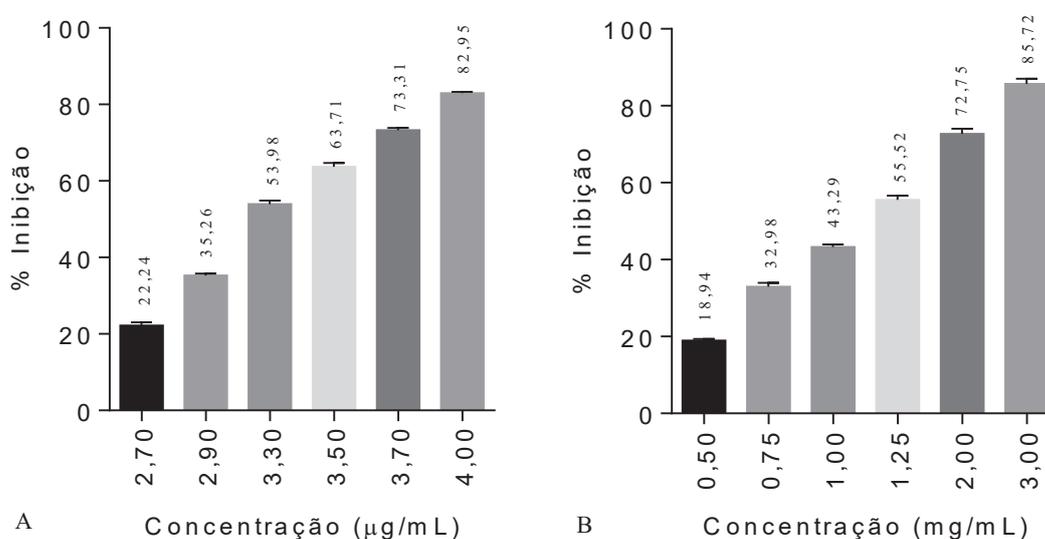
Nesse sentido, os compostos fenólicos podem inibir algumas enzimas digestivas intestinais, como lipase e α -glicosidase, modulando a biodisponibilidade de nutrientes e resultando no controle da glicemia e efeitos benéficos na obesidade (BELLESIA et al., 2014), como diferenciação inibidora de adipócitos, diminuição da síntese de ácidos graxos e aumento do gasto energético (LES et al., 2018). Além de ajudar na inibição enzimática, os compostos fenólicos também são úteis na redução do estresse oxidativo. Sabe-se que a hiperglicemia apresentada por pacientes diabéticos reduz a atividade de enzimas antioxidantes e leva à destruição do sistema de defesa antioxidante (CHEN et al., 2019).

4.9.1 α -Glicosidase

Para avaliar a atividade inibitória da enzima, foram realizadas curvas para o controle positivo acarbose, extrato bruto e fração acetato de etila de folhas. O

GRÁFICO 9 apresenta as concentrações médias testadas e as porcentagens de inibição obtidas respectivas a cada concentração, as quais foram utilizadas para a construção das curvas (TABELA 15). A partir das curvas foi calculada a IC_{50} e os resultados expressos em log da concentração e concentração (TABELA 15 e GRÁFICO 10). No controle acarbose, constatou-se por análise de covariância que as inclinações e o interceptos das retas eram equivalentes ($p > 0,05$).

GRÁFICO 9 – ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO (A) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (B) DE FOLHAS EXPRESSA EM PORCENTAGEM



FONTE: O autor (2020).

TABELA 15 – ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSA EM IC_{50}

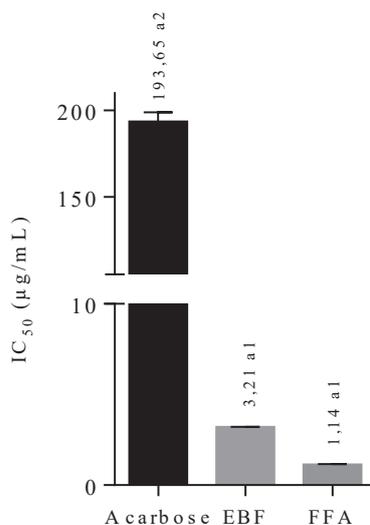
AMOSTRA	CURVA MÉDIA	R^2	$IC_{50} \pm DP$		Teste de Tukey
			Log [] $\mu\text{g/mL}$	[] $\mu\text{g/mL}$	
EBF	$y = 356,94x - 130,76$	0,9981	$0,5064 \pm 0,0013$	$3,2093 \pm 0,0093$	a1
FFA	$y = 87,966x + 44,948$	0,9964	$0,0574 \pm 0,0058$	$1,1414 \pm 0,0152$	a1
Acarbose	$y = 47,762x - 59,224$	0,9927	$2,2869 \pm 0,0117$	$193,6539 \pm 5,2369$	a2

FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}), Coeficiente de determinação (R^2), Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha acetato de etila (FFA).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

GRÁFICO 10 – ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS EXPRESSA EM IC₅₀



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC₅₀), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha acetato de etila (FFA).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

Os resultados encontrados para o extrato bruto e fração acetato de etila não apresentam diferença estatística entre si, mas diferiram significativamente da acarbose. Os extratos testados foram inibidores mais fortes da α -glicosidase que a acarbose, com 60 (extrato bruto) e 170 (fração) vezes a eficácia do controle positivo.

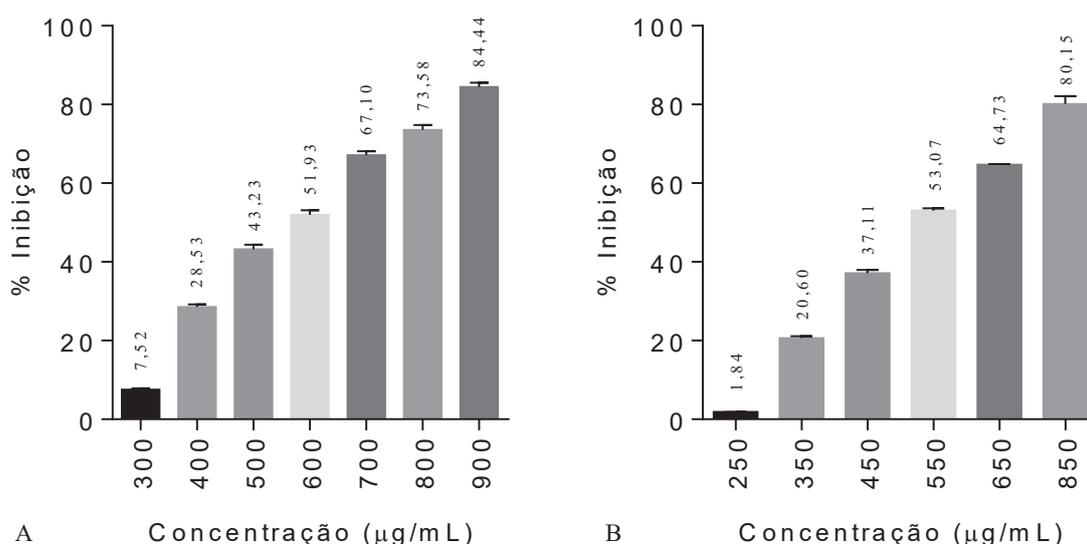
Os efeitos inibidores da α -glicosidase de *Myrcia hatschbachii* (IC₅₀: 1,1 - 3,2 µg/mL) foram muito mais fortes do que os descritos na literatura para duas espécies de Myrtaceae, *Backhousia citriodora* (IC₅₀: 130 µg/mL) e *Syzygium anisatum* (IC₅₀: 300 µg/mL) (SAKULNARMRAT; KONCZAK, 2012). Os efeitos também foram semelhantes ou mais fortes quando comparados a outros extratos de espécies do gênero, como *Myrcia salicifolia* (IC₅₀: 1,3 - 1,9 µg/mL), *Myrcia sphaerocarpa* (IC₅₀: 1,1 - 4,1 µg/mL), *Myrcia speciosa* (IC₅₀: 1,0 - 4,0 µg/mL) (GONZÁLEZ et al., 2016), *Myrcia guianensis* (IC₅₀: 7,8 µg/mL) e *Myrcia torta* (IC₅₀: 5,3 µg/mL) (LIMA et al., 2018). Todas essas espécies citadas são denominadas no Brasil de "pedra-hume-caá" ou "insulin plant" e têm uso tradicional como drogas antidiabéticas (SILVA et al., 2015).

O ácido elágico foi testado anteriormente (YIN et al., 2018) e apresentou uma IC₅₀ de 3,6 µg/mL para a α -glicosidase com uma inibição enzimática reversível e não competitiva. Relacionando os efeitos inibitórios das amostras e a identificação de ácido elágico na fração, pode-se inferir que o composto isolado possivelmente contribuiu para a atividade da espécie.

4.9.2 Lipase pancreática

Para avaliar a atividade inibitória da enzima, foram realizadas curvas para o controle positivo orlistate, extrato bruto e fração acetato de etila de folhas. O GRÁFICO 11 apresenta as concentrações médias testadas e as porcentagens de inibição obtidas respectivas a cada concentração, as quais foram utilizadas para a construção das curvas (TABELA 16). A partir das curvas foi calculada a IC_{50} e os resultados expressos em log da concentração e concentração (TABELA 16 e GRÁFICO 12). No controle orlistate, constatou-se por análise de covariância que as inclinações e o interceptos das retas eram equivalentes ($p > 0,05$).

GRÁFICO 11 - ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO (A) E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (B) DE FOLHAS EXPRESSA EM PORCENTAGEM



FONTE: O autor (2020).

TABELA 16 - ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* EXPRESSA EM IC_{50}

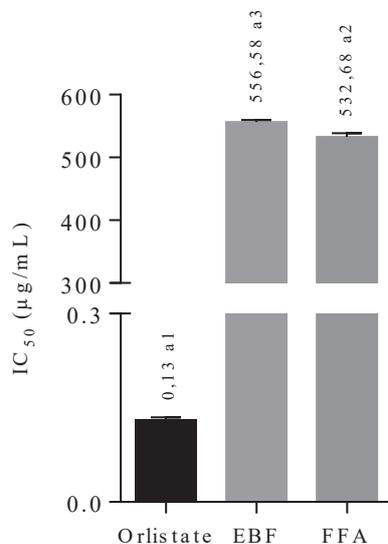
AMOSTRA	CURVA MÉDIA	R^2	$IC_{50} \pm DP$		Teste de Tukey
			Log [] µg/mL	[] µg/mL	
EBF	$y = 157,7x - 382,97$	0,9959	$2,7455 \pm 0,0024$	$556,5824 \pm 3,0656$	a3
FFA	$y = 151,28x - 362,46$	0,9969	$2,7265 \pm 0,0048$	$532,6813 \pm 5,8393$	a2
Orlistate	$y = 44,517x - 89,377$	0,9971	$-0,8844 \pm 0,0152$	$0,1305 \pm 0,0045$	a1

FONTE: O autor (2020).

NOTA 1: Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}), Coeficiente de determinação (R^2), Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha acetato de etila (FFA).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

GRÁFICO 12 - ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA EXERCIDA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS EXPRESSA EM IC₅₀



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC₅₀), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha acetato de etila (FFA).

NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

No teste estatístico, observou-se que o orlistate se diferiu do extrato bruto e da fração, assim como as amostras também se diferiram entre si. Embora seus efeitos inibitórios sejam inferiores ao orlistate, as amostras apresentam atividade especialmente em concentrações mais altas. O extrato bruto (900 µg/mL) mostrou uma inibição enzimática de cerca de 84% (GRÁFICO 11A), enquanto que a fração acetato de etila (850 µg/mL) inibiu 80% (GRÁFICO 11B).

A atividade inibitória das amostras (IC₅₀: 532 - 556 µg/mL) mostrou maior efeito em comparação com espécies da família, como *Backhousia citriodora* (IC₅₀: 2500 µg/mL) e *Syzygium anisatum* (IC₅₀: 1550 µg/mL) (SAKULNARMRAT; KONCZAK, 2012). O extrato de *Syzygium cumini* (5 mg/mL) inibiu a atividade da lipase pancreática em 32% (FRANCO et al., 2018), enquanto o extrato bruto de *Myrcia hatschbachii* (0,9 mg/mL) inibiu 84%. Não foram encontrados dados de inibição da lipase pancreática no gênero *Myrcia*.

Em um estudo realizado com o ácido elágico (LES et al., 2018), este composto apresentou efeito inibitório enzimático de IC₅₀ de 92 µg/mL para lipase pancreática. Relacionando a atividade das amostras e a identificação de ácido elágico na fração, pode-se inferir que o composto isolado possivelmente contribuiu com os resultados da espécie.

4.9.3 Correlação de Pearson

Para avaliar a correlação entre a inibição da atividade enzimática e o conteúdo de compostos fenólicos e métodos antioxidantes, foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson (TABELA 17), o qual mostrou uma correlação altamente positiva (MUKAKA, 2012) entre a inibição da atividade de ambas as enzimas e o conteúdo de compostos fenólicos, pois o coeficiente apresentou resultado superior a 0,9. Estudos anteriores com plantas medicinais também demonstraram essa correlação (SAKULNARMRAT; KONCZAK, 2012; LORDAN et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2016).

TABELA 17 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE A ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E O DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E MÉTODOS ANTIOXIDANTES

CORRELAÇÃO		EBF	FFA
Inibição da atividade enzimática x Fenólicos	α -Glicosidase x Fenólicos	0,9880	0,9951
	Lipase pancreática x Fenólicos	0,9933	0,9973
Inibição da atividade enzimática x Métodos antioxidantes	α -Glicosidase x DPPH	0,9379	0,9823
	α -Glicosidase x FRAP	0,9930	0,9797
	α -Glicosidase x ABTS	0,9836	0,9910
	Lipase pancreática x DPPH	0,9443	0,9868
	Lipase pancreática x FRAP	0,9699	0,9914
	Lipase pancreática x ABTS	0,9786	0,9966
Inibição da atividade enzimática	α -Glicosidase x Lipase pancreática	0,9900	0,9872

FONTE: O autor (2020).

NOTA: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha acetato de etila (FFA).

As interações moleculares de compostos fenólicos e enzimas digestivas, como α -glicosidase e lipase pancreática, mostraram que a ligação não covalente, principalmente as forças de van der Waals, ligação de hidrogênio, ligação hidrofóbica e outras forças eletrostáticas, são a chave para a inibição enzimática. Uma maior capacidade de ligação e inibição dessas enzimas está relacionada principalmente à estrutura dos compostos fenólicos, como número de grupos hidroxila, presença de glicosilação, posição e número de unidades glicosil e complexidade estrutural. Em alguns casos, a presença de um grupo hidroxila fenólico extra pode modificar o efeito dos fenólicos na catálise. Outros aspectos que influenciam essa interação são a composição da enzima (número de aminoácidos polares e hidrofóbicos, e peso

molecular) e as características da reação (pH, temperatura e tempo de incubação) (GONZÁLEZ et al., 2017).

Uma correlação altamente positiva também foi apresentada entre a inibição da atividade das enzimas e os métodos antioxidantes. Esta associação justifica os resultados obtidos pela espécie, trazendo benefícios complementares, uma vez que o diabetes tipo 2 está relacionado ao aumento do estresse oxidativo. A hiperglicemia causa a liberação de espécies reativas de oxigênio prejudiciais aos tecidos, bem como distúrbios dos sistemas de defesa antioxidante, como alteração na enzima antioxidante e metabolismo prejudicado da glutathione (MURUGAN; PARI, 2006).

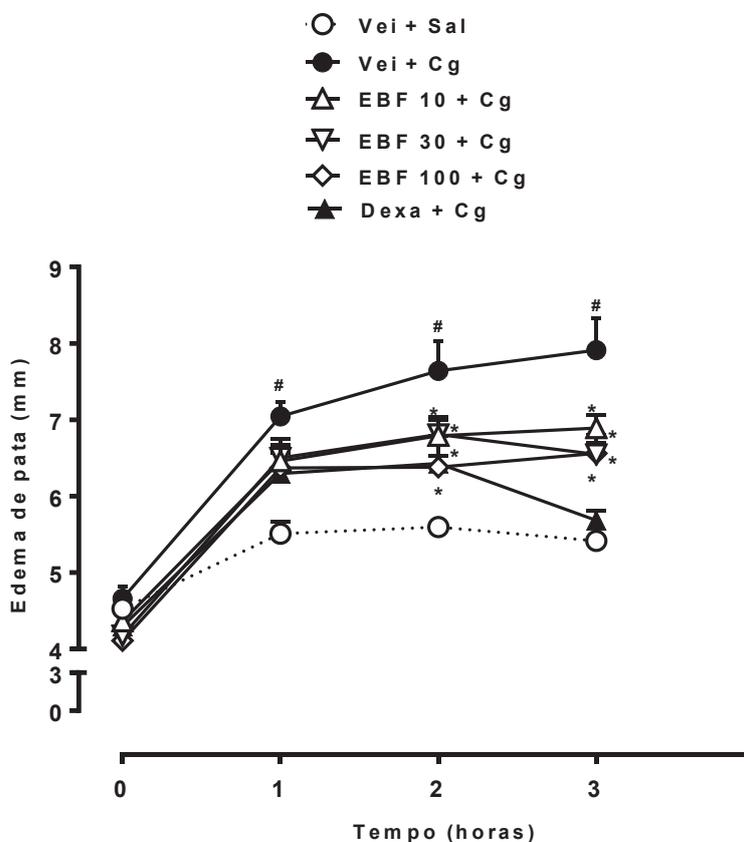
4.10 ESTUDO FARMACOLÓGICO

4.10.1 Avaliação do efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina

O efeito do tratamento com extrato bruto de folhas (em doses de 10, 30 ou 100 mg/kg), veículo (salina) ou dexametasona no edema de pata induzido por carragenina pode ser observado no GRÁFICO 13. A análise de variância de duas vias, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com veículo estimulados com carragenina ou tratados somente com salina, demonstrando formação de edema de pata ipsilateral após 1, 2 ou 3 horas à injeção de carragenina.

Além disso, o teste de Bonferroni mostrou que o tratamento com o extrato bruto (em todas as doses analisadas) atenuou o edema da pata na 2ª e 3ª hora após a injeção de carragenina ($p < 0,05$), sendo estes períodos considerados como o pico de ação edematogênica desta substância. Já o edema da pata no grupo tratado com dexametasona também foi significativamente diferente em comparação com o grupo tratado com veículo e carragenina na 2ª e 3ª hora após a injeção de carragenina ($p < 0,05$).

GRÁFICO 13- ESPESSURA DA PATA MEDIDA ANTES E 1, 2 E 3 HORAS APÓS A INJEÇÃO DE CARRAGENINA OU SALINA



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Os animais foram tratados com veículo (vei ou sal; solução salina; 1 mL/kg), extrato bruto (EBF; 10, 30 ou 100 mg/kg) ou dexametasona (dexa; 1mg/kg) 1h antes da injeção de carragenina (Cg; 200 µg/pata em 0,1mL de salina).

Os dados representam a média ± EPM de 8-9 animais/grupo experimental. (#) indica $p < 0,05$ comparando Vei + Cg e Vei + Sal. (*) indica $p < 0,05$ comparando Vei + Cg e EBF 10, 30 ou 100 + Cg; e Vei + Cg e Dexa + Cg. ANOVA de duas vias (fatores independentes: tratamento e tempo), seguida de *post-hoc* de Bonferroni.

O edema da pata induzido por carragenina (FIGURA 12) é um modelo de inflamação aguda que produz uma resposta bifásica: a primeira fase (variando de 0 a 60 minutos após a administração da carragenina) é caracterizada pela liberação de substâncias como histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a segunda fase (de 1, 2 e 3 horas) é caracterizada por um aumento na produção e liberação de prostaglandinas, bem como espécies reativas de oxigênio de neutrófilos migratórios (DI ROSA et al., 1971). Essa resposta inflamatória aguda é geralmente inibida por AINEs, como indometacina, ou corticoides, como a dexametasona, e esses efeitos foram atribuídos à inibição da liberação de mediadores inflamatórios e da expressão tecidual da ciclooxygenase-2 (NANTEL et al., 1999).

FIGURA 12 - EDEMA DE PATA FORMADO APÓS INJEÇÃO DE CARRAGENINA



FONTE: O autor (2020).

O potencial anti-inflamatório de preparações de outras espécies de *Myrcia* já tem sido demonstrado previamente. Assim, foi observado que o óleo essencial de *Myrcia ovata* (nas doses de 200 e 300 mg/kg) inibiu o edema de pata induzido por carragenina (SANTOS et al., 2014).

Ademais, a atividade anti-inflamatória demonstrada pelo extrato bruto corrobora com os estudos *in vivo* que comprovam esta propriedade no ácido elágico (AE). No presente estudo, este composto foi isolado da fração acetato de etila, obtida a partir do extrato bruto. Foi observado que após a administração de AE, houve a diminuição do grau de inflamação associado à colite experimental induzida por dextrano sulfato de sódio (LARROSA et al., 2010). Outro estudo revelou que, após a administração de AE, houve uma atenuação significativa da inflamação macroscópica, e da gravidade e extensão das lesões intestinais induzidas pelo ácido trinitrobenzenossulfônico, o qual mimetiza um modelo experimental de doença inflamatória intestinal e reproduz características clínicas e morfológicas proeminentes da doença de Crohn (ROSILLO et al., 2011, 2012).

Foi observado também que o AE auxilia na artrite reumatoide, uma artropatia inflamatória crônica. Um estudo explorou os potenciais efeitos antiartríticos do ácido cafeico e do ácido elágico na artrite induzida por adjuvante, em comparação com o celecoxib. Os ácidos cafeico e elágico atenuaram a gravidade da artrite com eficácia comparável a substância referência. Ambos os agentes mitigaram efetivamente o edema das patas e a infiltração inflamatória de células e protegeram os tecidos articulares contra a formação de pannus (tecido inflamatório sinovial em proliferação).

Os compostos também suprimiram o estresse oxidativo sérico por meio da diminuição de peróxidos lipídicos e óxido nítrico (FIKRY et al., 2019).

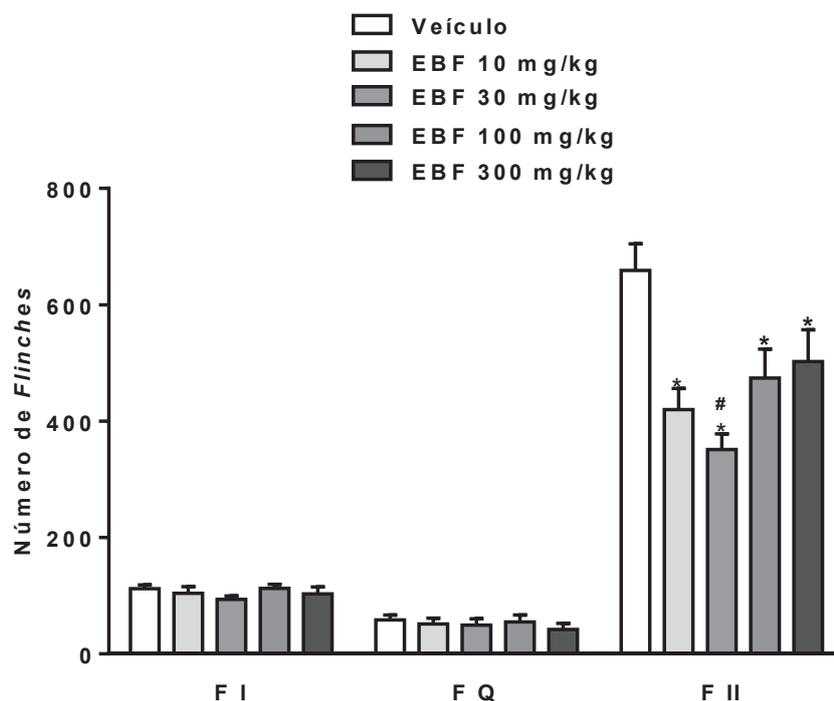
4.10.2 Avaliação do efeito antinociceptivo no teste da formalina

O extrato bruto de folhas foi testado frente a nocicepção induzida por formalina, analisando o número de *flinches* total durante a primeira e segunda fase do teste (GRÁFICO 14).

Na fase I, não foi observada diferença estatística entre o número de *flinches* contabilizados no grupo controle (veículo) e nos grupos tratados com extrato bruto (nas quatro doses testadas).

No entanto, quando avaliados os comportamentos nociceptivos exibidos durante a fase II, houve uma notável redução no número de *flinches* nos grupos tratados com extrato bruto quando comparados ao grupo veículo. Estatisticamente, a média de *flinches* nos grupos tratados com extrato nas doses de 10, 100 e 300 mg/kg não se diferiu entre si, mas foi estatisticamente menor quando comparado a média do grupo controle. Em relação a porcentagem de inibição do comportamento nociceptivo provocado pela formalina nesta fase, a inibição do número de *flinches* quando comparada ao grupo controle foi de 36,33% para a dose de 10 mg/kg, 46,74% para a dose de 30 mg/kg, 28,06% para a dose de 100 mg/kg e 23,79% para a dose de 300 mg/kg, sendo a dose de 30 mg/kg diferente estatisticamente das doses de 100 ou 300 mg/kg.

GRÁFICO 14 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NAS FASES I, QUIESCENTE E II



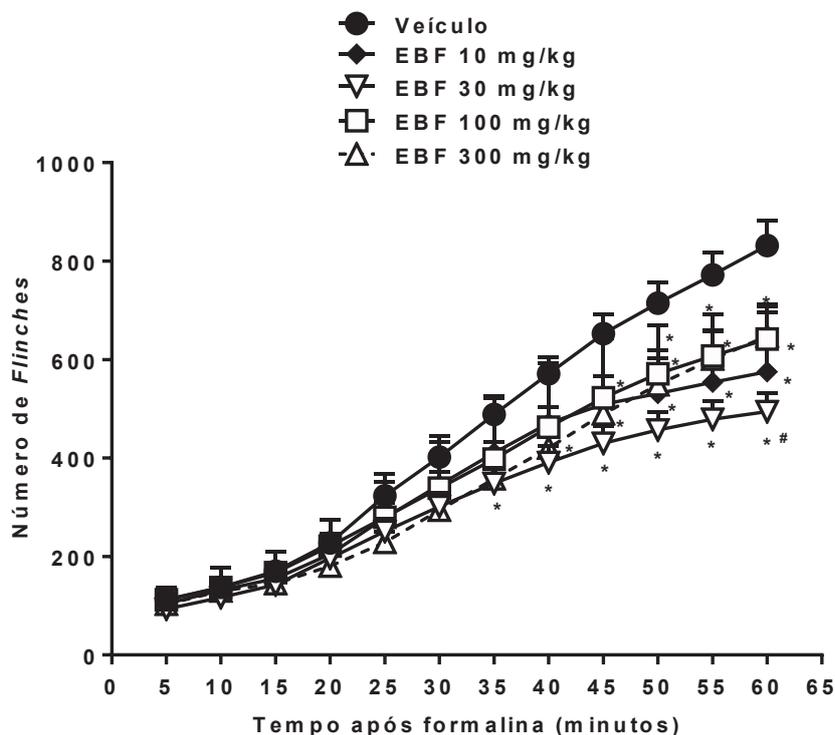
FONTE: O autor (2020).

NOTA: Os animais foram tratados com veículo (solução salina; 1 mL/kg) ou extrato bruto (EBF; 10, 30, 100 ou 300 mg/kg) 1h antes da injeção de formalina 2,5% (50 µL/pata) e avaliados quanto ao número total de *flinches* exibidos durante a fase I (F I: 0–5 minutos), fase quiescente (FQ: 6–15 minutos) e fase II (F II: 16–60 minutos).

Os dados representam a média \pm EPM de 8-10 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ comparando o veículo aos grupos tratados. (#) indica $p < 0,05$ comparando a dose de 30 mg/kg com as doses de 100 e 300 mg/kg. ANOVA de duas vias (fatores independentes: tratamento e tempo), seguida de *post-hoc* de Bonferroni.

No efeito do extrato bruto avaliado a partir da frequência de *flinches* realizados no decurso temporal do teste (GRÁFICO 15), é possível observar que o grupo tratado com extrato na dose de 30 mg/kg passou a mostrar efeito antinociceptivo comparado ao grupo controle a partir de 35 minutos do início do teste. O mesmo ocorreu com a dose de 300 mg/kg a partir de 40 minutos, dose de 10 mg/kg a partir de 45 minutos e dose de 100 mg/kg a partir de 50 minutos. Comparando os grupos tratados com o extrato, a dose de 30 mg/kg se diferenciou estatisticamente das doses de 100 ou 300 mg/kg no tempo de 60 minutos.

GRÁFICO 15 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE FOLHAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NO DECORRER DE 60 MINUTOS



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Os animais foram tratados com veículo (solução salina; 1 mL/kg) ou extrato bruto (EBF; 10, 30, 100 ou 300 mg/kg) 1h antes da injeção de formalina 2,5% (50 µL/pata) e avaliados quanto ao número de *flinches* cumulativamente contados ao longo dos 60 minutos.

Os dados representam a média \pm EPM de 8-10 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ comparando o veículo aos grupos tratados. (#) indica $p < 0,05$ comparando a dose de 30 mg/kg com as doses 100 e 300 mg/kg. ANOVA de duas vias (fatores independentes: tratamento e tempo), seguida de *post-hoc* de Bonferroni.

O teste de formalina possui um padrão bifásico e é caracterizado por duas fases distintas de comportamento nociceptivo, o qual avalia na primeira fase a analgesia de origem neurogênica (nível central) e na segunda fase a dor de origem inflamatória (nível periférico) (HUNSKAAR et al., 1985). O teste da formalina é considerado um modelo mais válido para a dor clínica do que os testes com estimulação mecânica ou térmica (AMARAL et al., 2007).

Os comportamentos nociceptivos de sacudir e/ou lamber a pata estimulada neste teste durante a primeira fase resultam da estimulação química direta de fibras aferentes nociceptivas (mielinizadas e não mielinizadas) pela formalina (CAMPOS et al., 2002; AMARAL et al., 2007).

É descrito na literatura que os comportamentos nociceptivos exibidos durante a segunda fase resultam da liberação de mediadores inflamatórios nos tecidos periféricos e de alterações funcionais nos neurônios do corno dorsal espinal

(CAMPOS et al., 2002; AMARAL et al., 2007). Assim, esta fase é conhecida como fase inflamatória.

O padrão de comportamentos nociceptivos exibidos durante o teste da formalina permite que o mesmo seja amplamente utilizado como uma ferramenta para indicar possíveis mecanismos de ação antinociceptivos bem como seus sítios de ação periférico e/ou central (PACHECO et al., 2019). Fármacos que atuam principalmente no sistema nervoso central inibem as duas fases igualmente, enquanto drogas anti-inflamatória de ação periférica inibem apenas a segunda fase (SANTOS et al., 2014).

Estudos prévios da literatura já demonstraram que o tratamento com o óleo essencial de folhas de *Myrcia pubiflora* (em todas as doses testadas: 25, 50 ou 100 mg/kg) inibiu significativamente a resposta nociceptiva durante a segunda fase do teste de formalina em camundongos, indicando ação antinociceptiva periférica (ANDRADE et al., 2012). Ademais, o tratamento com óleo essencial de folhas de *Myrcia ovata* (doses de 200 e 300 mg/kg) reduziu significativamente o tempo que os ratos passaram lambendo a pata após a injeção de formalina tanto na primeira (58 e 59%, respectivamente) quanto na segunda fase (52 e 54%, respectivamente) (SANTOS et al., 2014).

O óleo essencial de folhas de *Myrcia rostrata* reduziu de forma significativa o tempo de lambidas e mordidas na pata dos camundongos na fase I (neurogênica) nas doses 150 e 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle (veículo). Na fase II (inflamatória), as três doses (75, 150 e 300 mg/kg) foram capazes de inibir o tempo total gasto em lambidas (SILVA et al., 2018). O extrato hidroalcolico de folhas de *Myrcia bella* não apresentou redução significativa no tempo de lambida na fase neurogênica nas doses testadas (125, 250, 375 mg/kg). Porém na fase inflamatória, a dose de 250 mg/kg reduziu em 32,3% a resposta a dor quando comparada ao grupo veículo (NUNES, 2012).

5 CONCLUSÃO

O material vegetal foi coletado (aproximadamente 4,9 kg de folhas e 2,7 kg de galhos) no Capão do Cifloma, localizado no Campus Jardim Botânico da UFPR e ocorreu no mesmo local e período (entre os meses de abril e maio) que a coleta de 2016. O material seco e triturado resultou em 2,4 kg de folhas e 1,5 kg de galhos.

As análises físico-químicas foram realizadas por métodos gravimétricos, obtendo resultados de umidade de 13,37% para folhas e 10,62% para galhos. Já os resultados de cinzas totais foram de 7,76% para folhas e 4,24% para galhos. Em relação a análise termogravimétrica, o perfil de degradação térmica das folhas e galhos apresentaram um comportamento semelhante, com quatro perdas de massa em atmosfera de argônio. Neste estudo, constatou-se que as folhas apresentaram estabilidade térmica até 124°C, e galhos até 134°C, o que garante confiabilidade térmica nos processos de extração à quente.

Os extratos brutos foram obtidos por Soxhlet em solvente etanol e demonstraram rendimento de 10,03% para folhas e 3,19% para galhos. As frações também foram extraídas por Soxhlet utilizando solventes de polaridades crescentes: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O screening fitoquímico foi realizado com o objetivo de identificar os principais metabólitos dos extratos brutos e frações provenientes das coletas de 2016 e 2018. A pesquisa foi feita por CCD utilizando diferentes fases móveis e reveladores de acordo com a classe fitoquímica. Todas as amostras de ambas as coletas foram positivas para taninos e flavonoides.

O ácido elágico foi isolado das frações clorofórmio e acetato de etila e identificado por RMN tanto nas folhas quanto nos galhos. As principais atividades relatadas na literatura para este composto são anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. O ácido 3-O-metil elágico foi isolado da fração acetato de etila de galhos, identificado por RMN e apresenta propriedades antimicrobianas. Ambos os compostos foram isolados pela primeira vez na espécie *Myrcia hatschbachii*, sendo que o ácido 3-O-metil elágico foi identificado pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

O ácido gálico previamente identificado (GATTO, 2018) foi quantificado por CLAE na fração acetato de etila de folhas, a qual foi isolado este composto. Com esta análise, foi estabelecido que o ácido gálico representa 18% da composição da fração.

O doseamento de compostos fenólicos foi feito pelo método de Folin-Ciocalteu e mostrou que todas as amostras, com exceção das frações hexano, apresentaram uma alta quantidade de compostos ($> 0,05$ g EAG/g), com destaque para a fração acetato de etila de folhas com 75% de fenólicos na sua composição.

A capacidade antioxidante avaliada pelos métodos do radical DPPH e complexo fosfomolibdênio foi realizada com o ácido gálico para demonstrar que a relevante propriedade da fração acetato de etila de folhas está possivelmente relacionada à presença desta substância que está contida nela.

Os métodos de FRAP e radical ABTS reafirmaram a capacidade antioxidante exercida pelos extratos brutos e frações demonstradas nos métodos anteriormente testados (radical DPPH e fosfomolibdênio) (GATTO, 2018). O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma forte relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e os métodos de DPPH, FRAP e ABTS.

As atividades antibacteriana e antifúngica foram testadas pelo método de microdiluição em caldo, de onde foi obtida a CIM capaz de impedir o crescimento microbiano. Extratos brutos, frações e óleo essencial apresentaram atividades frente a diferentes micro-organismo, especialmente a *Candida albicans* com resultados de CIM de 15,6 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$ para as frações acetato de etila e remanescente de galhos, respectivamente. O efeito bactericida pode ser observado na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ das amostras foliares de extrato bruto e fração acetato de etila frente ao *Staphylococcus aureus*.

Os resultados de inibição da atividade de α -glicosidase para extrato bruto e fração acetato de etila de folhas foram estatisticamente superiores do que o apresentado pela acarbose. E, embora os efeitos inibitórios da lipase pancreática tenham sido inferiores ao orlistate, ambas as amostras apresentam atividade especialmente em concentrações mais altas. O coeficiente de Pearson mostrou uma correlação positiva alta entre a inibição da atividade das enzimas e o conteúdo de compostos fenólicos e métodos antioxidantes.

No estudo farmacológico foram testadas as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos. O tratamento com extrato bruto de folhas nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, por via oral, mostrou potencial anti-inflamatório, pois atenuou o edema de pata na 2ª e 3ª hora após a injeção de carragenina. O extrato também apresentou efeito na segunda fase da nocicepção induzida por formalina nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg, sendo eficaz na dor de origem inflamatória (nível periférico).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família Myrtaceae é reconhecida pela sua diversidade química, propriedades biológicas e produção de frutos e óleo essencial. O gênero *Myrcia* é explorado quanto aos seus usos populares, especialmente como hipoglicemiantes, e metabólitos secundários, como taninos e flavonoides.

A continuidade da pesquisa de *Myrcia hatschbachii* possibilitou explorar estas características do gênero. O extrato bruto e fração acetato de etila de folhas apresentou melhor resultado de inibição *in vitro* da enzima α -glicosidase quando comparado ao fármaco de referência, acarbose. Isso demonstra que possivelmente a espécie também tenha propriedades hipoglicemiantes *in vivo*, assim como revelado em estudos com outros exemplares do gênero, bem como as espécies do grupo “pedra-hume-caá” (*Myrcia puniceifolia*, *Myrcia speciosa*, *Myrcia amazonica*, *Myrcia citrifolia*, *Myrcia guianensis*, *Myrcia salicifolia*, *Myrcia sylvatica* e *Myrcia uniflora*), conhecidas por este uso popular.

Além disso, o isolamento de compostos precursores de taninos, como ácido elágico e ácido 3-O-metil elágico corrobora com os metabólitos mais comumente encontrados no gênero, e incentivou o estudo *in vivo* da atividade anti-inflamatória, já que o ácido elágico se tornou conhecido por esta propriedade.

De acordo com estes resultados, assim como a pronunciada capacidade antioxidante exercida em diferentes métodos, a espécie *Myrcia hatschbachii* se mostra promissora para o aprofundamento de estudos que possibilitem o desenvolvimento de futuros medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN, L. D.; PEÑA, A. E.; GONZALES, C. N.; QUINTERO, A.; MEZA, M.; USUBILLAGA, A.; VELASCO, J. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia falax* (Rich.) DC. from Venezuela. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 75, p. 221–227, 2009.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ALVES, M. F.; NIZIO, D. A. C.; SAMPAIO, T. S.; NASCIMENTO JUNIOR, A. F.; BRITO, F. A.; MELO, J. O.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; MACHADO, S. M. F.; BLANK, A. F. *Myrcia lundiana* Kiaersk native populations have different essential oil composition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 266–273, 2016.
- AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; ARAÚJO, F. L. D.; SOUZA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1217- 1220, 2007.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANDRADE, G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTANA, M. T.; SIQUEIRA, R. S.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. S.; SOBRAL, M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 181–188, 2012.
- AYRES, M. C. B.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. 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.
- BATISTA, A. N. L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I. C.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S; REIMBERG, M. C. H. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 402–406, 2011.
- BELLESIA, A.; VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHI, D. Pomegranate ellagitannins inhibit α -glucosidase activity *in vitro* and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1-8, 2014.

BFG - The Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2018.

BOEHNING, A. L.; ESSIEN, S. A.; UNDERWOOD, E. L.; DASH, P. K.; BOEHNING, D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 411-418, 2018.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância, 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Agência Nacional de Vigilância, 2019.

BUSTO, R.; SERNA, J.; PERIANES-CACHERO, A.; QUINTANA-PORTILLO, R.; GARCÍA-SEISDEDOS, D.; CANFRÁN-DUQUE, A.; PAINO, C. L.; LERMA, M.; CASADO, M. E.; MARTÍN-HIDALGO, A.; ARILLA-FERREIRO, E.; LASUNCIÓN, M. A.; PASTOR, Ó. Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. **BBA Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 9, p. 958-967, 2018.

CALAO, V. Y. P. **Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Brasil.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, p. 116-120, 2002.

CÂNDIDO, C. S.; PORTELLA, C. S. A.; LARANJEIRA, B. J.; SILVA, S. S.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, M. P. S.; GOMES, A. G.; ALMEIDA, P. C.; CARVALHO, C. B. M. Effects of *Myrcia ovata* Cambess, essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 4, p. 621-627, 2010.

CARVALHO, J. L. S. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Ciências Farmacêuticas, Curitiba, Brasil.

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

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTOS, L. S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881–904, 2015.

CERQUEIRA, M. D. **Estudo Fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (Berg.) Legrand. (Myrtaceae)**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; GUEDES, M. L. S.; RIVELINO, R.; CRUZ, F. G. Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1421–1423, 2013.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CHAO, P.; HSU, C.; YIN, M. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, n. 33, p. 1-8, 2009.

CHEN, J.; ZHANG, X.; HUO, D.; CAO, C.; LI, Y.; LIANG, Y.; LI, B.; LI, L. Preliminary characterization, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from *Mallotus furetianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, n. 1, p. 307-315, 2019.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA, USA, 8. ed., 2008.

CONG-CONG, X.; BING, W.; YI-QIONG, P.; JIAN-SHENG, T.; TONG, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004.

DÁVALOS, J. Z.; LIMA, C. F. R. A. C.; SANTOS, L. M. N. B. F.; ROMERO, V. L.; LIEBMAN, J. F. Thermochemical and structural studies of gallic and ellagic acids. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 129, p. 108-113, 2019.

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

DONADO-PESTANA, C. M.; MOURA, M. H. C.; ARAUJO, R. L.; SANTIAGO, G. L.; BARROS, H. R. M.; GENOVESE, M. I. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 42–49, 2018.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ERTAM, I.; MUTLU, B.; UNAL, I.; ALPER, S.; KIVÇAK, B.; OZER, O. Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: A randomized, prospective, open-label study. **Journal of Dermatology**, v. 35, p. 570–574, 2008.

FEHLBERG, I. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Antimicrobianas e Antiparasitárias das Substâncias Isoladas de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae)**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

FERREIRA, A. C. F.; NETO, J. C.; SILVA, A. C. M.; KUSTER, R. M.; CARVALHO, D. P. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 351–355, 2006.

FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; FELIPE, K. B.; CORREIA, J. F. G.; FERREIRA, E. C.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C. Potent hepatoprotective effect in CCl₄-induced hepatic injury in mice of phloracetophenone from *Myrcia multiflora*. **Lybian Journal of Medicine**, v. 5, 2010.

FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; REBELLO, J. M.; CORREIA, J. F. G.; OLIVEIRA, L. F. S.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, p. 1569–1574, 2011.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r)*. **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.

FIKRY, E. M.; GAB, A. M.; EID, A. H.; ARAB, H. H. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 878-886, 2019.

FRANCO, D. M.; SALDANHA, L. L.; SILVA, E. M.; NOGUEIRA, F. T. S.; DOKKEDAL, A. L.; SANTOS, C.; ALMEIDA, L. F. R. Effects of leaf extracts of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.: on growth and gene expression during root development of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 237–248, 2015.

FRANCO, R. R.; CARVALHO, D. S.; MOURA, F. B. R.; JUSTINO, A. B.; SILVA, H. C. G.; PEIXOTO, L. G.; ESPINDOLA, F. S. Evaluation of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activities of some medicinal plants used in type-2 Diabetes Mellitus and its anti-glycation and antioxidant roles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 140-146, 2018.

FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. Optimisation of edible chitosan coatings formulations incorporating *Myrcia ovata* Cambessedes essential oil with antimicrobial potential against foodborne bacteria and natural microflora of mangaba fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 1-10, 2017.

GATTO, L. J. **Estudo fitoquímico, morfoanatômico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes da espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, Myrtaceae**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Ciências Farmacêuticas, Curitiba, 2018.

GATTO, L. J.; FABRI, N. T.; SOUZA, A. M.; FONSECA, N. S. T.; FURUSHO, A. S.; MIGUEL, O. G.; DIAS, J. F. G.; ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D. Chemical composition, phytotoxic potential, biological activities and antioxidant properties of *Myrcia hatschbachii* D. Legrand essential oil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1-9, 2020a.

GATTO, L. J.; VEIGA, A.; GRIBNER, C.; MOURA, P. F.; RECH, K. S.; MURAKAMI, F. S.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. *Myrcia hatschbachii*: antifungal activity and structural elucidation of ellagic and 3-O-methyl ellagic acids. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2020b.

GONZÁLEZ, A. I. M.; SÁNCHEZ, A. G. D.; ROSA, L. A. L.; REQUENA, C. L. V.; JAIMES, I. B.; PARRILLA, E. A. Polyphenolic Compounds and Digestive Enzymes: *In Vitro* Non-Covalent Interactions. **Molecules**, v. 22, p. 1-27, 2017.

GONZÁLEZ, M. F.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 322-327, 2016.

GORIPARTI, S.; HARISH, M. N. K.; SAMPATH, S. Ellagic acid – A Novel Organic Electrode Material for High Capacity Lithium Ion Batteries. **Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications**, 2013.

GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 3, p. 1185, 1972.

GULDBRANDSEN, N.; MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T.; WIEBE, C.; DICKHAUT, J.; REINGRUBER, R.; SORGENFREI, O.; HAMBURGER, M. Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, p. 353–367, 2014.

GUPTA, P.; MOHAMMAD, T.; KHAN, P.; ALAJMI, M. F.; HUSSAIN, A.; REHMAN, M. T.; HASSAN, M. I. Evaluation of ellagic acid as an inhibitor of sphingosine kinase 1: A targeted approach towards anticancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 1-12, 2019.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of neuroscience methods**, v.14, p. 69-76, 1985.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A. P.; GUALTIERI, S. C. J.; MOLINILLO, J. M. G.; LACRET, R.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29–35, 2013.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MIRANDA, M. A. F. M.; GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 241-248, 2015.

JESUS, I. C.; FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 142-147, 2016.

JIMÉNEZ, D.; ARAQUE, M.; ROJAS, L.; CORDERO, A.; BRICEÑO, B. Componentes volátiles y actividad antibacteriana del vástago de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. **Revista da Faculdade de Farmácia**, v. 54, p. 7–11, 2012.

JOYCE, A.; DENING, T. J.; MEOLA, T. R.; GUSTAFSSON, H.; KOVALAINEN, M.; PRESTIDGE, C. A. Nanostructured clay particles supplement orlistat action in inhibiting lipid digestion: An *in vitro* evaluation for the treatment of obesity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 135, p. 1–11, 2019.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, n. 76, p. 1479–1491, 2010

LARROSA, M.; SARRÍAS, A. G.; GÁSCON, M. J. Y.; SELMA, M. V.; ORTUÑO, M. A.; TOTI, S.; BARBERÁN, F. T.; DOLARA, P.; ESPÍN, J. C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 717–725, 2010.

LATTÉ, K. P.; KOLODZIEJ, H. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, p. 467–472, 2000.

LEMOS, V. O. T.; LUCENA, E. M. P.; BONILLA, O. H.; EDSON-CHAVES, B.; CASTRO, M. A.; SAMPAIO, V. S. Ecological anatomy of *Eugenia luschnathiana* (O.Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks. (Myrtaceae) leaves in the Restinga region, state of Ceara. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 5, p.1-14, 2018.

LES, F.; MAINAR, J. M. A.; VALERO, M. S.; LÓPEZ, V. Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, p. 67-74, 2018.

LIMA, M. A. A.; OLIVEIRA, F. F. M.; GOMES, G. A.; LAVOR, P. L.; SANTIAGO, G. M. P.; NAGAO-DIAS, A. T.; ARRIAGA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; CARVALHO, M. G. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 11716–11720, 2011.

LIMA, R. C. L.; KATO, L.; KONGSTAD, K. T.; STAERK, D. Brazilian insulin plant as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPENMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 444–451, 2018.

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

LORDAN, S.; SMYTH, T. J.; SOLER-VILA, A.; STANTON, C.; ROSS, P. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2170–2176, 2013.

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

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, VI and V. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 429–431, 2002.

MEHRZADI, S.; BAHRAMI, N.; MEHRABANI, M.; MOTEVALIAN, M.; MANSOURI, E.; GOUDARZI, M. Ellagic acid: A promising protective remedy against testicular toxicity induced by arsenic. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1464-1472, 2018.

MENDES, L. A.; SOUZA, T. S.; MENINI, L.; GUILHEN, J. H. S.; BERNARDES, C. O.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Spring alterations in the chromatographic prolife of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 295–302, 2018.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEIT O, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEIT O S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, D. E.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. 2003. Apostila da disciplina de Fitoquímica – Universidade Federal do Paraná, Farmácia, Curitiba, 2003.

MIURA, T.; MIZUTANI, Y.; ISHIDA, T. Antidiabetic effect of the herb *Myrcia speciosa* in KK-Ay diabetic mice. **Traditional Medicine Journal**, v. 23, p. 16-18, 2006.

MONTES, A.; WEHNER, L.; PEREYRA, C.; OSSA, E. J. M. Generation of microparticles of ellagic acid by supercritical antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 101-110, 2016.

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

MORESCO, H. H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L. C.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2014.

MURUGAN, P.; PARI, L. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 79, p. 1720-1728, 2006.

MUKAKA, M. M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.

NAKAI, M.; FUKUI, Y.; ASAMI, S.; TOYODA-ONO, T.; IWASHITA, T.; SHIBATA, H.; MITSUNAGA, T.; HASHIMOTO, F.; KISO, Y. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4593-4598, 2005.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 853–859, 1999.

NEVES, N. A.; STRINGHETA, P. C.; ALONSO, S. G.; GUTIÉRREZ, I. H. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 252, p. 61-71, 2018.

NOUNDOU, X. S.; NDINTEH, D. T.; OLIVIER, D. K.; MNKANDHLA, D.; ISAACS, M.; MUGANZA, F. M.; MBAFOR, J. T.; VUUREN, S. F. V.; PATNALA, S.; HOPPE, H.; KRAUSE, R. W. M. Biological activity of plant extracts and isolated compounds from *Alchornea laxiflora*: Anti-HIV, antibacterial and cytotoxicity evaluation. **South African Journal of Botany**, v. 122, p. 498-503, 2018.

NUNES, V. V. A. **Avaliação do efeito do extrato hidroalcolólico de *Myrcia bella* Cambess na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais de roedores**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, São Paulo.

- OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, C. A. Inhibition of alpha-amylase by “insulin plant” (*Myrcia sphaerocarpa* DC) extracts: an alternative for the treatment of diabetes mellitus? **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 5, p. 089-093, 2015.
- OLIVEIRA, R. F.; GONÇALVES, G. A.; INÁCIO, F. D.; KOEHNLEIN, E. A.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Journal Nutrients**, v. 7, p. 5601-5614, 2015.
- PACHECO, S. D. G.; GASPARIN, A. T.; JESUS, C. H. A.; SOTOMAIOR, B. B.; VENTURA, A. C. S. S. B.; REDIVO, D. D. B.; CABRINI, D. A.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNHA, J. M. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Bixin, a Carotenoid Extracted from the Seeds of *Bixa orellana*. **Planta Medica**, v. 85, p. 1216-1224, 2019.
- PENG, X.; ZHANG, G.; LIAO, Y.; GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. **Food Chemistry**, n. 190, p. 207-215, 2016.
- PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats. **Diabetes Research**, v. 22, n. 2, p. 49-57, 1993.
- PEREIRA, A. C.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, E. A. S.; SILVA, M. N.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Inhibition of α -Glucosidase and Hypoglycemic Effect of Stilbenes from the Amazonian Plant *Degueliarufescens* v r. urucu (Ducke) A.M.G. Azevedo (Leguminosae). **Planta Medica**, v. 78, p. 36–38, 2012.
- PEREIRA, J. V.; FREIRES, I. A.; CASTILHO, A. R.; CUNHA, M. G.; ALVES, H. S.; ROSALEN, P. L. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 2312–2319, 2016.
- PONTES, F. C.; ABDALLA, V. C. P.; IMATOMI, M.; FUENTES, L. F. G.; GUALTIERI, S. C. J. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. **Brazilian Journal of Biology**, p. 1-6, 2018.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.
- RANADE, A. N.; RANPISE, N. S.; RAMESH, C. To investigate the pharmacokinetic profile of ellagic acid in presence of *Aloe vera* gel powder in rabbits using validated HPLC method. **Synergy**, v. 2, p. 25-30, 2015.
- RAPOSO, J. D. A.; FIGUEIREDO, P. L. B.; SANTANA, R. L.; SILVA JUNIOR, A. Q.; SUEMITSU, C.; SILVA, R.; MOURÃO, R. H. V.; MAIA, J. G. S. Seasonal and circadian study of the essential oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC., a valuable aromatic species occurring in the Lower Amazon River region. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 79, p. 21–29, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, R.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; EVANS, C. R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, M. C. M.; BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; MOURÃO, R. H. V.; CONCEIÇÃO, E. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 45, p. 9–12, 2016.

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

ROSILLO, M. A.; HIDALGO, M. S.; CÁRDENO, A.; LA LASTRA, C. A. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 737–745, 2011.

ROSILLO, M. A.; HIDALGO, M. S.; CÁRDENO, A.; SOTO, M. A.; FIDALGO, S. S.; VILLEGAS, I.; LA LASTRA, C. A. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. **Pharmacological Research**, v. 66, p. 235– 242, 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 125, ISSN 1679-6535, 2006.

SA, F. A. S.; PAULA, J. A. M.; SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G. A. R.; LIÃO, L. M.; PAULA, J. R.; SILVA, M. R. R. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. Leaves. **Molecules**, v. 22, 2017.

SACCOL, E. M. H.; CEPA, I. J.; OURIQUE, G. M.; PÊS, T. S.; GRESSLER, L. T.; MOURÃO, R. H. V.; RODRÍGUEZ, G. M.; MANCERA, J. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; STICHA, J. A. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 150-160, 2018.

SACCOL, E. M. H.; LONDERO, E. P.; BRESSAN, C. A.; SALBEGO, J.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. V. F.; MOURÃO, R. H. V.; OLIVEIRA, R. B.; LLESUY, S. F.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, p. 555-566, 2017.

SAFAEI-GHOMI, J.; AHD, A. A. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, 2010.

SAIFUDDIN, N.; RAZIAH, A. Z. Enhancement of Lipase Enzyme Activity in Non-Aqueous Media through a Rapid Three Phase Partitioning and Microwave Irradiation. **Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 864-871, 2008.

SAKULNARMRAT, K.; KONCZAK, I. Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and *in vitro* inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1011–1019, 2012.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SALVADOR, M. J.; LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C.; STEFANELLO, M. E. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SAMPAIO, T. S.; NIZIO, D. A. C.; WHITE, L. A. S.; MELO, J. O.; ALMEIDA, C. S.; ALVES, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; SOBRAL, M. E. G.; BLANK, A. F. Chemical diversity of a wild population of *Myrcia ovata* Cambessedes and antifungal activity against *Fusarium solani*. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p.196–209, 2016.

SANTANA, C. B.; SOUZA, J. G. L.; CORACINI, M. D. A.; WALERIUS, A. H.; SOARES, V. D.; COSTA, W. F.; PINTO, F. G. S. Chemical composition of essential oil from *Myrcia oblongata* DC and potential antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (DEGEER, 1778). **Bioscience Journal**, v. 34, n. 4, p. 996-1009, 2018.

SANTOS, A. O.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, C.; GALAVERNA, R. S.; ANGOLINI, C. F. F.; NUNES, V. V. A.; ALMEIDA, L. F. R.; RUIZ, A. I. T. G.; CARVALHO, J. E.; DUARTE, R. M. T.; DUARTE, M. C. T.; EBERLIN, M. N. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. **Molecules**, v. 23, 2018.

SANTOS, G. C. M.; GOMES, G. A.; GONÇALVES, G. M.; SOUSA, L. M.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Essential oil from *Myrcia ovata*: Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. **Planta Medica**, v. 80, p. 1588–1596, 2014.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural** v. 37, p. 803–808, 2007.

SCALVENZI, L.; GRANDINI, A.; SPAGNOLETTI, A.; TACCHINI, M.; NEILL, D.; BALLESTEROS, J. L.; SACCHETTI, G.; GUERRINI, A. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) Essential Oil from Amazonian Ecuador: A Chemical Characterization and Bioactivity Profile. **Molecules**, v. 22, 2017.

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; VILEGAS, W.; LÓPEZ, W. M.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. In normal and tumor gastric cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 345-355, 2015.

SHAN, X.; LIU, X.; HAO, J.; CAI, C.; FAN, F.; DUN, Y.; ZHAO, X.; LIU, X.; LI, C.; YU, G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249-255, 2016.

SILVA, A. N. **Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais em espécies do gênero *Myrcia* D. C. (Myrtaceae).** 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Biotecnologia, Feira de Santana, Brasil.

SILVA, A. N.; BOMFIM, H. F.; MAGALHÃES, A. O.; ROCHA, M. L.; LUCCHESI, A. M. Composição química e atividade antinociceptiva em modelo animal do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae). **Química nova**, v. 41, n. 9, p. 982-988, 2018.

SILVA, A. N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESI, A. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 2, p. 269 – 27, 2013.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007.

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

SILVA, F. K. S.; ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S.; ZOGHBI, M. G. B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 5, n. 1, p. 7–15, 2015.

SILVA, N. V. P.; DONATO, A. M. Morpho-anatomy of the leaf of *Myrciaria glomerata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 275–280, 2016.

SILVA, P. D. **Compostos fenólicos e terpenos de *Myrcia hiemalis* e *Myrcia myrtifolia* (Myrtaceae)**. 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, Brasil.

SILVA, S. M.; KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; PERALTA, R. A.; SOUZA, C. G. M.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; PERALTA, R. M. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão o coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

SILVA, V. P.; ALVES, C. C. F.; MIRANDA, M. L. D.; BRETANHA, L. C.; BALLESTE, M. P.; MICKE, G. A.; SILVEIRA, E. V.; MARTINS, C. H. G.; AMBROSIO, M. A. L. V.; SILVA, T. S.; TAVARES, D. C.; MAGALHÃES, L. G.; SILVA, F. G.; EGEA, M. B. Chemical composition and leishmanicidal, *in vitro* antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 638–645, 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOBRAL, M. **A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Unisinos, 2003.

SOUSA, L. A. F.; MOURA, V. M.; RAPOSO, J. D. A.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, R. B.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, R. N. M.; SILVA, A. M. M.; ARANHA, E. P.; SUEMITSU, C.; GUERRA, C. E.; CHALKIDIS, H. M.; PACHECO, S.; MOURÃO, R. H. V. The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 42, p. 3139–3146, 2013.

SOUZA, A. P. S. F.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Inhibition of pancreatic lipase by extratcts of *Baccharis trimera*: avaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 450-455, 2011.

STEFANELLO, M. E. A.; RIVA, D.; SIMIONATTTO, E. L.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SALVADOR, M. J. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil from *Myrcia laruotteana* fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 7–10, 2011.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, L.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOLGIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 120-132, 2015.

TENORIO, A. I. S.; VARGAS, D.; ESPINOSA, A.; DÍAZ, A.; GUPTA, M. P. Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Calyptranthes microphylla* B. Holts & M.L., *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Krug & Urb from Panama. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p.29-33, 2011.

THIRACH, S.; TRAGOOLPUA, K.; PUNJAISEE, S. Antifungal Activity of Some Medicinal Plant Extracts Against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Acta horticulturae**, v. 597, p. 217-221, 2003.

TONG, W. Y.; WANG, H.; WAISUNDARA, V. Y.; HUANG, D. Inhibiting enzymatic starch digestion by hydrolyzable tannins isolated from *Eugenia jambolana*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 59, p. 389-395, 2014.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, ISBN 978-85-85658-62-5, 2016.

VADIVELAN, R.; KRISHNAN, R. G.; KANNAN, R. Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2019.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018.

VAREDA, P. M. P.; SALDANHA, L. L.; CAMAFORTE, N. A. P.; VIOLATO, N. M.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

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

VENÂNCIO, A. M.; ONOFRE, A. S. C.; LIRA, A. F.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M.; ESTEVAM, C. S.; ARAUJO, B. S. Chemical Composition, Acute Toxicity, and Antinociceptive Activity of the Essential Oil of a Plant Breeding Cultivar of Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Planta Medica**, v. 77, p. 825-829, 2011.

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. p. 298-299 e 319-319.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p. 1-112, 1963.

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. C.; STAERK, D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE– NMR: α -Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 246-252, 2015.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L. M. G.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, v. 19, p. 16039-16057, 2014.

YIN, P.; YANG, L.; XUE, Q.; YU, M.; YAO, F.; SUN, L.; LIU, Y. Identification and inhibitory activities of ellagic acid- and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α -glucosidase, α -amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viability. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 1247–1259, 2018.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. II. Aldose Reductase and α -Glucosidase Inhibitors from Brazilian Natural Medicine, the Leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of Myrciacitrins I and II and Myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 11, p. 113-119, 1998.

ZHENG, D.; LV, C.; SUN, X.; WANG, J.; ZHAO, Z. Preparation of a supersaturatable self-microemulsion as drug delivery system for ellagic acid and evaluation of its antioxidant activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p.1-9, 2019.

ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE PELO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL



Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Superintendência de Obras e Serviços
Departamento de Produção Vegetal
Divisão do Museu Botânico Municipal

Curitiba, 26 de abril de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaro para os fins que se fizerem necessários que, em 26 de abril de 2016, determinei por comparação com o exemplar tombado neste herbário sob número 72379, o exemplar de *Myrcia hatschbachii* D.Legrand, coletado por Larissa Junqueira Gatto, Natasha Tiemi Fabri, Obdulio Gomes Miguel e Paulo Sérgio Diniz, em 07/04/2016, no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, coordenadas 25°26'S e 49°14'W.

Por ser verdade, firmo a presente.

JOSÉ TADEU WEIDLICH MOTTA
Curador do Herbário MBM

ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA/BIO – UFPR N° 1322



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

N° 1322

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução N° 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution N° 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.064678/2019-61

APROVADO/APPROVAL: 22/10/2019 – R.O. 09/2019

TÍTULO: Estudo dos potenciais efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato bruto de folhas de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand.

TITLE: Study of the potential anti-inflammatory and antinociceptive effects of crude extract of leaves from *Myrcia hatschbachii* D. Legrand.

AUTORES/AUTHORS: Joice Maria da Cunha, Carlos Henrique Alves Jesus, Larissa Junqueira Gatto, Caroline Gribner, Paula Françoise Moura, Evelize Stacoviaki Rosa, Alexia Tamara Gasparin.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO, em 20/12/2019, às 02:09, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador 2397823 e o código CRC 5C2DC27E.