

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAROLINA CERIANI SAULLE

ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE FOLHAS E CAULES E ANÁLISE  
QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Eucalyptus saligna* Sm.(MYRTACEAE)

PONTA GROSSA

2018

CAROLINA CERIANI SAULLE

ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE FOLHAS E CAULES E ANÁLISE  
QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Eucalyptus saligna* Sm.(MYRTACEAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel  
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2018

**Ficha  
Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S256 Saulle, Carolina Ceriani  
Análise morfoanatômica de folhas e caules e análise química e biológica do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* Sm. (Myrtaceae) / Carolina Ceriani Saulle. Ponta Grossa, 2018.  
97f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Manfron Budel.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Atividade antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Morfoanatomia. 5. Óleo essencial. I. Budel, Jane Manfron. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

CDD: 616.01

CAROLINA CERIANI SAULLE

ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE FOLHAS E CAULES E ANÁLISE  
QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Eucalyptus saligna* Sm.(MYRTACEAE)

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

Ponta Grossa, 16 de março de 2018.

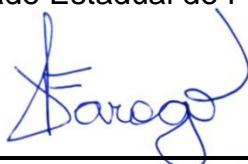


---

Profa. Dra. Jane Manfron Budel – Orientadora

Doutora em Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual de Ponta Grossa

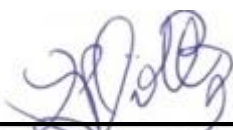


---

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Coorientador

Doutor em Química

Universidade Estadual de Ponta Grossa

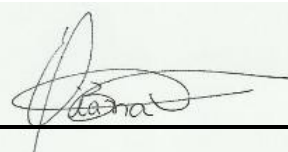


---

Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin

Doutora em Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual de Ponta Grossa



---

Profa. Dra. Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo

Doutora em Engenharia de Produção

Universidade Federal Tecnológica do Paraná

Dedico este trabalho à minha mãe Carla, que batalhou muito para que  
eu pudesse chegar até aqui.  
Aos meus avós, Roberto e Valdéria (*in memoriam*).  
Aos meus tios, César e Kátia.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me manteve de pé iluminando e abençoando meus passos.

À minha amada mãe Carla, que sempre foi minha base, minha força e que me deu todas as condições para que eu chegasse até aqui.

À professora Dra. Jane Manfron Budel, pela orientação, confiança, paciência e apoio em todos os momentos. Obrigada por me incentivar a ser cada vez melhor.

Ao professor Dr. Paulo Vitor Farago, por sempre ter me ajudado e apoiado, desde os tempos da graduação até hoje. Professor e pessoa incrível, um exemplo para mim.

À professora Dra. Débora Maria Borsato, pela ajuda, apoio e paciência durante meu trabalho. Obrigada também pelas nossas conversas e por compartilhar suas experiências de vida comigo. Sinto um carinho enorme por você.

Ao professor Dr. Luís Antonio Esmerino, por me ajudar com os testes antimicrobianos, sempre me apoiando. Muito obrigada.

À professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, pela paciência, confiança, apoio, amizade e disposição para me ajudar com os testes citotóxicos. Sinto falta da rotina do laboratório.

Ao especialista Thiago Bevilacqua Flores, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pela identificação da espécie.

À técnica do laboratório de farmacognosia Luciane Mendes Monteiro, que sempre me ajudou quando precisei e me apoiou durante toda realização deste trabalho.

À minha amiga e colega de mestrado Izabel Pietczak Migacz, pela amizade e companheirismo.

Ao aluno de iniciação científica Adrian Vriesman G. de Oliveira, pela amizade e auxílio na pesquisa morfoanatômica.

Ao Laboratório Multiusuário (c-LABMU) pela MEVEC e EED.

À Capes pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

*Eucalyptus saligna* Sm. é uma árvore nativa do sudeste da Austrália. No Sul do Brasil seu principal uso está relacionado a utilização da madeira. Entretanto, estudos morfoanatômicos da espécie, químicos e biológicos envolvendo o óleo essencial são escassos. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da morfoanatomia das folhas e caules a fim de auxiliar na identificação desse táxon e na diferenciação das demais espécies de *Eucalyptus*, bem como determinar a composição química, investigar a atividade antioxidante, o efeito antimicrobiano e o potencial citotóxico do óleo essencial de *E. saligna* cultivado nos Campos Gerais. O material botânico foi coletado no campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Paraná, Brasil). A partir dos métodos usuais de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura, foram evidenciados estômatos anomocíticos em ambas as faces do limbo foliar de *E. saligna*, ausência de tricomas, mesofilo isobilateral, nervura mediana levemente biconvexa em ambas as faces, idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio, cavidades secretoras contendo óleo essencial, pecíolo com sistema vascular em arco aberto. Além disso, um caule com formato arredondado, colênquima angular, cavidades secretoras, cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio. Por meio de hidrodestilação de folhas e caules, obteve-se um teor de 1,03% de óleo essencial. Os principais componentes do óleo essencial de *E. saligna* identificados por CG-EM foram o *p*-cimeno (28,90%) e a criptona (17,22%). A atividade antioxidante total do óleo essencial, pelo método do fosfomolibdênio, foi superior a determinada para a rutina. Porém, através dos métodos do radical livre DPPH e do ABTS, o potencial antioxidante observado foi baixo. O óleo essencial de *E. saligna* apresentou um efeito antimicrobiano frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Candida albicans*, por meio dos métodos de difusão em disco e difusão em meio sólido utilizando cavidades. Quanto à citotoxicidade avaliada pelo método do MTT, o óleo essencial de *E. saligna* mostrou-se citotóxico tanto para as células Calu-3, como para as células 3T3. Não apresentando assim, seletividade contra as células tumorais em estudo.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. Citotoxicidade. Morfoanatomia. Óleo essencial.



## ABSTRACT

*Eucalyptus saligna* Sm. is a tree native to southeastern Australia. Its main use is related with the wood. However, morpho-anatomical studies of this species, chemical and biological involving its essential oil are scarce. The objective of the present work was to study the morphology of leaves and stems, as well as to determine the chemical composition, to investigate the antioxidant activity, the antimicrobial effect and the cytotoxic potential of the essential oil of *E. saligna*. The botanical material was collected on the campus of the State University of Ponta Grossa (Paraná, Brazil). From the usual methods of optical microscopy and scanning electron microscopy, anomocytic stomata were evident on both sides of the leaf of *E. saligna*, absence of trichomes, isobilateral mesophyll, midrib with a biconvex shape on both sides, idioblasts with calcium oxalate prismatic crystals, secretory cavities containing essential oil, petiole with open arch vascular system. In addition, a rounded-shaped stem, angular collenchyma, secretory cavities, calcium oxalate prismatic crystals and druses were observed. The yield of essential oil extracted by hydrodistillation from leaves and stems was 1.03%. The main compounds of essential oil of *E. saligna* were *p*-cymene and cryptone. The total antioxidant activity of the essential oil, by the phosphomolybdenum method, was superior to that determined for the routine. However, through the free radical DPPH and ABTS methods, the antioxidant potential observed was low. The essential oil of *E. saligna* showed an antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* strains, using both methods of disc diffusion and diffusion in solid-medium by plate-cavities. As for the cytotoxicity assessed by the MTT method, essential oil of *E. saligna* presented to be cytotoxic for both cells, Calu-3 and 3T3. Considering these results, additional studies can be recommended, in order to use the essential oil of *E. saligna* as raw material for the pharmaceutical industry.

Key words: Antimicrobial activity. Antioxidant activity. Cytotoxicity. Morfoanatomy. Essential oil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Árvore adulta de <i>Eucalyptus saligna</i> .....	25
FIGURA 2- Aparato de Clevenger utilizado na extração de óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> .....	37
FIGURA 3- Folhas e caules de <i>Eucalyptus saligna</i> em estufa para secagem .....	38
EQUAÇÃO 1- Cálculo da porcentagem de inibição do DPPH• .....	40
FIGURA 4- Molécula de DPPH. Mecanismo de reação com um antioxidante através da transferência de um elétron .....	40
EQUAÇÃO 2- Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico .....	41
EQUAÇÃO 3- Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante pelo método do ABTS•+ .....	41
FIGURA 5- Modelo ilustrativo do plaqueamento de células para determinação da citotoxicidade.....	45
EQUAÇÃO 4- Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	46
FIGURA 6- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae (A) Aspecto geral de um ramo florido. (B) Face adaxial (ad) das folhas adultas. (C) Face abaxial (ab) das folhas adultas .....	47
FIGURA 7- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. (A) Secção paradérmica da folha, face adaxial, evidenciando os estômatos anomocíticos (es) e o formato poliédrico das células epidérmicas. (B) Secção paradérmica da folha, face abaxial, indicando os estômatos anomocíticos. (C) Face adaxial da folha, evidenciando estômatos (es) em microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEVEC). (D) Face abaxial da folha, mostrando estômatos (es) e cera epicuticular (ce) – MEVEC .....	49
FIGURA 8- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da lâmina foliar, expondo o aspecto geral do mesofilo isobilateral, com destaque para cavidade oleífera (cv), óleo essencial (oe), cutícula (ct), epiderme (ep), parênquima esponjoso (pe) e parênquima paliçádico (pp). (B) Detalhe da figura anterior, destacando cavidade oleífera (cv), cutícula (ct), epiderme (ep), parênquima esponjoso (pe) e parênquima paliçádico (pp). (C) Detalhe da cavidade oleífera (cv), evidenciando o óleo essencial (oe) e também a cutícula (ct), podendo-se observar epiderme (ep) e parênquima paliçádico (pp). (D) Por menor do mesofilo, indicando uma drusa (dr) e os parênquimas esponjoso (pe) e paliçádico (pp) .....	51
FIGURA 9- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da nervura mediana da folha, indicando a cutícula (ct), colênquima (co), bainha esclerenquimática (es), xilema (xi), parênquima paliçádico (pp) e cavidade oleífera (cv). (B) Detalhe do feixe vascular, com destaque para a bainha esclerenquimática (es), xilema (xi) e floema (fl). (C) Cristal prismático de oxalato de cálcio no interior de um idioblasto (pr). (D) Secção transversal da nervura mediana da folha, evidenciando a cutícula (ct), epiderme uniestratificada (ep), colênquima (co), cristais prismáticos (pr), bainha esclerenquimática (es), floema (fl) e xilema (xi). (E) Secção	

transversal da nervura mediana da folha, evidenciando a cutícula (ct), epiderme (ep), colênquima (co), cristais prismáticos (pr), bainha esclerenquimática (es) e floema (fl).....	53
FIGURA 10- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da porção mediana do pecíolo. (B) Secção transversal da porção distal do pecíolo (MEVEC). (C) Detalhe da cavidade oleífera, observando-se também o colênquima (co), cavidade oleífera (cv), esclerênquima (es) e floema (fl). (D) Detalhe da epiderme (ep), cutícula (ct), colênquima (co) e cristal prismático (pr). (E) Detalhe do cristal prismático de oxalato de cálcio (pr) .....	55
FIGURA 11- <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. (A) Visão geral do caule. (B) Detalhe da região cortical do caule, evidenciando a cutícula (ct), epiderme uniestratificada (ep), colênquima (co), cavidades oleíferas (cv) e óleo essencial (oe). (C) Secção transversal da região xilemática e medular, indicando o xilema (xi) e a medula (me). (D) Detalhe da cavidade oleífera (cv), epiderme (ep), cutícula (ct) e cristais prismáticos (pr). (E) Cristais prismáticos de oxalato de cálcio, detalhe do cristal prismático (pr) (MEVEC) .....	57
FIGURA 12- Espectro de EDS de um cristal prismático de <i>Eucalyptus saligna</i> .....	59
FIGURA 13- Espectro de EDS de uma drusa de <i>Eucalyptus saligna</i> .....	59
FIGURA 14 - Caracterização histoquímica de <i>Eucalyptus saligna</i> Sm., Myrtaceae. Secções transversais. (A) Lâmina foliar, evidenciando cutícula (ct) e cavidade oleífera (cv), ambas em reação com Sudan III. (B) Óleo essencial (oe) no interior de uma cavidade oleífera (cv) em reação com Sudan III. (C) Região da nervura mediana da folha, destacando compostos fenólicos (cf) em reação com cloreto férrico, além do colênquima (co), bainha esclerenquimática (es), floema (fl) e xilema (xi). (D) Pecíolo indicando a presença de compostos fenólicos (cf) em reação com cloreto férrico no floema (fl), e os elementos: epiderme (ep), colênquima (co), cavidade oleífera (cv), e xilema (xi). (E) Detalhe da figura anterior. (F) Feixe vascular do pecíolo evidenciando compostos fenólicos (cf) em reação positiva no teste de Hoepfner-Vorsatz no floema (fl), perto das células esclerenquimáticas (es) e em algumas células parenquimáticas do xilema (xi). (G) Caule mostrando compostos lignificados em reação positiva com floroglucina clorídrica nas células esclerenquimáticas (es) do floema (fl) e no xilema (xi). (H) Caule evidenciando endoderme amilífera (en), onde são observados os grãos de amido (ga) em reação com lugol, células do esclerênquima (es), floema (fl) e xilema (xi) .....	61
FIGURA 15- Óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> extraído por meio de hidrodestilação .....	62
FIGURA 16- Estrutura química dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> .....	64
FIGURA 17- Cromatograma do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> obtida por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas .....	67
FIGURA 18- Cromatograma expandido (7-35 min) do óleo essencial das folhas e caules de <i>Eucalyptus saligna</i> obtido por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas.....	67

FIGURA 19- Cromatograma expandido (8,25-13,25 min) do óleo essencial das folhas e caules de <i>Eucalyptus saligna</i> obtido por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massa, mostrando o composto majoritário <i>p</i> -cimeno em 10,25 min.....	67
FIGURA 20- Inibição total do crescimento de <i>C. albicans</i> pelo óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> , através do teste de difusão em meio sólido utilizando cavidades .....	74
FIGURA 21- Teste de difusão em disco, contra <i>C. albicans</i> , utilizando diluições do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> . (1) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 2000 µg/mL. (2) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 1000 µg/mL. (3) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 500 µg/mL .....	77
FIGURA 22- Efeito do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> sobre células Calu-3 em tratamento de 72h. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes, com n=16 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ( $p < 0,001$ ).....	80
FIGURA 23- Efeito do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> sobre células 3T3 em tratamento de 72h. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes, com n=16 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ( $p < 0,001$ ).....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> obtida por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas.....	64
TABELA 2- Média e desvio padrão da atividade antioxidante relativa (%AAR) ao ácido ascórbico do óleo volátil de <i>Eucalyptus saligna</i> e dos controles ácido gálico e rutina pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.....	68
TABELA 3- Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante pelo método do DPPH• em diferentes concentrações, no tempo 30 minutos.....	70
TABELA 4- Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante pelo método do radical catiônico ABTS• <sup>+</sup> , em diferentes concentrações, no tempo de 30 minutos.....	72
TABELA 5- Média dos halos de inibição referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> e suas diluições, frente aos microrganismos testados, pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades.....	73
TABELA 6- Média dos halos de inibição, referente à atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> , frente aos controles positivos, pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades.....	73
TABELA 7- Média dos halos de inibição referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> e suas diluições, frente aos microrganismos testados, pelo método de difusão em disco.....	76
TABELA 8- Média dos halos de inibição, referente à atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> , frente aos controles positivos, pelo método de difusão em disco.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	absorbância
AA	atividade antioxidante
AAR	atividade antioxidante relativa
ABRAF	Associação Brasileira dos Produtores de Floresta Plantada
ABTS• <sup>+</sup>	radical catiônico
a.C.	período cronológico antes do nascimento de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	graus Celsius
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa
CIM	concentração inibitória mínima
cm	centímetros
DMAPP	difosfato de dimetillalil
DPPH	radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et. al.	expressão latina abreviada <i>et alli</i> , (=e outros)
FAA	fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico
FPP	pirofosfato de farnesil
GPP	difosfatogeramil
H	hora
IC <sub>50</sub>	concentração necessária para reduzir 50 % de algo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPP	difosfato de isopentenil
L	litro
m	metro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
Mmol	milimol
n <sup>o</sup>	número
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sódio
nm	nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PND	Plano Nacional de Desenvolvimento
UFC	unidades formadoras de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
V	volume
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
%	porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	18
2.2 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.....	20
2.3 GÊNERO <i>Eucalyptus</i> L'Hér.....	22
2.4 <i>Eucalyptus saligna</i> Sm.....	24
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i> .....	29
2.6.1 Atividade antioxidante.....	30
2.6.2 Atividade antimicrobiana.....	31
2.6.3 Atividade citotóxica/antitumoral.....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	35
4.2 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS.....	35
4.2.1 Análise morfológica.....	35
4.2.2 Análise microscópica.....	35
4.2.3 Testes histoquímicos.....	36
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEVEC).....	36
4.2.5 Espectrometria de raios x por energia dispersiva (EED).....	36
4.3 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	37
4.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL.....	38
4.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	39
4.5.1 Atividade antioxidante.....	39
4.5.1.1 Método do DPPH.....	39
4.5.1.2 Método do fosfomolibdênio.....	40
4.5.1.3 Método do ABTS.....	41
4.5.2 Atividade antimicrobiana.....	42
4.5.2.1 Difusão em meio sólido utilizando cavidades.....	42
4.5.2.2 Difusão em disco.....	43
4.5.3 Citotoxicidade.....	43
4.5.3.1 Fármacos, reagentes e solventes.....	43
4.5.3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	43
4.5.3.3 Determinação da citotoxicidade do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> em células Calu-3 e 3T3: ensaio de redução do MTT.....	45
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS.....	47
5.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	62
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL.....	63

5.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	68
5.4.1 Atividade antioxidante.....	68
5.4.1.1 Método do fosfomolibdênio.....	68
5.4.1.2 Método do DPPH.....	69
5.4.1.3 Método do ABTS.....	71
5.4.2 Atividade antimicrobiana.....	72
5.4.2.1 Teste de difusão em meio sólido utilizando cavidades.....	72
5.4.2.2 Teste de difusão em disco.....	76
5.4.3 Citotoxicidade.....	79
5.4.3.1 Determinação da citotoxicidade e IC <sub>50</sub> do óleo essencial de <i>Eucalyptus saligna</i> em células Calu-3 e 3T3.....	79
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O homem há milhares de anos e em todas as culturas, aprendeu a utilizar os recursos naturais para sua sobrevivência. Através da observação dos efeitos causados por algumas plantas quando ingeridas ou quando em contato com a pele e mucosas, criou-se um conhecimento. Esse conhecimento foi passado e aprimorado ao longo das gerações, e até os dias de hoje o uso das plantas medicinais contribui para o desenvolvimento da vida moderna (LORENZI; MATOS, 2008).

A população continua fazendo o uso dessas plantas como alternativa terapêutica, fato que ressalta a importância e necessidade de comprovações científicas a respeito da eficácia terapêutica e segurança no uso. Vale ressaltar que a grande maioria dos medicamentos teve origem vegetal, principalmente a partir do século XIX, período em que foram descobertos importantes fármacos isolados de plantas medicinais como a morfina, a codeína, a efedrina, entre outros (NIERO et al., 2003).

Ecosistemas com grande variedade de espécies vegetais, assim como o brasileiro, constituem um abrangente campo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos, bons exemplos são os metabólitos secundários vincristina e vimblastina, que são isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G.Donis, e atuam como antineoplásicos. Portanto, uma investigação não somente fitoquímica, mas visando aspectos biológicos e farmacológicos de plantas medicinais, pode auxiliar na descoberta de novos agentes terapêuticos (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2014; FOGLIO et al. 2006).

Myrtaceae Juss. é uma das famílias mais importantes na formação de florestas, possuindo cerca de 132 gêneros e 5600 espécies (THE PLANT LIST, 2018), que se distribuem preferencialmente na América tropical e na Austrália (WILSON, 2011). No Brasil, encontram-se aproximadamente 1000 espécies e 23 gêneros (SOBRAL et al., 2015). Entre os gêneros importantes de Myrtaceae, destaca-se *Eucalyptus* L'Her que é conhecido pela sua grande variedade genética. Esse gênero possui mais de 800 espécies com propriedades químicas e físicas muito diversas (FLORES et al., 2016; RIBEIRO et al., 2015).

Em todo o mundo, as plantas de madeira dura pertencentes ao gênero *Eucalyptus* são as mais cultivadas, ocupando cerca de 20 milhões de hectares (RIBEIRO et al., 2015), sendo que no Brasil seu cultivo foi considerado o maior do mundo na década de 1990 (ELDRIGDE, 1994). São as espécies florestais mais plantadas no país, ocupando cerca de 5,10 milhões de hectares (ANUÁRIO, 2013). O uso de espécies de *Eucalyptus* está relacionado à produção de celulose/papel, chapas de fibras, madeira serrada, carvão para siderúrgica, entre outros. Além do uso da madeira, o óleo essencial extraído a partir das folhas e caules tem sido utilizado nas indústrias de perfumaria e na fabricação de produtos farmacêuticos e domissanitários, representando uma forma de aumento no rendimento econômico, uma vez que as folhas eram descartadas no processo de corte das árvores (FLORES et al., 2016).

Apesar do interesse econômico crescente na utilização do óleo essencial obtido de *Eucalyptus*, algumas espécies ainda têm seu uso voltado principalmente à produção de madeira, extração de celulose e ao reflorestamento. Conseqüentemente os estudos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos acabam sendo mais restritos (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010).

*Eucalyptus saligna* Sm. é uma espécie subtropical nativa do sudeste da Austrália, mais especificamente da região costeira do estado de Nova Gales do Sul. Esse táxon tem como principais exigências climáticas uma temperatura média anual entre 13 e 18°C e precipitação anual entre 900 e 1400 mm (FLORES et al., 2016). No Brasil seu cultivo está voltado ao reflorestamento, especialmente no Sul e Sudeste do país (EMBRAPA, 2014).

Em razão das espécies de *Eucalyptus* apresentarem heterofilia e uma morfologia bastante similar, *E. saligna*, por exemplo, pode ser confundido com *Eucalyptus deanei* Maiden, *Eucalyptus dunni* Maiden, *Eucalyptus grandis* W.Hill e *Eucalyptus botryoides* Sm. Essas semelhanças reforçam a importância de estudos morfoanotômicos no sentido de ajudar na identificação correta dessas espécies, o que ainda é muito escasso (FLORES et al., 2016).

Com relação aos óleos essenciais de *E. saligna*, já foram relatadas atividades antimicrobianas (BARBOSA et al., 2016; SARTORELLI et al., 2007), inseticidas (BARBOSA et al., 2016; BROOKER; KLEINIG, 2006), nematocidas (SALGADO et al., 2003), repelente (CEFERRINO et al., 2006; TAPONDJOU et al., 2005) e atividades de citotoxicidade (BHUYAN et al., 2017). As atividades

biológicas dos óleos essenciais são altamente dependentes da sua composição química (BARBOSA et al., 2016) e vários estudos têm mostrado diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos dos óleos essenciais em *E. saligna* coletados de diferentes regiões (BETT et al., 2016; MOSSI et al, 2011; TOLOZA et al., 2006).

Considerando a similaridade morfológica das espécies de *Eucalyptus* e o fato de que o óleo essencial de *E. saligna* apresenta composição química diferente, dependendo da região, o objetivo desse trabalho foi fornecer dados micrográficos de folhas e caules a fim de auxiliar na identificação desse táxon e na diferenciação das demais espécies de *Eucalyptus*, além de caracterizar quimicamente o óleo essencial de *E. saligna* coletada nos Campos Gerais (Paraná, sul do Brasil) e investigar o seu potencial antioxidante, microbiológico e citotóxico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de espécies vegetais para cura e tratamento de doenças e sintomas ocorre desde o início das civilizações. Essa prática se arrastou pelo tempo e até hoje contribui para o desenvolvimento da saúde humana. Diversos registros mostrando o uso de plantas para fins terapêuticos podem ser encontrados, de datas muitas antigas como os registros de 2100 a.C. da Mesopotâmia e a existência de uma lista chinesa contendo indicações e posologia para uso de plantas medicinais (CRAGG; NEWMAN, 2014).

O conhecimento popular sobre uso dos produtos naturais acompanhou as transições filosóficas e comportamentais da humanidade, um exemplo disso é o efeito sedativo da valeriana, que foi utilizado pela medicina grega por Hipócrates, posteriormente por Galeno em Roma, descrita por Dioscórides em sua obra “De Materia Medica”. Esse efeito foi investigado e comprovado cientificamente por meio de diversas pesquisas (LEITE, 2009).

A pesquisa etnofarmacológica de plantas que a população utiliza há anos e que demonstram terem propriedades farmacológicas, é um meio bastante importante de descobrir ou de desenvolver novos fármacos (CORDEIRO et al, 2006). Uma vez que o efeito das mesmas se dá por algum componente natural do metabolismo, por meio dos estudos químicos esses compostos podem ser identificados e isolados, dando origem a novas opções terapêuticas. A descoberta de fármacos a partir dessas fontes naturais foi um dos pontos cruciais para o desenvolvimento da indústria farmacêutica (RISHTON, 2008).

Na década de 60, o uso irracional dos medicamentos que não tem origem natural, aliado a inacessibilidade de grande parte da população aos novos medicamentos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incentivar a população a utilizar as plantas medicinais e os fitoterápicos, e essa prática vem aumentando cada vez mais (CZELUSNIAK et al., 2012; LEITE, 2009).

Estima-se que, em 2011, cerca de 70 a 95% da população dos países em desenvolvimento fazia uso de plantas medicinais para tratamento de doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Nestes países, muitas vezes, essas plantas representam o único recurso na atenção primária à saúde de populações carentes (LEITE, 2009).

De todos os medicamentos disponíveis, cerca de 25% tem origem direta ou indireta dos compostos presentes em plantas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Na lista dos 252 medicamentos considerados essenciais e básicos pelo OMS, 28 tem sua origem exclusivamente de plantas, confirmando a importância de espécies vegetais como fonte de compostos bioativos (RATES, 2001). Alguns exemplos importantes de fitofármacos são: a vimblastina e vincristina, obtidas de *Catharanthus roseus* e utilizadas no tratamento de câncer; a artemisinina, obtida de *Artemisia annua* L. e usada como antimalárica; a morfina, isolada de *Papaver somniferum* L. e precursora dos hipnoanalgésicos; a pilocarpina, isolada de espécies de *Pilocarpus* Vahl e usada no tratamento de glaucomas, entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2014; YUNES; CECHINEL-FILHO, 2014).

As propriedades farmacológicas encontradas nas plantas medicinais provêm, normalmente, das moléculas biotivas. Estas moléculas são originárias do metabolismo secundário das espécies vegetais. Os grupos de compostos formados a partir desse metabolismo possuem, geralmente, funções de proteção, adaptação, reprodução e defesa, ajudando na sobrevivência e perpetuação da espécie. Além disso, os compostos vindos do metabolismo secundário das plantas são considerados elementos de diferenciação e especialização (LEITE, 2009).

Os compostos biotivos extraídos de espécies vegetais apresentam grande complexidade estrutural, alta diversidade e inúmeros mecanismos de ação para serem elucidados, e exatamente por essas características peculiares que o interesse na obtenção, identificação e ensaios biológicos com essas substâncias se mantêm crescente, apesar de fatores desfavoráveis como a grande demanda de tempo, custos financeiros, possibilidade de obtenção de amostras em quantidades mínimas que não possibilitam a realização de testes biológicos e também de se encontrar algo já conhecido (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2014).

A enorme variedade existente na flora brasileira, constituindo um grande campo de estudo, contribui para o interesse nas investigações de espécies vegetais no país (CRAGG; NEWMAN, 2014).

O Brasil possui cerca de 55 mil espécies de plantas, formando a maior e mais rica diversidade genética entre todos os países. Apesar disso, menos de 15% dessas espécies foram submetidas a estudos fitoquímicos ou de avaliação das características biológicas até o ano de 2009 (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A morfoanatomia de espécies medicinais tem sido analisada, uma vez que há necessidade de se determinar os marcadores morfoanatômicos para a identificação das espécies, e que grande parte delas não consta de Farmacopéias (ALMEIDA et al., 2017; BERTOCCO et al., 2017; BOBEK et al., 2016). Adicionalmente, a análise microscópica é especialmente necessária quando as espécies vegetais são comercializadas na forma rasurada, triturada ou pulverizada (UPTON et al., 2011). Nesse sentido, escassos estudos anatômicos foram conduzidos com espécies de *Eucalyptus* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; IFTIKHAR et al., 2009; MALINOWSKI et al., 2009; SANTOS et al., 2008; TANTAWY, 2004).

## 2.2 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

Myrtaceae, pertencente à ordem Myrtales ou Myrtiflorae, possui cerca de 132 gêneros e 5600 espécies (THE PLANT LIST, 2018). Ela se divide em duas grandes subfamílias, denominadas Leptospermoideae e Myrtoideae. Os representantes da subfamília Leptospermoideae apresentam folhas alternadas e frutos secos, já os representantes da Myrtoideae apresentam folhas opostas e frutos carnosos. A distribuição geográfica das subfamílias também é distinta, sendo na Austrália a maior concentração de Leptospermoideae e na América do Sul e América Central, de Myrtoideae (LEGRAND; KLEIN, 1978).

No Brasil, espécies de Myrtaceae possuem grande importância dentre as famílias de Angiospermae (Magnoliopsida), possuindo uma tribo denominada Myrta e três subtribos: Myrciina, Eugeniina e Myrtinae (LORENZI; MATOS, 2008). Wilson et al. (2005) propuseram uma nova classificação

reconhecendo duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylodeae, e 17 tribos para Myrtaceae.

As angiospermas conhecidas somam mais de 400 famílias, sendo Myrtaceae 1,32% desse total. Entre todos os gêneros pertencentes à Myrtaceae, os gêneros *Eugenia* L., *Eucalyptus* L'Hér, *Myrcia* DC., *Syzygium* Gaertner e *Melaleuca* L. são os maiores (THE PLANT LIST, 2018). No Brasil, encontram-se aproximadamente 1000 espécies e 23 gêneros, sendo que merece destaque as espécies cultivadas, originárias da Austrália, como as representantes de *Eucalyptus* (SOBRAL et al., 2015).

De acordo com Wilson et al. (2001) os taxa de Myrtaceae são espécies lenhosas, arbóreas ou arbustivas. É característico possuírem folhas inteiras contendo cavidades oleíferas, ovário semi-ínfero a ínfero, estames geralmente numerosos, floema interno, e pontuações guarnecidas nos vasos de xilema. As folhas inteiras podem apresentar disposição alterna, oposta ou oposta cruzada, com presença de pontuações e pequenas estípulas. Pode ocorrer cauliflora. As flores são na maioria das vezes brancas, mas podem apresentar coloração avermelhada. São hermafroditas, efêmeras, com simetria radial, geralmente pentâmeras, mono ou diclamídeas. O receptáculo pode ser bem desenvolvido, a corola quando suprimida apresenta um cálice gamossépalo com deiscência transversal e frequentemente observa-se a presença de vários estames. O ovário pode ser pentacarpelar e pentalocular, apresentando muitos óvulos, e varia de súpero a semi- ínfero, até ínfero. O fruto pode ser do tipo baciforme ou capsular loculicida, e as sementes podem ser tipo aladas e apresentar poliembrionia (JOLY, 1998).

No Brasil, representantes de Myrtaceae habitam predominantemente a Floresta Atlântica. São importantes economicamente, sendo cultivadas principalmente no Sul e Sudeste do país (ANUÁRIO, 2013). Cerca de 70% das espécies de Myrtaceae tem seu uso voltado para fins medicinais. Comumente, as partes utilizadas são as folhas, cascas e frutos, e os principais usos são como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, antidiarreicos, antireumáticos e hipocolesterolêmicos (STEFANELLO et al., 2011). Na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Serviço Único de Saúde (RENISUS), entre as 71 espécies com potencial farmacológico, encontram-se 4 espécies de Myrtaceae (*Eugenia uniflora* L., *Eucalyptus globulus* Labill.,

*Psidium guajava* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels) demonstrando sua importância terapêutica (BRASIL, 2009).

Em Myrtaceae vários compostos bioativos já foram descritos, entre eles compostos fenólicos como a miricetina, a rutina, a quercitrina (DASTMALCHI, 2012), a quercimetricina e o hexaidroxidifenol-galiol-glicose (WU et al., 2012); terpenos como  $\alpha$ -pineno, espatulenol, biciclogermacreno (PADOVAN et al., 2014); alcaloides como 1,2,3,4-tetraidro-1-metil- $\beta$ -carbolina (DOMINGUES et al., 2010) e antocianinas como cianidina, malvidina e delfinidina (FLORES et al., 2012).

Atualmente, vários estudos são realizados buscando comprovar o uso popular dos constituintes de Myrtaceae. Para tal são utilizadas investigações farmacognósticas, que englobam os aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas (AZEVEDO, 2016; DEFAVERI et al., 2011; FAITANIN, 2016; FURTADO et al., 2015; PARK et al., 2011).

### 2.3 GÊNERO *Eucalyptus* L'HÉR.

*Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui cerca de 800 espécies reconhecidas botanicamente, tendo sua origem na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania (EMBRAPA, 2014; FLORES et al., 2016). Após milhões de anos de especialização, espécies deste gênero encontram-se em regiões com condições climáticas muito distintas, desde regiões tropicais até temperadas, regiões extremamente úmidas a extremamente secas, no nível do mar até montanhas altas. Essa diversidade faz de *Eucalyptus* um gênero com morfologia variável e complexa, possuindo representantes como espécies arbóreas com até 90 m de altura e arbustos com 40 cm (FLORES et al., 2016).

A primeira descrição botânica do gênero foi feita pelo botânico francês Charles-Louis L'Heritier de Brutelle em 1789 (FLORES et al., 2016). A espécie *Eucalyptus globulus* Labill., farmacopeica, foi descoberta em 1792 por La Billardièrre. Joseph Smith foi o responsável pela denominação da maior parte das espécies descritas (BROOKER, 2002).

A introdução de *Eucalyptus* no Brasil ocorreu nos estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo no final do século XIX, a princípio com finalidade ornamental. A busca pelo cultivo dessas espécies com objetivos



comerciais se deve ao agrônomo e silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, que recebeu do botânico Joseph Henry Maiden 154 espécies de *Eucalyptus*, para que fossem testadas as mais adaptadas ao clima do estado de São Paulo. Navarro selecionou as espécies *E. maculata* Hook., *E. pellita* F. Muell., *E. resinífera* Sm., *E. saligna*, *E. tereticornis* Sm. e *E. urophylla* S.T.Blake. Com o passar dos anos os eucaliptos foram sendo disseminados pelo país (FLORES et al., 2016). Esse fato se deve tanto à facilidade de cultivo até mesmo em condições adversas, como ao seu rápido crescimento, menores custos no cultivo e diversificada utilização da madeira, garantindo um poder econômico elevado (EMBRAPA, 2014).

Embora existam centenas de espécies e subespécies de *Eucalyptus*, atualmente não mais do que 20 delas são utilizadas comercialmente no mundo. No Brasil, a eucaliptocultura só ganhou força e destaque em 1966, com a promulgação da Lei nº 5.106 de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento. A prática se consolidou no país com o Plano Nacional de Desenvolvimento (II PND) em 1970 (BRASIL, 1974). No decorrer dos anos a área plantada e a produtividade das florestas só cresceram, segundo dados do Anuário Estatístico da Associação Brasileira dos Produtores de Floresta Plantada (ABRAF) de 2013, estima-se que cerca de 5,10 milhões de hectares de florestas de eucalipto existam no Brasil (ANUÁRIO, 2013).

Florestas de eucalipto podem ser encontradas em todo território brasileiro e se distribuem pelas regiões na seguinte porcentagem: Região Sudeste (53%) a que apresenta maior quantidade de áreas plantadas, seguida pelas Regiões Nordeste (15,8%), Centro-Oeste (13,4%), Sul (11,5%) e Norte (6,2%). *Eucalyptus*, a exemplo de *E. grandis* W. Hill, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis* Labill., híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. dunnii* Maiden e *E. benthamii* Maiden & Cabbage são as mais utilizadas atualmente em função das características das suas madeiras (EMBRAPA, 2014).

A utilização dos eucaliptos está focada principalmente no uso da madeira, que existe em uma grande variedade de tipos levando a diversos usos como a produção de papel e celulose, madeira roliça, chapas de fibras, lâminas, serrados e como fonte de energia. Entretanto, o óleo essencial extraído principalmente das folhas e caules adultos de diversas espécies de eucaliptos é utilizado na produção de artigos de higiene e limpeza, cosméticos,

fármacos e alimentos. Estes usos vêm crescendo e merecem destaque como uma forma de aproveitamento dos subprodutos do corte da madeira (EMBRAPA, 2014).

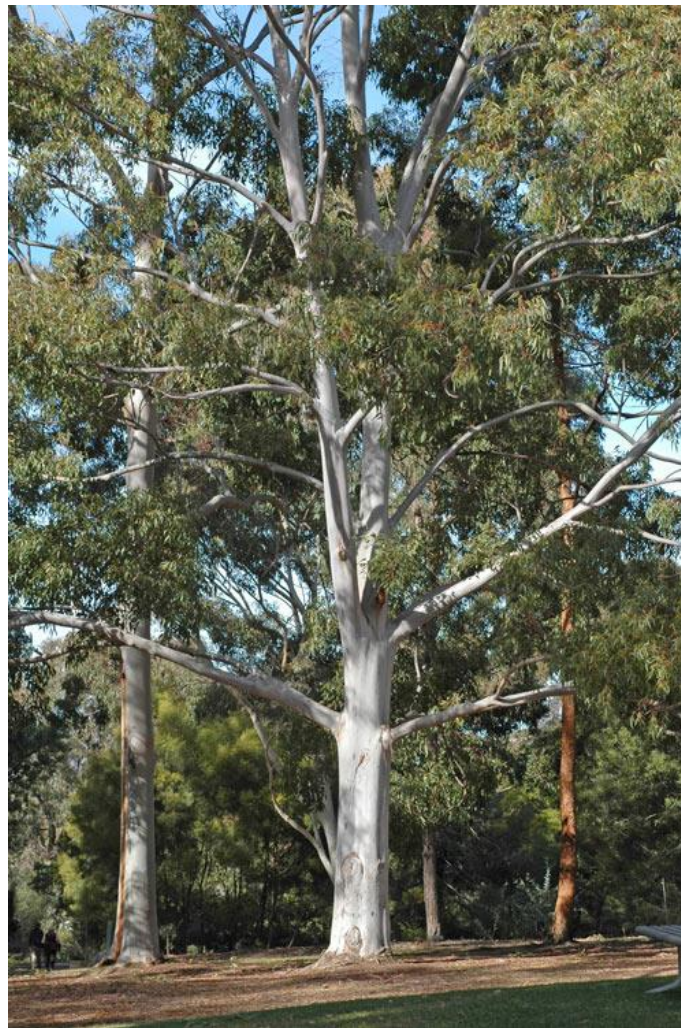
Para a identificação botânica das espécies de *Eucalyptus* são necessárias várias características, uma vez que a morfologia é muito semelhante entre as espécies. Alguns dos pontos observados para determinação botânica são: a morfologia do tronco, folhas, inflorescências, flores, frutos e sementes. Em algumas situações dados como localização geográfica, habitat e ocorrência natural das espécies podem ajudar na identificação (FLORES et al., 2016).

#### 2.4 *Eucalyptus saligna* Sm.

*Eucalyptus saligna*, é uma espécie pertencente ao gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) que foi descrita em 1797 por Smith. É uma espécie subtropical nativa do sudeste da Austrália, mais especificamente da região costeira do estado de Nova Gales do Sul. Esse táxon tem como principais exigências climáticas uma temperatura média anual entre 13 e 18°C e precipitação anual entre 900 e 1400 mm (FLORES et al., 2016). No Brasil seu cultivo está voltado ao reflorestamento, especialmente no Sul e Sudeste do país (EMBRAPA, 2014).

Morfologicamente são árvores de porte grande, que possuem uma casca áspera e de coloração castanha no terço inferior do tronco, e lisa de coloração branco-acinzentada na parte superior. Suas folhas possuem diferentes formatos, podendo ser lanceoladas, estreito-lanceoladas ou falcadas. Suas inflorescências têm o pedúnculo achatado e suas flores são brancas, com ovário ínfero e estames orientados de forma irregular. Seus frutos são lisos e de forma obcônica, e as sementes apresentam-se na forma cubóide ou piramidal, com coloração castanha (FLORES et al., 2016). A Figura 1 apresenta uma árvore de *E. saligna* adulta.

FIGURA 1- Árvore adulta de *Eucalyptus saligna*.



Fonte: ANBG, 2016.

Essa espécie pode ser confundida com *Eucalyptus deanei* Maiden, *Eucalyptus dunni* Maiden, *Eucalyptus grandis* W.Hill e *Eucalyptus botryoides* Sm. Isso ocorre devido a heterofilia que as espécies de *Eucalyptus* apresentam, sendo que a distinção entre as espécies pode ser feita através de uma análise morfoanatômica (FLORES et al., 2016).

Com relação aos óleos essenciais, vários estudos têm mostrado diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos químicos dos óleos essenciais de *E. saligna* quando coletados de diferentes regiões (BETT et al., 2016; MOSSI et al., 2011; TOLOZA et al., 2006). Além disso, algumas

atividades biológicas já foram relatadas para esses óleos essenciais, como antimicrobianas (BARBOSA et al., 2016; SARTORELLI et al., 2007), inseticidas (BARBOSA et al., 2016; BROOKER; KLEINIG, 2006), nematocidas (SALGADO et al., 2003), repelente (CEFERINO et al., 2006; TAPONDJOU et al., 2005;) e atividades de citotoxicidade (BHUYAN et al., 2017).

## 2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Pela definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os óleos essenciais “são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico e podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados” (BRASIL, 1999). Óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de algumas plantas, denominadas aromáticas. Estas, por possuírem atividades conservantes, terapêuticas e por darem sabor e aroma aos alimentos, são utilizadas há muitos anos por diversas civilizações. Os responsáveis por essas propriedades geralmente são os óleos essenciais presentes nas plantas. Paracelsus Von Hohenheim, no século 16, foi o primeiro a utilizar o termo “óleo essencial”, que significa “a alma da planta” ou “a quinta essência” para a cura. Atualmente os óleos essenciais também são chamados de óleos voláteis, óleos etéreos e essências (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Na pré-história, o uso das plantas aromáticas é atribuído a curiosidade do homem em saber a procedência do aroma liberado quando certos arbustos ou resinas eram queimados. No antigo Egito, os óleos essenciais eram utilizados como oferendas nas cerimônias religiosas, como perfumes e também para embalsamar faraós. Foi na Idade Média que os processos de extração dessas essências evoluíram, por meio das experiências dos alquimistas da época foi possível extrair o óleo essencial através de vapor d'água. (AZEVEDO, 2016). No século XIII, os farmacêuticos começaram a extrair óleos essenciais, e seus efeitos terapêuticos foram descritos em farmacopéias. Já no século XVII as farmácias estocavam essas preparações e seus usos já estavam difundidos em toda Europa. Todavia, no decorrer dos séculos XIX e XX, o uso na medicina foi ficando em segundo plano em relação ao uso como aromatizantes e flavorizantes (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Os óleos essenciais e seus componentes são usados na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, de produtos sanitários e odontológicos. Os óleos essenciais também podem ser utilizados na aromaterapia, uma terapia alternativa que se propõe a curar ou prevenir doenças por meio da inalação de essências (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Em se tratando da composição química, os óleos essenciais são constituídos por misturas muito variáveis de fenilpropanoides e terpenoides, especificamente monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular. De acordo com a parte da planta de onde o óleo essencial é extraído, a composição química pode variar dentro de uma mesma espécie (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007). Além disso, fatores ambientais também podem alterar a composição química e a concentração dos constituintes dos óleos essenciais, como o tipo de solo, temperatura, altitude, pluviosidade e luminosidade (LEITE, 2009).

Os principais constituintes voláteis dos óleos essenciais possuem rotas biossintéticas precursoras distintas: a via do ácido mevalônico e do fosfato desoxirilulose fosfato, que dá origem aos derivados terpenoides, e a via do ácido chiquímico aos derivados fenilpropanoides. O ácido chiquímico é formado pela condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato, e é responsável pela formação das duas unidades básicas dos fenilpropanoides, o ácido cinâmico e o ácido *p*-cumárico. Esses dois ácidos, através de redução, oxidação e ciclização formam os alilbenzenos, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos e cumarinas. Os monoterpenos (C<sub>10</sub>) são formados pela via do mevalonato, através da união do difosfato de isopentenil (IPP) e seu isômero, o difosfato de dimetilalil (DMAPP) formando o difosfato de geranil (GPP). A cadeia de GPP quando condensado com outra unidade de IPP, forma o pirofosfato de farnesil (FPP) (C<sub>15</sub>) que é precursor da maioria dos sesquiterpenos (LEITE, 2009).

Apesar dos óleos essenciais possuírem composições químicas diferentes, eles apresentam propriedades físicas comuns: são líquidos voláteis e lípidos, de sabor acre e picante, incolores ou de coloração variável. Possuem característica lipossolúvel, são insolúveis ou parcialmente solúveis

em água, solúveis em solventes orgânicos apolares. A principal característica dos óleos essenciais é a sua volatilidade (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Na planta, os óleos essenciais possuem funções biológicas como proteção contra predadores, atração de insetos para polinização, controle da temperatura, proteção contra perda de água entre outras (PINHEIRO, 2003; SILVA, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2004). Todos os órgãos vegetais da planta podem produzir óleo essencial, que é produzido e armazenado em estruturas anatômicas especializadas, a exemplo das células parenquimáticas diferenciadas (idioblastos), tricomas glandulares e tricomas tectores, dutos secretores ou cavidades secretoras (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

A extração do óleo essencial pode ocorrer por meio de vários processos, que vão depender da localização do óleo volátil na planta, da quantidade e do objetivo de uso. A prensagem é utilizada para extração de óleo essencial de frutos cítricos, que são prensados até a liberação das substâncias voláteis, e depois são efetuadas a decantação, centrifugação ou destilação fracionada para separação dos óleos com a água (MARQUES; VIGO, 2009).

A *enfleurage* é um método para extração de óleo essencial de flores frescas utilizando gordura (sem odor). Pétalas são colocadas sobre uma fina camada de gordura e substituídas em intervalos de tempo, nove vezes. A gordura absorve os compostos voláteis e os mesmos são retirados por extração com solvente orgânico (MARQUES; VIGO, 2009).

A extração por hidrodestilação é o método mais comum para extração de óleo essencial e utiliza o material vegetal em contato com água em um balão, que é aquecido e o vapor d'água arrasta os óleos para as paredes resfriadas do aparelho. O aparato mais utilizado para esse método é o Clevenger e a separação da água se dá por diferença de densidade. Os óleos obtidos podem ser secos com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (MARQUES; VIGO, 2009).

Pode ser utilizada ainda, a extração por *headspace*, uma técnica utilizada na análise de compostos presentes em baixas concentrações. Consiste na diferença de volatilidade do analito e da matriz, o analito sendo mais volátil vai volatilizar preferencialmente, não havendo então outros

interferentes na amostra. No *headspace* há a possibilidade de se determinar de forma direta os componentes da amostra (MARQUES; VIGO, 2009).

A análise da composição química dos óleos essenciais pode ser empregada tanto para pesquisa de produtos naturais como para o controle de qualidade. O método mais utilizado para analisar a composição química dos óleos essenciais é cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Tem-se dado preferência pela CG-EM, pois permite separar e quantificar os componentes dos óleos essenciais simultaneamente, evitando erros provenientes da determinação indireta (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; LEITE, 2009).

## 2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus*

Os óleos essenciais são utilizados há milhares de anos para cura de doenças ou alívio de sinais e sintomas. Em razão da frequente presença desses óleos nos vegetais e de sua variável e complexa composição química, os óleos essenciais tornaram-se alvo de estudos visando encontrar atividades biológicas, e os resultados indicam forte potencial terapêutico (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

As principais atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais são: atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antihelmíntica, antiparasitária, antitumoral, analgésica, sedativa entre outras. Devido à grande complexidade química dessas substâncias, muitas vezes é difícil atribuir uma atividade biológica a apenas um componente, uma vez que pode ocorrer sinergismo químico para que ocorra tal atividade. No entanto, diversos trabalhos visam caracterizar e identificar os componentes bioativos responsáveis pelas atividades farmacológicas dos óleos essenciais (AZEVEDO, 2016; HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; MEHTA et al., 2013; RINI et al., 2012).

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* são conhecidos por possuírem propriedades antibacterianas, antifúngicas, analgésicas e anti-inflamatórias, essas propriedades têm sido amplamente utilizadas em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (MULYANINGSIH et al., 2011). Em

geral, esses óleos essenciais possuem um amplo espectro de atividade contra fungos, bactérias, insetos, ácaros e ervas daninhas, e são considerados uma alternativa ambientalmente segura para o controle de pragas. Recentemente os Estados Unidos da América (EUA) aprovaram o uso desses óleos como repelentes de insetos para aplicação na pele (MOSSI et al., 2011).

Em seus estudos, Mossi et al. (2011) verificaram atividade repelente e inseticida contra *Sitophilus zeamais* nos óleos essenciais de *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. benthamii*, *E. globulus* e *E. viminalis*. A capacidade larvicida e adulticida dos óleos essenciais de algumas espécies de *Eucalyptus* contra o *Aedes aegypti*, também tem sido comprovada através de modelos validados (LUCIA et al., 2011).

#### 2.6.1 Atividade antioxidante

A presença de grande quantidade de compostos fenólicos nos óleos essenciais levou ao interesse quanto ao seu potencial antioxidante, uma vez que os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio quando presentes no organismo levam a várias alterações celulares que estão relacionadas a diversas doenças, entre elas doenças cardíacas, câncer, diabetes, Alzheimer, entre outras (LI et al., 2012; MIGUEL, 2010).

Óleos essenciais com propriedade antioxidantes comprovadas têm sido utilizados na indústria farmacêutica, de cosmético e, principalmente, na alimentícia. Nesse sentido, destacam-se os óleos de orégano (*Origanum vulgare* L.), de menta (*Mentha* spp.) e alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.). Entretanto, além do ponto de vista de conservação dos produtos, óleos essenciais com propriedades antioxidantes podem apresentar uso terapêutico, uma vez que o potencial antioxidante está ligado a uma série de atividades farmacológicas por representar uma proteção contra danos celulares causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Várias espécies de *Eucalyptus* tiveram a atividade antioxidante de seus óleos essenciais testada e apresentaram resultados positivos, como *E. tereticornis* (SINGH et al., 2009), *E. benthamii* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015)



e *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* (Maiden, Blakely & Simmonds) J.B.Kirkp. (MULINOWSKI et al., 2010).

Diversos testes *in vitro* podem ser utilizados para determinação do potencial antioxidante de extratos vegetais. Levando em consideração a complexidade química da composição dos óleos essenciais, recomenda-se a utilização de mais de um teste para que a atividade antioxidante seja comprovada (DORMAN et al., 2000).

### 2.6.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido alvo de grande interesse dos pesquisadores nas últimas décadas. Essa busca pode levar a descobertas de novos agentes terapêuticos, o que se torna necessário frente ao contínuo surgimento de mecanismos de resistência bacteriana contra os medicamentos já existentes (MENDES et al., 2011).

A estrutura química, os grupos funcionais e a estereoquímica estão ligados à capacidade antimicrobiana e antifúngica dos óleos essenciais. Os compostos fenólicos, por exemplo, apresentam uma ação mais efetiva, sendo tanto bactericidas como bacteriostáticos. Grupamentos hidroxila ligados à estruturas fenólicas tendem a aumentar a potência da atividade inibitória, e de acordo com a estereoquímica das moléculas, elas podem ter ou não atividade antimicrobiana. A propriedade lipofílica dos óleos essenciais também está relacionada a atividade antimicrobiana, uma vez que permite interações com a membrana bacteriana (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Por possuírem um número grande de substâncias químicas em suas composições, a ação antimicrobiana e/ou antifúngica dos óleos essenciais pode não estar relacionada a apenas um composto e sim a vários, atuando em sinergismo (YAP et al., 2014). A maioria das pesquisas utiliza os óleos essenciais sem fracionamento, e algumas, por meio de isolamento de substâncias, conseguem atribuir a ação a alguns componentes específicos (ELAISSI et al., 2011; HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Existem alguns métodos *in vitro* que são mais utilizados para determinar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a saber: difusão, diluição e

bioautografia. Os métodos que utilizam difusão podem ser por difusão em disco ou difusão por cavidades, cujos resultados são interpretados de acordo com o diâmetro dos halos de inibição que se formam após incubação. O método de diluição é quantitativo e usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Já no método da bioautografia, uma placa cromatográfica é utilizada para separação das substâncias, o que torna possível localizar os compostos ativos na amostra (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

O óleo essencial de frutos de *E. globulus* e os óleos de folhas de *E. globulus* e *E. radiata* A. Cunn. ex DC. demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente. Essa atividade foi atribuída, principalmente, à presença de aromadentreno, seguido de citronelol, citronela e 1,8-cineol (MULYANINGSIH et al., 2011). Elaissi et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de 20 espécies diferentes de *Eucalyptus*, e verificaram que todas possuíam atividade, em maior ou menor grau. A bactéria mais sensível aos óleos essenciais foi *Staphylococcus aureus* e a mais resistente foi *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se correlação entre a quantidade de 1,8-cineol, *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno ou de criptona nos óleos com a atividade antibacteriana.

### 2.6.3 Atividade citotóxica/ antitumoral

Um efeito bastante importante e estudado dos óleos essenciais é seu potencial citotóxico. Os óleos, por possuírem característica lipofílica, conseguem atravessar a membrana das células e danificar sua estrutura, deixando-a permeável, podendo ocasionar a morte celular por apoptose e/ou necrose, parada no ciclo celular e perda da função de organelas. A citotoxicidade dos óleos essenciais tem sido alvo de interesse em pesquisas, na busca de novos agentes naturais que consigam sensibilizar células tumorais (GAUTAM et al., 2014).

Diversos mecanismos estão associados a atividade antitumoral dos óleos essenciais, entre eles estão os mecanismos de quimioprevenção e supressão do tumor resultantes da atividade antiproliferativa. Os óleos essenciais podem atuar na indução da apoptose, aumento dos níveis de radicais livres, inibição enzimática, parada no ciclo celular, reparo no DNA e

bloqueio da metástase e da angiogênese (GAUTAM et al., 2014; GUYTON; KENSLER, 2002).

Diversas pesquisas têm demonstrado atividade anticâncer dos óleos essenciais tanto *in vitro* como *in vivo* (FERRAZ et al., 2013; GAUTAM et al., 2014; KOUNDAL et al., 2015; KULISIC- BILUSIC et al., 2011). Nesse sentido, a citotoxicidade frente às células normais, também é testada a fim de se avaliar a toxicidade dos óleos essenciais (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

O óleo essencial de espécies de *Eucalyptus* apresentaram atividades citotóxica e antitumoral, despertando interesse dos pesquisadores. O óleo essencial extraído de *E. benthamii* demonstrou potencial para gerar apoptose em células de algumas linhagens cancerígenas (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015). Da mesma forma, os óleos essenciais de *E. sideroxylon* e *E. torquata* apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma hepatocelular e de câncer de mama, e os óleos de *E. cladocalyx* e *E. camaldulensis*, contra células de leucemia promielocítica e células ECV-304, respectivamente (SOUSA, 2015; GAUTAM et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar morfoanatomicamente as folhas e caules, e química e biologicamente o óleo essencial de *Eucalyptus saligna* Sm.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar partes vegetativas aéreas de *E. saligna*;
- Identificar botanicamente a espécie *E. saligna*;
- Avaliar morfoanatomicamente as folhas e caules de *E. saligna*;
- Extrair e determinar o teor de óleo essencial de folhas e caules de *E. saligna*;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes no óleo essencial de *E. saligna*;
- Determinar a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. saligna*;
- Investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. saligna*;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do óleo essencial de *E. saligna*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada durante o mês de abril de 2016, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (campus de Uvaranas), no município de Ponta Grossa, na região dos Campos Gerais, estado do Paraná. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Ponta Grossa está localizada a 912,408 m de altitude, 25°09'36" S de latitude e 50°10'18" W de longitude.

As folhas e caules de *Eucalyptus saligna* Sm. foram coletadas durante o mês de abril de 2016. A identificação da espécie foi realizada pelo especialista Thiago Flores Bevilacqua e a exsicata foi depositada no Hérbario da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número 21836.

### 4.2 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

#### 4.2.1 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada utilizando as folhas e os caules frescos da espécie *E. saligna*. Para a descrição dos caracteres morfológicos foi utilizado Gonçalves e Lorenzi (2007).

#### 4.2.2 Análise microscópica

O material vegetal foi fixado em FAA 70, que consiste em uma mistura de etanol a 70% (90%), formol (5%) e ácido acético (5%) (JOHANSEN, 1940), e estocado em etanol a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

Para preparação das lâminas semipernamentes o material vegetal foi seccionado à mão livre, nos sentidos transversal e longitudinal. O pecíolo foi seccionado nas porções proximal, medial e distal, bem como foram realizadas secções paradérmicas da face adaxial e da face abaxial das folhas. Para coloração das secções foram utilizados os corantes azul de astra e a fucsina básica (ROESER, 1972), ou azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964), a

montagem das lâminas foi feita com glicerina diluída a 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado o esmalte incolor.

#### 4.2.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados em secções transversais realizados à mão livre no material previamente fixado. Para pesquisa de compostos lipofílicos foi empregado o reativo Sudam III (SASS, 1951), para detectar compostos fenólicos foram usados o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e Hoepfner-Vorsatz test, modificado por Reeve (1951), para verificação de lignina foi empregada uma solução de floroglucina clorídrica (FOSTER, 1949), e lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Para registro dos resultados obtidos, utilizou-se o microscópio fotônico Olympus CX 31 acoplado à câmera digital C7070.

#### 4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEVEC)

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (Mira 3 Tescan), foram utilizados folhas e caules frescos de *E. saligna*. As amostras foram submetidas à desidratação em série etanólica crescente e pelo ponto crítico. Após montagem em suporte, foram submetidas à metalização com ouro em aparelho Quorum, modelo SC7620. Esse procedimento foi conduzido no Laboratório Multiusuários (c-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

#### 4.2.5 Espectrometria de Raios X por Energia Dispersiva (EED)

A microanálise qualitativa de Raios X foi realizada em cristais e em células sem cristais (controle) amostrados aleatoriamente. Para essa análise foi utilizado o detector Mira 3 Tescan nas mesmas condições de operacionalidade do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo. Esse procedimento foi conduzido no c-LABMU da UEPG.

### 4.3 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial de folhas e caules de *E. saligna* foi realizada por meio de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger (Figura 2) (USP XXXVI, 2014), em triplicata, com duração de 6 horas cada extração. Foram utilizados folhas e caules previamente dessecados e pesados. As folhas e caules coletados foram secos em estufa à 35 °C, por 5 dias, conforme demonstrado na Figura 3.

O óleo essencial obtido foi medido em tubo graduado para determinação do teor e após esse processo, o óleo essencial foi seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e em seguida estocado em tubos de Eppendorf a uma temperatura de 4 ± 0,5°C.

FIGURA 2- Aparato de Clevenger utilizado na extração de óleo essencial de *Eucalyptus saligna*.



Fonte: O autor, 2016

FIGURA 3- Folhas e caules de *Eucalyptus saligna* em estufa para secagem.



Fonte: Autor, 2016

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL

Para realização da identificação e quantificação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de *E. saligna* foi realizada uma cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (CG-EM). Essa análise foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As amostras foram solubilizadas em acetato de etila e o volume de 1,0  $\mu\text{L}$  foi injetado no cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 6890, equipado com o detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, em coluna decapilaridade HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). O gás de arraste utilizado foi o hélio a 1 mL/min. As temperaturas do injetor e da coluna foram de, respectivamente, 220°C e 60°C com rampa de aquecimento de 3 °C/min. O cromatógrafo gasoso



Hewlett-Packard 5890 equipado com um detector de ionização de chama foi utilizado para a determinação quantitativa.

Os componentes encontrados foram identificados por comparação com os dados da literatura e com os espectros da biblioteca NIST-127. Também foi utilizado padrão interno.

## 4.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial extraído das folhas e caules de *E. saligna* foi determinada por meio de três métodos: o método do fosfomolibdênio, o método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e o método do radical 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS).

Os diversos métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante de uma substância ou grupo de substâncias, além de oferecerem informações diferentes, podem sofrer interferências. Neste contexto, a utilização de mais de um método para avaliação da capacidade antioxidante se faz necessária para que a pesquisa seja mais completa (SILVA et al., 2007).

#### 4.5.1.1 Método do fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênio para a determinação da capacidade antioxidante total foi realizado de acordo com o descrito por Prieto et al., (1999). O molibdênio VI quando em contato com uma substância antioxidante é reduzido a molibdênio V, possibilitando a formação de um complexo entre fosfato e o molibdênio reduzido. Esse complexo possui coloração verde e, em pH ácido, pode ser determinado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 695 nm

Para realização deste teste, primeiramente foi preparado o reagente (molibdato de amônio a 4 mmol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L, ácido sulfúrico 0,6 mol/L). Após, em um tubo de ensaio foram adicionados 300 µL de óleo essencial em uma solução de etanol a 200 µg/mL, e 3 mL do reagente. O tubo foi selado e colocado em banho de água a 95°C durante 90 min. Em seguida

foi realizada a leitura utilizando um espectrofotômetro UV / Vis Shimadzu-1601 a 695 nm contra um branco (300 mL de etanol com 3 mL de reagente). As análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa AAR% (óleo essencial), AAR% (ác. gálico) e AAR% (rutina), todos em relação a substância de referência (ácido ascórbico), através da equação:

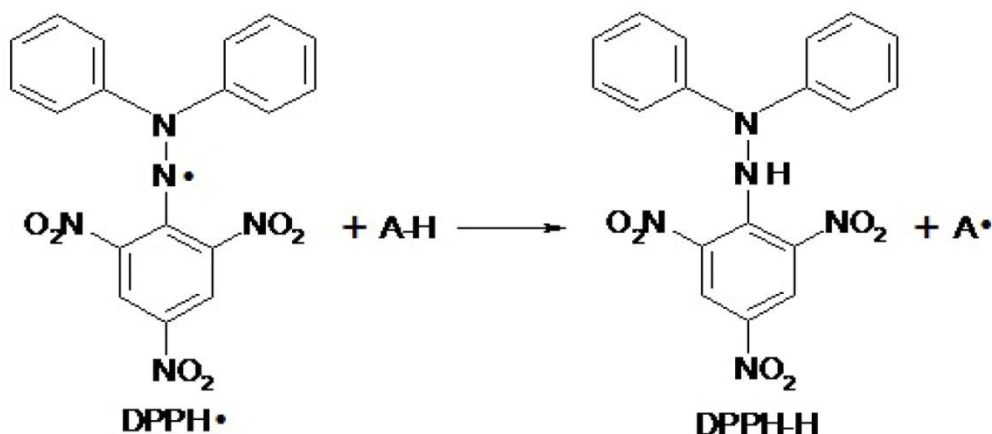
EQUAÇÃO 1- Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico.

$$\text{AAR\%} = 100. [ (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) / (\text{Abs controle} - \text{Abs branco}) ]$$

#### 4.5.1.2 Método do DPPH

O 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) é um radical livre, cromóforo, e sua solução possui uma coloração violeta cuja absorbância máxima ocorre no comprimento de onda de 517 nm (KEDARE; SINGH, 2011). Quando em contato com uma substância antioxidante, o DPPH vai sendo reduzido e vai perdendo sua coloração violeta (OLIVEIRA, 2015), como mostra a Figura 4.

FIGURA 4- Molécula de DPPH. Mecanismo de reação com um antioxidante através da transferência de um elétron.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Para determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, o óleo essencial e os padrões foram diluídos em etanol a concentrações de 20, 15, 10 e 5 mg/mL (CHEN et al., 2003). Em microplacas de 96 poços foram

transferidos 20 µl das soluções de óleo essencial de *E. saligna* bem como dos controles positivos e do branco (etanol), e 100 µl da solução de DPPH. As placas foram homogeneizadas durante 1 minuto e a leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 517 nm, imediatamente após a mistura e no final de uma incubação de 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Através dos valores de absorvância (A) foram obtidas as porcentagens de atividade antioxidante (% AA) das amostras utilizando a fórmula:

EQUAÇÃO 2- Cálculo da porcentagem de inibição do DPPH

$$\% \text{ AA} = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / A_{\text{controle}}]$$

#### 4.5.1.3 Método do ABTS

Para realização do método de descoloração do radical catiônico (ABTS •+), descrito por Re et al., (1999) foi preparada uma solução de ABTS (7 mmol/L) e de persulfato de potássio (2,45 mmol/L) com uma relação volumétrica de 1:1, que foi incubada durante 12 horas sob luz, à temperatura ambiente. Após esse período, a solução de ABTS •+ foi diluída em etanol até obtenção de um valor de absorvância de ± 0,7 a 734 nm. Foram preparadas diluições em etanol (20, 15, 10 e 5 mg/mL) do óleo essencial e dos padrões.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 190 µL da solução de ABTS•+ e 10 µL das amostras, em triplicata. A leitura foi realizada imediatamente após o preparo das placas e após 30 minutos de incubação no escuro, em um leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 734 nm. A atividade antioxidante foi calculada pela seguinte equação:

EQUAÇÃO 3- Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante pelo método do ABTS.

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

Este método se fundamenta na perda da coloração esverdeada do cátion ABTS<sup>•+</sup>, que é formado pela ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença do ABTS<sup>•+</sup>, quando em contato com um agente antioxidante (RE et al., 1999).

#### 4.5.2 Atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. saligna* foram realizados dois métodos: o método de difusão em meio sólido utilizando cavidades e o método de difusão em disco (HENRIQUES; SIMÓES-PIRES; APEL, 2007). Em ambos os testes foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Cada microrganismo foi inoculado em soro fisiológico e padronizado de acordo com o tubo 0,5 da Escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL. Os meios de cultura utilizados foram o Ágar Mueller-Hinton (MHA) para bactérias e o Ágar Mueller-Hinton enriquecido com 2% de glicose para fungos. Os meios foram incubados em estufa a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas, sem inoculação, antes da realização dos experimentos para que houvesse controle de esterilidade. Como controles positivos, foram utilizados o cloranfenicol (6  $\mu\text{g/mL}$ ) e a gentamicina (6  $\mu\text{g/mL}$ ) para as bactérias e a clorexidina (1,2  $\mu\text{g/mL}$ ) para *Candida albicans*.

Em ambos os testes, o óleo essencial foi testado puro e nas concentrações 2000, 1000, 500, 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . As diluições foram preparadas em veículo contendo água purificada, etanol e polissorbato 80 até 10% (m/V), esse veículo também foi testado para se ter certeza que não possuía efeito sobre os microrganismos utilizados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

##### 4.5.2.1 Difusão em meio sólido utilizando cavidades

Para realização desta análise, cada microrganismo foi semeado de forma homogênea, com auxílio de um swab, em uma placa de Petri contendo seu respectivo meio de cultura. Logo após, foram feitas cavidades de 6 mm de

diâmetro no meio das placas, onde foram inoculados 50 µL do óleo essencial, suas diluições e dos controles positivos. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas.

Após esse período foi verificada a ocorrência ou não de halos de inibição, e a medição, com auxílio de uma régua graduada, do diâmetro dos halos observados (HERSCH-MARTINEZ et al., 2005; ELAISSI et al., 2011).

#### 4.5.2.2 Difusão em disco

Para obtenção dos discos, foram impregnados 20 µL do óleo essencial de *E. saligna* e de suas diluições em discos de papel de filtro estéreis, com auxílio de uma micropipeta. Os meios de cultura previamente preparados foram semeados com os inóculos padronizados dos microrganismos, de forma homogênea, com a utilização de um swab. Com uma pinça estéril os discos impregnados, bem como os discos contendo os controles, foram distribuídos sobre as placas de Petri contendo os meios já semeados, no máximo três discos por placa. Em estufa a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$ , as placas foram incubadas invertidas por 24 a 48 horas.

Após esse período foram realizadas as medições dos halos de inibição formados com auxílio de uma régua graduada (HERSCH-MARTINEZ et al., 2005; ELAISSI et al., 2011).

#### 4.5.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* foi determinada em células de adenocarcinoma de pulmão (Calu-3) e de fibroblastos (3T3).

##### 4.5.3.1 Fármacos, reagentes e solventes

Os principais fármacos, reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram: meio RPMI1640 (Vitrocel), soro fetal bovino (Vitrocel), L-glutamina (Biotec), piruvato sódico (Sigma-Aldrich), penicilina (Vitrocel), estreptomomicina (Vitrocel), bicarbonato sódico (Biotec) e azul de tetrazólio MTT (Sigma-Aldrich).

#### 4.5.3.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de folhas e caules de *E. saligna*, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: Calu-3 e 3T3. As células Calu-3 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katia Sabrina Paludo (UEPG). As células 3T3 número CRL-1658 foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e foram gentilmente cedidas pelas Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Mathias Döll Boscardi (UEPG). Ambas as células foram cultivadas rotineiramente em meio RPMI 1640, pH 7,4, contendo 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 0,002g/mL de bicarbonato de sódio, suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) e 10.000 U de penicilina e 10/mg de estreptomicina por litro de meio. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C com pressão de CO<sub>2</sub> a 5%.

As células Calu-3 são células epiteliais derivadas de adenocarcinoma de pulmão, mais especificamente das glândulas bronquiais submucosas, e tem sido muito utilizadas em estudos *in vitro* como modelo de células tumorais humanas (ONG et al., 2013). Já as células 3T3 são consideradas um modelo de células fibroblásticas padrão, obtidas do tecido de embriões de ratos albinos suíços e, portanto, possuem características de célula normal, ou seja, não tumoral (MOSMANN, 1983). Ambas as linhagens celulares se desenvolvem de forma aderida.

Para os tratamentos as células Calu-3 e 3T3 foram semeadas na concentração de  $8 \times 10^3$  células/poço, em placas de 96 poços, e mantidas sob condições de cultura (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>) para aderência, por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com 100 µL do óleo essencial de *E. saligna* nas concentrações 1000, 500, 250, 50 e 5 µg/mL. As placas de culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

O óleo essencial foi solubilizado em uma mistura de dois solventes, etanol P.A. e propilenoglicol na proporção 75% e 25% denominado solução veículo, e adicionado o meio RPMI suplementado. Para o controle foram utilizados o meio de cultura e a solução veículo.

A Figura 5 mostra o esquema de plaqueamento utilizado. Cada concentração do óleo essencial e também o controle, foram adicionados em 16 poços em cada placa.

Figura 5- Modelo ilustrativo do plaqueamento para determinação da citotoxicidade. Nos poços com coloração azul foi adicionado o controle. Os poços vermelhos foram tratados com o óleo essencial de *Eucalyptus saligna* na concentração de 1000 µg/mL, os verdes 500 µg/mL, amarelos 250 µg/mL, roxo 50 µg/mL e os laranjas 5 µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
B	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
C	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
D	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
E	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
F	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
G	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange
H	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange	Blue	Red	Green	Yellow	Purple	Orange

Fonte: o autor, 2017.

#### 4.5.3.3 Determinação da citotoxicidade do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* em células Calu-3 e 3T3: ensaio de redução do MTT.

O metabolismo celular de redução do (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), o MTT, é um dos ensaios utilizados para determinação da viabilidade celular. As enzimas mitocondriais e não mitocondriais presentes nas células viáveis clivam o anel de tretazólio presente na estrutura do MTT, formando cristais de formazan de coloração violeta. Quando esses cristais são solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a coloração pode ser lida por espectrofotometria no comprimento de onda de 550 nm (MOSMANN, 1983).

Após o procedimento descrito no item 4.5.3.2, o sobrenadante das placas foi descartado e foi adicionado 200 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL em cada poço. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 4 horas, período em que se formaram os cristais de formazan. Posteriormente a

incubação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais. Em leitora de placas (Biotek,  $\mu\text{Quant}$ ) foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm.

Utilizando os valores das absorbâncias, a viabilidade celular (%) foi calculada através da Equação 4.

EQUAÇÃO 4- Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \left( \frac{\text{Absorbância do tratado}}{\text{Média das absorbâncias do controle}} \right) \times 100$$

Com os valores de viabilidade celular foi calculada a concentração do óleo essencial eficaz para inibir 50% de crescimento celular ( $\text{IC}_{50}$ ). Os valores foram obtidos por meio da análise de Probit, conforme descrito no item análises estatísticas.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software estatístico GraphPadPrism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA). Foi empregado a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste POST-HOC de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Valores de  $p$  menores do que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular de cerca de 50% das células ( $\text{IC}_{50}$ ) e foi calculada por regressão de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus version 5.8.4.

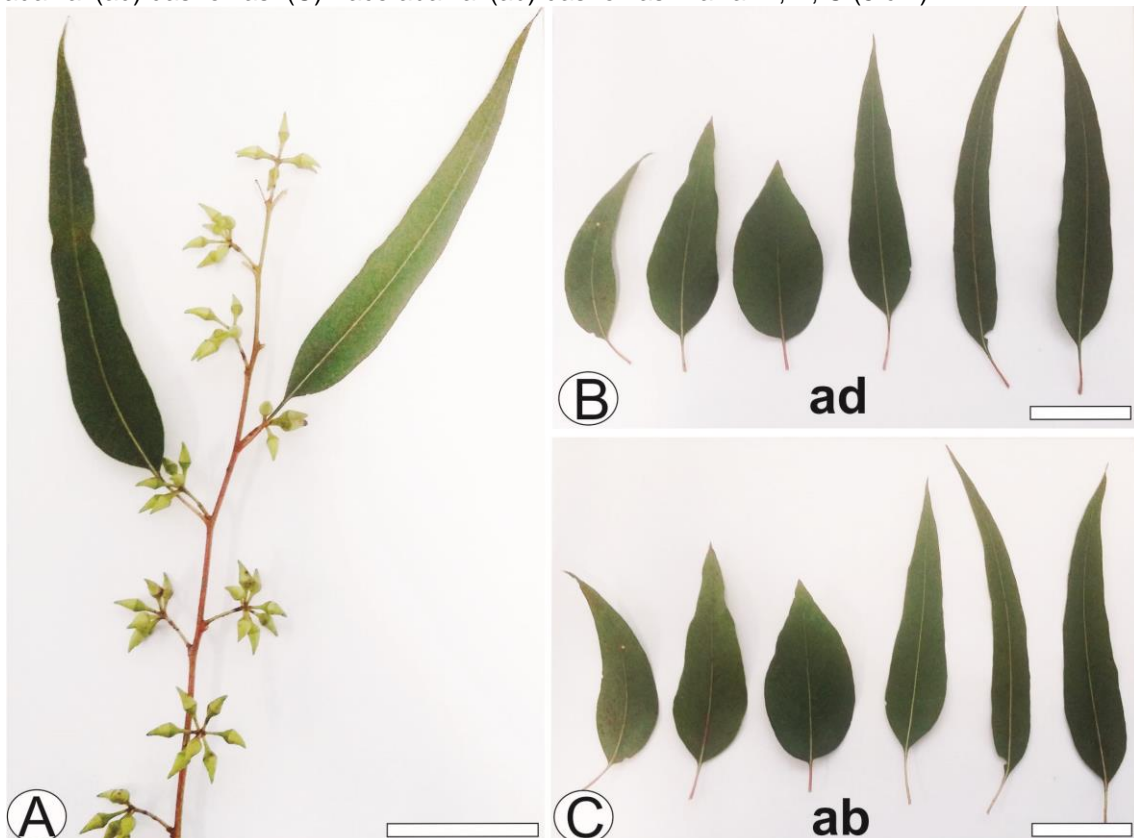


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

Morfologicamente, as folhas adultas de *Eucalyptus saligna* Sm. (Figura 6A) apresentaram formato de lanceolado a falciforme e a filotaxia alterna. Os ápices revelaram, na sua grande maioria, forma acuminada, e as bases atenuadas. As margens se apresentam inteiras e a nervação penínérvea. As folhas variaram de 8-15,5 x 1,8-3,4cm e o pecíolo apresentou tamanho de 12 a 15 mm. Considerando todas as folhas presentes na espécie em estudo, pôde-se observar a presença de heterofilia, com a presença de folhas lanceoladas, falciformes e cordiformes (Figuras 6B e C). As características encontradas neste estudo vão ao encontro das observadas por Flores et al. (2016) para as folhas de *E. saligna*.

FIGURA 6- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae (A) Aspecto geral de um ramo florido. (B) Face adaxial (ad) das folhas. (C) Face abaxial (ab) das folhas. Barra: A, B, C (5 cm).



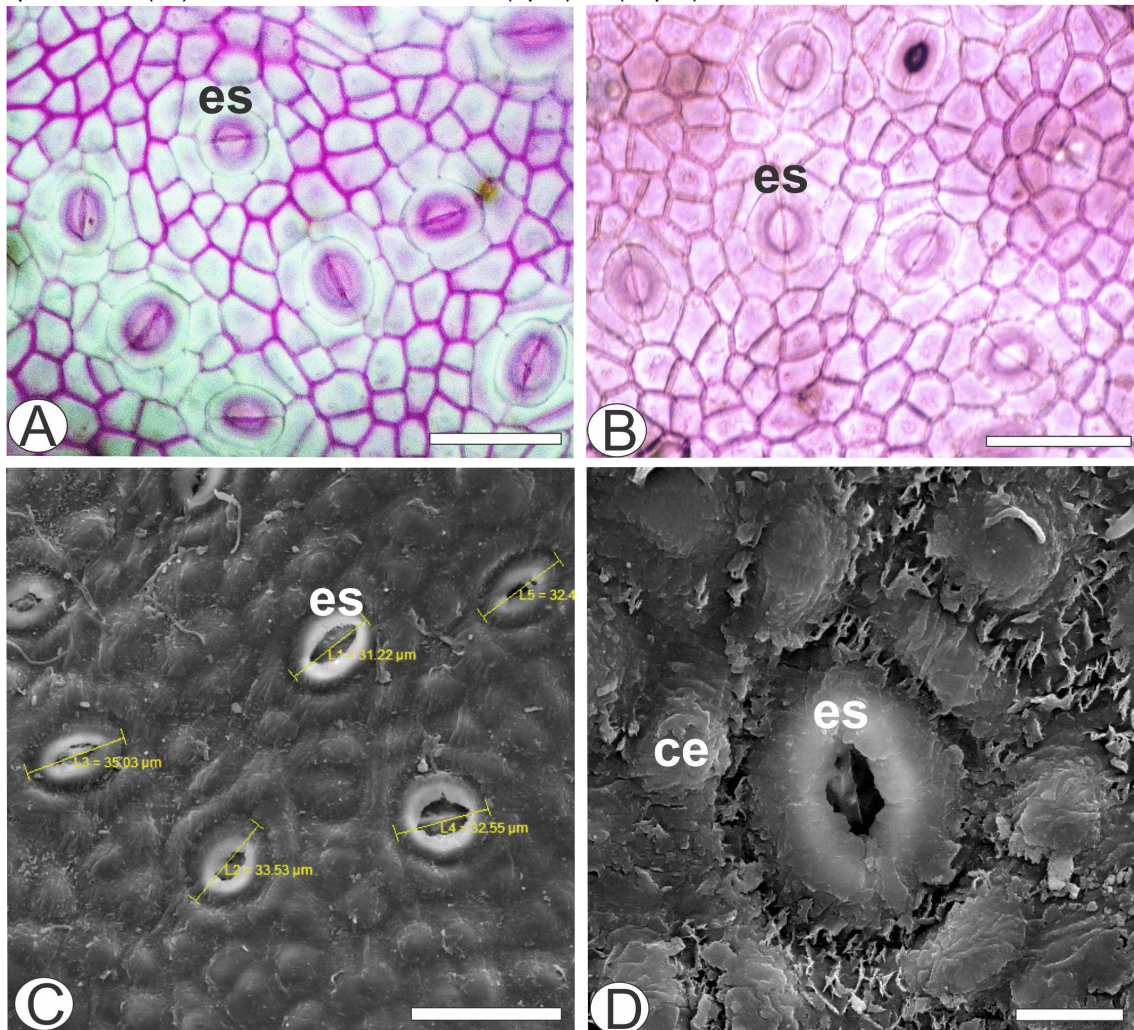
Fonte: O autor, 2017.

Anatomicamente, em vista frontal, as células epidérmicas mostraram paredes anticlinais retas (Figuras 7A e B) e revestidas por uma cutícula lisa (Figura 7C). Estômatos do tipo anomocíticos estavam presentes tanto na face adaxial (Figura 7A) como na face abaxial (Figura 7B), caracterizando a folha como anfiestomática. Os estômatos mediram em média 31 $\mu$ m (Figura 7C). Na análise ultraestrutural foi evidenciada a presença de cera epicuticular tipo crosta e em plaquetas.

Em *Eucalyptus*, estômatos anomocíticos (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010) ou anisocíticos (TANTAWI, 2004) podem ser encontrados, sendo mais comum o primeiro tipo. Folhas anfiestomáticas são frequentes no gênero (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; SANTOS et al., 2008), contudo, folhas hipoestomáticas também podem ser observadas (MALINOWSKI et al., 2009).

Cera epicuticular é comum em *Eucalyptus* (BARTHLOTT et al., 1998), o tipo cristalóide filamentoso foi descrito para *E. globulus* subsp. *bicostata* (MALINOWSKI et al., 2009), plaquetas paralelas para *E. yalataensis* Boomsma, plaquetas com borda inteira para *E. viridis* F.Muell. ex R.T.Baker e plaquetas com bordos digitados para *E. platypus* Hook f. (KNIGHT et al., 2004).

FIGURA 7- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. (A) Secção paradérmica da folha, face adaxial, evidenciando os estômatos anomocíticos (es) e o formato poliédrico das células epidérmicas. (B) Secção paradérmica da folha, face abaxial, indicando os estômatos anomocíticos. (C) Face adaxial da folha, evidenciando estômatos (es) em microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEVEC). (D) Face abaxial da folha, mostrando estômatos (es) e cera epicuticular (ce)- MEVEC. Barra: A, B e C (5µm); D (10µm).



Fonte: o autor, 2017.

Em secção transversal da lâmina foliar de *E. saligna* foi possível observar uma epiderme uniestratificada recoberta com uma cutícula espessa e lisa em ambas as faces (Figuras 8A, B e C). O mesofilo é isobilateral, sendo constituído por aproximadamente três camadas de parênquima paliçádico, em ambas as faces, e de duas a três camadas de parênquima esponjoso na região mediana (Figuras 8A, B, C e D).

A cutícula pode apresentar-se na forma estriada, sulcada ou papilosa, e representa uma característica anatômica diagnóstica (UPTON et al., 2011). Em *E. benthamii*, a cera epicuticular se apresentou ondulada e sinuosa em ambas as faces, com presença de finas estriações (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010).

Algumas espécies de *Eucalyptus* apresentam papilas (GUZMÁN et al., 2014), em *E. saligna* foram observadas papilas na face adaxial da folha.

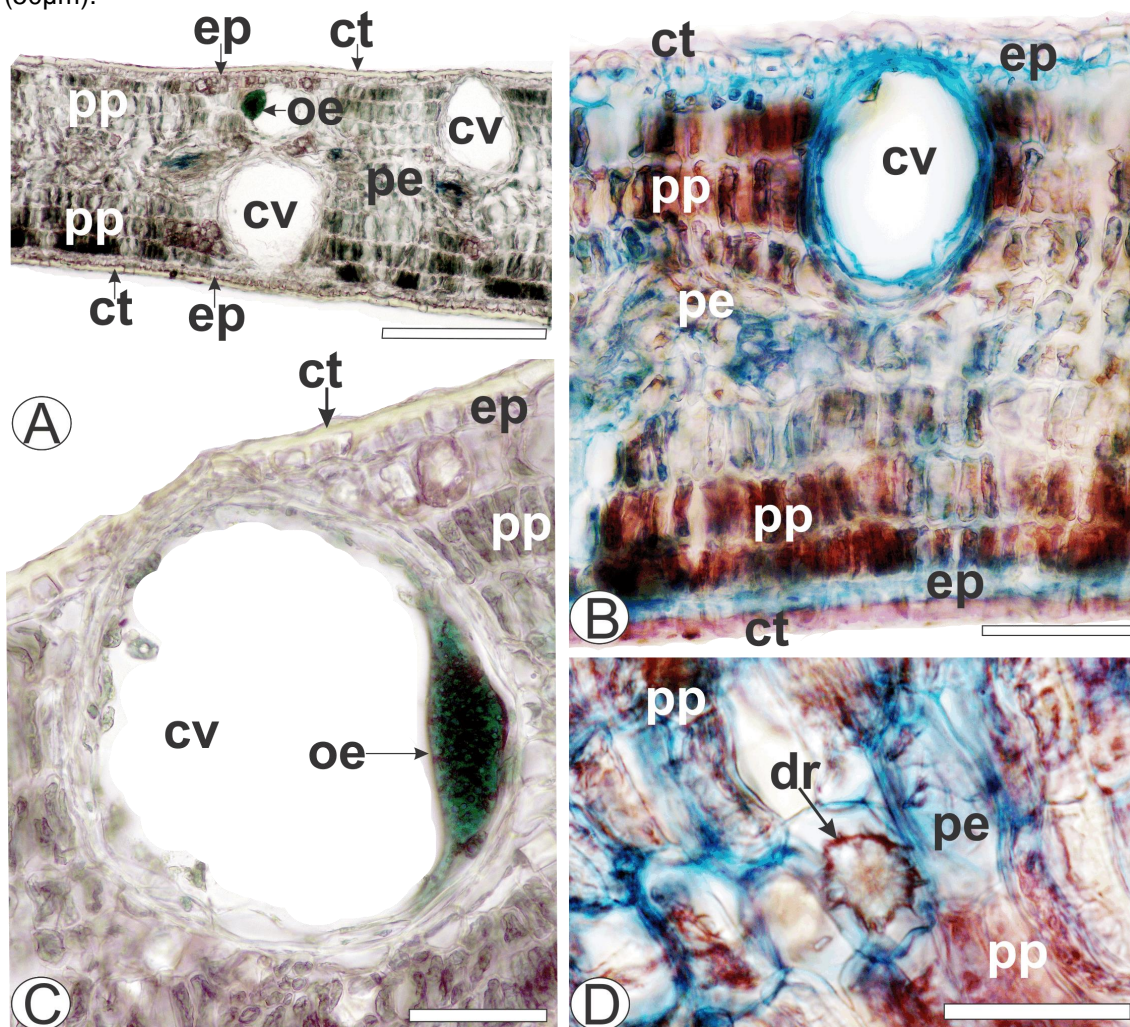
O tipo do mesofilo e também o número de camadas de parênquima paliçádico e esponjoso são características que podem auxiliar na diferenciação de espécies de *Eucalyptus*. Entretanto, a anatomia foliar pode ser alterada por fatores climáticos, a exemplo de *E. camaldulensis* que apresenta folhas espessas quando cresce em ambientes áridos (JAMES; BELL, 1995). Mesofilo isobilateral é comum em *Eucalyptus* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; IFTIKHAR et al., 2009; SANTOS et al., 2008), contudo, o tipo dorsiventral também pode ser observado, como em *E. globulus* subsp. *bicostata* (MALINOWSKI et al., 2009).

Cavidades secretoras, com conteúdo de caráter lipofílico, foram localizadas dispersas no mesofilo, especialmente na região subepidérmica, em ambas as faces (Figuras 8A, B e C). Na região mediana do mesofilo foi observada a presença de feixes vasculares que tendem a ser colaterais de pequeno e médio porte. Próximo a esses feixes, foram notados idioblastos contendo cristais prismáticos e drusas (Figura 8D).

A presença de cavidades oleíferas é uma característica marcante em gêneros de Myrtaceae, a exemplo de *Callistemon*, *Myrtus*, *Psidium*, *Syzygium* e *Eucalyptus* (AL-EDANY; AL-SAAD, 2012). De acordo com a literatura, a distribuição e o tamanho das cavidades pode variar (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; IFTIKHAR et al., 2009; MALINOWSKI et al., 2009; SANTOS et al., 2008). Nesse sentido, Santos et al. (2008) evidenciaram muitas cavidades oleíferas em ambas as faces de *E. pellita* F.Muell., enquanto, *E. pillularis* Sm. apresentou poucas cavidades oleíferas, ocorrendo apenas na face adaxial. Óleos essenciais têm importantes funções na planta, como proteger do frio e do calor, atrair ou repelir insetos e como ferramentas de defesa (LAWRENCE; REYNOLDS, 2001).

O súber cicatricial está presente em alguns taxa de *Eucalyptus* e tem como função evitar a perda de água e de outras substâncias voláteis, como ocorre em *E. globulus* e em *E. benthamii* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 1998). Na lâmina foliar de *E. saligna* essa característica também foi observada.

FIGURA 8- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da lâmina foliar, expondo o aspecto geral do mesofilo isobilateral, com destaque para cavidade oleífera (cv), óleo essencial (oe), cutícula (ct), epiderme (ep), parênquima esponjoso (pe) e parênquima paliçádico (pp). (B) Detalhe da figura anterior, destacando cavidade oleífera (cv), cutícula (ct), epiderme (ep), parênquima esponjoso (pe) e parênquima paliçádico (pp). (C) Detalhe da cavidade oleífera (cv), evidenciando o óleo essencial (oe) e também a cutícula (ct), podendo-se observar epiderme (ep) e parênquima paliçádico (pp). (D) Por menor do mesofilo, indicando uma drusa (dr) e os parênquimas esponjoso (pe) e paliçádico (pp). Barra: A (200µm); B, C e D (50µm).



Fonte: O autor, 2017.

A nervura mediana, em secção transversal, possui formato levemente biconvexo em ambas as faces (Figura 9A). A epiderme uniestratificada é coberta por uma cutícula espessa e lisa (Figuras 9A, D e E). Subjacente à epiderme encontra-se a região do colênquima, composto por cerca de quatro camadas em ambas as faces, nessa região também foram encontrados idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio (Figuras 9C, D e E). Uma bainha esclerenquimática incompleta circunda o sistema vascular (Figura 9A).

O sistema vascular foi classificado como bicolateral, sendo formado por um feixe central em arco aberto e dois feixes dorsais (Figura 9A).

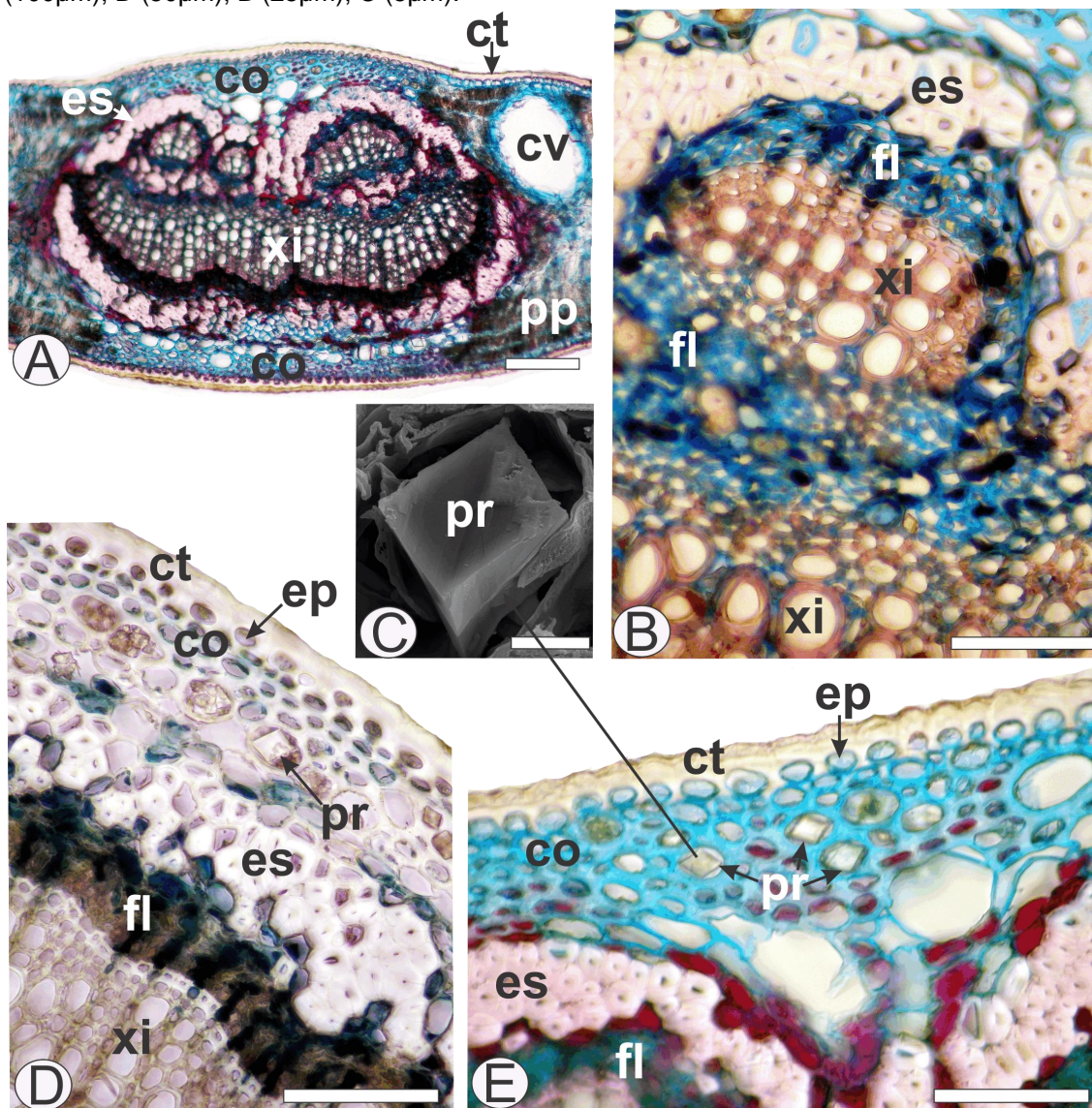
Nervura central com formato levemente biconvexo foi observado em *E. pyrocarpa* L.A.S. Johnson & Blaxell (SANTOS et al., 2008). Todavia, formato plano-convexo foi relatado para várias espécies de *Eucalyptus*, a saber: *E. grandis*, *E. resinifera* e *E. urophylla* S.T.Blake (SANTOS et al., 2008).

Santos et al. (2008) ao analisarem a anatomia foliar de sete espécies de *Eucalyptus* observaram que os feixes vasculares eram do tipo bicolateral na nervura mediana, em todas as espécies estudadas. Porém, a disposição desses feixes foi diferente entre os taxa. Para as espécies *E. grandis*, *E. pellita*, *E. pilularis* e *E. urophylla* a disposição dos feixes vasculares era em arco aberto, enquanto que para *E. resinifera* e *E. saligna* o arranjo era em arco aberto com terminações invaginadas. Adicionalmente, Malinowski et al. (2009) descreveram o padrão vascular da nervura central formado por um feixe vascular de maior porte voltado para a face abaxial e por dois feixes de menor porte voltados para a face adaxial, concordando com o descrito para a espécie em estudo.

O formato da nervura central e o padrão vascular podem ser marcadores anatômicos, auxiliando na diferenciação de espécies do mesmo gênero, a exemplo de *Baccharis* (BOBEK et al., 2016), *Passiflora* (WOSCH et al., 2015) e *Mikania* (ALMEIDA et al., 2017), da mesma forma ocorrendo no gênero em estudo (SANTOS et al., 2008).

Cristais prismáticos (Figuras 9C, D e E) foram encontrados dispersos no parênquima fundamental e compostos fenólicos foram observados no sistema vascular, principalmente no floema (Figuras 9B e E).

FIGURA 9- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da nervura mediana da folha, indicando a cutícula (ct), colênquima (co), bainha esclerenquimática (es), xilema (xi), parênquima paliçádico (pp) e cavidade oleífera (cv). (B) Detalhe do feixe vascular, com destaque para a bainha esclerenquimática (es), xilema (xi) e floema (fl). (C) Cristal prismático de oxalato de cálcio no interior de um idioblasto (pr). (D) Secção transversal da nervura mediana da folha, evidenciando a cutícula (ct), epiderme uniestratificada (ep), colênquima (co), cristais prismáticos (pr), bainha esclerenquimática (es), floema (fl) e xilema (xi). (E) Secção transversal da nervura mediana da folha, evidenciando a cutícula (ct), epiderme (ep), colênquima (co), cristais prismáticos (pr), bainha esclerenquimática (es) e floema (fl). Barra: A (100µm); D (50µm); B (25µm); C (5µm).



Fonte: O autor, 2017.

O pecíolo de *E. saligna*, seccionado transversalmente em diferentes alturas proximal, mediana e distal mostrou sutis diferenças entre o pecíolo mediano (Figura 10A) que se mostrou arredondado e o pecíolo distal (Figura 10B) que se apresentou praticamente plano-convexo, com duas pequenas alas na face adaxial. A epiderme evidenciou as mesmas características apresentadas para a lâmina foliar (Figura 10D). Subjacente à epiderme,

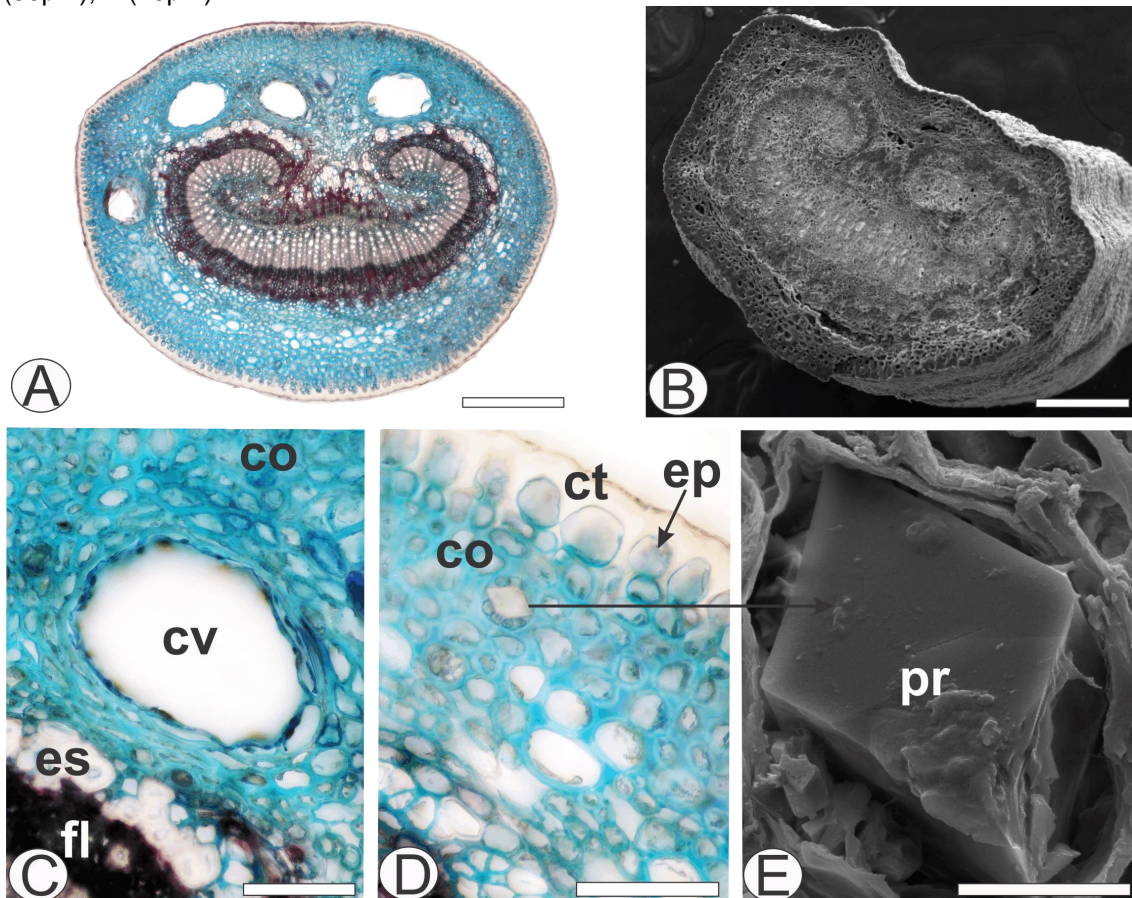
observou-se de três a seis camadas de colênquima do tipo angular, e a presença de alguns idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Figuras 10D e E).

As cavidades secretoras foram visualizadas no parênquima fundamental e apresentaram características semelhantes às encontradas no mesófilo (Figura 10C). O sistema vascular é do tipo bicolateral em arco aberto com invaginações nas extremidades. Ao redor do sistema vascular foi observada uma bainha esclerenquimática descontínua, composta de um a dois estratos celulares (Figura 10C).

Quanto ao pecíolo das Myrtaceae, Metcalfe e Chalk (1950) afirmaram que o mesmo possui um sistema vascular do tipo bicolateral. Para o gênero essa mesma característica foi constatada, a exemplo de *E. benthamii* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010). Assim como o formato da nervura central, o formato do pecíolo e o padrão vascular auxiliam na diferenciação das espécies (WOSCH et al., 2015).



FIGURA 10- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. (A) Secção transversal da porção mediana do pecíolo. (B) Secção transversal da porção distal do pecíolo (MEVEC). (C) Detalhe da cavidade oleífera, observando-se também o colênquima (co), cavidade oleífera (cv), esclerênquima (es) e floema (fl). (D) Detalhe da epiderme (ep), cutícula (ct), colênquima (co) e cristal prismático (pr). (E) Detalhe do cristal prismático de oxalato de cálcio (pr). Barras: A, B (200µm); C, D (50µm); E (10µm).



Fonte: O autor, 2017.

O caule, em secção transversal (Figura 11A), apresentou formato arredondado e epiderme uniestratificada com células de formatos irregulares, coberta por uma cutícula espessa e lisa (Figuras 11B e D). Subjacentemente à epiderme foi observado um colênquima angular, formado por cerca de sete camadas de células. Nesta região foram encontradas cavidades secretoras contendo óleo essencial (Figura 11B) e cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Figura 11D, E e F).

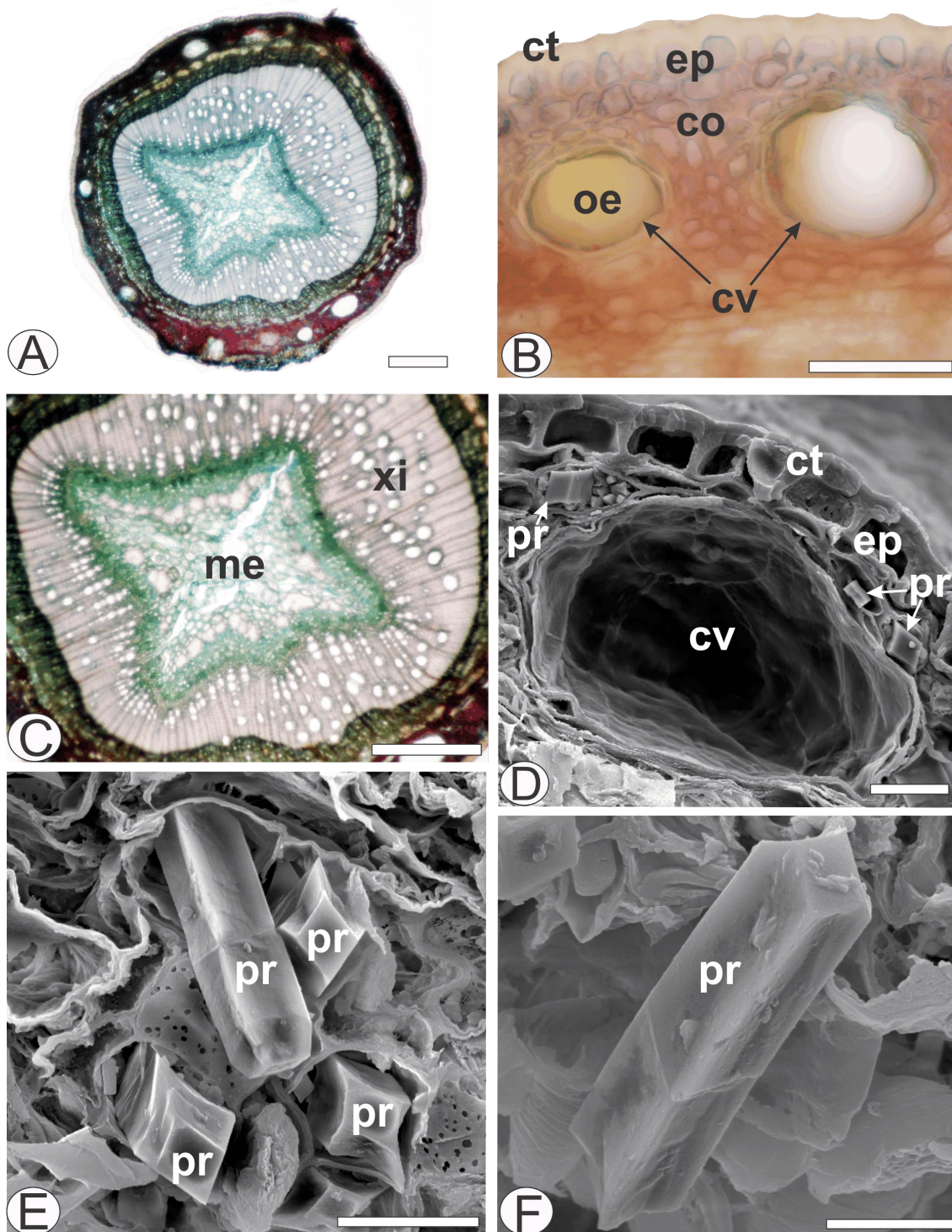
O sistema vascular apresentou câmbio formando floema centriptamente e xilema centrifugamente (Figura 11C). Células esclerenquimáticas foram observadas próximas ao sistema floemático. A medula evidenciou um formato praticamente quadrado em secção transversal e as células parenquimáticas apresentaram diversos tamanhos e paredes delgadas (Figura 11A e C).

Células esclerenquimáticas, cristais prismáticos e drusas também foram encontrados na região medular.

Revolti (2015) em seu estudo com a espécie *E. grandis*, observou na secção transversal do caule uma epiderme unisseriada, córtex com parênquima e colênquima, sistema vascular desenvolvido e medula parenquimática central, além disso evidenciou cavidades secretoras com óleo essencial e grande quantidade de cristais prismáticos de oxalato de cálcio no córtex e na medula.

Brisola e Demarco (2011) afirmaram que há diferenças anatômicas importantes no caule jovem de *E. grandis*, *E. urophylla* e o híbrido *E. grandis* x *urophylla*. Esses autores afirmaram que o formato do caule, a presença de esclerênquima e de idioblastos fenólicos auxiliam na diferenciação dos três taxa.

FIGURA 11- *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. (A) Visão geral do caule. (B) Detalhe da região cortical do caule, evidenciando a cutícula (ct), epiderme uniestratificada (ep), colênquima (co), cavidades oleíferas (cv) e óleo essencial (oe). (C) Secção transversal da região xilêmica e medular, indicando o xilema (xi) e a medula (me). (D) Detalhe da cavidade oleífera (cv), epiderme (ep), cutícula (ct) e cristais prismáticos (pr). (E) Cristais prismáticos de oxalato de cálcio, detalhe do cristal prismático (pr) (MEVEC). Barra: A (200µm); B, C (50µm); D (20µm); E (10µm); F (5µm).



Fonte: O autor, 2017.

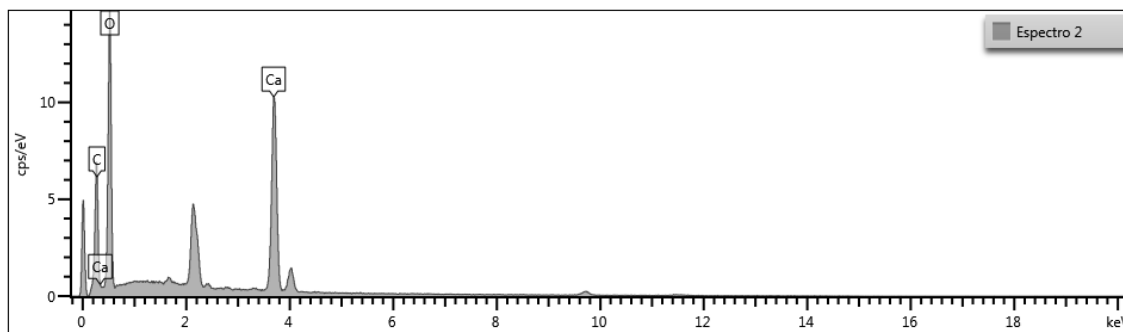
No presente estudo, dois morfotipos cristalinos foram encontrados, cristal prismático e drusa. Esses estavam presentes no mesofilo (Figura 8D), na nervura central (Figuras 9C, D, E), no pecíolo (Figuras 10D, E) e no caule (Figuras 11E, F). A presença de cristais é comum em *Eucalyptus* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; MALINOWSKI et al., 2009; SANTOS et al., 2008).

Os cristais normalmente se formam nos vegetais a partir da excreção do ácido oxálico na forma de sais de cálcio insolúveis, e podem ter a estrutura de cristais prismáticos, drusas, cristais aciculares, estiloides ou areia cristalina (UPTON et al., 2011). Os cristais fornecem rigidez ao tecido, mantêm o equilíbrio iônico e atuam removendo o cálcio, magnésio, ácido oxálico, alumínio e outros metais pesados, além de atuar como ferramentas de defesa contra o ataque de herbívoros (FRANCESCHI; NAKATA, 2005; HE et al., 2012)..

A presença ou ausência de cristais em espécies vegetais, seus tipos e a composição química são características taxonômicas (MERIC, 2009). A composição química, comumente, é de sais de cálcio precipitados nas formas de oxalato, fosfato, sulfato, silicato, carbonato, malato e citrato (WEINER; DOVE, 2003).

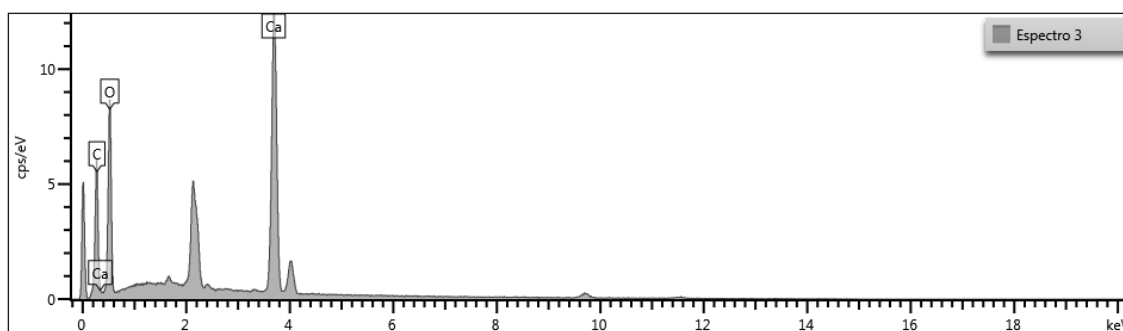
Os cristais prismáticos e as drusas foram analisados quanto à sua composição química elementar. Na Figura 12, o espectro de um cristal prismático pode ser observado, sendo os picos proeminentes para cálcio (37,18%), carbono (13,09%) e oxigênio (49,73%), enquanto que na Figura 13, o espectro de uma drusa evidencia picos de Ca (42,23%), C (11,17%) e O (46,60%). Vários estudos têm mostrado a composição química elementar dos cristais por EDS (ALMEIDA et al., 2017; ANDRADE et al., 2017; BERTOCCO et al., 2017; HE et al., 2012; SANTOS et al., 2018; SWIECH et al., 2016).

Figura 12- Espectro de EDS de um cristal prismático de *Eucalyptus saligna*.



Fonte: O autor, 2017.

Figura 13. Espectro de EDS de uma drusa de *Eucalyptus saligna*.



Fonte: O autor, 2017.

Os testes histoquímicos realizados contribuíram para a localização de compostos lipofílicos, lignificados e fenólicos, além de grãos de amido em *E. saligna*. Compostos lipofílicos, em reação positiva no teste com o Sudan III, foram localizados na cutícula (Figura 14A) e no interior de cavidades secretoras (Figura 14B), apresentando coloração alaranjada. A cutícula é a barreira mais importante no controle da perda de água pelas folhas, caules, frutos e outros órgãos de plantas superiores (RIEDERER; SCHREIBER, 2001). É formada principalmente pela cutina, que é um polímero lipofílico depositado dentro e fora das paredes das células epidérmicas. A ornamentação cuticular é um marcador anatômico importante e pode aparecer em forma de estrias e papilas (UPTON et al., 2011).

Os óleos essenciais atuam na defesa do vegetal, atraindo ou repelindo insetos. Apresentam reconhecida atividade antimicrobiana e repelente de insetos (LAWERWNC; REYNOLDS, 2001). A presença de óleo essencial nas cavidades oleíferas foi amplamente demonstrada na literatura (BRISOLA; DEMARCO, 2001; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; SANTOS et al., 2008),

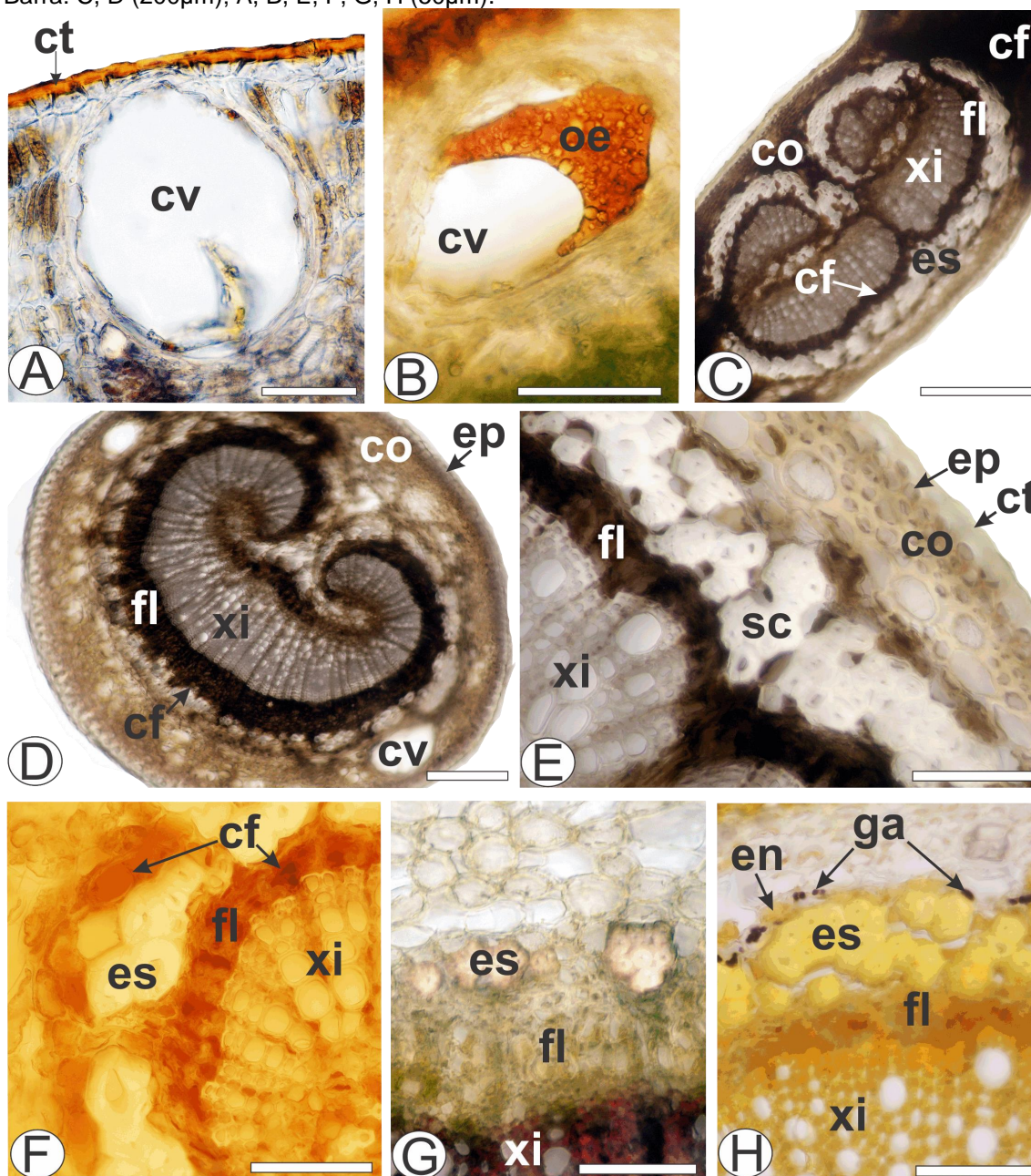
contudo, estudos apontaram diferenças na composição química dos óleos essenciais de *Eucalyptus* (BARBOSA et al., 2016; CARRAFA et al., 2016; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; FERREIRA, 2014; JESUS et al., 2016; SILVESTRE et al., 1997; TOMAZ et al., 2014).

Compostos fenólicos reagiram positivamente com cloreto férrico, apresentando coloração marrom escura, e no teste de Hoepfner-Vorsatz, coloração alaranjada, e foram encontrados no mesofilo (Figura 14C) e, especialmente, no floema na nervura central (Figura 14C) e no pecíolo (Figuras 14C, D, E, F). Compostos fenólicos atuam na defesa do vegetal, atuando como antioxidantes, na adaptação das espécies, na resistência a fatores abióticos desfavoráveis e na resistência ao ataque de microrganismos (ROCHA et al., 2011). Vários estudos demonstraram a presença de compostos fenólicos em espécies de *Eucalyptus* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; BRISOLA; DEMARCO, 2001; SANTOS et al., 2008).

Compostos lignificados reagiram com floroglucina clorídrica, apresentando coloração amarelada, e foram encontrados nos elementos de vaso do xilema, nas células esclerenquimáticas, estas, localizadas especialmente no floema da nervura central, pecíolo e caule (Figura 14G), e na medula do caule. Os compostos lignificados localizam-se na parede secundária das células de tecidos específicos como xilema e esclerênquima e fornecem hidrofobicidade e resistência a esses tecidos (BOERJAN et al., 2003).

Grãos de amidos reagiram com solução de lugol, adquirindo coloração marrom escura, e foram localizados na endoderme do caule (Figura 14H), apresentando formatos arredondados ou ovalados, isolados ou formando agregados. Grãos de amidos são amplamente distribuídos nos tecidos de plantas e são frequentemente encontrados em grande quantidade em raízes, rizomas e frutos. A presença e a forma dos grãos de amido muito podem contribuir para a identificação de um *taxon* (UPTON et al., 2011).

FIGURA 14- Caracterização histoquímica de *Eucalyptus saligna* Sm., Myrtaceae. Secções transversais. (A) Lâmina foliar, evidenciando cutícula (ct) e cavidade oleífera (cv), ambas em reação com Sudan III. (B) Oléo essencial (oe) no interior de uma cavidade oleífera (cv) em reação com Sudan III. (C) Região da nervura mediana da folha, destacando compostos fenólicos (cf) em reação com cloreto férrico, além do colênquima (co), bainha esclerenquimática (es), floema (fl) e xilema (xi). (D) Pecíolo indicando a presença de compostos fenólicos (cf) em reação com cloreto férrico no floema (fl), e os elementos: epiderme (ep), colênquima (co), cavidade oleífera (cv), e xilema (xi). (E) Detalhe da figura anterior. (F) Feixe vascular do pecíolo evidenciando compostos fenólicos (cf) em reação positiva no teste de Hoepfner-Vorsatz no floema (fl), perto das células esclerenquimáticas (es) e em algumas células parenquimáticas do xilema (xi). (G) Caule mostrando compostos lignificados em reação positiva com floroglucina clorídrica nas células esclerenquimáticas (es) do floema (fl) e no xilema (xi). (H) Caule evidenciando endoderme amilífera (en), onde são observados os grãos de amido (ga) em reação com lugol, células do esclerênquima (es), floema (fl) e xilema (xi). Barra: C, D (200µm); A, B, E, F, G, H (50µm).



Fonte: O autor, 2017.

## 5.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial a partir de folhas e caules de *E. saligna*, realizada por hidrodestilação com o aparato de Clevenger teve um rendimento de  $1,03 \pm 0,7\%$ .

No decorrer da extração foi observado que o óleo essencial de *E. saligna* possui coloração amarela clara (Figura 15), odor forte e característico, e que sua densidade é menor que a densidade da água. Essas características físicas também foram observadas no óleo essencial de *E. benthamii* (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010).

FIGURA 15- Óleo essencial de *Eucalyptus saligna* extraído por meio de hidrodestilação.



Fonte: Autor, 2016

O rendimento do óleo em estudo, em coleta realizada no outono (mês de abril), foi semelhante ao obtido do óleo de *E. benthamii* coletado na mesma estação climática (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010; SIMÕES et al., 2010). Vitti e Brito (2003) afirmaram que, no Brasil, as principais espécies que apresentam maior rendimento no óleo essencial das folhas são *E. globulus* (1,7-5%) e *E. staigeriana* F.Muell. ex F.M.Bailey (1,2-1,5%).



Bett et al. (2016), ao extraírem o óleo essencial de *E. saligna*, verificaram um rendimento de 0,38%. No presente estudo o rendimento foi de 1,03%. Esta diferença pode ser justificada porque o rendimento de óleos essenciais pode variar para o mesmo *taxon*, dependendo dos fatores ambientais, dos métodos utilizados para extração do óleo essencial e das condições de armazenamento (BROOKER; KLEINIG, 2006; LEMOS et al., 2012). Além disso, os autores citados acima utilizaram apenas as folhas de *E. saligna* para extração do óleo essencial, enquanto que no presente estudo, foram utilizadas folhas e caules para a extração. A presença de várias e grandes cavidades secretoras no córtex do caule, evidenciadas no estudo anatômico, pode ter contribuído para aumentar o rendimento do óleo essencial.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química dos óleos essenciais extraídos de folhas e caules de *E. saligna* foi obtida através de CG-EM, e está compilada na Tabela 1. Por meio dessa análise foi possível determinar a composição química em percentual de 84,16%. Foram identificados 16 constituintes dos óleos essenciais, sendo o *p*-cimeno constituinte majoritário (28,90%), seguido da criptona (17,22%). Comparando os grupos químicos, o óleo de *E. saligna* possui uma alta fração de monoterpenos (79,32%), sendo 41,14% de monoterpenos oxigenados.

Uma composição química diferente foi encontrada para o óleo essencial de *E. saligna* coletada em Busia, no Quênia, sendo os principais componentes 1,8-cineol (24,26%), *o*-cimeno (9,92%) e  $\alpha$ -terpineol (8,81%) (BETT et al., 2016). Já o óleo essencial de *E. saligna* cultivada nos Camarões mostrou 1,8-cineol (45,2%), *p*-cimeno (34,4%) e  $\alpha$ -pineno (12,8%) como principais componentes (MOSSI et al., 2011). Uma porcentagem bastante elevada de 1,8-cineol (93,2%) foi encontrada no óleo essencial de *E. saligna* coletado na Argentina (TOLOZA et al., 2006).

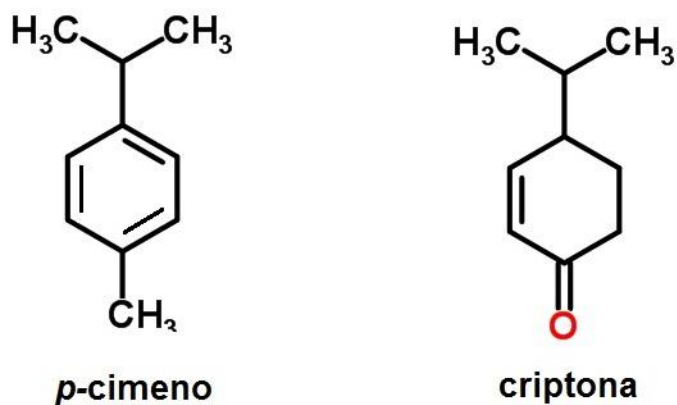
TABELA 1- Composição química do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* obtida por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas.

Constituinte	IA calculado	IA teórico	Concentração (%)
$\alpha$ -Tujeno	927	924	0,94
$\alpha$ -Pineno	933	932	1,04
$\alpha$ -Felandreno	1006	1002	1,04
A-Terpineno	1017	1014	0,57
<i>p</i> -Cimeno	1025	1022	28,90
Silvestreno	1029	1025	4,89
1,8-Cineol	1032	1026	2,15
<i>p</i> -Cimemeno	1091	1089	0,80
Sabina ketone	1152	1154	2,25
Terpinen-4-ol	1179	1174	5,33
Criptona	1188	1183	17,22
$\alpha$ -Terpineol	1193	1186	0,73
Cumin aldeído	1242	1238	5,25
trans-Ascaridol Glicol	1277	1266	7,32
Timol	1305	1289	0,89
Espatuleno	1582	1577	4,84
<b>Total identificado</b>			<b>84,16</b>
<b>Monoterpenos</b>			<b>38,18</b>
<b>Monoterpenos oxigenados</b>			<b>41,14</b>
<b>Sesquiterpenos</b>			<b>4,84</b>

(IA)- índice aritmético

Fonte: O autor, 2016.

Figura 16- Estrutura química dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *Eucalyptus saligna*.



Fonte: Adaptado de ChemSpider, 2017.

Considerando o óleo essencial extraído a partir de folhas de *E. saligna* cultivados no Brasil, há diferenças consideráveis na composição química. Os principais compostos encontrados para o óleo essencial de *E. saligna* do Estado de Goiás foram *p*-cimeno (25,6%),  $\alpha$ -terpineol (9,3%),  $\alpha$ -canfonellal (8,0%) e 1,8-cineol (6,2%) (ESTANISLAU et al., 2001). Já o  $\alpha$ -pineno foi o composto encontrado em maior quantidade (92,3%) no óleo essencial de *E. saligna* do Estado de Minas Gerais (FILOMENO et al., 2008). Do Estado de São Paulo, Sartorelli et al. (2007) observaram  $\alpha$ -pineno (45,1%), *p*-cimeno (22,5%) e óxido de  $\alpha$ -pineno (11,3%) enquanto Batista-Pereira et al. (2006) encontraram  $\alpha$ -pineno (25,9%), *p*-cimeno (24,4%) e  $\gamma$ -terpineno (24,6%) como principais compostos do óleo essencial de *E. saligna*.

*Eucalyptus saligna* é amplamente cultivada no Brasil para produção de celulose e é uma espécie composta de vários quimiotipos, sendo alguns deles ricos em 1,8-cineol (BARBOSA et al., 2016). Sartorelli et al. (2007) ao analisarem o óleo essencial de *E. saligna* observaram diferenças entre as composições químicas dependendo do estágio fenológico das folhas, possuindo maior concentração de  $\alpha$ -pineno durante o florescimento e de *p*-cimeno na fase vegetativa.

No presente estudo, o óleo essencial das folhas e caules de *E. saligna* evidenciou menor concentração de 1,8-cineol (2,18%). Essa composição foi diferente da encontrada para outras espécies de *Eucalyptus*, nas quais o 1,8-cineol, ou eucaliptol, aparece como principal componente (CARRAFA et al., 2016; FERREIRA, 2014; JESUS et al., 2016; SILVESTRE et al., 1997; TOMAZ et al., 2014). Na espécie farmacopeica, *E. globulus*, o 1,8-cineol é o componente majoritário do óleo essencial (pelo menos 70%) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

A composição química do óleo essencial pode variar de acordo com a região, estação, tipo de solo, clima, idade da planta, métodos utilizados para secagem do material vegetal e o processo de extração (BROOKER; KLEINIG, 2006; BARBOSA et al., 2016). Além disso, as atividades biológicas estão diretamente ligadas a composição química do óleo essencial (BARBOSA et al., 2016).

Em geral, espécies com grande quantidade de eucaliptol são as utilizadas para fins terapêuticos (SIMÕES et al., 2010), entretanto, existem

estudos demonstrando que espécies com teores menores de 1,8-cineol também possuem atividades farmacológicas (BARBOSA et al., 2016; BHUYAN et al., 2017; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015; ELAISSI et al., 2012; TAPONDJOU et al., 2005).

No presente estudo, o principal composto encontrado no óleo essencial de *E. saligna* foi o *p*-cimeno (28,90%). Este componente foi encontrado em outras espécies de *Eucalyptus*, como em *E. camaldulenses* (17,9%) (LUCIA et al., 2008) e em *E. tereticornis* (22%) (TOLOZA et al., 2006). Existem estudos indicando uma possível ação fungicida deste composto (CAMELE et al., 2012; ELSHAFIE et al., 2015; LOPEZ-REYES et al., 2010). Santana et al. (2011) observaram, em um estudo *in vivo*, que o *p*-cimeno reduz a resposta nociceptiva orofacial e pode representar uma biomolécula importante no tratamento da dor na região orofacial. Outros estudos relacionaram uma potente atividade anti-inflamatória a esse composto (CHEN et al., 2014; ZHONG et al., 2013).

O segundo componente principal do óleo essencial de *E. saligna*, identificado neste estudo, foi a criptona. Elaiissi et al. (2011) encontraram 20,9% de criptona no óleo essencial de *E. odorata* Behr, enquanto que, Cimanga e colaboradores (2002) relataram 25% em *E. deglupta* Blume e 4% em *E. urophylla*. Coffi et al. (2012) encontraram 5,71% de criptona no óleo essencial de folhas de *E. camaldulenses* da Argentina e 9,81% na mesma espécie coletada na Austrália. Este composto demonstrou estar relacionado a atividades antibacterianas e antifúngicas, e óleos essenciais que o contém em relativa quantidade podem fornecer um produto terapêutico promissor para o tratamento de algumas doenças respiratórias causadas por infecções bacterianas (ELAISSI et al., 2011, 2012).

FIGURA 17- Cromatograma do óleo essencial das folhas e caules de *Eucalyptus saligna* obtido por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas.

Fonte: O autor, 2016.

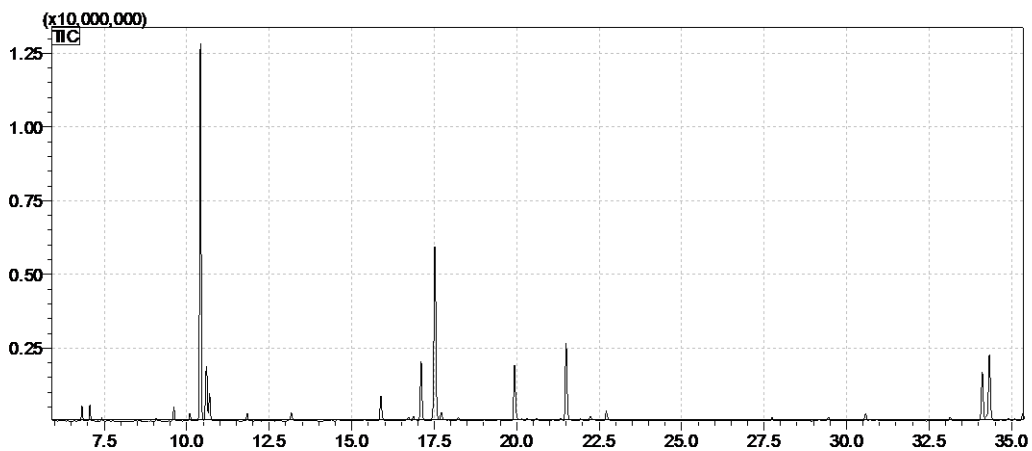
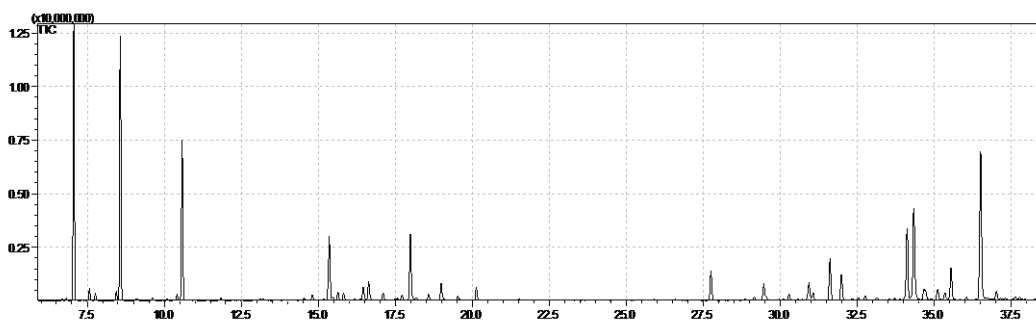
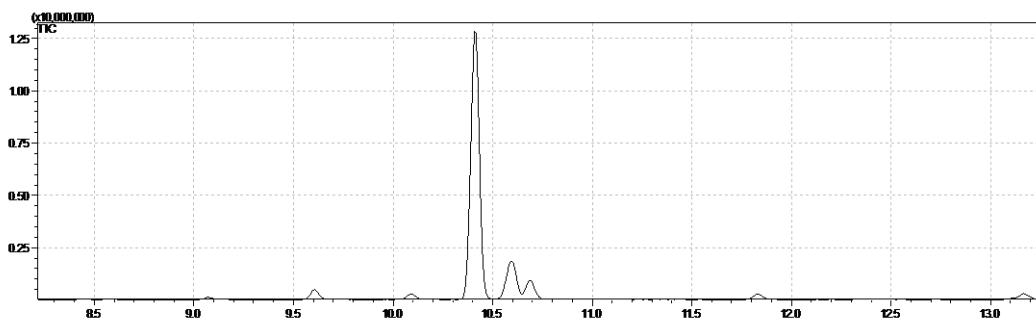


FIGURA 18- Cromatograma expandido (7-35 min) do óleo essencial das folhas e caules de *Eucalyptus saligna* obtido por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas.



Fonte: O autor, 2016.

FIGURA 19- Cromatograma expandido (8,25-13,25 min) do óleo essencial das folhas e caules de *Eucalyptus saligna* obtido por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massa, mostrando o composto majoritário *p*-cimeno em 10,412 min.



Fonte: O autor, 2016.

## 5.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 5.4.1 Atividade antioxidante

#### 5.4.1.1 Método do fosfomolibdênio

A tabela 2 apresenta a atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo essencial de *E. saligna* em relação aos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e rutina. O ácido ascórbico foi usado como substância de referência, sua atividade antioxidante foi considerada de 100% no ensaio experimental, de acordo com a literatura (PRIETTO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

TABELA 2- Média e desvio padrão da atividade antioxidante relativa (%AAR) ao ácido ascórbico do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* e dos controles ácido gálico e rutina pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.

% AAR			
Ácido ascórbico	Ácido gálico	Óleo essencial	Rutina
100	45,31 ± 0,05	28,53 ± 0,29	11,85 ± 0,14

Fonte: O autor, 2017.

De acordo com os resultados obtidos, a rutina mostrou um AAR de 11,85 ± 0,14% em relação ao ácido ascórbico, e o ácido gálico um AAR de 45,31 ± 0,05%, também em relação a substância adotada como de referência. O óleo essencial de *E. saligna* demonstrou uma capacidade antioxidante frente ao complexo fosfomolibdênio de 28,53 ± %. Esse valor, apesar de não ser o mesmo da substância de referência e menor do que do ácido gálico, é maior do que o encontrado para a rutina, que é um flavonoide, derivado glicado de quercetina, com conhecida ação antioxidante.

Dois mecanismos de redução podem explicar os resultados obtidos. A capacidade antioxidante total pode ser medida por esse método, tanto para substâncias que possuem hidroxilas disponíveis, com capacidade de doar um elétron ou um hidrogênio (mecanismo radicalar), quanto para substâncias que possuem anéis fenólicos em sua estrutura e, portanto, tem a capacidade de doar um par de elétrons (mecanismo redox). Ambos os mecanismos provocam,

portanto, a redução do complexo do fosfomolibdênio (MALINOWSKI et al., 2009). Dessa forma, a capacidade antioxidante observada do óleo essencial em estudo pode estar relacionada com a presença de compostos que agem pelos dois mecanismos.

Döll-Boscardin e colaboradores (2015) em seus estudos com *E. benthamii* obtiveram um resultado de 43,15% de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico. Porém, Malinowski et al. (2009) ao estudarem a espécie *E. globulus* ssp. *bicostata*, por meio do mesmo procedimento, obtiveram um valor de 25,72% de atividade para o óleo essencial. Portanto, pode-se dizer que o óleo essencial de *E. saligna* obteve melhores resultados na capacidade de reduzir o complexo do fosfomolibdênio quando comparado ao óleo essencial de *E. globulus* ssp. *bicostata*, contudo bastante inferior em comparação ao óleo essencial de *E. benthamii*.

#### 5.4.1.2 Método do DPPH

Na Tabela 3 encontram-se os resultados referentes a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. saligna*, em diferentes concentrações, obtidos pelo método de redução do radical DPPH•.

TABELA 3- Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante pelo método do DPPH• em diferentes concentrações, no tempo 30 minutos.

	AA%			
	20 mg/mL	15 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
<b>Óleo essencial</b>	8,33 (±0,73)	7,26 (±1,01)	3,38 (±0,40)	3,18 (±0,26)
<b>Ácido gálico</b>	99,60 (±0,26)	98,70 (±0,30)	97,56 (±0,15)	96,62 (±0,18)
<b>Ácido ascórbico</b>	99,43 (±0,14)	98,67 (±0,30)	97,48 (±0,16)	96,17 (±0,45)
<b>Rutina</b>	96,68 (±0,26)	96,04 (±0,26)	94,84 (±0,27)	94,29 (±0,13)

Fonte: O autor, 2017.

Os padrões rutina, ácido gálico e ácido ascórbico apresentaram uma capacidade antioxidante bem maior do que do óleo essencial de *E. saligna*. Os valores no tempo 0 e no tempo 30 não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das amostras testadas.

O radical DPPH•, ao sofrer redução formando difenil-picril-hidrazina, desenvolve uma coloração amarela. A capacidade de redução do DPPH está relacionada a sua capacidade específica de receber um elétron ou um hidrogênio da amostra, ou seja, esse método avalia o poder redutor do antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Segundo Blois (1958), o radical livre DPPH• não tem capacidade para ser reduzido por substâncias aromáticas com apenas uma hidroxila. Esse fato pode explicar o resultado negativo do óleo essencial de *E. saligna* no estudo da capacidade de redução do DPPH•, porém melhor no método do fosfomolibdênio. Os óleos essenciais, em geral, não são ricos em compostos aromáticos que possuem mais de uma hidroxila, portanto, não são capazes de reduzir de forma significativa o radical livre DPPH• pelos seus compostos voláteis insaturados (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2015). Em contrapartida, a presença de grande quantidade de compostos insaturados no óleo essencial em estudo, pode justificar sua maior eficiência em reduzir o complexo fosfomolibdênio em comparação ao flavonoide rutina.

Atividades antioxidantes baixas em ensaios de DPPH foram obtidas em outras espécies de *Eucalyptus*, como *Eucalyptus gunnii* Hook. F. (GUIMARÃES et al., 2010), *E. grandis* (SEWANU, 2010), *E. cinerea* e *E.camaldulenses* (HERZI et al., 2013). Contudo, também encontra-se na literatura estudos mostrando uma forte atividade antioxidante de alguns óleos essenciais de *Eucalyptus* através deste método, a exemplo *E. teretecornis* (SINGH et al., 2009), *E. globulus* e *E. radiata* (LUIS et al., 2016).

Said et al.(2016), em estudo com o óleo essencial extraído de frutos de *E. globulus*, indicaram um valor de IC<sub>50</sub> igual a  $27 \pm 0,2$ mg/mL, quando da avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do DPPH. Nesse mesmo trabalho foi observado que 61,2% da composição do óleo essencial era constituída de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados e 31,2% de monoterpenos, sendo que o 1,8-cineol apareceu com teor de 19,8%.

Na análise dos óleos essenciais coletados de folhas de *E. globulus* e *E. radiata*, Luis et al. (2016) encontraram valores de IC<sub>50</sub> de  $2,90 \pm 0,35$ (v/v) para *E. globulus* e de  $4,56 \pm 0,70$ (v/v) para *E. radiata*. Ambos os óleos foram considerados com atividade antioxidante forte, e essa bioatividade foi atribuída, principalmente, a presença de polifenóis na composição química das amostras



testadas. Assim, inferiu-se que a atividade antioxidante dos óleos essenciais dos eucaliptos estudados se deve principalmente à presença de seus principais compostos: 1,8-cineol (*E. globulus*) e limoneno (*E. radiata*).

Em seus estudos sobre o óleo essencial de *E. benthamii*, Döll-Boscardin et al. (2015) obtiveram, através do método do DPPH, um IC<sub>50</sub> 3,21mg/mL. No mesmo estudo foi observado um teor ínfimo de 1,8-cineol (0,54%), e o componente majoritário encontrado foi o  $\alpha$ -pineno (22,63%).

#### 5.4.1.3 Método de ABTS

As porcentagens de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> obtidas através desse método encontram-se na Tabela 4.

Assim como no teste do DPPH, o óleo essencial de *E. saligna* não apresentou uma atividade antioxidante significativa. As melhores porcentagens foram dos controles rotina, ácido gálico e ácido ascórbico. Esse resultado pode ser explicado, assim como no teste do DPPH, pelo fato do óleo essencial em estudo não possuir alto teor de compostos fenólicos com mais de uma hidroxila, e portanto, capazes de ocasionar a redução radical ABTS<sup>•+</sup>.

TABELA 4- Média e desvio padrão das porcentagens de atividade antioxidante pelo método do radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>, em diferentes concentrações, no tempo de 30 minutos.

	AA%			
	20 mg/mL	15 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
<b>Óleo essencial</b>	31,81 ( $\pm 0,35$ )	22,59 ( $\pm 0,18$ )	15,89 ( $\pm 0,36$ )	12,58 ( $\pm 0,32$ )
<b>Ácido gálico</b>	99,56 ( $\pm 0,30$ )	99,42 ( $\pm 0,08$ )	98,98 ( $\pm 0,28$ )	98,31 ( $\pm 0,29$ )
<b>Ácido ascórbico</b>	99,76 ( $\pm 0,09$ )	99,49 ( $\pm 0,07$ )	98,93 ( $\pm 0,20$ )	98,42 ( $\pm 0,17$ )
<b>Rutina</b>	98,70 ( $\pm 0,10$ )	97,80 ( $\pm 0,17$ )	96,60 ( $\pm 0,53$ )	96,20 ( $\pm 0,20$ )

Fonte: O autor, 2017.

A atividade antioxidante é influenciada pela composição fenólica do óleo essencial (AHMADI et al., 2010). Herzi et al. (2013), mostraram que a composição química dos óleos essenciais de *E. cinerea* e *E. camaldulensis* diferem dependendo do método utilizado para extração, e que essas diferenças influenciaram a atividade antioxidante dos óleos testados, tanto pelo método ABTS como pelo DPPH.

#### 5.4.2 Atividade antimicrobiana

O presente estudo avaliou a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* do óleo essencial extraído de folhas e caules de *E. saligna*, frente a cepas de diferentes microrganismos patogênicos (*C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*). Em todos os testes, o óleo essencial foi testado puro e nas concentrações 2000, 1000, 500, 10 e 50 µg/mL. Como controles positivos, foram utilizados o Cloranfenicol (6 µg/mL) e a Gentamicina (6 µg/mL) para as bactérias, e a Clorexidina (1,2 µg/mL) para a levedura.

##### 5.4.2.1 Teste de difusão em meio sólido utilizando cavidades

Este método consiste na difusão radial da amostra no meio, impossibilitando que uma possível presença de partículas em suspensão interfiram na difusão da substância antimicrobiana (SILVEIRA et al., 2009).

Os halos de inibição verificados no experimento para o óleo essencial puro e suas diluições frente os microrganismos testados, encontram-se na Tabela 5. Na Tabela 6 encontram-se os halos formados pelos controles positivos utilizados. Não houve diferenças nos halos de 24 e 48 horas.

Tabela 5- Média dos halos de inibição referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus saligna*, suas diluições e dos controles positivos, frente aos microrganismos testados, pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades.

Microorganismo	Halos de inibição (mm)					
	Óleo puro	2000 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	500 (µg/mL)	100 (µg/mL)	50 (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	23	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	IT	2,4	2	NI	NI	NI

(NI): não houve inibição do crescimento bacteriano; (IT): inibição total do crescimento bacteriano.

Fonte: O autor, 2017.

Tabela 6- Média dos halos de inibição, referente à atividade antimicrobiana dos controles positivos, frente aos microrganismos testados, pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades.

Microrganismo	Halos de inibição (mm)		
	Cloranfenicol (6µg/mL)	Gentamicina (6µg/mL)	Clorexidina (1,2µg/mL)
<i>S. aureus</i>	19	17	-
<i>P. aeruginosa</i>	13	12	-
<i>E. coli</i>	20	19	-
<i>C. albicans</i>	-	-	18

(-): não testado

Fonte: O autor, 2017

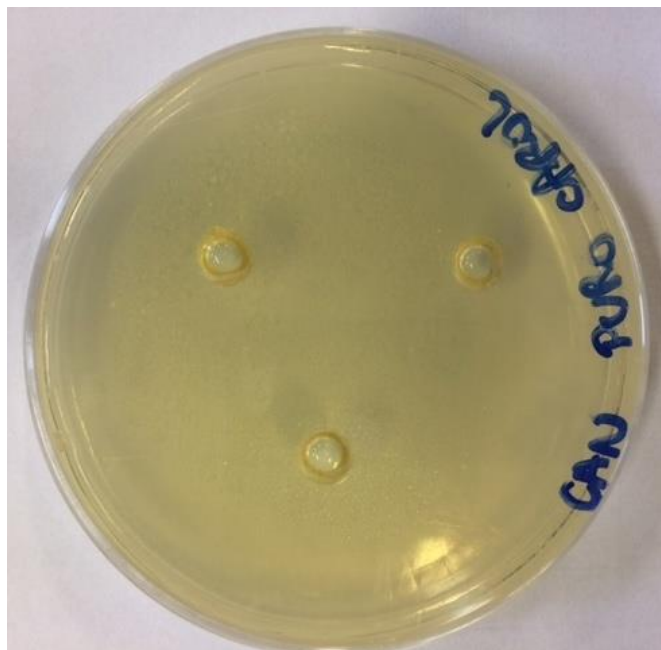
De acordo com a largura do halo de inibição expresso em mm, os resultados foram classificados como se segue: não sensível para diâmetro igual ou inferior a 8 mm; sensível para diâmetro entre 8 e 14 mm; muito sensível para diâmetro de 14 a 20 mm e extremamente sensível para diâmetro igual ou superior a 20 mm (DURAFFOURD et al., 1986; ELAISSI et al., 2011; HERSCH-MARTINEZ et al., 2005).

Entre as bactérias utilizadas no estudo, o óleo essencial puro de *E. saligna* apresentou atividade contra a cepa de *S. aureus*, com halo de inibição do óleo puro de 23 mm, maior que os halos observados para os controles gentamicina e cloranfenicol (Tabela 5). Através da classificação adotada, *S. aureus* foi considerado extremamente sensível. Apesar disso, não houve inibição de crescimento para essa cepa em nenhuma das diluições realizadas, apenas no óleo essencial puro.

Não houve formação de halo de inibição para as demais bactérias testadas, *P. aeruginosa* e *E. coli*., ambas gram negativas. Sendo assim, no teste de difusão em ágar utilizando cavidades, o óleo essencial em estudo apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, e nenhuma atividade contra gram negativas. As bactérias gram negativas possuem várias camadas bastante complexas, sendo sua parede celular composta de peptidoglicanos e lipoproteínas, membrana externa e lipopolissacarídeos, que a envolvem externamente (HANAMANTHAGOUDA et al., 2010).

No caso das cepas de *C. albicans*, o óleo essencial puro inibiu totalmente o crescimento da levedura (Figura 20), enquanto que o controle clorexidina apresentou halo de 18 mm, de acordo com a Tabela 6. Desta forma, a cepa testada foi considerada extremamente sensível ao óleo essencial de *E. saligna* puro.

Figura 20- Inibição total do crescimento de *C. albicans* pelo óleo essencial de *Eucalyptus saligna*, através do teste de difusão em meio sólido utilizando cavidades.



Fonte: O autor, 2017.

A busca por novos medicamentos, que sejam inovadores, biosustentáveis e que tenham eficiência em causar a morte ou inibir a proliferação de fungos e bactérias, tem aumentado com o crescente surgimento de microrganismos resistentes as terapias já conhecidas. A pesquisa em produtos naturais é essencial para a descoberta de novos agentes bioativos (LOBO, 2014).

Nas últimas décadas, os óleos essenciais e seus componentes têm atraído maior interesse e, conseqüentemente, têm sido amplamente investigados, principalmente em sistemas *in vitro*. A sua eficácia contra uma ampla gama de microrganismos está relacionada com a sua hidrofobicidade, o que os permite integrar-se aos lipídeos da membrana celular e das mitocôndrias, tornando-os permeáveis e conduzindo a uma fuga de conteúdos

celulares (HORVATHOVA et al., 2014; MULYANINGSIH et al., 2010; SAID et al., 2016).

Vários estudos com óleo essencial de diversas espécies de *Eucalyptus* avaliando a atividade antimicrobiana já foram realizados. Sabe-se que a presença de polifenóis, esteroides e triterpenos nos óleos essenciais presentes em espécies desse gênero pode estar relacionada à boa atividade antibacteriana que normalmente apresentam (COSTA, 2002; SIMÕES et al., 2010).

Döll-Boscardin et al. (2015), verificaram atividade antibacteriana do óleo essencial de *E. benthamii* frente a *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e antifúngica à levedura *C. albicans*. Lobo (2014), em seu estudo com o óleo essencial de *E. elata* Dehnh, observou atividade antimicrobiana promissora tanto contra bactérias gram positivas como gram negativas, e contra leveduras. Já Estanislau et al. (2001), concluíram que o óleo essencial *E. grandis* apresenta um maior efeito inibitório contra as bactérias gram negativas.

Recentemente, Knezevic et al. (2016) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído de folhas de *E. camaldulensis* contra MDR *Acinetobacter baumannii* isolado de feridas, e obtiveram resultados positivos. Em outro estudo com bactéria multi-resistente, o óleo essencial de frutos de *E. globulus* e os óleos de folhas de *E. globulus* e *E. radiata* demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* metilicina-resistente (MULYANINGSIH et al., 2011).

#### 5.4.2.2 Teste de difusão em disco

No teste de difusão em disco, assim como no teste de difusão em meio sólido, apenas as cepas de *S. aureus* e *C. albicans* foram sensíveis ao óleo essencial extraído de folhas e caules de *E. saligna*, como observado na Tabela 7.

Tabela 7- Média dos halos de inibição referentes à atividade antimicrobina do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* e suas diluições, frente aos microrganismos testados, pelo método de difusão em disco.

Microorganismo	Halos de inibição (mm)					
	Óleo puro	2000 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	500 (µg/mL)	100 (µg/mL)	50 (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	10	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	21	11,6	10,3	9	4,6	NI

(NI): não houve inibição do crescimento bacteriano.

Fonte: O autor, 2017.

De acordo com a Tabela 8, os controles positivos para bactérias gentamicina e cloranfenicol, formaram halos maiores (23 e 24 mm, respectivamente) que do óleo essencial puro em estudo para a cepa da bactéria gram positiva (10 mm). Em contrapartida, para *C. albicans* o controle positivo clorexidina formou halo de menor diâmetro (15 mm), em relação ao formado pelo óleo essencial puro (21 mm).

Tabela 8- Média dos halos de inibição, referente à atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus saligna*, frente aos controles positivos, pelo método de difusão em disco.

Microorganismo	Halos de inibição (mm)		
	Cloranfenicol (6µg/mL)	Gentamicina (6µg/mL)	Clorexidina (1,2µg/mL)
<i>S. aureus</i>	24	23	-
<i>P. aeruginosa</i>	18	23	-
<i>E. coli</i>	30	21	-
<i>C. albicans</i>	-	-	15

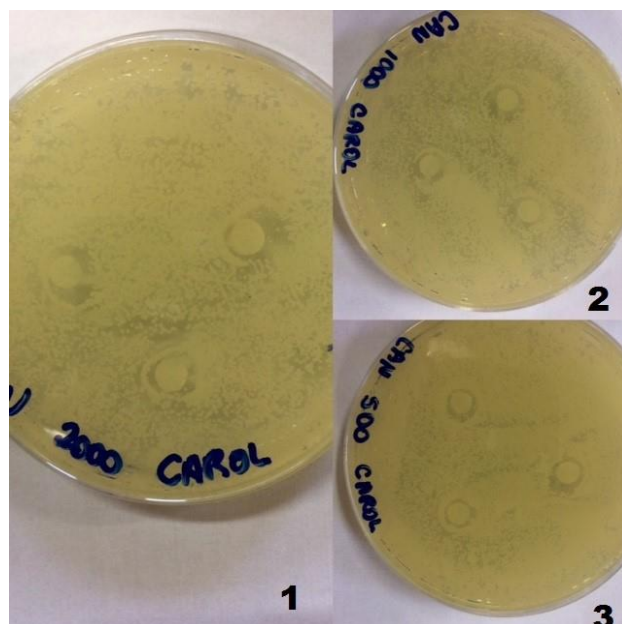
(-): não testado

Fonte: O autor, 2017.

Neste teste, portanto, de acordo com a classificação adotada, a cepa de *S. aureus* foi considerada sensível ao óleo essencial puro de *E. saligna*, e a cepa de *C. albicans* extremamente sensível ao óleo essencial puro e sensível frente às diluições nas concentrações de 2000, 1000 e 500 µg/mL (Figura 21).

Com a realização deste método também é possível observar que o óleo essencial puro, mesmo em quantidades menores (20µL) do que a utilizada no primeiro teste (50µL), mantém seu efeito antibacteriano e antifúngico.

Figura 21- Teste de difusão em disco, contra *C. albicans*, utilizando diluições do óleo essencial de *Eucalyptus saligna*. (1) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 2000 µg/mL. (2) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 1000 µg/mL. (3) Teste com discos impregnados com 20 µL do óleo essencial na concentração de 500 µg/mL.



Fonte: O autor, 2017.

Embora não existam muitos dados na literatura a respeito das atividades antibacterianas e antifúngicas do óleo essencial extraído de folhas e caules de *E. saligna*, os resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro aos observados em diversos trabalhos com óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*.

Elaissi et al. (2011), ao analisarem a composição química e a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de 20 espécies diferentes de *Eucalyptus*, verificaram que essa atividade apresentou considerável variação entre as espécies, porém todas permaneceram mais baixas que a do antibiótico gentamicina usado como padrão. Essa variedade na atividade antibacteriana poderia ser atribuída à composição química dos óleos essenciais. Neste mesmo estudo, a maior atividade observada foi a do óleo essencial de *E. odorata* frente a bactéria gram positiva *S. aureus*. *Eucalyptus*

*odorata* apresentou maior porcentagem de criptona na composição química de seu óleo essencial.

Em outro estudo, sobre a composição química e atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais de 8 espécies de *Eucalyptus*, Elaissi et al. (2012), reafirmaram a presença de criptona como componente majoritário no óleo essencial extraído das folhas de *E. odorata* e o relacionaram com as atividades antibacteriana e antifúngica apresentadas pelo mesmo.

Elshafie et al. (2015), observaram grande atividade antifúngica em óleos essenciais ricos em *p*-cimeno, que foi o constituinte majoritário encontrado no óleo essencial de *E. saligna*. Outros estudos também apontam para a atividade fungicida deste composto, isolado ou em sinergismo com outros monoterpenos e compostos fenólicos (CAMELE et al., 2012; LOPEZ-REYES et al., 2010).

Oyedeji e colaboradores (1999), ao verificarem a atividade antimicrobiana dos óleos de 5 espécies de *Eucalyptus*, entre elas a espécie *E. saligna*, pelo método de difusão em disco, encontraram resultados de atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e também de atividade antifúngica contra a *C. albicans*, em todos os 5 óleos essenciais testados.

O óleo essencial de *E. globulus* ssp. *bicostata*, estudado por Malinowski et al. (2009), demonstrou atividade antifúngica contra as espécies de leveduras *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *Malassezia pachydermatis*, em teste de difusão em disco. Tal efeito foi atribuído a ação conjunta dos terpenos presentes na amostra.

Apesar do óleo essencial de *E. saligna* ter apresentado resultados que condizem com dados encontrados na literatura para diversas espécies do gênero, entretanto não se pode afirmar qual ou quais compostos são responsáveis pelos resultados encontrados, visto que os compostos não foram testados isoladamente, tampouco os possíveis mecanismos de ação e sinergismos entre os constituintes do óleo essencial.

#### 5.4.3 Citotoxicidade

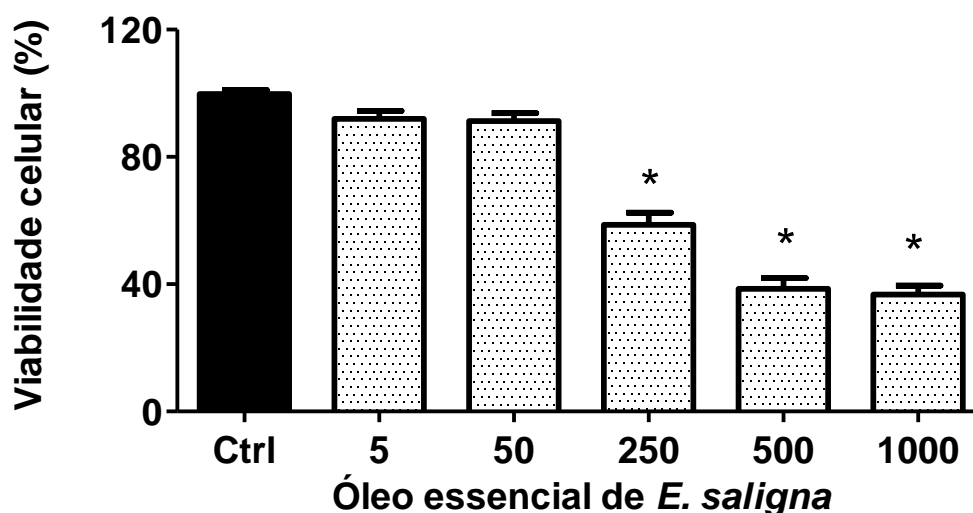
5.4.3.1 Determinação da citotoxicidade e IC<sub>50</sub> do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* em células Calu-3 e 3T3



O efeito do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* sobre a viabilidade celular das linhagens Calu-3 e 3T3, nas concentrações de 5 a 1000 µg/mL está demonstrado nas Figuras 22 e 23. Os dados mostram, para ambas as linhagens celulares, uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) no número de células viáveis, nas concentrações 250, 500 e 1000 µg/mL do óleo essencial, quando comparadas com as células tratadas com o controle.

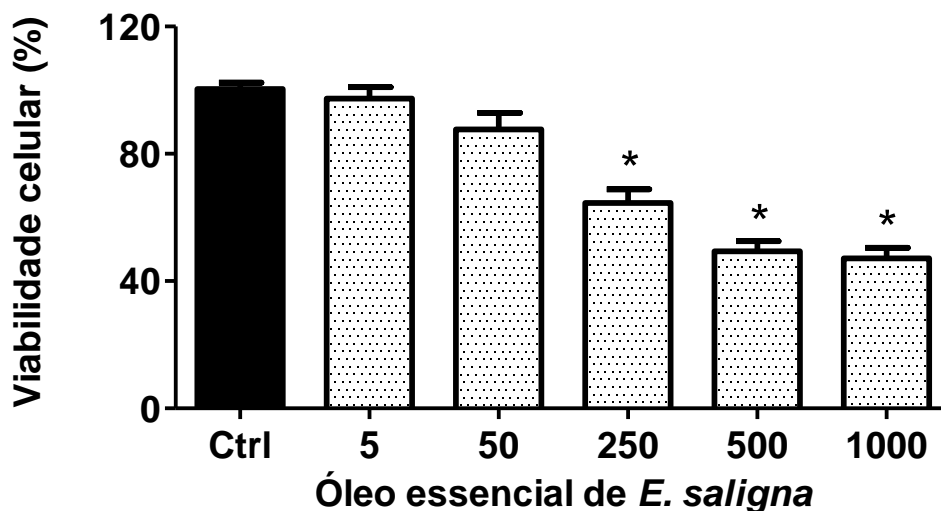
Na linhagem celular Calu-3 foi observada uma redução da viabilidade celular para  $58,70 \pm 3,77\%$  na concentração de 250 µg/mL, enquanto a 500 e 1000 µg/mL a viabilidade ficou em  $38,75 \pm 3,37\%$  e  $38,56 \pm 2,78\%$ , respectivamente. Para a linhagem celular 3T3, na concentração de 250 µg/mL a viabilidade celular reduziu para  $64,57 \pm 4,27\%$ , na concentração de 500 µg/mL para  $49,30 \pm 3,32\%$ , e para  $47,19 \pm 3,21\%$  na concentração de 1000 µg/mL.

FIGURA 22- Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* sobre células Calu-3 em tratamento de 72h. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes, com  $n=16$  por ensaio. Os símbolos \* representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ( $p < 0,001$ ).



Fonte: o autor, 2017.

Figura 23- Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* sobre células 3T3 em tratamento de 72h. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes, com n=16 por ensaio. Os símbolos \* representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ( $p < 0,001$ ).



Fonte: o autor, 2017.

Utilizando os resultados de viabilidade celular obtidos por meio do ensaio de redução do MTT, foi calculado o valor de  $IC_{50}$  para o óleo essencial de *E. saligna* para ambas as linhagens celulares. Para células Calu-3 o  $IC_{50}$  calculado foi de  $412,10 \pm 263,56 \mu\text{g/mL}$  e para as células 3T3 foi de  $660,80 \pm 130,93 \mu\text{g/mL}$ .

Várias pesquisas têm mostrado uma atividade supressiva dos óleos essenciais contra o câncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (BHUYAN et al., 2017; DÖLL-BOSCADIN et al., 2012; SOUSA, 2015; GAUTAM et al., 2014). A citotoxicidade dos óleos essenciais pode estar ligada a sua característica lipofílica, que permite interações com a membrana citoplasmática das células, tornando-a permeável. Outra característica dos óleos essenciais é a capacidade de causar danos na membrana mitocondrial, através da despolarização, o que a torna permeável (GAUTAM et al., 2014). Além desses mecanismos, deve-se destacar a constituição dos óleos essenciais, ou seja, uma mistura bastante complexa de substâncias que, agindo em sinergismo, podem ocasionar efeitos biológicos mais potentes do que compostos isolados

(SOUSA, 2015; DÖLL-BOSCARDIN et al, 2012). A citotoxicidade apresentada pelo óleo essencial em estudo pode ser atribuída aos fatores expostos a cima.

Em estudo com *E. benthamii*, Döll-Boscardin et al. (2012), demonstraram *in vitro* a suscetibilidade das linhagens celulares Jurkat, HeLa, B16F10 e J774A ao óleo essencial extraído de folhas jovens e adultas da espécie. Todas as linhagens celulares em estudo tiveram uma redução significativa na viabilidade celular quando tratadas com o óleo essencial a 300 µg/mL, com valores de viabilidade após 48h de cultivo: 4,23 ± 0,31% (Jurkat), 8,46 ± 0,38% (HeLa), 18,80 ± 0,64% (B16F10) e 7,52 ± 0,47 (J774A).

No mesmo estudo, Döll-Boscardin e colaboradores (2012), testaram a citotoxicidade de alguns terpenos isolados ( $\alpha$ -pineno e o  $\gamma$ -terpineno) nas mesmas linhagens celulares e observaram que, com base no ensaio do MTT, os óleos essenciais demonstraram melhores resultados do que os compostos isolados.

Bhuyan et al. (2017) ao estudarem extratos etanólicos e aquosos de 4 espécies de *Eucalyptus* (*E. robusta*, *E. saligna*, *E. globulus* e *E. microcorys* F.Muell), verificaram que os extratos aquosos de folhas e frutas de *E. microcorys* a 100 µg/mL exercem uma inibição significativa no crescimento das células de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2) com valores de IC<sub>50</sub> 86.05 ± 4.75 µg/mL e 64.66 ± 15.97 µg/mL, respectivamente. No mesmo estudo o extrato etanólico de *E. saligna* apresentou a menor ação citotóxica sobre as células MIA PaCa-2, com IC<sub>50</sub> 115,52 ± 5,36 µg/mL.

Algumas outras espécies de *Eucalyptus* também já foram estudadas e demonstraram atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células tumorais: *E. sideroxylon* e *E. torquata* contra carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e câncer de mama (MCF7); *E. cladocalyx* contra leucemia promielocítica (HL-60); *E. camaldulensis* contra células ECV-304 (SOUSA, 2015; GAUTAM et al, 2014).

O óleo essencial em estudo demonstrou citotoxicidade moderada frente às linhagens celulares Calu-3 e 3T3, nas concentrações 250, 500 e 1000 µg/mL. Como o efeito citotóxico ocorreu também nas células ditas normais (3T3), pode-se dizer que o óleo essencial de *E. saligna* não possui citotoxicidade seletiva para células tumorais Calu-3.

## 6 CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas de folhas alternadas, presença de heterofilia, estômatos do tipo anomocíticos presentes em ambas as faces, presença de papilas, mesofilo isobilateral, nervura mediana em formato levemente biconvexo com sistema vascular bicolateral formado por um feixe em arco aberto e dois feixes dorsais, presença de cavidades secretoras com óleo essencial, ocorrência de idioblastos contendo cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio, presença de súber cicatricial, caule de formato arredondado com sistema vascular com câmbio formando floema centriptamente e xilema centrifugamente e medula em formato praticamente quadrado, quando avaliadas em conjunto, auxiliam na diferenciação e identificação de *Eucalyptus saligna* Sm.

Com relação à composição química do óleo essencial que apresentou um teor médio de 1,03%, foram identificados, através de cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas, como compostos majoritários os terpenos *p*-cimeno (28,90%) e criptona (17,22%). O monoterpeneo oxigenado 1, 8-cineol, comumente observado em espécies de *Eucalyptus*, foi detectado em pequena quantidade (2,15%).

O óleo essencial de *E. saligna* demonstrou atividade biológica, com efeito antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, apresentando valor superior ao apurado para o flavonóide rutina. Entretanto, foi obtida uma atividade antioxidante relativa muito baixa quando avaliada pelos métodos do DPPH• e do ABTS•<sup>+</sup>.

O óleo essencial apresentou potencial antimicrobiano frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e à levedura *Candida albicans*, através dos métodos de difusão em meio sólido utilizando cavidades e difusão em disco. Em diluição, o óleo essencial de *E. saligna* foi eficaz frente a cepa de *Candida albicans*, revelando um possível uso farmacológico.

O óleo essencial de *E. saligna* apresentou, através do método do MTT, uma citotoxicidade moderada contra as linhagens celulares Calu-3 e 3T3. Não apresentando assim, seletividade contra as células tumorais em estudo.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; et al. Chemical composition, *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1137–1144, 2010.
- AL-EDANY, T. Y.; AL-SAADY, S. A. A. M. Taxonomic Significance of Anatomical Characters in Some Species of the Family Myrtaceae. **American Journal of Plant Science**, v. 3, p. 572-581, 2012.
- ALMEIDA, V. P. de; HIRT, A. A.; RAESKI, P. A.; et al. Comparative morphoanatomical analysis of *Mikania* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 9-19, 2017.
- ANBG, **Australian National Botanic Gardens**. Disponível em: <<https://www.anbg.gov.au/gnp/trainees-2016/eucalyptus-saligna.html>> Acesso em: 25 mai. 2016.
- ANDRADE, E. A. de; FOLQUITTO, D. G.; LUZ, L. E. C.; et al. Anatomy and histochemistry of leaves and stems of *Sapium glandulosum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 1000-1016, 2017.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA ABRAF 2013: ano base 2012. Brasília: **ABRAF** 2013. 130 p.
- AZEVEDO, S. G. **Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de Eugenia spp. (myrtaceae) ocorrentes na Amazônia de terra firme**. Manaus 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.
- BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. **Molecules**, v. 21, p. 1671-1686, 2016.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUS, C.; CUTLER, D.; et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal**, v. 126, p. 237-260, 1998.
- BATISTA-PEREIRA, L. G.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A. G.; et al. Electrophysiological responses of *Eucalyptus* brown looper *Thyrinteina arnobia* to EOs of seven *Eucalyptus* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 555–561, 2006.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Eames: Iowa State University, 1976. 326 p.

BERTOCCO, A. R. P.; MIGACZ, I. P.; SANTOS, V. L. P.; et al. Microscopy diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C.DC. **Microscopy Research & Technique**. p. 1-7, 2017.

BETT, P. K.; DENG, A. L.; OGENDO, J. O.; et al. Chemical composition of *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus saligna* leaf essential oils and bioactivity against major insect pests of stored food grains. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 51-62, 2016.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1959, 1958.

BOBEK, V. B.; HEIDEN, G.; OLIVEIRA, C. F.; et al. Comparative analytical micrographs of vassouras (*Baccharis*, Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 26, p. 665-672, 2016.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BRASIL. **II Plano Nacional de Desenvolvimento (1975-79)**. Brasília: Imprensa Oficial, 1974.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de Vigilância Sanitária. Resolução 104/99, de 26/04/1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência. Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)> Acesso em 26 jan. 2017.

BRISOLA, S. H.; DEMARCO, D. Análise anatômica do caule de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis x urophylla*: desenvolvimento da madeira e sua importância para a indústria. **Scientia Forestalis**. v. 39, n. 91, p. 317-330, 2011.

BROOKER, I. Botany of the eucalypts. In: COOPER, J. J. W. **Eucalyptus: The Genus Eucalyptus**. London: Taylor, Francis, 2002, 3-35 p.

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. vol.1. South-eastern Australia. Bloomings, Melbourne, 2006.

BHUYAN, D. J.; SAKOFF, J.; BOND, D. R.; et al. In vitro anticancer properties of selected *Eucalyptus* species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 53, p. 604-615, 2017.

CAMELE, I.; ALTIERI, L.; DE MARTINO, L.; et al. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2290–2300, 2012.

CARRAFA, A. C. M.; PIVA, C. G.; PIRES, R. A.; PARIZOTTO, C. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial da espécie *Eucalyptus dunnii* Maiden no controle do fungo Antracnose em videiras. **VII Mostra Científica-SIEPE**, 2016.

CEFERINO, T. A.; JULIO, Z.; MOUGABURE, C. G.; et al. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, p. 889–895, 2006

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

COFFI, K.; SOLEYMANE, K.; HARISOLO, R.; et al. Monoterpene hydrocarbons, major components of the dried leaves essential oils of five species of the genus *Eucalyptus* from Côte d'Ivoire. **Natural Science**, v. 4, p. 106-111, 2012

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Default.aspx>> Acesso em: 17 mar 2017.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 503–506, 2003.

CHEN, L.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; Lan, Z. Protective Effect of p-Cymene on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. **Inflammation**, v. 37, p. 358-364, 2014.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 276 p.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs). **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: UNIVALI, 2014, p. 55-84.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando

*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, Botucatu, v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DASTMALCHI, K. Edible *Myrciaria vexator* fruits: bioactive phenolics for potential COPD therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4549-4555, 2012.

DEFAVERI, A. C. A.; SATO, A.; BORRÉ, L. B.; et al. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1531-1538, 2011.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; NAKASHIMA, T.; et al. Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 94-101, 2010.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L.; et al. *In vitro* cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2012.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; BORSATO, D. M.; MIRANTE, D. C. Antioxidant, antimicrobial and pediculicidal activities of *Eucalyptus benthamii* essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 9, p. 1823-1829, 2015.

DOMINGUES, E. A.; et al. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 23-27, 2010.

DORMAN, H. J. D.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; DEANS, S. G. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 12-16, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESES, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ ácido linoléico em método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DURAFFOURD, C.; LAPAZ, J. C. **Cuadernos de Fitoterapia Clínica** (Ed.). Masson, Mexico, 1986. 86 p.

ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; MABROUK, S. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1427-1434, 2011.

ELAISSI, A.; ROUIS, Z.; SALEM, N. A. B.; MABROUK, S. Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their



antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2012.

ELDRIDGE, K. G.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. ***Eucalyptus domestication and breeding***. Oxford: Oxford University Press, 1994.

ELSHAFIE, H.S.; MANCINI, E.; CAMELE, I. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 11-15, 2015.

EMBRAPA. Transferência de Tecnologia Florestal: Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. Brasília: **EMBRAPA**, 2014. 140 p.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FAITANIN, R. D., **Avaliação do Perfil Químico e Atividades Biológicas de Myrciaria Strigipes O. Berg (myrtaceae)**. Vitória, 2016, 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Espírito Santo.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2000. Parte II.

FERRAZ, R. P. C.; CARDOSO, G. M. B.; SILVA, T. B. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopiya frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**. v. 141, p. 196-200, 2013.

FERREIRA, C. A. **Nutritional aspects of the management of *Eucalyptus* plantations on poor sandy soils of the Brazilian Cerrado region**. Oxford, 1989, 193 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Oxford University.

FERREIRA, L. C. **Identificação do óleo essencial obtido de folhas e caule de *Eucalyptus viminalis* coletados na região sudeste do Paraná- Agregando valor a cadeia de produção de madeira**. Pato Branco, 2014, 41 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

FILOMENO, C. A.; BARBOSA, L. C. A.; PEREIRA, J. L.; et al. The chemical diversity of *Eucalyptus* spp. essential oils from plants grown in Brazil. **Chemical & Biodiversity**, 2008.

FLORES, G. et. al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1256-1262, 2012.

FLORES, T. B.; ALVARES, C. A.; SOUZA, V. C.; STAPE, J. L. ***Eucalyptus no Brasil: zoneamento climático e guia para identificação***. Piracicaba: IPEF, 2016. 448 p.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, nº 7, 2006.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. 228 p.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 41-71, 2005.

FURTADO, N. A. D. E. O.; SAMPAIO, T. O.; XAVIER, M. A. Phytochemical profile and determination of antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) against oral microorganisms. **Revista brasileira de Plantas medicinais**. v. 17. n. 4. p. 1091- 1096. 2015.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essentials oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. Review article. **Biomed Research Internacional**. 2014.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**.1 ed. Nova Odessa. 2007. 444 p.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. G.; FERREIRA, I. C. F. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.152-156, 2010.

GUYTON, K.; KENSLER, T. Prevention of liver cancer. **Current Oncology Reports**, v. 4, p. 464–470, 2002.

GUZMÁN, P.; FERNÁNDEZ, V.; GRAÇA, J.; et al. Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 481, 2014.

HANAMANTHAGOUDA, M.S.; KAKKALAMELI, S.B.; NAIK, P.M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H.R.; MURTHY, H.N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v.118, n.3, p. 836-839, 2010.

HE, H.; BLEBY, T. M.; VENEKLAAS, E. J.; et al. Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia robeorum* (Leguminosae: Mimosoideae). **Annals of Botany**, v. 109, n. 5, p. 887-896, 2012.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. *In*: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO,

V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 1ª ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. 303 p.

HERSCH-MARTINEZ, P.; LEANOS, B. E.; SANTOS, S. F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. **Fitoterapia**, v. 7, p. 453–457, 2005.

HERZI, N.; BOUAJILA, J.; CAMY, S.; CAZAUX, S. Comparison between supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydrodistillation for two species of *Eucalyptus*: yield, chemical composition, and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, p. 667-672, 2013.

HORVATHOVA, E.; NAVAROVA, J.; GALOVA, E.; et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6632–6639, 2014.

IFTIKHAR, A.; ABBAS, S. Q.; HAMEED, M.; et al. Leaf Anatomical Adaptations In Some Exotic Species Of *Eucalyptus* L'HÉR. (Myrtaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 6, p. 2717-2727, 2009.

JAMES, S. A.; BELL, D. T. Morphology and anatomy of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* clones: Variation between geographically separated locations. **Australian Journal of Botany**, v. 43, p.415-433, 1995.

JESUS, M. S.; FERNANDES, L. A.; FONSECA, F. S. A.; et al. Crescimento e composição química do óleo essencial de mudas de *Eucalyptus globulus* (Labill) adubadas com nitrogênio e potássio. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 01-08, 2016.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw Hill Book, 1940. 523 p.

JOLY, B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KNEZEVIC, P.; ALEKSIC, V.; SIMIN, N.; SVIRCEV, E.; PETROVIC, A.; MIMICA-DUKIC, N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drugresistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 125–136, 2016.

KNIGHT, T. G.; WALLWORK, M. A. B.; SEDGLEY, M. Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four *Eucalyptus* species and their hybrids. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 27-36, 2004.

KOUNDAL, R.; KUMAR, D.; WALIA, M. Chemical and in vitro cytotoxicity evaluation of essential oil from *Eucalyptus citriodora* fruits growing in the Northwestern Himalaya, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, p. 158-162, 2015.

KULESIC- BILUSIC, T.; SCHMOLLER, I.; SCHNABELE, K. The anticarcinogenic potential of essential oil and aqueous infusion from caper (*Capparis spinosa* L.). **Food Chemistry**, v. 132, p. 261-267, 2011.

LAWERENCE, B. M.; REYNOLDS, R. J. Progress in essential oils. **Perfumer and Flavourist**, v. 26, p. 44-52, 2001.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – *Myrciaria*, *Pseudocaryophyllus*, *Blepharocalyx*, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 731-876, 1978.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: uma abordagem biossintética. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo; Ed. Atheneu, 2009. 195 p.

LEMOES, D. R. H.; MELO, E. C.; ROCHA, R. P.; et al. Influence of drying air temperature on the chemical composition of the essential oil of melaleuca. **Engenharia Agricola**, v. 20, p. 5–11, 2012.

LI, X.; WANG, W.; LUO, M. Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 133, p. 427-444, 2012.

LOBO, A. C. P. **Prospecção fitoquímica e atividades biológicas de folhas, caule, cascas do tronco e do óleo essencial de *Eucalyptus elata*, Myrtaceae**. Curitiba, 2014, 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Paraná.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. ed. 2. Nova Odessa, 2008. 356 p.

LOPEZ-REYES, J. C.; SPADARO, D.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 171–177, 2010.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Yield, chemical composition, and bioactivity of EOs from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, p. 107–114, 2008.

LUCIA, A.; JUAN, L. W.; ZERBA, E. N.; HARRANT, L. Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 1675-1686, 2011.

LUÍS, A.; DUARTE, A.; GOMINHO, J.; et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 274-282, 2016.

MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização Morfoanatómica das Folhas Jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 756-61, 2009.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo; Ed. Atheneu, 2009. 195 p.

MEHTA, A. K. et al. The effect of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in animal models of depression and locomotor activity. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 233–238, 2013.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p.121-125, 2011.

MERIC, C. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe inuleae (Asteraceae). **Acta biológica cracoviensia**, v. 51, n. 1, p. 105-110, 2009.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses. v. 2. Oxford: Clarendon Press, 1950.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSI, A. J.; ASTOLFI, V.; KUBIAK, G.; Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Society of Chemical Industry**, v. 91, p. 273-277, 2011.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole

from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1061–1066, 2010.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, ed. 9, p. 893-899, 2011.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003, p. 9-56.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**, 2 ed. Atheneu, São Paulo, 1998.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

ONG, H.X., TRAINI, D., YOUNG, P. M. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 9, p. 1287-1302, 2013.

OYEDEJI, A. O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O. N.; et al. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v. 70, p. 526-528, 1999.

PADOVAN, A.; et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**. v. 13, n. 3, p. 694-716, 2014.

PARK, H.-M.; KIM, J.; CHANG, K.-S.; KIM, B.-S.; et al. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 405-410, 2011.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa: CPT, manual n° 463, 2003. 140 p.

PRADO, A. G. S.; **Química Verde, os desafios da química do novo milênio**, 2003.

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.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Orland, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REEVE, R. M. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. **Stain Technology**, v. 26, p. 91-96, 1951.

REVOLTI, Paola Mazza. **Caracterização morfológica de um mutante em Eucalyptus**. Botucatu, 2015. p. 57 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu.

RIBEIRO, Z.; COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; et al. *Glycaspis brimblecombei* Moore, 1964 (Hemiptera: Psyllidae) on *Eucalyptus*: oviposition non-preference and antibiosis. **Euphytica**, v. 202. ed. 2, p. 285- 295, 2015.

RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 2023-2032, 2001.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn . leaf oils. **The Journal Wood Science**, v. 58, p. 429–436, 2012.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drugs leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, 2008.

ROCHA, W.S.; LOPES, R. M.; SILVA, D.B.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1215-1221, 2011.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer-massen produkt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v.61, p.33-36, 1972.

SAID, Z. B. S.; HADDADI-GUEMGHAR, H.; RIGOU, P.; REMINE, H. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 167-175, 2016.

SALGADO, S. L. M.; CAMPOS, V. P.; CARDOS, M. D. G.; SALGADO, A. P. S. Hatching and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in essential plant oils. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 17–22, 2003

SANTANA, M. F.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H., et al. p-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 1138-1143, 2011.

SANTOS, L. D. T.; THADEO, M.; IAREMA, L.; et al. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. *Revista Árvore*, v. 32, n. 4, p. 769- 779, 2008.

SANTOS, V. L. P.; RAMAN, V.; BOBEK, V. B; et al. Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 9-15, 2018.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231-233, 2007.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951. 391 p.

SEWANU, S. O. **The chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils of *Tulbaghia violacea* Harv. and *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**. Master of Science in the Dept. of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science and Agriculture, Univ. of Zululand, South Africa, 2010.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, N. C. C. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510– 1514, 2012.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; DA CRUZ, A. L. N. MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMOND, B.; et al. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p. 27-33, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/ SC: Editora da UFSC/UFRGS, 2010. 467-496 p.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and



decaying leaves of *Eucalyptus tereticormis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6962-6966, 2009.

SINGH, H. P.; KAUR, S.; NEGI, K.; KUMARI, S.; SAINI, V.; NATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **LWT – Food Science and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2012.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, et al. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>> Acesso em: 02/01/2017. 15:24.

SOUZA, M., A., D. **Estudos em *Eugenia* L. (Myrtaceae) na Amazônia Central: taxonomia com o uso de ferramentas morfoanatômica**. Manaus, 2015. p. 182. Tese (Ciências Biológicas (Botânica)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

SOUSA, P. D. **Bioactive essential oils and câncer**. Springer. João Pessoa – PB, 2015.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

SWIECH, J. N. D.; BOBEK, V. B.; FOLQUITTO, D. G.; et al. Morpho-anatomy of the vegetative organs of *Philodendron meridionale* (Araceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, p. 2142-2148, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TANTAWY, M. E. Morpho-anatomical study on certain *taxa* of Myrtaceae. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 3, p. 274-283, 2004.

TAPONDJOU, A. L.; ADLER, C.; FONTEM, D. A.; et al. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. **Journal of Stored and Products Research**, v. 41, p. 91–102, 2005.

THE PLANT LIST, 2018. Version 1.1. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

TOLOZA, A. C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G. M.; et al. Fumigant and Repellent Properties of Essential Oils and Component Compounds Against Permethrin-Resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medicine Entomology**, v. 43, p. 889-895, 2006.

TOMAZ, M. A.; COSTA, A. V.; RODRIGUES, W. N.; PINHEIRO, P. F. Chemical composition and allelopathic activity of *Eucalyptus* essential oil. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 475-483, 2014.

USP XXXVI (**UNITED STATES PHARMACOPEIA**). 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

UPTON, R.; GRAFF, A.; JOLLIFFE, G.; et al. **American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy-Microscopic Characterization of Botanical Medicines**. CRC Press: Boca Raton, 2011.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo:USP/ESALQ, Documentos Florestais n. 17, p. 1-26, 2003.

WEINER, S.; DOVE, P. M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, p. 1-29, 2003.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matk phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

WILSON, P. G. Myrtaceae. In: K. Kubitzki (ed.). **Flowering plants. Eudicots: The families and genera of vascular plants**. v. 10. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. 212-271p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011.12 p.

WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; et al. Comparative study of *Passiflora taxa* leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 328- 343, 2015.

WU, S. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark- colored fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513-7525, 2012.

YAP, P. S. X.; KRISHNAN, T.; YIAP, B. C.; et al. Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1119-1128, 2014.

YASNI, S.; IMAIZUMI, K.; SIN, K.; SUGANO, M.; NONAKA, G. Identification of an active principle in essential oils and hexane-soluble fractions of *Curcuma*

*xanthorrhiza* Roxb. showing triglyceride-lowering action in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 273–278, 1994.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs). **Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: UNIVALI, 2014. p. 9-37.

ZHONG, W.; GEFU C.; LANXIANG, J. p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF-κB activation. **Inflammatory**. v. 26, p. 529–537, 2013.