

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

WAGNER OZORIO D'ALMEIDA

MORFOANATOMIA DE FOLHA E CAULE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia involucrata* DC.: UMA
ABORDAGEM INTERDISCIPLINAR

PONTA GROSSA - PR
2019

WAGNER OZORIO D'ALMEIDA

MORFOANATOMIA DE FOLHA E CAULE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia involucrata* DC.: UMA
ABORDAGEM INTERDISCIPLINAR

Dissertação apresentada para 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 - PR
2019

D136 D'Almeida, Wagner Ozorio
Morfoanatomia de folha e caule, caracterização química e atividades biológicas do óleo essencial de *Eugenia involucrata* DC: uma abordagem interdisciplinar/ Wagner Ozório D'Almeida. Ponta Grossa, 2019.
57 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Área de concentração – Atenção Interdisciplinar em Saúde),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

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

1. *Eugenia involucrata*. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade inseticida. 4. Composição química – análise. 5. Microscopia. I. Budel, Jane Manfron. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa – Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

CDD : 615

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

WAGNER OZÓRIO D'ALMEIDA

MORFOANATOMIA DE FOLHA E CAULE, CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
EUGENIA INVOLUCRATA DC., UMA ABORDAGEM
INTERDISCIPLINAR

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

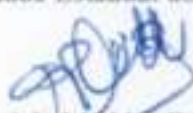
Ponta Grossa, 15 de maio de 2019.



Profa. Dra. Jane Mauffron Budel – Orientador
Doutora em Ciências Farmacéuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Fabiane Fortes
Doutora em Ciências Médicas
Universidade Estadual do Paraná



Profa. Dra. Patrícia Mauritas Döll Boscardin
Doutora em Ciências Farmacéuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa

*Dedico este trabalho a todos que contribuíram
direta ou indiretamente para sua realização.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Jane Manfron Budel, pela dedicação e paciência nas orientações, confiança e apoio em todos os momentos. Obrigada por me encorajar a superar meus limites.

Ao Professor Dr. Paulo Vitor Farago, por sempre ter me ajudado e apoiado, pelas aulas brilhantes de Metodologia da Pesquisa, que tanto contribuiu na construção desse estudo.

À Professora Dra. Katia Paludo, pela ajuda, dedicação e gentileza durante meu experimento, com os testes citotóxicos. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Luís Antonio Esmerino, por me ensinar ajudar com os testes antimicrobianos, sempre de forma gentil e contribuindo no aspecto multidisciplinar. Muito Obrigado.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pelo auxílio na análise química dos óleos essenciais.

A amiga e professora Ivonilce Venturi, pelo incentivo, apoio e motivação, em mais essa trajetória. Obrigado pelo aporte pedagógico, multiprofissional durante a confecção desse estudo. Muito Obrigado.

Aos Professores Edson Aires da Silva e Marta Borges Maia, pelo incentivo e exemplo como educadores.

À técnica do Laboratório de Farmacognosia Luciane Mendes Monteiro, pela dedicação e parceria na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de mestrado Libardone Brustolin, Valter Paes de Almeida, Paola Raeski, Lislaine Klider e Isabel Pietczak Migacz pela amizade e companheirismo.

A colega Bárbara Justus pela ajuda com as análises antimicrobianas.

Ao Acadêmico de iniciação científica, Kennon Rios Santos, pelo auxílio no experimento de citotoxicidade.

Ao Laboratório Multiusuário (c-LABMU) pela análise do material botânico.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade.

À Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu – UNIGUAÇU, pelo apoio incondicional na realização dos experimentos, cedendo laboratórios e equipamentos. E pelo incentivo dado aos docentes para a realização do Mestrado.

“Quem não busca pelo menos uma vez por mudanças na própria vida, não deve ter muitas emoções para serem divididas”

Autor desconhecido

RESUMO

O gênero *Eugenia* é um dos mais representativos e complexos da família Myrtaceae. Muitas espécies são importantes sob o ponto de vista econômico e medicinal. *Eugenia involucrata* DC. é utilizada na medicina tradicional para tratar problemas digestivos, sangramentos e diarreia, possui frutos comestíveis, usados para a produção de geleias e licores. Os óleos essenciais das folhas apresentam atividades antimicrobianas, e não há relatos na literatura sobre a atividade inseticida e citotóxica do mesmo. Portanto este trabalho teve como objetivos obter e analisar o óleo essencial de folhas de *E. involucrata*, visando identificar a composição química, verificar a capacidade antioxidante, inseticida e citotóxica, além de fornecer dados morfoanatômicos das folhas e caules. Para a análise morfoanatômica, folhas e caules foram preparados para análise em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Morfoanatomicamente, a epiderme foliar é unisseriada e possui paredes anticlinais sinuosas na face adaxial, enquanto que paredes ondeadas são observadas na face abaxial, a folha é dorsiventral e hipoestomática, os estômatos são anomocíticos, paracíticos e tetracíticos, cristais de oxalato de cálcio ocorrem no mesofilo. A nervura central é côncavo-convexa e os caules são circulares. Compostos lipofílicos, lignina, grãos de amido e fenólicos reagiram positivamente nos testes histoquímicos, tanto no caule como na folha. Os compostos majoritários foram o germacreno B (22,17%), o biciclogermacreno (19,76%) e o β -elemeno (10,86%). O óleo essencial apresentou potencial citotóxico para as linhagens tumorais melanoma murinho e boa atividade antioxidante (80%) pelo ensaio de DPPH. Na análise inseticida via tópica foi observada uma mortalidade de 13,3% em ft. Dix estirpe. Não foi observada toxicidade para os insetos testados nos ensaios fumigante e residual. Os caracteres morfoanatômicos descritos auxiliam na identificação da espécie vegetal e fornecem subsídios para o controle da qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. O óleo essencial das folhas de *E. involucrata* apresentaram efeitos antioxidantes e citotóxicos, mas não evidenciam ação inseticida.

Palavras-chave: *Eugenia involucrata*. Atividade antioxidante. Atividade inseticida. Análise da Composição química. Microscopia.

ABSTRACT

The genus *Eugenia* is one of the most representative and complex of the family *Myrtaceae*. Many species are important from an economic and medicinal point of view. *Eugenia involucrata* DC. is used in traditional medicine to treat digestive problems, bleeding and diarrhea, has edible fruits which are used to produce jellies and liqueurs. The essential oil of its leaves present antimicrobial activities and there are no reports in the literature on the insecticidal and cytotoxic activity of leaf essential oil. The aim of this work was to obtain and analyze the essential oil of leaves of *E. involucrata*, in order to identify the chemical composition, verify the antioxidant, insecticidal and cytotoxic capacity, as well as to identify the morphoanatomy of leaves and stems. For the morphoanatomical analysis, the leaves and stems were prepared for analysis in light microscopy and field scanning electron microscopy. Morphoanatomically, the epidermis of the leaves is uniseriate and has sinuous anticlinal cell walls on the adaxial side, whereas wavy walls are observed on abaxial side, the leaves dorsiventral and hypostomatic, the stomata are anomocytic, paracytic and tetracytic, calcium oxalate crystals are in the mesophyll. The midrib is concave-convex and the stem has circular shape. In the histochemical tests, positive reaction for lipophilic, lignin, starch grains and phenolic compounds in the leaves and stems was observed. The major compounds germacrene B (22.17%), bicyclogermacrene (19.76%) and β -elemene (10.86%) were identified. Essential oil presented cytotoxic potential for murine melanoma tumor cell lines. Good antioxidant potential by the DPPH assay. In the topical insecticidal analysis, a mortality of 13.3% was observed in ft. Dix strain. No toxicity was observed for the insects tested in the fumigant and residual assays. The morphoanatomical features assist the identification of the species and provide data for the quality control of the herbals. The essential oil of the leaves of *E. involucrata* presented antioxidant and cytotoxic effects, but there was no insecticidal action.

Keywords: *Eugenia involucrata*. Antioxidant activity. Insecticidal activity. Chemical composition. Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes espécies de <i>Eugenia</i>	16
Figura 2. <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	18
Figura 3. Morfoanatomia de folhas de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	33
Figura 4. Anatomia de folhas de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	36
Figura 5. Espectro de EDS de um cristal prismático	37
Figura 6. Anatomia de caules de <i>Eugenia involucrata</i> DC. – secção transversal.	37
Figura 7. Picos do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i> , indicando os componentes majoritários.....	40
Figura 8. Espectro de massas do β -elemeno do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i>	41
Figura 9. Espectro de massas do biciclogermacreno do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i>	42
Figura 10. Espectro de massas do Germacreno B do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i>	43
Figura 11. Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i>	44
Figura 12. Percentual médio (\pm EP) de mortalidade de insetos adultos frente a duas doses de óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i> quando aplicado topicamente.....	45
Figura 13. Viabilidade celular após 72 horas de exposição à diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i> pelo método do MTT.	46
Figura 14. Alterações morfológicas encontradas em linhagens celulares incubadas com 84 μ g/mL do óleo essencial de <i>Eugenia involucrata</i> por 24 horas.	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Índices de retenção e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *Eugenia involucrata*..... 39
- Tabela 2.** Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares incubadas com o óleo de *Eugenia involucrata* e os índices de seletividade (IS) das linhagens tumorais (B16F10 e MCF7) em relação à linhagem não tumoral (MacCoy).....46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.....	14
2.2	GÊNERO <i>Eugenia</i> L.....	15
2.3	<i>Eugenia involucrata</i> DC.....	17
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	19
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	23
4.2	MORFOANATOMIA DE FOLHAS E CAULES	23
4.2.1	Preparação da Amostra Para Microscopia De Luz.....	23
4.2.2	Micromedidas.....	24
4.2.3	Análises Histoquímicas.....	24
4.2.4	Preparação Da Amostra Para Microscopia Eletrônica de Varredura Por Emissão De Campo (FESEM)	24
4.2.5	Espectrometria De Raios X Por Energia Dispersiva (EDS).....	25
4.3	EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE).....	25
4.3.1	Extração Do Óleo Essencial.....	25
4.3.2	Caracterização Química Do Óleo Essencial.....	25
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL	26
4.4.1	Método Da Redução Do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	26
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
4.5.1	Criação Dos Insetos.....	27
4.5.2	Bioensaio Tópico	28
4.5.3	Bioensaio Residual	28
4.5.4	Bioensaio de fumigação	28
4.6	DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	29
4.6.1	Linhagens Tumerais.....	29
4.6.2	Ensaio De Viabilidade Com MTT.....	29

4.6.3 Cálculo Da Concentração Inibitória Mínima IC ₅₀	30
4.6.4 Cálculo Do Índice De Seletividade	30
4.6.5 Análise Morfológica.....	30
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 ESTUDOS ANATÔMICOS	32
5.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL	38
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	39
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. involucrata</i>	43
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia involucrata</i>	44
5.6 DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO OLEO ESSENCIAL DE <i>Eugenia. involucrata</i>	45
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERENCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais incluindo plantas para fins terapêuticos, tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade. Registros anteriores a era de Cristo já descreviam o uso de ervas na cura de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2010). Os egípcios em 1500 a.C documentaram mais de 700 fármacos, com sua forma de administração, sendo que a grande maioria era derivada de plantas, este documento é conhecido como *Ebers Papyrus* (NIERO; CECHINEL-FILHO; YUNES, 2018). Cerca de 60% das plantas têm uso medicinal na história da humanidade desde o período pós-neolítico (HAO, 2019).

O uso de plantas para a cura de doenças é comum nos dias atuais. Aproximadamente 80% da população em todo o mundo faz uso de plantas para o tratamento de doenças primárias, e em alguns países a medicina tradicional está bem incorporada no sistema público de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Além do uso das plantas medicinais como alternativa à medicina farmacológica para a promoção da saúde em muitas regiões do mundo (ADENIYI et al., 2018), espécies vegetais também são muito usadas como base para o desenvolvimento de novos medicamentos. Estima-se que 32% dos novos fármacos aprovados tiveram origem nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Myrtaceae Juss. possui 5.970 espécies distribuídas em cerca de 145 gêneros, tornando-a a maior família da ordem Myrtales (THE PLANT LIST, 2019). Compreendem arbustos, árvores, ervas, ou ainda lianas/volúveis/trepadeiras. No Brasil, está representada por 24 gêneros, sendo 4 endêmicos (MYRTACEAE IN FLORA DO BRASIL, 2020). No Brasil, Myrtaceae se destaca por possuir inúmeras espécies comestíveis a exemplo da jabuticaba, pitanga, goiaba, araçá e gabioba que também são apropriadas para arborização urbana (SILVA; CHAVES; NAVES, 2001). Essa família é especialmente importante por apresentar espécies produtoras de óleos essenciais, a exemplo de cravo, eucalipto e mirtilo (FARAG et al., 2018).

Eugenia L. é um dos maiores e mais complexos gêneros de Myrtaceae, possuindo aproximadamente 2000 espécies que estão amplamente distribuídas desde o sul do México até a Argentina e um pequeno número de espécies na África. No Brasil são encontradas 388 espécies (*Eugenia* IN FLORA DO BRASIL, 2019). Representantes do gênero apresentam grande similaridade entre os taxa. Nesse sentido, a anatomia foliar tem sido estudada a fim de identificar caracteres diagnósticos entre suas espécies morfológicamente semelhantes

(DEFAVERI; ARRUDA; SATO, 2011). Espécies do gênero são importantes economicamente sendo utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumes. Várias atividades biológicas têm sido relatadas para espécies do gênero, há exemplo de atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiviral, anti-hipertensiva e anti-inflamatória (CHAIIEB et al., 2007; CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017).

Muitas das atividades biológicas observadas em espécies de *Eugenia* estão relacionadas à presença de óleos essenciais. Atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica foram relatadas para o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. (VICTORIA et al., 2012) atividade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* foi observada no óleo essencial de *Eugenia calycina* Cambess (SOUSA et al., 2015), enquanto atividade antifúngica contra *Pseudomonas fluorescens* foi encontrada no óleo essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine (MENDES et al., 2018).

Eugenia involucrata DC., conhecida popularmente de cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra e araçazeiro, é uma espécie nativa do Sul do Brasil, mas não endêmica. É encontrada desde o Rio Grande do Sul até a Bahia (*Eugenia* IN FLORA DO BRASIL, 2020). É uma árvore utilizada como ornamental e seus frutos são usados para a produção de sucos e geleias (BARZOTTO et al., 2019). É também utilizada na medicina tradicional na forma de infusão para o tratamento de infecções, diarreia, indigestão e sangramentos (VECHI et al., 2018). Esta espécie apresenta frutos com potencial econômico, devido à variedade de produtos que podem ser gerados, como suco, geleias ou licores, além de poderem ser consumidas cruas. A espécie também é usada para recompor áreas degradadas e é usada como ornamental em função da beleza de suas flores (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007).

Considerando a similaridade morfológica entre as espécies de *Eugenia* e as promissoras propriedades biológicas dos óleos essenciais, o objetivo do trabalho foi analisar anatomicamente a folha e o caule de *E. involucrata*, analisar quimicamente e testar atividades biológicas do óleo essencial, fornecendo caracteres botânicos de identificação da espécie vegetal, bem como determinar o perfil químico e as atividades antioxidante, inseticida e citotóxica do óleo essencial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

Myrtaceae é uma família de Angiospermas composta por aproximadamente 145 gêneros e quase 6000 espécies e tem predominância no hemisfério Sul (THE PLANT LIST, 2019). A Austrália é o país com a maior representação de Myrtaceae, tendo ocorrência também na América do Sul, Sudeste da Ásia, África, Índia, Nova Caledônia e muitas ilhas do Pacífico, estendendo-se até o norte do Haváí (THORNHILL et al., 2015).

O Brasil tem catalogado 23 gêneros e 1031 espécies, e é encontrada nas regiões Sudeste, Nordeste, Sul, Norte e Centro-oeste, sendo a região Sudeste com o maior número de espécies (644), e a região Centro-oeste com o menor número (184). O Paraná possui 230 espécies. A família Myrtaceae tem seu domínio fitogeográfico nas regiões da Mata Atlântica (715), Cerrado (253), Amazônia (223), Caatinga (99), Pampa (16) e Pantanal (8) (MYRTACEAE IN FLORA DO BRASIL, 2020).

A família está entre as mais importantes na maioria das vegetações e é frequentemente encontrada entre as espécies arbustivas-arbóreas na Floresta Ombrófila Densa. No Paraná, Myrtaceae está entre as plantas lenhosas de maior significância em número de espécies. As espécies pertencentes à essa família, encontradas no Brasil, possuem formas de arbustos, árvores, erva, liana/volúvel/trepadeira ou subarbusto. É nativa e não endêmica do Brasil (LIMA; CADDAH; GOLDENBERG, 2015; MYRTACEAE IN FLORA DO BRASIL, 2020).

De acordo com Silva e Mazine (2016, p.205), a família Myrtaceae é caracterizada por:

Arbustos até árvores. Casca normalmente esfoliante. Folhas opostas, glabras ou com indumento de tricomas simples, unicelulares ou dibráquiados, margem inteira, venação penínérvea, geralmente com a nervura primária proeminente, nervuras secundárias unidas por uma ou duas nervuras marginais paralelas a borda ou formando arcos; glândulas translúcidas visíveis ao olho nu ou não. Flores brancas, solitárias ou em dicásio, racemo, panícula, fascículo ou glomérulo, bissexuadas, diclamídeas, raramente com pétalas de tamanho reduzido ou abortadas, actinomorfas, hipanto bem desenvolvido; cálice (3)4–5(6)-mero, dialissépalo, frequentemente persistente no fruto; corola (3)4–5(6)-mera, dialipétala; androceu multiestaminado, dialistêmone, exsertos, filetes filiformes, anteras globulares, rimosas e bitecas; gineceu com o ovário ínfero, gamocarpelar, de bi a multilocular, dois a muitos óvulos por lóculo. Frutos bagas. Sementes com embrião decotilédone vestigiais até grandes e carnosos; hipocótilo pequeno a alongado.

A família possui um elevado potencial econômico e farmacológico, além da exploração comercial de seus frutos comestíveis, madeira e óleos essenciais e seu uso como plantas ornamentais (FIGUEIREDO et al., 2019). Como árvores frutíferas se destacam a

jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* O. Berg.), guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) e jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) (SERAGLIO et al., 2019), pitanga (*Eugenia uniflora* Linnaeus), cereja-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.), uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) (SILVA et al., 2017) camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK) (NERI-NUMA et al., 2018), goiaba (*Psidium guajava* L.), cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) e pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) (LUCENA et al., 2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* destacam-se pela alta concentração de terpenoides em suas folhas e também pela grande variabilidade tanto qualitativa como quantitativa desses compostos em níveis taxonômicos populacionais e individuais. Os gêneros que se destacam em relação a produção de óleos essenciais são *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Leptospermum*, *Melaleuca*, *Myrtus*, *Pimenta*, *Psidium* e *Syzygium* (EBADOLLAHI, 2013; SILVA et al., 2017).

Os óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de Myrtaceae apresentaram atividade leishmanicida, antibacteriana e citotóxica (SILVA et al., 2018). Yeom et al. (2013), avaliaram a atividade fumigante de óleos essenciais extraídos de 11 diferentes espécies de Myrtaceae. Dentre essas, *Eucalyptus polybractea* (F.Muell. ex R.T.Baker), *Eugenia smithii* R.T. Baker, *Eugenia radiata* A.Cunn. ex DC., *Eugenia globulus* Labill. e *Melaleuca uncinata* R.Br.eM apresentaram alta atividade fumigante contra *Blattella germanica* (L.) (baratas alemãs) machos adultos na concentração de 7,5 mg/L de concentração de ar. Óleos essenciais extraídos de espécies de *Myrcia* apresentaram diversas atividades biológicas e dentre as espécies estudadas destacou-se *Myrcia ovata* (Hook. & Arn.) O. Berg que demonstrou atividade anti-inflamatória, antibacteriana e larvicida (CASCAES et al., 2015).

Estudos com espécies da família Myrtaceae têm sido encorajados devido à variedade de compostos fitoquímicos como os flavonoides, taninos, terpenos, entre outros (NERI-NUMA et al., 2018).

2.2 GÊNERO *Eugenia* L.

O gênero *Eugenia* compõe aproximadamente um terço das espécies da família Myrtaceae. Estão catalogadas mais de 1.000 espécies distribuídas do Sul do México até a região Norte da Argentina (FARIA-JÚNIOR, 2010). No Brasil, há registros de 388 espécies e destas 97 encontram-se na região Sul do país, sendo 83 localizadas no estado do Paraná. Ocorrem principalmente na Mata Atlântica, mas também há registros em todos os outros domínios vegetacionais nacionais (*Eugenia* IN FLORA DO BRASIL, 2019).

As características das plantas do gênero *Eugenia* são descritas por Silva e Mazine (2016, p.211) como:

Arvoretas a árvores; sem ramificação dicotômica. Bractéolas persistentes ou não na antese. Flores axilares, tetrâmeras, terminais ou em nós bracteados; solitárias ou reunidas em racemos, cimeiras, fascículos, glomérulos ramifloros ou dicásios; pétalas presentes; cálice fechado ou levemente aberto no botão com lobos individualizados; 2–(3) lóculos por ovário; 2– numerosos óvulos por lóculo; placentação axilar. Bagas coroadas pelas sépalas; 1–2–(3) sementes por fruto; testa membranácea a crustada; embrião eugenioide com cotilédones fundidos formando uma massa sólida, hipocótilo reduzido.

A Figura 1 apresenta imagens de três diferentes espécies de *Eugenia* encontradas no Brasil.

Figura 1 - Diferentes espécies de *Eugenia*.



Fonte: SCHWIRKOWSKI (2019)

Notas: A) *Eugenia brasiliensis* Lam.; B) *Eugenia pluriflora* DC. e C) *Eugenia uniflora* L.

Comumente as espécies de *Eugenia* apresentam em sua constituição química terpenos, flavonoides e taninos, sendo seu uso na medicina popular como diurética, anti-inflamatória, antidepressiva, antidiarreica, hipoglicemiante, entre outros (VECHI, 2015).

O óleo de eucalipto, por exemplo, tem sido usado em formulações de diferentes medicamentos para aliviar os sintomas da asma, rinite e resfriado, e podendo ser aplicado na pele, atuando como rubefaciente (ARONSON, 2016).

O óleo essencial de *E. uniflora* exibiu atividade anticancerígena contra câncer de pulmão, cólon, estômago e melanoma, com uma perspectiva real para o desenvolvimento fitoterápico subsequente (FIGUEIREDO et al., 2019). O óleo essencial das folhas de *E. sulcata* Spring ex Mart. induziu a mortalidade e reduziu o número de adultos de duas espécies de insetos-praga, *Dysdercus peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus* sugerindo seu uso na agricultura para o controle de pragas (GONZALEZ et al., 2014).

Um estudo avaliou a composição química de espécies de *Eugenia* encontradas em Monteverde na Costa Rica, entre elas, *E. austin-smithii* Standl, *E. cartagensis* O.Berg, *E. haberi* Barrie, *E. monteverdensis* Barrie e *E. zuchowskiae* Barrie. Foram encontrados α -pineno, *trans*-hexanal, linalol, zingiberene, α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, δ -

cadineno, *trans*-histolol e torreyol como componentes majoritários (COLE; HABER; SETZER, 2007).

O extrato etanólico de *E. uniflora* L. demonstrou boa atividade antioxidante sendo atribuído parte dessa atividade pelos compostos polifenólicos como a quercetina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina e ácido gálico (CUNHA et al., 2016).

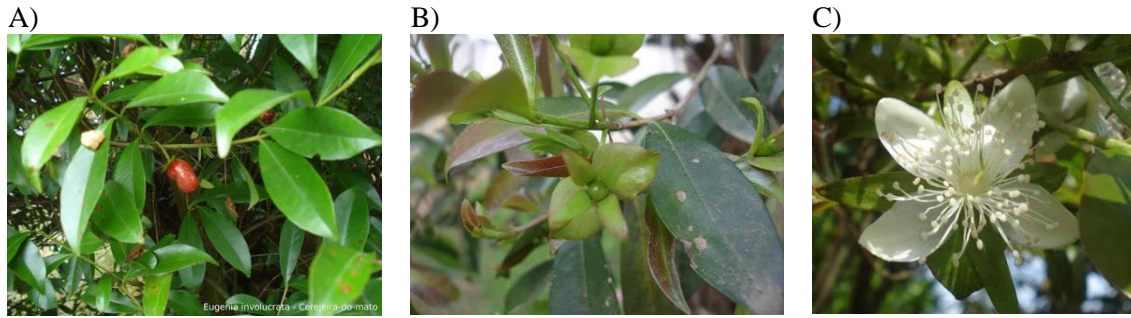
Extratos de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L. foram avaliados para a atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica. As duas espécies foram capazes de inibir 100% das linhagens mastigotas, foi também eficiente para três cepas parasitárias e 100% de inibição das cepas de *Tripanosoma cruzi* (SOUZA et al., 2017). *Eugenia brasiliensis* Lam. apresentou efeitos antinocipetivos e anti-inflamatórios na dor visceral em camundongos (SIMÕES et al., 2018). O óleo essencial de *E. uniflora* L. mostrou atividade contra *Candida* ssp. (SANTOS et al., 2018a).

O extrato hidroalcólico de folhas de *E. brasiliensis* evidenciou boa capacidade antioxidante, em modelos animais (LIMA et al., 2017). MAGINA et al. (2010) demonstraram a atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas e caules de três espécies de *Eugenia* (*E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* O. Berg), sendo testado por diferentes metodologias. As espécies *E. brasiliensis* e *E. beaurepairiana* (Kiaersk.) D. Legrand demonstraram maior capacidade antioxidante, a qual foi correlacionada ao teor de compostos fenólicos presentes nestas espécies. O extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* foi avaliado quanto ao potencial antioxidante, sendo essa atividade relacionada à presença de taninos e flavonoides (AURICCHIO et al., 2007).

A capacidade antioxidante do óleo essencial extraído de folhas de *E. uniflora* foi constatada usando os ensaios de DPPH, ABTS e FRAP, além da redução da peroxidação lipídica em camundongos, tendo sido encontrado boa atividade antioxidante nos ensaios testados (VICTORIA et al., 2012).

2.3 *Eugenia involucrata* DC.

Eugenia involucrata DC. (Figura 2a-c), conhecida popularmente como: “Cerejeira-domato”, “Cerejeira-da-terra”, “Cerejeira-do-rio-grande”, “Ibajáí” e “Ubajáí”, é utilizada na medicina tradicional na forma de chá para tratar problemas digestivos, sangramentos e diarreia (VECHI et al., 2018).

Figura 2 - *Eugenia involucrata* DC.

Fonte: (SCHWIRKOWSKI, 2019).

Notas: A) Fruto; B) Folhas e C) Flor

Pertence ao gênero *Eugenia* e à família Myrtaceae, ordem Myrtales Juss, superordem Rosanae Takht, subclasse Magnoliidae Novák e classe Equisetopsida C Agardh. A árvore pode chegar a 10 m de altura (BARZOTTO et al., 2019; MENDONÇA et al., 2009; VECHI, 2015), tem ocorrência no Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, sendo encontrada no Nordeste apenas na Bahia (EUGENIA IN FLORA DO BRASIL, 2019).

De acordo com EUGENIA IN FLORA DO BRASIL (2019) *E. involucrata* DC. possui:

Folha: forma elíptica(s)/obovada(s)/oblonga(s); base aguda(s)/cuneada(s); ápice(s) rostrado(s)/acuminado(s); textura membranácea(s)/cartácea(s); margem(ns) plana(s)/revoluta(s); margem(ns) cartilaginosa(s) ausente(s); nervura-central adaxial sulcada(s); nervura-marginal 1. Inflorescência: tipo racemo(s) auxotélico; bráctea(s) persistente(s). Flor: bractéola(s) persistente(s) vistosa(s); hipanto liso(s) glabro(s); cálice(s) no botão-floral aberto(s); sépala(s) 4; pétala(s) 4. Fruto: formato elipsoide; superfície(s) lisa(s); bractéola(s) persistente(s) vistosa(s). Semente: número 1/2; embrião cotilédone(s) fundido(s).

O fruto de *E. involucrata* DC. (Figura 2a) é comestível, possui cor que pode variar de vermelha à vinácea-escura e a polpa possui consistência cremosa e sabor adocicado (MENDONÇA et al., 2009). É muito utilizado na produção de licores e geleias (MARIN et al., 2008).

Estudos demonstram que extratos etanólicos de folhas e frutos de *E. involucrata* DC. evidenciaram atividade antioxidante (MARIN et al., 2008; TOLEDO, 2018), sendo a alta atividade antioxidante correlacionada ao conteúdo de α -tocoferol (BARZOTTO et al., 2019). O extrato etanólico de folhas de *E. involucrata* DC. apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas e levedura *Candida albicans* (TOLEDO, 2018), além de atividade gastroprotetora e antinociceptiva (VECHI, 2015). Adicionalmente, o extrato etanólico das sementes dessa espécie também demonstrou potencial gastroprotetor (ROSA, 2013).

O óleo essencial extraído das folhas de *E. involucrata* DC. também evidenciou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans* (TOLEDO, 2018) e atividade antioxidante (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017).

Quanto à composição química, o extrato etanólico das folhas demonstrou a presença de saponinas, esteroides, flavonoides e taninos (TOLEDO, 2018), outro estudo identificou a presença do composto majoritário(-)-catequina, além de fitol e os compostos inéditos denominados de 24,25-epoxi-28-hidroxicicloartan-3-ona e 24-25-epoxi-28-hidroxicicloartan-3-ona acetilado (VECHI, 2015).

O óleo essencial extraído das folhas de *E. involucrata* evidenciou como compostos majoritários os sesquiterpenos β -elemeno e biciclogermacreno (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017). Toledo (2018) confirmou que 89,41% dos compostos presentes no óleo essencial pertence à classe dos sesquiterpenoides.

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) têm sido amplamente utilizados desde a idade média para aplicações cosméticas e medicinais, como bactericidas, fungicidas, inseticidas, antiparasitárias (BAKKALI et al., 2008). Vem ganhando um espaço significativo no campo farmacêutico devido à suas inúmeras aplicações farmacológicas como na quimioterapia, no tratamento de doenças cardiovasculares, (MATOS; LUCCA; KOESTER, 2019), e na indústria de cosméticos (KHAYYAT; ROSELIN, 2019). São usados também como desinfetantes naturais em superfícies de contato com alimentos (FALCÓ et al., 2019), entre muitas outras utilizações.

Na natureza os OE exercem um importante papel na proteção das plantas, agindo como antibacteriano, antifúngico, inseticidas e antivirais, além da capacidade de atrair insetos que farão a dispersão de pólenes e sementes (BAKKALI et al., 2008).

Os OE são misturas complexas de componentes de baixo peso molecular produzidos por organismos vivos, armazenados em estruturas secretoras especializadas e extraídos por diferentes métodos de uma planta inteira ou partes de uma planta. Eles podem atuar como sinais químicos no reino vegetal e como defesa química contra o reino animal. Existe uma grande variação na composição química dos OEs que está relacionada a cada espécie, apresentando uma função biológica vital para a sobrevivência e adaptação das plantas ao meio ambiente (BUDEL et al., 2018; NÉMETH-ZÁMBORINÉ et al., 2015).

Óleos essenciais são fluidos hidrofóbicos, aromáticos e termolábeis, podem ser facilmente oxidados e hidrolisados. Extraídos de partes de plantas como folhas, flores, sementes, galhos, casca, frutos e raízes, os OE são constituído por moléculas voláteis como os terpenos (KHAYYAT; ROSELIN, 2019; MATOS; LUCCA; KOESTER, 2019; OMONIJO et al., 2018).

Diferentes métodos de extração são utilizados para a obtenção de OE, sendo os métodos tradicionais a hidrodestilação à vapor, prensagem à frio, *enfleurage* e extração de solvente, e os métodos não tradicionais incluem a extração de fluido supercrítico, hidrodestilação assistida por micro-ondas, extração por ultrassom e hidrodifusão (KHAYYAT; ROSELIN, 2019).

A quantidade e a qualidade de um OE extraído de uma planta podem variar conforme a região em que se encontra, sofrendo influência do clima, composição do solo, órgão vegetal utilizado para a extração, idade da planta, processo de extração e também do estágio do ciclo vegetativo (BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais e seus constituintes voláteis também têm sido investigados para o tratamento de câncer. O geraniol, α -pineno, terpin-4-ol, α -santalol, β -elemeno, eugenol, β -cariofileno apresentaram atividade citotóxica para melanoma, sendo que o OE atuou na fase de inicialização do melanoma (PAVITHRA; MEHTA; VERMA, 2018).

Oliveira et al. (2015) afirmaram que os OE são mais concentrados em compostos voláteis, por isso podem exercer melhor atividade terapêutica em relação aos compostos isolados, podendo assim, apresentar maior toxicidade às células tumorais.

Os OE possuem diversas atividades biológicas como, antioxidante (WANG et al., 2017), antimicrobiana (VIEIRA-BROCK; VAUGHAN; VOLLMER, 2017), inseticida (TU et al., 2018), repelente (REYES et al., 2019), antifúngica (WANG et al., 2018), antitripanossoma (BUDEL et al., 2018; KAMTE et al., 2018), atividade antitumoral para melanoma (PAVITHRA; MEHTA; VERMA, 2018), câncer pancreático (DAHAM et al., 2015), câncer de cólon (ASIF et al., 2019), entre outras atividades.

Os OE também vêm recebendo muita atenção devido às suas propriedades pesticidas e por não apresentarem elevada toxicidade ao ser humano, podem ser usados como biopesticidas. Diversos OE tem mostrado potencial de inibição do crescimento de insetos, por meio de atividades de fumigação, contato e alimentação (BHAVYA; CHANDU; DEVI, 2018).

Algumas substâncias apresentam atividade inseticida já conhecida, como as piretrinas, nicotina, rotenona, veratridina, cevadina, rianodina, quassinoides, azadiractina e biopesticidas

voláteis (CORRÊA; SALGADO, 2011). O óleo da citronela, presente em algumas plantas aromáticas como o capim limão (*Cymbopogon citratus* DC.) e o eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson) é um exemplo de OE usado na fabricação de inseticida contra mosquitos e borrachudos (MENEZES, 2005).

O OE extraído de folhas de *E. caryophyllata* Thunb. foi testado contra *Oryzaephilus surinamensis* e demonstrou uma alta mortalidade em baixas concentrações, evidenciando uma importante ação inseticida (NESCI et al., 2011). O OE de *Schinus molle* apresentou forte toxicidade de fumigação contra percevejos (*Cimex lectularius* L.) (MACHADO et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as características anatômicas de folhas e caules e realizar a determinação do perfil químico do óleo essencial de folhas de *Eugenia involucrata* DC., além de avaliar as atividades antioxidante, inseticida e citotóxica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material botânico de *E. involucrata*;
- Avaliar anatomicamente as folhas e caules de *E. involucrata*;
- Extrair e determinar o teor de óleo essencial de folhas de *E. involucrata*;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes no óleo essencial de folhas de *E. involucrata*;
- Determinar a atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *E. involucrata*;
- Determinar a atividade inseticida do óleo essencial de folhas de *E. involucrata*;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica do óleo essencial de folhas de *E. involucrata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico (folhas e caules) de *Eugenia involucrata* DC. foi realizada durante o mês de abril de 2017, no município de Porto Vitória, na região Sul do estado do Paraná. Porto Vitória está localizado a 750 m de altitude, 26 ° 09 ' 40 " S de latitude e 51 ° 13 ' 54 " W de longitude.

Uma exsicata foi confeccionada e depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número HUPG 15548. O acesso ao patrimônio genético *E. involucrata* foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SISGEN) e está registrado sob o número A7C2C48.

4.2 MORFOANATOMIA DE FOLHAS E CAULES

4.2.1 Preparação da amostra para microscopia de luz

As folhas adultas e os caules, ambos frescos, de *E. involucrata* foram fixados em solução de FAA70 (Etanol 70% (90%)), formaldeído (5%) e ácido acético (5%) por 4 dias, a fim de evitar a degradação da amostra e garantir uma boa fixação. Após, o material foi lavado em água corrente e estocado em etanol a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

Foram confeccionadas lâminas semipermanentes nos sentidos transversal e longitudinal, à mão livre, utilizando-se lâminas de barbear. Uma gota de glicerina 50% foi utilizada para a montagem das lâminas e a lutagem foi feita com esmalte incolor. O processo de coloração das lâminas foi realizado com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1962) ou azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965), sendo que o azul cora as paredes primárias das células e a fucsina básica cora de rosa as paredes secundárias celulares.

As amostras foram submetidas ao processo de clareamento em solução de hipoclorito de sódio 20% até ficarem translúcidas, e então lavadas com água e coradas com safranina, possibilitando análise das características epidérmicas das folhas (KRAUS; ARDUIN, 1997).

4.2.2 Micromedidas

Estudos quantitativos dos estômatos foram realizados por meio de 20 medidas de múltiplas folhas de *E. involucrata*. A relação entre a frequência dos estômatos e das células epidérmicas foi calculada pelo índice estomático (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = (S \times 100) / (E+S)$. Sendo: S = número de estômatos por unidade de área, e E = número de células epidérmicas (incluindo tricomas) na mesma área unitária.

A medida do comprimento e largura dos estômatos foram calculadas a partir de 20 estômatos em diferentes locais da lâmina foliar a fim de se determinar o tamanho estomático médio.

4.2.3 Análises histoquímicas

Para as análises histoquímicas foram utilizados folhas e caules “à fresco”, sendo feitas secções transversais à mão livre, e então submetidos à pesquisa com diferentes reagentes como descrito a seguir.

- Para os compostos lipofílicos foi utilizado Sudam III (SASS, 1951);
- Para a pesquisa de compostos fenólicos, utilizou-se solução de cloreto férrico 2% (JOHANSEN, 1940) e solução de dicromato de potássio 20% (GABE, 1968);
- Para detectar lignina foi utilizada a solução de floroglucinol/HCl (FOSTER, 1949);
- Para a pesquisa de amido foi utilizada solução de lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

O registro dos resultados foi feito por meio de fotomicrografias realizadas no microscópio fotônico Olympus CX 31, acoplado à câmera digital C7070 do laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2.4 Preparação da amostra para Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)

As folhas frescas de *E. involucrata* foram desidratadas utilizando uma série crescente de etanol (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), sendo então realizada a montagem em suporte. Para à metalização com ouro utilizou-se o Metalizador Quorum, modelo SC7620.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários (c-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.2.5 Espectrometria de Raios X Por Energia Dispersiva (EDS)

A realização da espectrometria de Raio X por Energia Dispersiva foi feita em cristais e em células desprovidas de cristais (controle) todas amostradas aleatoriamente. Utilizou-se o detector modelo Mira 3 Tescan para as análises, nas mesmas condições de operacionalidade do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo. Esses procedimentos foram conduzidos no Laboratório Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.3 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE)

4.3.1 Extração do óleo essencial

Foram utilizadas folhas de *E. involucrata* previamente selecionadas e padronizadas. Estas foram secas à sombra em temperatura ambiente. Após a secagem, foram rasgadas manualmente em pedaços de aproximadamente 1 cm.

A extração do OE de folhas de *E. involucrata* foi realizada por meio de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger (USP XXXVI, 2014), com duração de 4 h.

Após a obtenção do óleo essencial foi utilizado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para a retirada de água. O OE obtido foi medido em tubo graduado e após esse processo, o OE foi estocado em tubos de Eppendorf a uma temperatura de $4 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

4.3.2 Caracterização química do óleo essencial

As análises do OE extraído de *E. involucrata* foi realizada em cromatógrafo CG-EM/EM da marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus.

Na análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), a amostra foi diluída a 1% (v/v) em diclorometano e foi caracterizada utilizando as seguintes condições de análise: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O gás de arraste empregado foi o hélio com vazão de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, em modo split 1:90, estando o injetor a 250°C e o sistema de

ionização 70 eV. Foi injetado 1 μL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 $^{\circ}\text{C}$ (0°) até 250 $^{\circ}\text{C}$, com aquecimento de 3 $^{\circ}\text{C}$ min.

Para o cálculo do índice de retenção foi empregada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados, C8 a C19. O índice de retenção experimental foi calculado utilizando equação de Van den Dool e Kratz (demonstrada na equação 1):

$$\text{Índice de Retenção} = 100 \times (C_n - C_{n-1}) \times \left(\frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 \times C_{n-1} \quad (1)$$

Onde: C_n é o número de átomos de carbono do n-alcano cujo tempo de retenção é imediatamente superior ao tempo de retenção do analito; C_{n-1} é o número de átomos de carbono do n-alcano cujo tempo de retenção é imediatamente inferior ao tempo de retenção do analito; T_x é o tempo de retenção do analito; T_n é o tempo de retenção do alcano C_n ; T_{n-1} é o tempo de retenção do alcano C_{n-1} .

Os componentes dos OEs foram identificados através da comparação dos índices de retenção e espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2007) e os espectros de massas também foram comparados com a biblioteca de massas NIST 02 (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2008). A quantificação relativa foi determinada a partir da normalização da área dos picos com a área total do cromatograma, sem o uso de nenhum fator de correção.

A análise da composição química do óleo da *E. involucrata* foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL

4.4.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante do OE extraído de folhas de *E. involucrata* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Yamaguchi et al. (1998). Diferentes concentrações do OE foram preparadas em metanol (35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 e 0,5 mg/mL). O metanol também foi empregado na obtenção das diluições seriadas dos controles positivos: ácido ascórbico e ácido gálico (1000 a 0,387 $\mu\text{g/mL}$) e também para a obtenção da solução de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (0,1 mol L^{-1}).

Foi transferida uma alíquota de 20 μL das soluções de óleo essencial de *E. involucrata* para uma microplaca de 96 poços, além dos controles positivos e do branco (metanol/solução de referência). Após, foi transferido 100 μL da solução de DPPH aos poços. A placa foi homogeneizada por um tempo de 1 min e incubada ao abrigo da luz e em temperatura

ambiente durante 30 min e então foi realizada a leitura da placa em um leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) com um comprimento de onda de 517 nm. A análise foi realizada apenas uma vez.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada utilizando porcentagem e calculada pela taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH com o OE de *E. involucrata* ou padrões, após os 30 min de reação em relação à solução de referência (DPPH em metanol), conforme a equação 02:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100] \quad (2)$$

Sendo: A correspondente ao valor de cada absorbância. A partir da porcentagem da AA obtida para cada concentração de óleo essencial foi então construído o gráfico para a obtenção da equação da reta. A equação da reta obtida foi utilizada para o cálculo do IC₅₀, no qual foi substituído o valor de Y por 50%. O valor de IC₅₀ encontrado representa a concentração da amostra que possui capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH utilizada.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.5.1 Criação dos insetos

As cepas de *C. lectularius* (Bayonne) 'Resistente a inseticidas' e Ft. Dix 'Susceptível' foram fornecidas pelo Dr. Changlu Wang, Departamento de Entomologia, Universidade Rutgers, New Brunswick, NJ e foram criadas no NCNPR (*National Center of Natural Products Research*, Oxford, Mississippi).

Os insetos foram alimentados em frascos de vidro transparente de 473 mL, contendo papel-toalha (papel 92-padrão multiuso) como abrigos. Os frascos foram cobertos com pano de malha fina para ventilação, vedado com um elástico (CAMPBELL; MILLER, 2015). Os frascos foram mantidos em uma câmara de crescimento a 26°C e 60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 13:11 h claro/escuro. Os insetos foram alimentados com sangue de coelho desfibrinado (Hemostat, CA) semanalmente. Os insetos foram alimentados de acordo com o método descrito por Montes, Cuadrillero e Vilella (2009).

Alimentadores de sangue (CG-1836-75 ChemGlass, NJ) foram ligados a um banho de água utilizando tubos de látex e um pedaço de membrana de parafilme "M" foi esticado ao longo do fundo do alimentador. Colocou-se uma quantidade de 5 mL de sangue de coelho desfibrinado (Hemostat) no centro oco do material de vidro e reuniu-se no parafilme. O

parafilme forneceu uma barreira para o inseto se alimentar. O banho de água foi ajustado para circular e aquecer o sangue a 37°C. Os insetos deitaram após a alimentação e os frascos foram removidos.

4.5.2 Bioensaio tópico

Estudos inseticidas com o OE de *E. involucrata* foram conduzidos de acordo com o procedimento descrito por Romero; Potter; Haynes (2009). Os insetos adultos foram separados usando uma pinça de peso pena nas placas de Petri. Os insetos foram anestesiados com CO₂ e 1 mL de uma solução de tratamento em acetona foi colocada na superfície dorsal do abdômen com um dispensador de repetição de mão (Hamilton Co., Reno, NV) equipado com uma seringa de vidro de 50 mL (Hamilton Co). Insetos controle receberam apenas 1 mL de acetona.

Após o tratamento, os insetos foram transferidos para os frascos de vidro transparente de 20 mL contendo tira de papel (padrão 92 - papel multiuso) e mantidos na câmara de crescimento. Os dados para a mortalidade dos insetos foram registrados aos 1, 2, 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Os insetos foram considerados mortos quando nenhuma parte do corpo se moveu, após serem tocados com uma agulha. Ocorreram 3 repetições com 10 insetos (ambos os sexos)/réplica. Quatro doses foram utilizadas, 125, 50, 25 e 12,5 µg OE/inseto e a deltametrina foi usada como inseticida padrão.

4.5.3 Bioensaio residual

Avaliação residual foi feita usando o método de papel filtro em uma placa de Petri, conforme descrito por Campbell e Miller (2015) após pequenas modificações. Um disco de papel de filtro de 20 cm² (Whatman # 1) foi tratado com uma alíquota de 100 µL de cada concentração de tratamento (25, 50 e 100 µg OE/cm²) usando pipeta. A alíquota cobriu completamente o papel de filtro. Os papéis de filtro tratados, foram, então, colocados na placa de Petri (50 mm x 9 mm, Falcon). Os tratamentos de controle receberam apenas acetona. Dez insetos adultos foram liberados no papel de filtro e a mortalidade foi registrada durante 7 dias como mencionado anteriormente. Foram utilizadas 3 repetições com 10 insetos/replicação. A deltametrina foi usada como padrão.

4.5.4 Bioensaio de fumigação

Os insetos foram submetidos à toxicidade por vapor em jarra de vidro transparente de 125 mL. Um pequeno pedaço de papel foi colocado no fundo da jarra para fornecer um substrato para os insetos descansarem durante os testes com o OE de *E. involucrata*. Os insetos foram introduzidos nos frascos 2-4 h antes do tratamento para se aclimatarem. Uma solução de tratamento ou alíquota de acetona de 2 µL foi depositada diretamente na superfície interna da parede lateral da jarra a 4 cm do fundo da jarra, usando uma seringa a 50 µL à prova de gás (Hamilton Company acoplada a um PB600, Reno, NV) repetindo dispensa. Cinco concentrações: 15,6, 31,25, 62,5, 125 e 250 µg OE/125 cm² foram testadas contra os insetos. Os frascos foram colocados na câmara de crescimento e os dados para mortalidade foram registrados 24 h após o tratamento. O 2,2-diclorovinil-dimetilfosfato (DDVP) foi usado como padrão.

4.6 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.6.1 Linhagens tumorais

Para a determinação da citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10), carcinoma de mama humano (MCF-7) e a linhagem não tumoral de fibroblasto murino (MacCoy). Estas linhagens foram obtidas de culturas mantidas no laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através de expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) e, mantidos em estufa a uma temperatura constante de 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após a cultura se tornar confluenta (aproximadamente 48 h), as células foram coletadas e sub-cultivadas.

4.6.2 Ensaio de viabilidade com MTT

O método do MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método colorimétrico usado para medir a proliferação celular e também a citotoxicidade. As linhagens celulares MacCoy, B16F10 e MCF7 foram semeadas a uma densidade de 3×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após as células terem sido expostas à concentrações

crescentes de OE de *E. involucrata* (0,84 µg/mL a 8,4 mg/mL) em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos por 72 h.

Imediatamente antes do tratamento, as soluções contendo o óleo essencial e o meio de cultivo foram submetidas a agitação vigorosa utilizando agitador do tipo “vortex” pelo tempo de no mínimo 1 minuto. Após o período de tratamento o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5µg/µL) mantida por 2 h a uma temperatura de 37 °C. Após a incubação, os cristais de formazan, resultantes da redução do MTT foram dissolvidos em uma solução de ácido clorídrico (HCl 0,1M).

A absorbância foi medida num leitor de absorbância de microplacas a um comprimento de onda de 570 nm. Foi considerado como 100% de células viáveis a densidade óptica obtida no grupo controle, e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada a relação entre a proporção da concentração (densidade óptica) e o número de células viáveis. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis.

4.6.3 Cálculo da Concentração inibitória mínima IC₅₀

A concentração inibitória mínima é aquela capaz de inibir em 50% a atividade das desidrogenases mitocondriais (IC₅₀). O IC₅₀ foi calculado utilizando o programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

4.6.4 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) do OE de *E. involucrata* foi calculado pela razão da IC₅₀ do composto entre as linhagens não-tumoral (MacCoy) e as tumorais (MCF-7 e B16F10) conforme equação 3 a seguir:

$$IS = (IC_{50} \text{ célula não tumoral}) / (IC_{50} \text{ célula tumoral}) \quad (3)$$

4.6.5 Análise morfológica

Foram feitas análises morfológicas das células na concentração de 77µg/mL. As células (5.000) foram plaqueadas sobre lamínulas redondas estéreis depositadas no fundo dos poços de placas de 24 poços. Após 24 horas as células foram tratadas com o óleo de *E.*

involucrata na concentração citada acima. Depois de 24 h de tratamento, as células foram lavadas com meio RPMI e fixadas com formol 2% em solução salina tamponada (PBS) por 10 minutos. Depois de fixadas as células foram submetidas à coloração de May-Grünwald-Giemsa e as alterações morfológicas observadas em microscopia convencional utilizando objetiva de imersão em microscópio com câmera digital acoplada.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi aplicada para analisar a viabilidade celular, para o IC_{50} sendo utilizado o Teste de ANOVA seguido do teste de Tukey. Foram considerados como significante os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) com intervalo de confiança de 95%. Para o cálculo dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows.

As médias de tratamento da toxicidade por vapor foram comparadas usando análise de variância de dois fatores (ANOVA) e separadas pela diferença significativa do Teste de Tukey (HSD). Os valores de LC_{50} das atividades inseticidas foram calculadas usando a análise Probit. As análises foram realizadas no SAS® 9.3 e no JMP® 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS ANATÔMICOS

As folhas de *Eugenia involucrata* (Figura 3a-d) possuem paredes periclinais das células epidérmicas sinuosas na face adaxial (Figura 3e), onduladas na face abaxial (Figura 3f) e cobertas externamente por uma cutícula lisa. Fontenelle, Costa e Machado (1994) identificaram três diferentes ornamentações cuticulares em seus estudos com espécies de *Eugenia*, lisa, estriada e ondulada. Entretanto, paredes anticlinais retas foram encontradas em ambas as faces de *E. rotundifolia* Casar. (DEFAVERI; ARRUDA; SATO, 2011) e na face adaxial da folha de *E. claviflora* Roxb. (HARON; MOORE, 1996). Dessa forma, a ornamentação cuticular é uma característica diagnóstica para espécies do gênero.

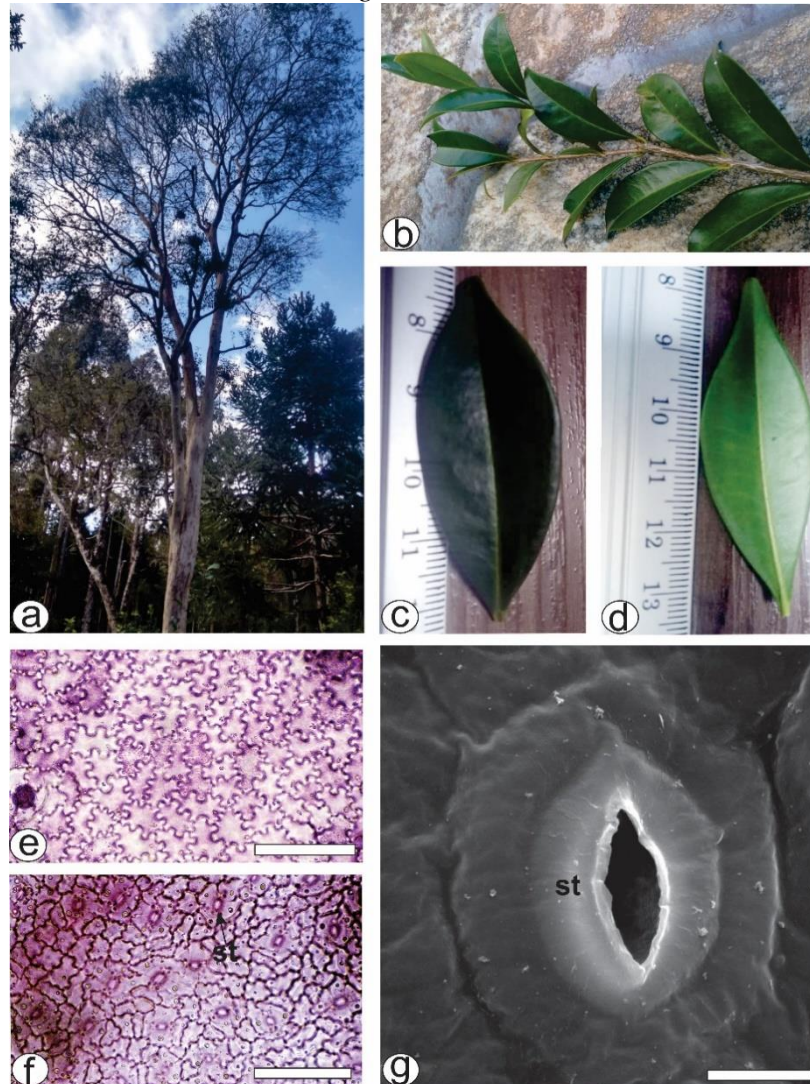
Estômatos (Figura 3f, g), são na grande maioria anomocíticos, alguns paracíticos e poucos tetracíticos e estão localizados levemente acima das demais células epidérmicas. São observados somente na face abaxial, classificando a folha como hipoestomática. A média do tamanho dos estômatos é de $20 \times 11 \mu\text{m}$. Haron e Moore (1996) avaliaram 21 espécies de *Eugenia* e encontraram o comprimento dos estômatos variando entre $13.3 \mu\text{m}$ (*E. cerasiformis* Miq) a $31,8 \mu\text{m}$ (*E. mugiensis* O. Berg). Esses autores também encontraram estômatos paracíticos e anomocíticos somente na face abaxial, na maioria das espécies analisadas.

Apesar de ser frequente a presença de tricomas tectores em espécies de Myrtaceae (Metcalf e Chalk (1950), e em espécies de *Eugenia*, a exemplo de *E. biflora* (L.) DC., *E. flavescens* DC., *E. patrisii* Vahl. e *E. tapacumensis* Berg. (ALVAREZ; SILVA, 2012), no presente estudo não foram observados esses apêndices epidérmicos. Adicionalmente, Fontenelle, Costa e Machado (1994) afirmam que algumas espécies de *Eugenia* possuem tricomas tectores apenas em folhas jovens, mas que em outras, eles permanecem também em folhas adultas, como é o caso de *E. badia* O. Berg., *E. maricaensis* G. M. Barroso e *E. nitida* Benth..

A folha de *E. involucrata*, em secção transversal, apresenta epiderme uniseriada (Figura 4a, d, e) e coberta por cutícula espessa. A cutícula reagiu positivamente na pesquisa de compostos lipofílicos (Figura 4e), como também observado em *E. uniflora* por Sá, Santana e Randau (2016). Cutícula espessa também foi encontrada em outras espécies de *Eugenia*, a exemplo de *E. brasiliensis* (DONATO; MORRETES, 2007). As epidermes mostram as células de tamanhos iguais em ambas as superfícies. O mesofilo apresenta estrutura tipicamente dorsiventral, sendo constituído pelo parênquima paliçádico com células dispostas

em 2 estratos, e pelo parênquima esponjoso, que ocupa maior porção do mesofilo e é formado por cerca de 14 camadas, estabelecendo pequenos espaços intercelulares.

Figura 3 - Morfoanatomia de folhas de *Eugenia involucrata* DC.



Fonte: O autor

Notas: [e, f: microscopia de luz; g: microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. a – planta no hábito. b – ramo com folhas. c – folha na face adaxial. d – folha na face abaxial. e, f – vista frontal da epiderme foliar (e. adaxial, f. abaxial). g. vista frontal do estômato. [st- stomata]. Barras: e, f = 50 μ m, g = 10 μ m.

Compostos fenólicos reagiram com dicromato de potássio (Figura 4d) e cloreto férrico e foram evidenciados, em maior quantidade, no parênquima paliçádico e nos feixes vasculares. Sá, Santana e Randau (2016) confirmaram a presença de compostos fenólicos em *E. uniflora* e afirmaram que flavonoides foram detectados no floema, em algumas células epidérmicas e em cavidades secretoras, enquanto taninos foram encontrados nessas mesmas estruturas e também nos parênquimas paliçádico e esponjoso.

Cristais prismáticos e drusas estão presentes no mesofilo, especialmente no parênquima paliçádico. Donato e Morretes (2007) afirmam que são numerosos os idioblastos contendo cristais prismáticos no parênquima paliçádico, especialmente em folhas de sol e que estes se revelaram anisotrópicos em luz polarizada em *E. florida* DC.

Apesar do mesofilo dorsiventral ser frequentemente encontrado em espécies de *Eugenia* (CARDOSO; PROENÇA; SAJO, 2009), o número de camadas pode ser diferente, a exemplo de *E. rotundifolia*, na qual a análise evidenciou parênquima paliçádico formado por até 4 camadas e parênquima esponjoso formado por até 18 camadas de células (DEFAVERI; ARRUDA; SATO, 2011). O número de camadas dos parênquimas clorofilianos pode variar dependendo da luminosidade do meio, como observado em *E. florida* que mostrou o parênquima paliçádico organizado em um ou dois estratos, conforme a folha tenha se desenvolvido em maior ou menor luminosidade, respectivamente (DONATO; MORRETES, 2007). Adicionalmente, Donato e Morretes (2007) afirmaram que o mesofilo de *E. brasiliensis* é dorsiventral com tendência à isobilateralidade.

Feixes vasculares de pequeno porte, do tipo bicolateral, estão distribuídos na região mediana do mesofilo, especificamente no parênquima esponjoso e são envoltos por endoderme sem estrias de Caspary visíveis (Figura 4d, e). Cavidades secretoras, de secção arredondada, estão situadas imediatamente abaixo da epiderme, frequentemente no parênquima paliçádico (Figura 4a, d). As estruturas secretoras mais desenvolvidas apresentam um diâmetro que, muitas vezes, ultrapassa a altura das células do parênquima paliçádico (Figura 4e). Seu epitélio secretor é constituído por células achatadas, com paredes delgadas. O material contido no interior dessas cavidades secretoras reagiu à pesquisa com Sudam III, revelando material de natureza lipofílica (Figura 4e). Sá, Santana e Randau (2016) detectaram a presença de OE em células epidérmicas, cavidades secretoras e em células parenquimáticas de *E. uniflora*.

A nervura central, em secção transversal, possui formato levemente côncavo na face adaxial e convexo na superfície abaxial (Figura 4a, d). Essa característica é comumente encontrada em espécies de *Eugenia* (ALVES; TRESMONDI; LONGUI, 2008; DONATO; MORRETES, 2007), contudo, diferente formato foi observado em *E. rotundifolia* que demonstrou proeminência na face adaxial, e plana na face abaxial (DEFAVERI; ARRUDA; SATO, 2011).

A epiderme unisseriada é revestida por cutícula lisa e espessa, e, subjacente, o clorênquima mostra-se contínuo em ambas as faces (Figura 4). Nessa região são observados inúmeros idioblastos cristalíferos, contendo cristais prismáticos (Figura 4j, k) e drusas (Figura

4l). Cavidades secretoras (Figura 4a) também são encontradas, contudo em quantidade menor do que os idioblastos cristalíferos.

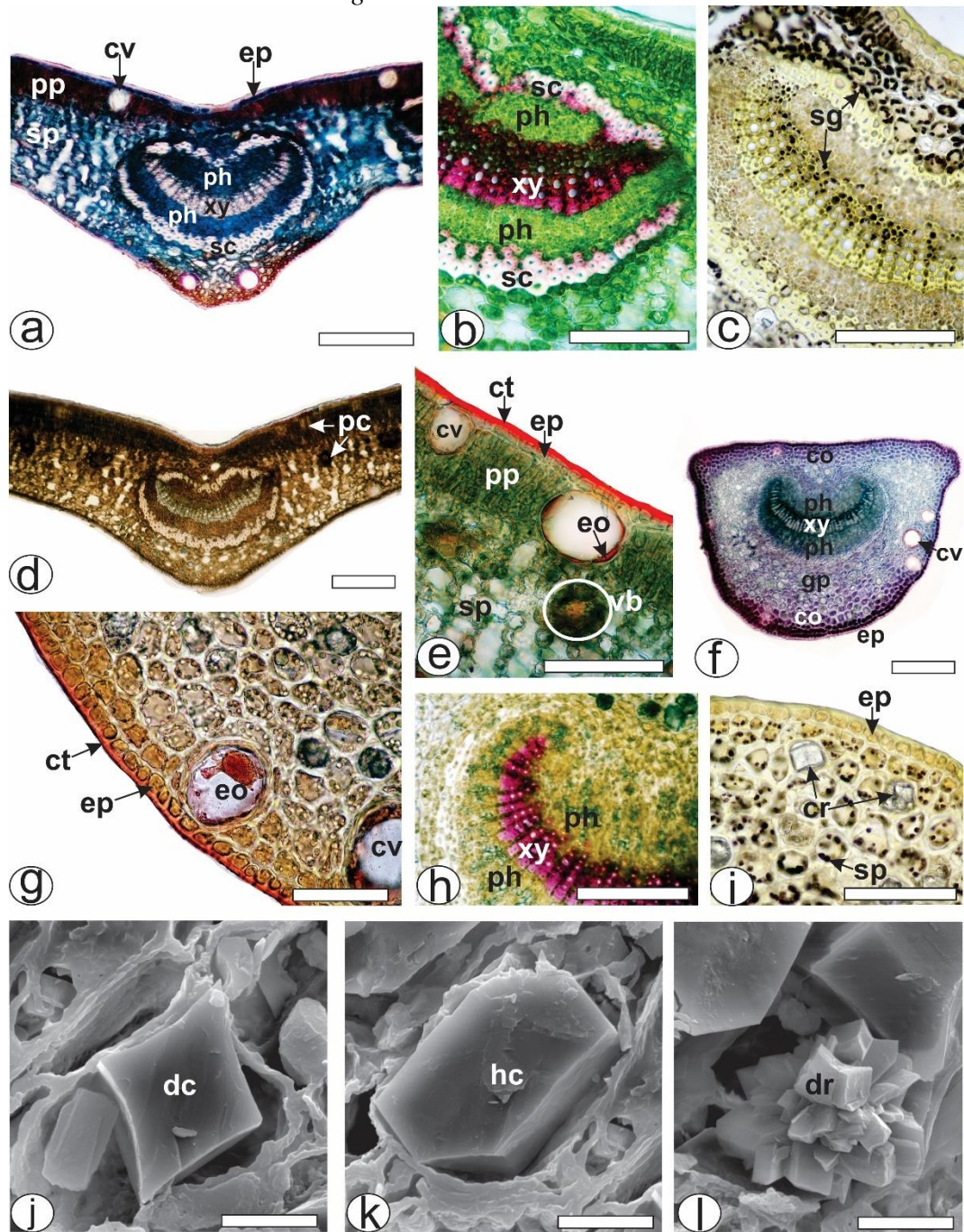
O sistema vascular está representado por um feixe vascular do tipo bicolateral, único, central e em arco aberto. Um anel esclerenquimático descontínuo formado por fibras perivasculares envolve o feixe vascular (Figura 4a, b, d) e reagiu ao teste com floroglucina/HCl, evidenciando a presença de lignina (Figura 4b). Anel esclerenquimático envolvendo o feixe vascular da nervura central também foi observado em *E. luschnathiana* (O.Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks. (LEMOS et al., 2018). Grãos de amido, em reação com solução de lugol 2%, são observados no colênquima e no xilema (Figura 4c).

O pecíolo de *E. involucrata*, em secção transversal, possui contorno plano na face adaxial e convexo na abaxial. Semelhante formato peciolar foi observado em *E. luschnathiana* (LEMOS et al., 2018). Entretanto, Fontenelle, Costa e Machado (1994), descreveram o formato do pecíolo de 11 espécies de *Eugenia* como côncavo-convexo. O revestimento epidérmico do pecíolo apresenta as mesmas características observadas na lâmina foliar (Figura 4f, g). O colênquima é do tipo angular e apresenta-se em faixas contínuas de 3-6 séries de células (Figura 4f, g). Notam-se cavidades secretoras, abaixo da epiderme, na região do colênquima, com as mesmas características relatadas para a lâmina foliar (Figura. 4f, g).

O conteúdo presente nas cavidades secretoras e na cutícula reagiram à pesquisa de compostos lipofílicos na presença do Sudam III (Figura 4g). Grãos de amido, em reação positiva com solução de lugol, foram evidenciados no colênquima. Muitos cristais prismáticos e drusas estão presentes no colênquima e no parênquima fundamental. Cristais prismáticos e drusas foram amplamente relatadas para o gênero (ALVES; TRESMONDI; LONGUI, 2008; CARDOSO; PROENÇA; SAJO, 2009; DEFAVERI; ARRUDA; SATO, 2011; DONATO; MORRETES, 2007).

Os cristais foram analisados quanto à composição química elementar usando um EDS. O espectro EDS de um cristal prismático (Figura 5) mostra picos proeminentes de cálcio (43.79%), carbono (13.07%) e oxigênio (43.15%). A composição química confirma que estes cristais são formados por oxalato de cálcio. De uma forma geral, sais de cálcio podem precipitar na forma de oxalato, fosfato, malato, sulfato, carbonato ou citrato (WEINER; DOVE, 2003); entretanto, oxalato de cálcio tem se mostrado o mais comum no reino vegetal (ANDRADE et al., 2017; MACHADO et al., 2018; SANTOS et al., 2018b). Os picos não identificados representam o elemento ouro usado para pulverizar as amostras.

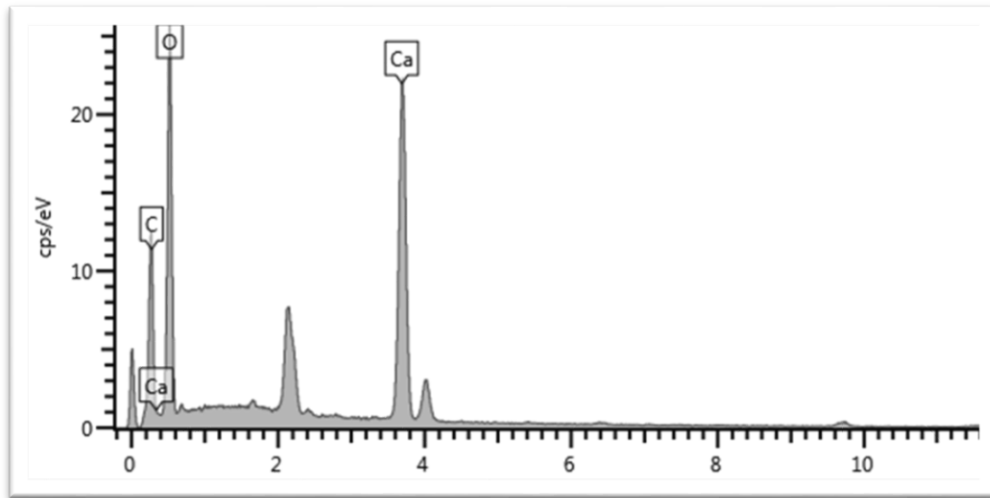
Figura 4 - Anatomia de folhas de *Eugenia involucrata* DC.



Fonte: O autor

Notas: [a - i: microscopia de luz; j -l: microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. a, d, e – lâmina e nervura central. b, c – nervura central. f, g, h, i – pecíolo. j, k – cristal prismático. l - drusa. [co- colênquima, ct- cutícula, ep- epiderme, cr- cristal prismático, cv- cavidade secretora, dr- drusa, dc- cristal prismático em forma de losango, eo- óleo essencial, hc– cristal prismático em forma de hexágono, pc- compostos fenólicos, ph- floema, pp- parênquima paliçádico, sc- esclerênquima, sg- grãos de amido, sp- parênquima esponjoso, vb- feixe vascular, xy- xilema]. Barras: a, d, f = 200 μ m, b, c, e, h = 100 μ m, g = 50 μ m, i, j, k = 5 μ m.

Figura 5 - Espectro de EDS de um cristal prismático

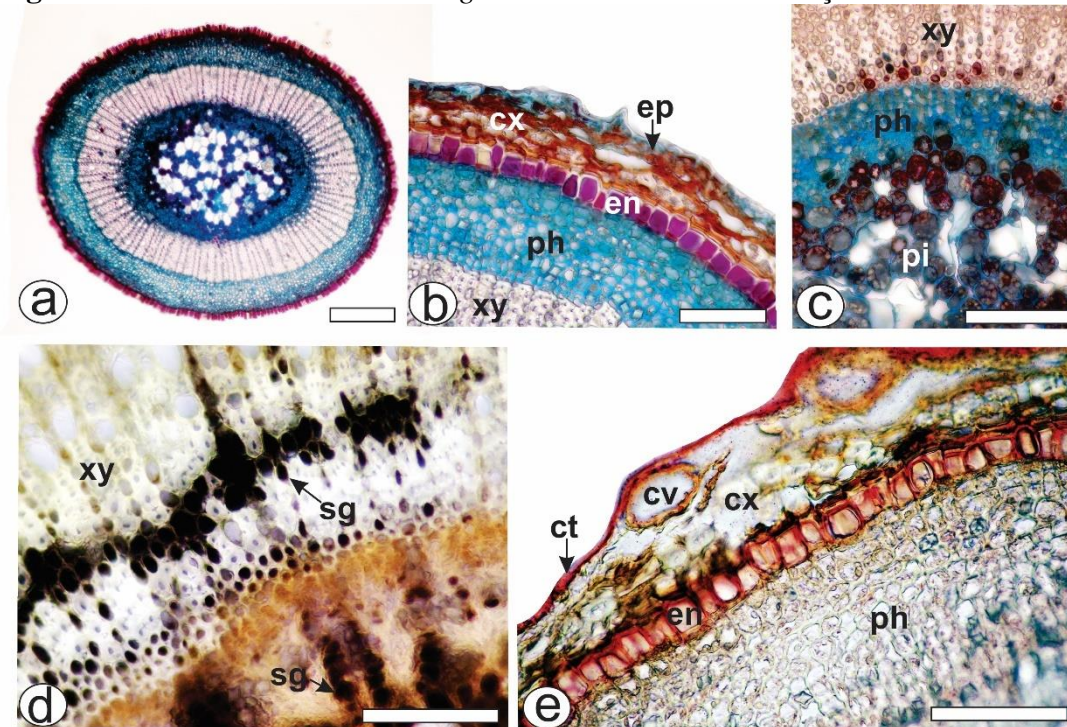


O sistema vascular está representado por um feixe bicolateral, único, central em forma de C com a abertura voltada para a face adaxial. A organização do sistema vascular é semelhante ao observado na nervura central, entretanto as margens do arco vascular são mais involutas no pecíolo (Figura 4f, h). Características similares foram encontradas em várias espécies de *Eugenia* (CARDOSO; SAJO, 2004; DONATO; MORRETES, 2007; LEMOS et al., 2018). Adicionalmente, o xilema reagiu positivamente com floroglucina nos testes histoquímicos (Figura 4h).

O caule, seccionado transversalmente, apresenta formato praticamente circular (Figura 6a). A epiderme caulinar se apresenta unisseriada e recoberta por cutícula delgada e lisa (Figura 6b). Esta reagiu com Sudam III nos testes histoquímicos (Figura 6e). Subjacentemente à epiderme, encontra-se o córtex formado por cerca de 4 camadas de células (Figura 6b). Fibras em grupos ou isoladas, bem como cavidades secretoras aparecem nesse tecido. Limitando internamente o córtex, observa-se uma endoderme sem estrias de Caspary evidente (Figura 6b) e que reagiu à pesquisa de compostos lipofílicos (Figura 6e). Diferentemente da espécie em estudo, *E. pyriformis* apresentou o caule, em secção transversal, com contorno circular, coberto por uma periderme impregnada com suberina e lignina e mostrando córtex representado por várias camadas de parênquima cortical (ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

O sistema vascular é formado por floema externo, xilema e floema interno, estabelecendo uma região medular (Figura 4a, c). *E. pyriformis* evidenciou cilindro vascular atravessado por raios parenquimáticos estreitos (ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012) o que não foi observado nesse estudo.

Figura 6 - Anatomia caulinar de *Eugenia involucrata* DC. – secção transversal.



Fonte: O autor

Notas: a – vista geral. b-e – detalhes de porções do caule [ct- cutícula, cv- cavidades, cx- córtex, en - endoderme, ep- epiderme, ph- floema, pi- medula, sg- grãos de amido, xy- xilema]. Barras: a = 200 μ m, b-e = 50 μ m.

O xilema é totalmente lignificado e possui elementos traqueais de diâmetro relativamente pequeno. O parênquima medular compõe-se de células de diversos tamanhos e de parede delgada. Muitos grãos de amido são observados no feixe vascular e medula (Figura 4c, d).

5.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

O OE de *E. involucrata* apresentou coloração amarelo-clara límpida e odor forte, amadeirado, solúvel em solventes orgânicos. Apresenta densidade menor que a água e obteve-se um rendimento de 0,15% \pm (v/p), com densidade de 0,84. Divergindo dessa constatação, coloração marrom-avermelhada foi encontrada no OE extraído de folhas dessa espécie coletadas no município de Santa Maria, RS (SILVA et al., 1991). Diferentes rendimentos de OE de *E. involucrata* foram registrados, a saber, 0,08% (v/p) quando coletada em Campinas, SP (RAMOS et al., 2006), 0,21% (v/p) quando coletada em Cascavel, PR (TOLEDO, 2018); 0,27% (v/p) para a espécie coletada em Santa Maria, RS (SILVA et al., 1991).

5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

A composição química do OE de folhas de *E. involucrata* obtida por meio da análise por CG-EM está apresentada na Tabela 1 e o cromatograma encontra-se na Figura 7.

Tabela 1 - Índices de retenção e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *Eugenia involucrata*.

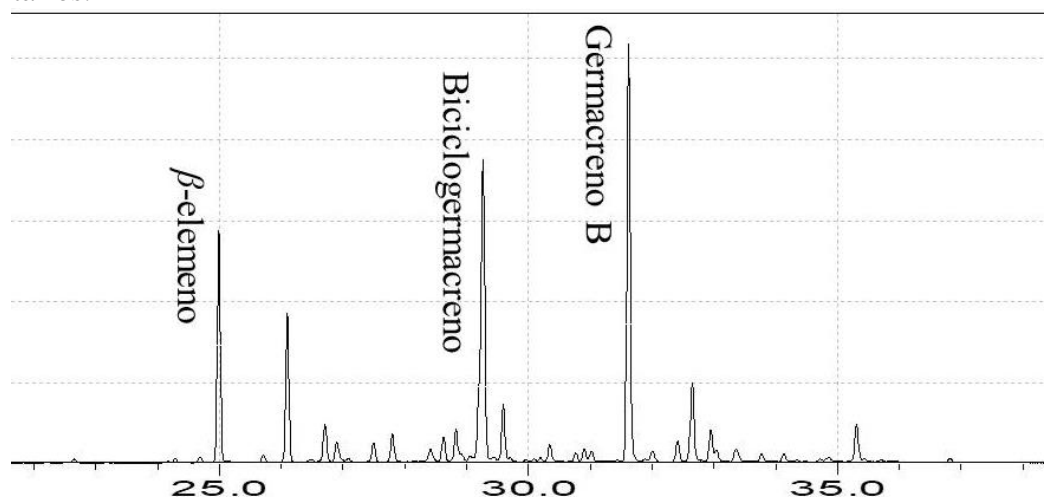
Nº	T _R (min)	AI ¹	AI Adms ²	Composto	[] %
1	22,651	1338	1335	δ -elemeno	0,22
2	24,166	1373	1374	Isoledeno	0,10
3	24,287	1376	1374	α -copaeno	0,23
4	24,990	1392	1389	β-elemeno	10,86
5	25,707	1410	1409	α -gurjuneno	0,44
6	26,098	1419	1417	(E)-cariofileno	7,74
7	26,489	1429	1430	β -copaeno	0,16
8	26,899	1439	1440	Aromadendreno	1,35
9	27,084	1443	1437	α -guaiano	0,30
10	27,494	1454	1452	α -humuleno	1,11
11	27,799	1461	1458	<i>Allo</i> -aromadendreno	1,99
12	28,623	1481	1484	Germacreno D	1,42
13	28,827	1486	1489	β -selineno	1,95
14	29,058	1492	1492	cis- β -guaieno	0,43
15	29,266	1497	1500	Biciclogermacreno	19,76
16	29,434	1501	1500	α -muuroleno	0,42
17	29,593	1505	1508	Germacreno A	3,18
18	29,704	1508	1511	δ -amorfenol	0,30
19	29,958	1515	1513	γ -cardineno	0,23
20	30,086	1518	1520	7-epi- α -selineno	0,23
21	30,342	1525	1522	δ -cardineno	1,08
22	31,016	1542	1545	Selina-3,7(11)-dieno	0,71
23	31,620	1558	1559	Germacreno B	22,17
24	32,005	1568	1567	Palustrol	0,93
25	32,413	1578	1577	Espatulol	1,22
26	32,651	1584	1590	Globulol	5,03
27	32,949	1592	1592	Viridiflorol	1,84
28	33,040	1594	1595	Cubeban-11-ol	0,70
29	33,360	1603	1600	Rosiflorol	1,08
30	34,862	1644	1640	(epi- α)-Muurolol	0,47
31	35,200	1653	1656	Patchuli álcool	0,13
32	35,431	1659	1665	Intermediol	0,28
33	36,811	1697	1700	Eudesm-7(11)-em-4-ol	0,27

Fonte: O autor.

Notas: ¹Índice de retenção calculado. ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Foram identificados os compostos de concentração <0.1%. São destacados em negrito os compostos majoritários.

A análise dos compostos encontrados no OE permitiu identificar 88,34% dos compostos voláteis presentes na amostra estudada. Desta composição 76,39% é de sesquiterpenos hidrocarbonetos e 11,95% é formada por sesquiterpenos oxigenados. Os compostos majoritários foram β -elemeno (10,86%), biciclogermacreno (19,76%), germacreno B (22,17%).

Figura 7 - Picos do óleo essencial de *Eugenia involucrata*, indicando os componentes majoritários.



Fonte: O autor

O OE extraído de folhas de *E. involucrata* coletadas na área rural de Urupema, SC, foi obtido por três diferentes métodos soxhlet, hidrodestilação e extração supercrítica usando CO₂. Os três métodos possibilitaram a identificação em diferentes concentrações dos majoritários β -elemeno (variando de 30,44 a 42,41%), biciclogermacreno (21,43 a 28,40%), cariofileno (6,69 a 13,94%) e Germacreno D (4,02 a 7,37%). Os compostos minoritários α -selineno, humuleno e allo-aromadendreno foi somente observado no método de hidrodestilação, enquanto que D-limoneno não foi observado por este método (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017), confirmando que o processo de extração influencia na quantidade e na qualidade dos componentes químicos dos OE.

Outro estudo sobre a composição química do OE extraído de folhas de *E. involucrata* coletadas em Campinas, SP, verificou como compostos majoritários o biciclogermacreno (19%), seguido de globulol (14%) e epi-globulol (8,0%), germacreno D (5,2%). A composição total foi de 58% de sesquiterpenos hidrocarbonetos e 42% de sesquiterpenos oxigenados (RAMOS et al., 2006).

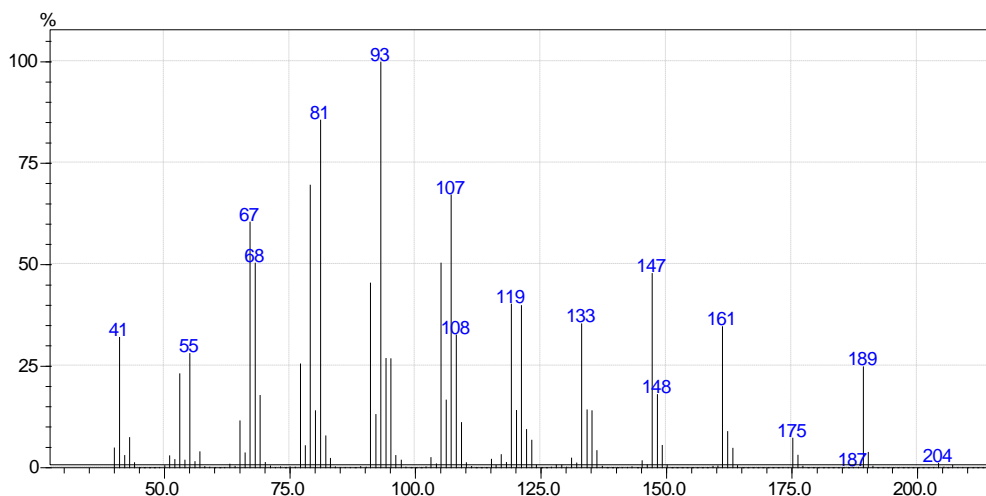
Pode ser verificado em todos os estudos a presença majoritária de compostos da classe dos sesquiterpenoides, sendo esta uma das características das espécies do gênero *Eugenia* (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007; RAMOS et al., 2006).

O OE é extremamente sensível às alterações ambientais, a exemplo das práticas de cultivo da planta, condições climáticas, nutrientes presentes no solo, idade da planta, entre outras características (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017). O perfil químico dos OE também pode ser afetado por condições de secagem aplicadas ao material vegetal antes da extração, o processo empregado para a moagem e as condições de armazenamento (BUDEL et al., 2018).

Os cromatogramas dos principais compostos identificados no OE das folhas de *E. involucrata* estão apresentadas nas Figuras 8-10. Os cromatogramas obtidos de cada pico foram comparados com a biblioteca NIST-127. A análise do cromatograma (Figura 8) encontrado para o composto β -elemeno (10,86%) é compatível com os dados da biblioteca NIST-127, pode-se observar a similaridade dos fragmentos em 81; 93; 107; 147; 161 e 189 m/z e com íon molecular em 204 m/z, estes íons coincidem com os encontrados por Li et al. (2018) confirmando a presença do composto β -elemeno na amostra estudada.

O composto β -elemeno pertence à classe dos sesquiterpenoides e destaca-se na terapêutica pela atividade antitumoral, atuando contra câncer de mama resistente à doxorrubicina (TANG et al., 2018), câncer hepatocelular (QIN et al., 2012), melanoma (CHEN et al., 2011), entre outros.

Figura 8 - Espectro de massas do β -elemeno do óleo essencial de *Eugenia involucrata*.



Fonte: O autor

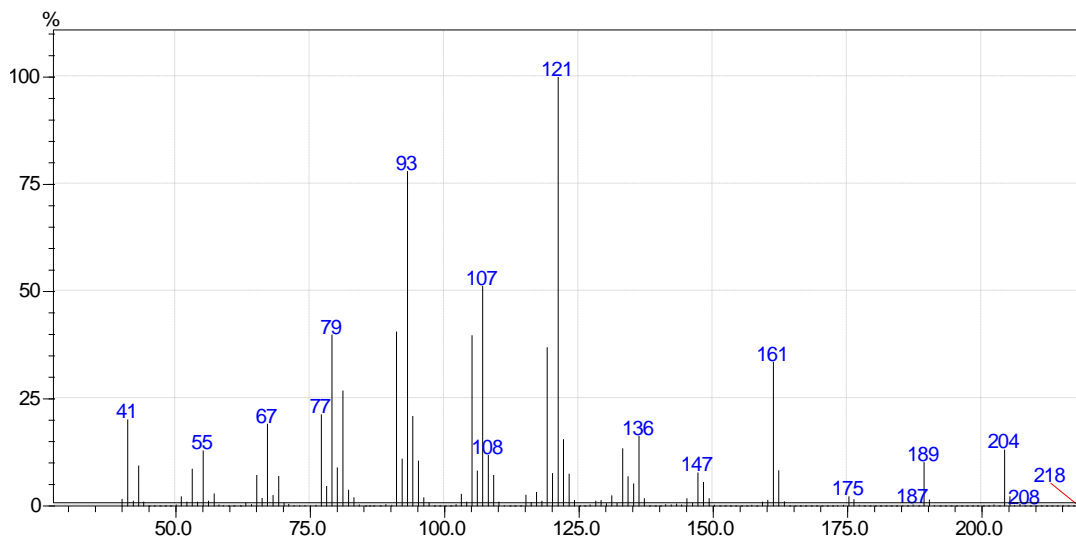
O β -elemeno também suprimiu o câncer de pulmão, regulando tanto macrófagos quanto células de câncer de pulmão. Atua inibindo a proliferação, migração, invasão de células de câncer de pulmão e aumentou sua radiosensibilidade, sendo um fármaco promissor para a combinação com quimioterapia ou radioterapia (YU et al., 2017)

Fang et al. (2017) evidenciaram potente efeito inibitório do β -elemeno na produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas via inativação de β -catenina, e também as funções protetoras do β -elemeno na inflamação induzida por endotoxinas, sugerindo o uso desse fármaco no tratamento de doenças inflamatórias (FANG et al., 2017).

O β -elemeno melhorou níveis de estresse oxidativo vascular prevenindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, atribuindo-se à esta atividade a função antioxidantes e anti-inflamatórias do composto (LIU et al., 2017).

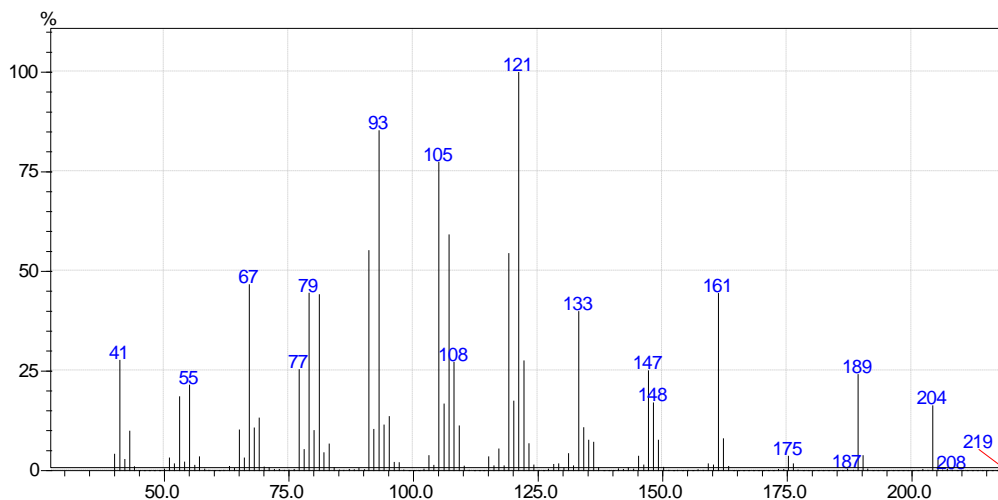
O segundo composto majoritário da amostra estudada foi o biciclogermacreno (19,76%), como apresentado no cromatograma da Figura 9. A comparação dos fragmentos encontrados na amostra e a biblioteca NIST -127 possibilitou inferir que se refere ao composto biciclogermacreno.

Figura 9 - Espectro de massas do biciclogermacreno do óleo essencial de *Eugenia involucrata*.



Fonte: O autor

Figura 10 - Espectro de massas do Germacreno B do óleo essencial de *Eugenia involucrata*.



Fonte: O autor

A figura 10 apresenta o espectro de massas do composto Germacreno B (22,17%). Ambos os compostos, biciclogermacreno e germacreno D foram identificados em amostra de OE extraído de folhas de *E. involucrata*, coletadas no município de Urupema – SC (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017). Amostra de OE de *E. involucrata* foi avaliada por Paroul et al. (2004) identificando 91,6% da composição por sesquiterpenos, sendo 36,8% de biciclogermacreno e 15,05% de germacreno B. Outro estudo com o OE de folhas dessa espécie identificou a presença de 19% de biciclogermacreno e 5,2% de germacreno (RAMOS et al., 2006).

Os resultados encontrados na literatura demonstram que a concentração de sesquiterpenos é majoritária em diferentes amostras de óleo de folhas de *E. involucrata*, variando no percentual encontrado.

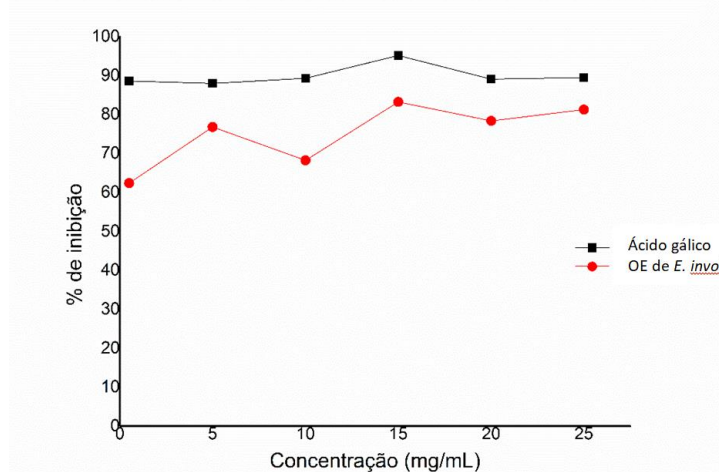
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. involucrata*

A determinação da atividade de captura de radicais livres do OE foi verificada por meio do ensaio de DPPH. O potencial antioxidante foi comparado ao ácido gálico, conforme figura 11. Como pode ser verificada, a atividade de remoção de DPPH cresce à medida que a concentração do óleo é aumentada.

A análise antioxidante do óleo essencial de folhas e flores de *Eugenia klotzschiana* Berg mostrou atividade moderada para ambos os óleos (CARNEIRO et al., 2017). O óleo

essencial de *E. caryophyllata* (cravo) demonstrou atividade antioxidante muito forte pelo método do DPPH (CHAIEB et al., 2007).

Figura 11 - Atividade antioxidante do óleo essencial de *Eugenia involucrata*.



Estudo realizado para avaliar a capacidade antioxidante de *E. uniflora* demonstrou uma eliminação de em média 42,8% do radical DPPH, sendo considerados como bom potencial antioxidante pelo método de DPPH (FIGUEIREDO et al., 2019). Outro estudo da avaliação da atividade antioxidante usando DPPH com o óleo essencial da *E. uniflora* demonstrou alta atividade antioxidante, sendo que a análise química demonstrou presença de majoritários como o germacrene A, B e D, sendo este último apontado com capacidade antioxidante (VICTORIA et al., 2012).

Observa-se, portanto, que a atividade antioxidante do OE de *E. involucrata* é semelhante aos achados na literatura em relação ao gênero *Eugenia*, sendo que o resultado encontrado neste estudo, demonstrou que a atividade antioxidante do OE de *E. involucrata* é inferior a atividade do ácido gálico, no entanto, próximo a 80% de eliminação do radical DPPH, podendo-se dizer que o OE tem um forte potencial antioxidante.

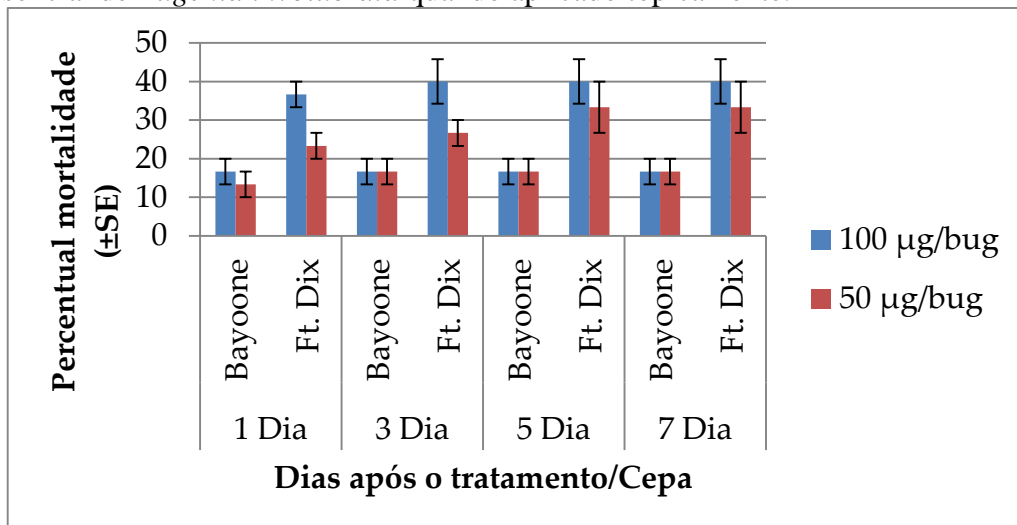
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia involucrata*

Os dados de mortalidade produzidos pelo OE aplicados topicamente a 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{bug}$ são dados na figura 12. Observou-se 13,3% e 16,6% de mortalidade em Bayonne, enquanto 23,3% e 36,6% foram verificadas em Ft. Dix em 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{bug}$, respectivamente. O resultado foi avaliado 24 h após o tratamento. A mortalidade chegou a 16,6% (ambas as

doses) em Bayonne e 33,3% (50 µg/bug) e 40% (100 µg/bug) em ft. Estirpe Dix, 7 dias após o tratamento. O OE (100 µg/bug) produziu uma mortalidade de 13,3% em ft. Dix estirpe que poderia chegar a 23,3% 7 dias após o tratamento em FT. Dix, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada na linhagem de Bayonne.

Ambos os óleos não foram tóxicos para os insetos testados nos ensaios fumigante (250 µg/125 mL de ar) e residual (100 µg/cm²).

Figura 12 - Percentual médio (\pm EP) de mortalidade de insetos adultos frente a duas doses de óleo essencial de *Eugenia involucrata* quando aplicado topicamente.



Fonte: Autor

Notas: Média e erro padrão calculado em JMP 10. Deltametrina (Standard) produziu 100% de mortalidade na estirpe de Bayonne e 65% em Ft. Dix a 0,0024 µg/bug. Dia (dia após o tratamento).

Utilizando os mesmos métodos, o EO de *Baccharis sphenophylla* Dusen ex Malme produziu $66,67 \pm 3,33\%$ de mortalidade na cepa resistente à inseticida 'Bayonne', enquanto produziu $83,33 \pm 3,33\%$ de mortalidade na cepa suscetível 'Ft.Dix', 24 após o tratamento (BUDEL et al., 2018). O EO de *Schinus molle* L. produziu $100,0 \pm 0,00\%$ (Ft. Dix) e $90,0 \pm 5,77\%$ (Bayonne) de mortalidade 24 h após o tratamento (MACHADO et al., 2018).

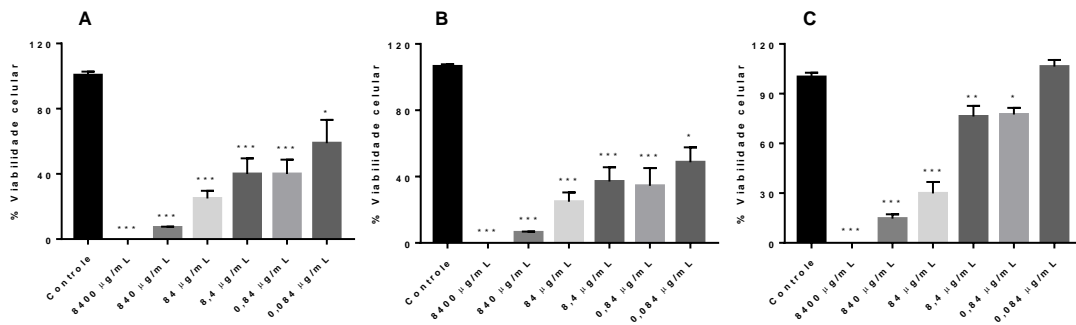
5.6 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO OLEO ESSENCIAL DE *Eugenia involucrata*

Considerando os resultados encontrados (Figura 13; Tabela 2) é possível perceber que o OE de *E. involucrata* foi citotóxico para as linhagens testadas.

Os resultados deste ensaio permitem observar que o OE de *E. involucrata* foi citotóxico para B16F10 em todas as doses testadas, já para a linhagem de MCF-7 humano

pode-se observar que o OE tem efeito tóxico até a dose de 0,84 µg/ml, após esta dose o OE não apresenta mais efeito. No entanto, o OE também foi tóxico para a linhagem não cancerígena de MacCoy.

Figura 13 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição à diferentes concentrações do óleo essencial de *Eugenia involucrata* pelo método do MTT.



Notas: A – MacCoy, B – B16F10, C – MCF-7. Cada barra representa a média \pm o erro padrão da média de 3 experimentos diferentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O OE de *E. uniflora* foi testado para as linhagens celulares de melanoma, câncer de pulmão, colón e estômago, induzindo a apoptose em todas as linhagens (FIGUEIREDO et al., 2019). Em outro estudo usando o extrato aquoso de *E. dysenterica* foi testado para as linhagens celulares de neuroblastoma humano, apresentando citotoxicidade para esta linhagem (GASCA et al., 2017). Estudo realizado com os caules de *E. sandwicensis* isolou vários compostos testando individualmente cada um deles, sendo que o 3 β -trans-p-cismaroiloxi-2 α , 23-di-hidroxioleno-12-O ácido en-28-óico apresentou toxicidade para câncer de mama em camundongos (GU et al., 2001).

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares incubadas com o óleo de *Eugenia involucrata* e os índices de seletividade (IS) das linhagens tumorais (B16F10 e MCF7) em relação à linhagem não tumoral (MacCoy).

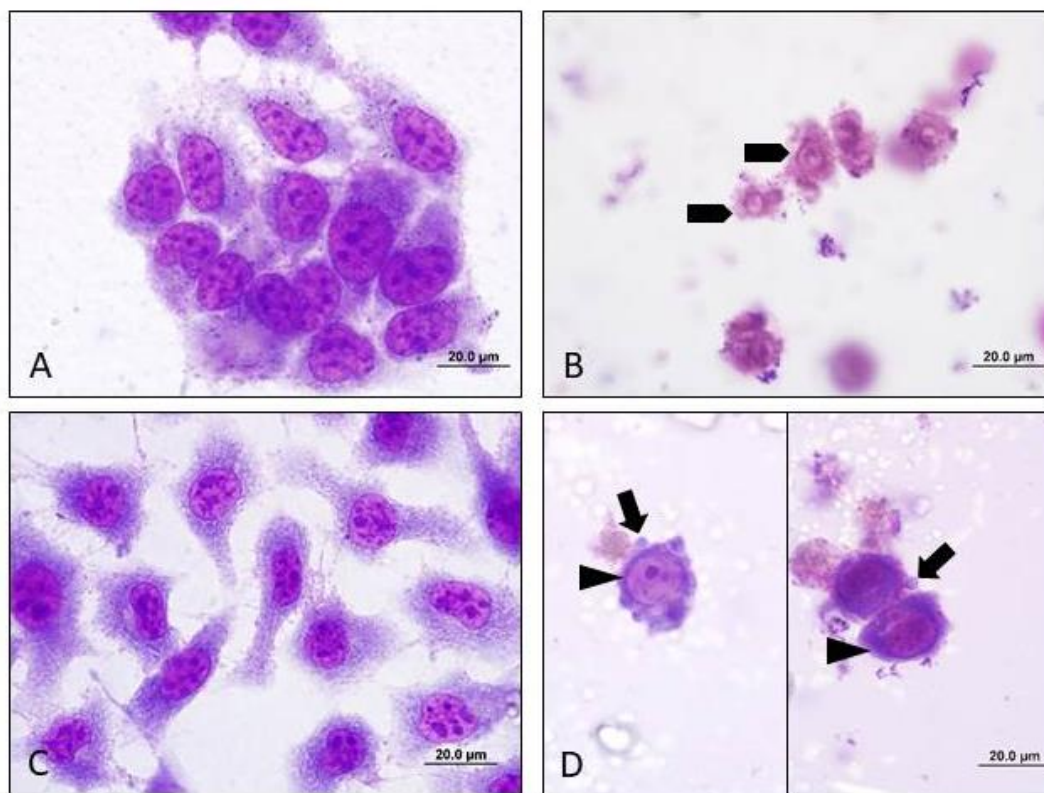
Linhagem	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
MacCoy	116,07	-
B16F10	156,6	0,74
MCF7	24,06	4,82

Quando observado os valores do índice de seletividade é possível inferir que o OE de *E. involucrata* apresenta alto potencial citotóxico para a linhagem de melanoma murino, enquanto que para o carcinoma de mama humano apresenta baixo potencial citotóxico.

Indicando, portanto, que o OE de *E. involucrata* pode ser um promissor agente citotóxico para melanoma murino.

Com o objetivo de evidenciar qual o processo de morte celular pode estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo OE de *E. involucrata*, foi realizado um ensaio de análise morfológica (Figura 14). É possível verificar a partir da figura 14 que o OE induz alterações morfológicas características de um processo de morte celular por apoptose, como formação de blebs, condensação de cromatina e arredondamento celular (MEER et al., 2010).

Figura 14 - Alterações morfológicas encontradas em linhagens celulares incubadas com 84µg/mL do óleo essencial de *Eugenia involucrata* por 24 horas.



Notas: A: linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF7) controle (incubada apenas com meio de cultura). B: MCF7 tratada com óleo de *E. involucrata*. É possível perceber profundas alterações morfológicas nas células, com grande redução no volume do citoplasma e núcleo celulares (B). C: Linhagem celular de melanoma murino (B16F10) controle (incubadas apenas com meio de cultura). D: B16F10 tratada com óleo de *E. involucrata*. É possível perceber o arredondamento celular (D) e a formação de blebs (D). Aumento de 1000x, coloração de May Grunwald-Giemsa.

Estes resultados confirmam os achados nos ensaios anteriores que demonstram que o OE de *E. involucrata* possui alto potencial citotóxico para a linhagem de melanoma murino.

6 CONCLUSÕES

A análise das folhas possibilitou classificá-la como hipoestomática, com epiderme unisseriada. Foi verificada a presença de cristais prismáticos e drusas no mesofilo. Houve reação positiva para compostos lipofílicos, lignina e fenólicos. Os cristais presentes apresentaram composição química de oxalato de cálcio.

Os caracteres morfoanatômicos encontrados auxiliam na identificação da espécie e fornecem subsídios para o controle da qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos.

O óleo essencial extraído das folhas de *E. involucrata* apresentou rendimento de 0,15%. A análise da composição química identificou 88,34% dos compostos, sendo que os compostos majoritários foram germacreno B (22,17%), bicilogermacreno (19,76%) e β -elemeno (10,86%).

O OE foi citotóxico para todas as linhagens tumorais B16F10, MCF-7. Avaliando o índice de seletividade é possível observar um forte potencial citotóxico para a linhagem de MCF7.

O OE apresentou bom potencial antioxidante pelo ensaio de DPPH.

Na análise da atividade inseticida, ensaio tópico, foi observada uma mortalidade de 13,3% em ft. Dix estirpe, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada na linhagem de Bayonne. Não foi observada toxicidade para os insetos testados nos ensaios fumigante e residual.

REFERENCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

ADENIYI, A. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants from Ghana; confirmation of ethnobotanical uses, and review of biological, and toxicological studies on medicinal plants used in Apra Hills Sacred Grove. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 76–87, 2018.

ALVAREZ, A. S.; SILVA, R. J. F. Anatomia foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) oriundas da restinga de Algodal / Maiandeuá-Pará. **INSULA Revista de Botânica**, v. 41, p. 83–94, 2012.

ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 22, p. 241–248, 2008.

ANDRADE, E. A. et al. Anatomy and histochemistry of leaves and stems of *Sapium glandulosum*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 27, p. 282–289, 2017.

ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 475–481, 2012.

ARONSON, J. K. Myrtaceae. In: **Meyler's Side Effects of Drugs**. Sixteenth ed.: Elsevier, 2016. p. 1159–1160.

ASIF, M. et al. Establishment of in vitro and in vivo anti-colon cancer efficacy of essential oils containing oleo-gum resin extract of *Mesua ferrea*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1620–1629, 2019.

AURICCHIO, M. T. et al. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARZOTTO, I. L. M. et al. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 55–63, 2019.

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

BHAVYA, M. L.; CHANDU, A. G. S.; DEVI, S. S. *Ocimum tenuiflorum* oil, a potential insecticide against rice weevil with anti-acetylcholinesterase activity. **Industrial Crops & Products**, v. 126, p. 434–439, 2018.

BUDEL, J. M. et al. Essential oils of five *Baccharis* species : investigations on the chemical composition and biological activities. **Molecules**, v. 23, p. 2–5, 2018.

CAMPBELL, B.; MILLER, D. Insecticide Resistance in Eggs and First Instars of the Bed Bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). **Insects**, v. 6, p. 122–132, 2015.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. **Rev Bras Bot**, v. 27, p. 47–54, 2004.

CARDOSO, C. M. V; PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Foliar anatomy of the subfamily Myrtoideae (Myrtaceae). **Aust J Bot**, v. 57, n. 148–161, 2009.

CARNEIRO, N. S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907–1915, 2017.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 23881–23904, 2015.

CHAIEB, K. et al. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v. 50, p. 403–406, 2007.

CHEN, W. et al. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, p. 799–808, 2011.

CIARLINI, J. J. S.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. Selectivity of supercritical CO₂ extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 29–34, 2017.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

CUNHA, F. A. B. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

DAHAM, S. S. et al. In vitro antimetastatic activity of Agarwood (*Aquilaria crassna*) essential oils against pancreatic cancer cells. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 2, p.

141–150, 2015.

DEFAVERI, A. C. A.; ARRUDA, R. C. O.; SATO, A. Leaf anatomy and morphology of *Eugenia rotundifolia* applied to the authentication of the “ abajurú ” commercially sold. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 373–381, 2011.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, R. C.; COSTA, R. R. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)**. 1. ed. Pelotas.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 426–443, 2007.

EBADOLLAHI, A. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 3, p. 148–175, 2013.

EUGENIA IN FLORA DO BRASIL. *Eugenia*. 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=171&genero=Eugenia&especie=&autor=&n>>.

FALCÓ, I. et al. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 220–228, 2019.

FANG, Y. et al. β -elemene attenuates macrophage activation and proinflammatory factor production via crosstalk with Wnt/ β -catenin signaling pathway Yangyi. **Fitoterapia**, v. 124, p. 92–102, 2017.

FARAG, N. F. et al. Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial Crops & Products**, v. 124, p. 870–877, 2018.

FARIA-JÚNIOR, J. E. Q. **O GÊNERO *EUGENIA* L. (MYRTACEAE) NOS ESTADOS DE GOIÁS E TOCANTINS, BRASIL TOCANTINS, BRASIL**. 2010. Universidade de Brasília, 2010.

FIGUEIREDO, P. L. B. et al. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, n. 25, p. 30–38, 2019.

FONTENELLE, G. B.; COSTA, C. G.; MACHADO, R. D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 116, n. 2, p. 111–133, 1994.

FOSTER, A. S. **Practical Plant Anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. v. 1

GABE, M. **Techniques Histologiques**. Paris: Massie e Cie, 1968.

GASCA, C. A. et al. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1–33, 2017.

GONZALEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 413–418, 2014.

GU, J. et al. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 121–127, 2001.

HAO, D-C. Genomics and Evolution of Medicinal Plants. In: HAO, D-C (Ed.). **Ranunculales Medicinal Plants Biodiversity, Chemodiversity and Pharmacotherapy**.: Elsevier, 2019. p. 1–33.

HARON, N. W.; MOORE, D. M. The taxonomic significance of leaf micromorphology in the genus *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 120, p. 265–277, 1996.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940.

KAMTE, S. L. N. et al. Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 154–165, 2018.

KHAYYAT, S. A.; ROSELIN, L. S. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 855–875, 2019.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LEMOS, V. O. T. et al. Ecological anatomy of *Eugenia luschnathiana* (O. Berg) Klotzsch ex B. D. Jacks. (Myrtaceae) leaves in the Restinga region, state of Ceara. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 5, p. 1–14, 2018.

LI, W. et al. GC – MS method for determination and pharmacokinetic study of seven volatile constituents in rat plasma after oral administration of the essential oil of *Rhizoma Curcumae*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 577–585, 2018.

LIMA, A. B. et al. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 642–649, 2017.

LIMA, D. F.; CADDAAH, M. K.; GOLDENBERG, R. A família Myrtaceae na Ilha do Mel,

Paranaguá, Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 497–519, 2015.

LIU, M. et al. β -Elemene attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via restoring NO levels and alleviating oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1789–1798, 2017.

LUCENA, E. M. P. et al. Biodiversidade das Myrtaceae Brasileiras Adaptadas à Flórida, EUA. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 07, n. 02, p. 327–340, 2014.

MACHADO, C. D. et al. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–10, 2018.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376–382, 2010.

MARIN, R. et al. Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172–177, 2008.

MATOS, S. P.; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S. Essential oils in nanostructured systems: challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, v. 195, p. 204–214, 2019.

MEER, F. J. V. D. et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**, v. 25, p. 259–267, 2010.

MENDES, J. F. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, p. 659–664, 2018.

MENDONÇA, V. et al. Crescimento inicial de mudas de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC) em substratos enriquecidos com superfosfatos simples. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 81–86, 2009.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica-RJ.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**.: Clarendon Press. Oxford, 1950.

MONTES, C.; CUADRILLERO, C.; VILELLA, D. Maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) using an artificial feeding technique. **J. Med. Entomol.**, v. 39, p. 675–679, 2009.

MYRTACEAE IN FLORA DO BRASIL. **Myrtaceae**. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2008.

NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. et al. Influence of growing location and variety on the essential oil content of *Melissa officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. **Natural Volatiles & Essential Oils**, v. 2, n. 4, p. 1–3, 2015.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345–360, 2018.

NESCI, A. et al. Insecticidal activity of synthetic antioxidants, natural phytochemicals, and essential oils against an *Aspergillus* section Flavi vector (*Oryzaephilus surinamensis* L.) in microcosm. **J Pest Sci**, v. 84, p. 107–115, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products of Therapeutic Importance. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 2, p. 623–646, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.. Medicinal Plants and Phytomedicines. In: CECHINEL-FILHO, V. (Ed.). **Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential Research & Development, Challenges and Perspectives**.: Springer, 2018. p. 1–33.

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, 1965.

OLIVEIRA, P. F. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 183–188, 2015.

OMONIJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 126–136, 2018.

PAROUL, N. et al. Avaliação da composição química do óleo volátil de Cerejeira (*Eugenia involucrata* DC). **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, p. 2004, 2004.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, A.; VERMA, R. S. Essential oils: from prevention to treatment of skin cancer. **Drug Discovery Today**, p. 1–42, 2018.

QIN, Y. et al. Anti-tumor effect of B-elemene in murine hepatocellular carcinoma cell line H22 depends on the level of c-Met downregulation. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 91–98, 2012.

RAMOS, M. F. S. et al. Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos óleos Essenciais de

Cinco Espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v. 2, n. 2, 2006.

REYES, E. I. M. et al. *Eucalyptus resinifera* essential oils have fumigant and repellent action against *Hypothenemus hampei*. **Crop Protection**, v. 116, p. 49–55, 2019.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33–36, 1962.

ROMERO, A.; POTTER, M. F.; HAYNES, K. F. Behavioral responses of the bed bug to insecticide residues. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 51–57, 2009.

ROSA, R. L. **Avaliação do potencial gastroprotetor e antiúlcera das sementes da *Eugenia involucrata* DC. (cereja do mato) e *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jaca) em roedores.** 2013. Universidade do Vale do Itajaí, 2013.

SÁ, R. D.; SANTANA, A. S. C. O.; RANDAU, K. P. Caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *Eugenia uniflora* L. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 01, n. 1, p. 96–105, 2016.

SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018. a.

SANTOS, V. L. P. et al. Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 28, p. 9–15, 2018. b.

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

SCHWIRKOWSKI, P. *Eugenia involucrata*. 2019. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/florasbs/myrtaceae/cerejeira-do-mato>>.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, 2019.

SILVA, A. T.; MAZINE, F. F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 203–223, 2016.

SILVA, M. C. M. et al. Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia involucrata* do Rio Grande do Sul. **CIÊNCIA E NATURA**, v. 13, n. 13, p. 61–66, 1991.

SILVA, V. P. et al. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops & Products**, v. 123, p. 638–645, 2018.

SILVA, E. L. et al. Dual high-resolution inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR

analysis for identification of α -glucosidase and radical scavenging inhibitors in *Solanum americanum* Mill. **Fitoterapia**, v. 118, n. 2016, p. 42–48, 2017.

SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita *Eugenia dysenterica* DC, no sudeste de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 330–334, 2001.

SIMÕES, R. R. et al. *Eugenia brasiliensis* leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 178–186, 2018.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71–78, 2015.

SOUZA, C. E. S. et al. LC-MS characterization, anti-kinetoplastide and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 9, p. 836–841, 2017.

TANG, C-y. et al. Effect of β -elemene on the kinetics of intracellular transport of d-luciferin potassium salt (ABC substrate) in doxorubicin-resistant breast cancer cells and the associated molecular mechanism. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 120, p. 20–29, 2018.

THE PLANT LIST. **Myrtaceae**. 2019. Disponível em:
<<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>>.

THORNHILL, A. H. et al. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 93, p. 29–43, 2015.

TOLEDO, A. G. **Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* DC**. 2018. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018.

TU, X-F et al. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. **Industrial Crops & Products**, v. 124, p. 192–200, 2018.

USP XXXVI. **UNITED STATES PHARMACOPEIA**.: Rockville, 2014.

VECHI, G. **Potencial biológico e composição química das folhas de *Eugenia involucrata* DC. (cerejinha do mato)**. 2015. UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI, 2015.

VECHI, G. et al. Analyses of chemical composition and gastroprotective and antinociceptive properties of *Eugenia involucrata* DC. leaves. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 04, p. 79–83, 2018.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.

VIEIRA-BROCK, P. L.; VAUGHAN, B. M.; VOLLMER, D. L. Comparison of antimicrobial activities of natural essential oils and synthetic fragrances against selected environmental pathogens. **Biochimie Open**, v. 5, p. 8–13, 2017.

WANG, H. et al. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. **Industrial Crops & Products**, v. 120, p. 180–186, 2018.

WANG, H-F. et al. Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 881–889, 2017.

WEINER, S.; DOVE, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1–29, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biodiversity**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/en/>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

YAMAGUCHI, T. et al. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. **Biosci Biotech Biochem**, v. 62, p. 1201–1204, 1998.

YEOM, H-J et al. Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 200–206, 2013.

YU, X. et al. β -elemene inhibits tumor-promoting effect of M2 macrophages in lung cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 24, n. 15, p. 3407–3411, 2017.