



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAYZA HELEN GRACIANO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE
Calypttranthes dardanoi MATTOS (MYRTACEAE) OCORRENTE NA FLORESTA
ATLÂNTICA E CAATINGA**

RECIFE
2020

RAYZA HELEN GRACIANO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE
Calyptranthes dardanoi MATTOS (MYRTACEAE) OCORRENTE NA FLORESTA
ATLÂNTICA E CAATINGA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Moraes de Oliveira

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Santos, Rayza Helen Graciano dos

Composição e atividade biológica do óleo essencial foliar de *Calyptanthus dardanoi* Mattos (Myrtaceae) ocorrente na Floresta Atlântica e Caatinga / Rayza Helen Graciano dos Santos – 2020.

94 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Antonio Fernando Morais de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Plantas medicinais 2. Antioxidante 3. Toxicidade Aguda I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Oliveira, Antonio Fernando Morais de (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 175

RAYZA HELEN GRACIANO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE
Calypttranthes dardanoi MATTOS (MYRTACEAE) OCORRENTE NA FLORESTA
ATLÂNTICA E CAATINGA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antonio Fernando Moraes de Oliveira (Co-orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Ana Paula Sant'anna da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Márcia Vanusa da Silva (Suplente Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Raquel Barbosa da Silva (Suplente Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICO E OFEREÇO

Àqueles que considero pedaços de mim....

*Minha mãe, minha vida toda não é capaz de retribuir tamanha dedicação,
preocupação e apoio incondicional em tudo na minha vida!*

*Meu irmão Ryzinho e minha tia Tânia (in memoriam), pelo carinho, cuidado
e exemplo de vida onde a alegria está nas pequenas coisas.*

*Sem vocês, o sol não seria tão radiante, o dia não teria tantas cores, o mundo
não teria graça (quanta falta Titia) e a vida não seria tão feliz!*

AGRADECIMENTOS

Com muito reconhecimento eu agradeço:

À Deus por mais uma conquista em minha vida, por me guiar e me conceder a sabedoria e serenidade necessária para enfrentar os desafios diários e ter a certeza, através da fé, de que no fim daria tudo certo.

A minha mãe por ter enfrentado tanto para me trazer ao mundo e me deu o que há de melhor: amor, carinho, educação. Pelo incentivo de sempre a realizar meus sonhos. Agradeço pelo apoio e paciência em entender minhas angústias e acalotá-las sempre. Mãe, eu nunca poderei retribuir tudo que a senhora fez e representa na minha vida! Ainda que com muito sacrifício, nunca nada me faltou! Sempre batalhadora, a senhora me inspira e me mostram dia-a-dia o quão infinito pode ser o amor... E lembre-se sempre, tudo isso é para você!

A minha tia Luzitânia (*in memoriam*) que cuidou de mim e esteve presente em um dos momentos mais felizes da minha vida que foi a aprovação no vestibular. A senhora realmente era muito para esse mundo, por isto, Deus a recrutou para mais perto Dele! Sei que estais bem melhor que nós! A saudade dilacera e às vezes corta a alma, mas sei que hoje eu tenho um anjo para chamar de meu!

Ao meu Ryzinho, que mesmo com pouca idade nos surpreende sempre por adivinhar quando mais precisamos de um carinho e de atenção! Deus mandou você para mim, porque era muito chato ser filha única e eu precisaria de você e do seu carinho em muitos momentos.

Ao meu noivo e amigo de todas as horas, por todo apoio, incentivo, cumplicidade, cuidado e paciência ao longo desse tempo! Por abrir mão de tantos momentos de descanso para me fazer companhia, por me buscar sempre que eu precisei sair mais tarde, por isso e tantas outras coisas que você abriu mão. Sou muito grata a Deus pela sua vida! Você torna a caminhada mais leve.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Tereza, por ter me acolhido sem ao menos antes me conhecer, acreditado em mim e ter facilitado tanto essa caminhada tão intensa que é o mestrado! Professora, a senhora nunca mediu esforços para me ajudar em todos os momentos que eu precisei no desenvolvimento do trabalho. E eu

lhe devo muito por isto! Minha gratidão por ter tido essa oportunidade de lhe conhecer e trabalhar com a senhora.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio Fernando, pela parceria, amizade, companheirismo e muitas risadas sempre! Professor, como um dia a gente estava conversando... “Quem diria que tu ía encontrar comigo numa universidade e eu ia te orientar, chupeta! ”... Realmente, quem diria! Mas Deus certamente sabia que eu precisaria de você para me orientar profissionalmente e pessoalmente. Sou muito grata por tudo que o senhor já fez e faz por mim! Quem convive com você sabe que pode encontrar em você um amigo!

A todos Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (LEAF) pelos momentos que passamos e por toda ajuda. Em especial, a minha parceria de todas as horas, Maíra Honorato! Realmente, eu descobri uma amiga durante essa etapa gostosa e intensa que é o mestrado! Muito obrigada por tantos conselhos, risadas, apoio, cuidado e pela parceria em congressos, viagens, coletas e tantas outras coisas. Eu sei o tanto que eu posso contar com você e saiba que é recíproco!

Aos Laboratório de Biologia Molecular e Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica) pela disponibilidade e colaboração em todas as análises realizadas. Em especial, a Elys Carvalho, por tanta parceria, cumplicidade e ajuda! Você me ajudou em vários momentos, fosse nos experimentos, fosse nos desabafos e desafios da vida. Ganhei você de presente do mestrado e espero levar comigo pra vida!

Luciclaudio, obrigada por toda ajuda na execução dos experimentos e parceria ao longo do mestrado! Pode contar comigo.

A Prof.^a Dr.^a Ivone e a Marcela, obrigada por toda ajuda e apoio! Vocês abriram as portas do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) para execução do experimento.

A João Ricardhis e o laboratório de Lipídios (Departamento de Bioquímica) pela ajuda na execução experimental da anti-inflamatória. Muito obrigada pela disponibilidade e prontidão!

Agradeço imensamente a Isabel Lima, por toda ajuda no processamento histológico e acompanhamento no teste de toxicidade aguda. Deus realmente envia anjos para nos ajudar nas horas que mais precisamos! Muito obrigada por tanto.

As minhas amigas da graduação para vida, Maria Luiza e Amanda. Vocês tornaram a jornada mais leve, nossos encontros embora que poucos, foram muito

felizes e de muitas comilanças! Sou muito grata a vocês, por todos os momentos de desabafos e de muita risada garantida. Temos muitas histórias para contar!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (UFPE) pelo ingresso e aos amigos que fiz no longo da caminhada do mestrado. Nossos grupos de seminários (Muitos!), as aulas e tantas conversas com trocas de experiências eram ótimas com vocês!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Aos amigos que fiz durante a caminhada no mestrado, em especial a Tuarne

A todos que se fizeram presentes, direta ou indiretamente, vocês são parte deste projeto, em vários capítulos desta história!

Por fim, e não menos importante, agradeço a mim mesma, que caí, levantei, aprendi, ri, chorei. E me desesperei algumas vezes! Pela minha capacidade de superação que eu nem imaginava que existia!

“A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas à inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota o pódio para vitória; das críticas, o palco, de onde recebem os aplausos. Se pensar é o destino do ser humano, continuar sonhando é o seu grande desafio. E isto, é lógico, implica em trajetórias com riscos, em vitórias, com muitas lutas, e não poucos obstáculos pelo caminho. Apesar de tudo, seja ousado. Liberte sua criatividade. E nunca desista dos seus sonhos, pois eles transformarão sua vida em uma grande aventura”. (Augusto Cury)

RESUMO

Inúmeros estudos vêm demonstrando a potencialidade e a eficácia das plantas medicinais no combate a diversas doenças, entretanto existem sérios problemas em relação ao uso indiscriminado de produtos de origem vegetal. Considerando o potencial biotecnológico dos óleos vegetais, neste estudo foi avaliado o potencial bioativo do óleo essencial de *Calypttranthes dardanoi* (Myrtaceae) quanto à toxicidade, potencial antioxidante e anti-inflamatório. O óleo essencial (OE) das folhas de *C. dardanoi* oriundos da Unisa São José – Igarassu/ PE - Floresta Atlântica (FA) e Parque Nacional Vale do Catimbau – Buíque/PE - Caatinga (CA) foi obtido por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. O potencial antioxidante foi avaliado pelo método Método de Fosfomolibdênio ou Atividade Antioxidante Total (AAT%). O potencial anti-inflamatório foi avaliado a partir de modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos, edema de pata induzido por carragenina e peritonite aguda induzida por carragenina. E para a avaliação da segurança do uso, foi utilizado o ensaio de toxicidade aguda e atividade hemolítica. Os resultados demonstram que o rendimento percentual médio do óleo essencial foliar da espécie apresentou diferença significativa quanto ao local de coleta (0,23% Floresta Atlântica e 0,33% Caatinga, respectivamente). Os componentes majoritários do óleo essencial extraído das folhas coletadas na Floresta Atlântica foram: (E) -Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%) e α -Humuleno (9,09%). Enquanto que o óleo obtido da espécie coletada na Caatinga apresentou como componentes majoritários: (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%) e α -Humuleno (9,86%). O óleo essencial demonstra ser uma fonte promissora de compostos com potencial antioxidante, apresentando capacidade antioxidante total maior que o ácido ascórbico (100%). Os óleos essenciais de FA e CA não apresentaram toxicidade aguda (2000 mg/Kg) e nem citotoxicidade a nível de membranas dos eritrócitos, além disso, não foram observadas alterações nas análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. No teste de edema de pata, foi observada uma diminuição significativa (67,42% FA e 69,06% CA, respectivamente) na maior concentração testada (200 mg/Kg) em relação ao grupo tratado com veículo. No modelo de peritonite aguda foi observado que o óleo essencial apresentou uma redução na expressão do TNF- α de 48,44% FA e 45,59% CA na concentração de 200

mg/Kg e a droga controle indometacina reduziu 66,35% a expressão do TNF- α induzida por carragenina para a cavidade peritoneal. Os resultados sugeriram o OE de *C. dardanoi* como uma fonte promissora de constituinte antioxidante, anti-inflamatório e não tóxico. Diante disso, a fração da planta pode ser de interesse na pesquisa de novas de moléculas que apresentam o estresse oxidativo e processo inflamatório como fenomenologia básica podendo ser aplicado na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Anti-inflamatória. Antioxidante. Cariófileno. Toxicidade Aguda.

ABSTRACT

Numerous studies have demonstrated the potential and effectiveness of medicinal plants in combating various diseases, however there are serious problems in relation to the indiscriminate use of products of plant origin. Considering the biotechnological potential of vegetable oils, in this study the bioactive potential of the essential oil of *Calyptanthes dardanoi* (Myrtaceae) was evaluated in terms of toxicity, antioxidant and anti-inflammatory potential. The essential oil (OE) of *C. dardanoi* leaves from Unisa São José - Igarassu/PE - Atlantic Forest (FA) and Vale do Catimbau National Park - Buíque/PE - Caatinga (CA) was obtained by hydrodistillation and analyzed by chromatography gas coupled to mass spectrometry. The antioxidant potential was evaluated using the Phosphomolybdenum Method or Total Antioxidant Activity (AAT%). The anti-inflammatory potential was evaluated using experimental models of acute inflammation in mice, carrageenan-induced paw edema and carrageenan-induced acute peritonitis. And to assess the safety of use, the acute toxicity and hemolytic activity test was used. The results show that the average percentage yield of the essential oil of the species showed a significant difference in relation to the place of collection (0.23% Atlantic Forest and 0.33% Caatinga, respectively). The major components of essential oil extracted from leaves collected in the Atlantic Forest were: (E) -Karyophyllene (47.80%), Germacrene-D (10.07%) and α -Humulene (9.09%). While the oil obtained from the species collected in the Caatinga showed as major components: (E) -Karyophyllene (15.59%), cis-calamenene (11.40%), Germacrene-D (10.22%) and α -Humulene (9.86%). The essential oil proves to be a promising source of compounds with antioxidant potential, presenting a total antioxidant capacity greater than ascorbic acid (100%). The essential oils of FA and CA did not present acute toxicity (2000 mg / Kg) nor cytotoxicity at the level of erythrocyte membranes, in addition, no changes were observed in biochemical, hematological and histopathological analyzes. In the paw edema test, a significant decrease (67.42% FA and 69.06% CA, respectively) was observed in the highest concentration tested (200 mg / Kg) in relation to the vehicle treated group. In the acute peritonitis model, it was observed that the essential oil showed a reduction in TNF- α expression of 48.44% FA and 45.59% CA at a concentration of 200 mg / kg and the control drug indomethacin reduced 66.35% a carrageenan-induced TNF- α expression into the peritoneal cavity.

The results suggested the *C. dardanoi* OE as a promising source of antioxidant, anti-inflammatory and non-toxic constituent. Therefore, the fraction of the plant may be of interest in the search for new molecules that present oxidative stress and inflammatory process as basic phenomenology and can be applied in the pharmaceutical industry.

Keywords: Anti-inflammatory. Antioxidant. Caryophyllene. Acute Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa dos Biomas do Brasil	20
Figura 2 –	Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque – PE.....	22
Figura 3 –	Usina São José, Igarassu – PE.....	24
Figura 4 –	Representante de <i>Calypttranthes dardanoi</i>	27
Figura 5 –	Esquema das principais vias de biossíntese de metabólitos primários e secundários.....	30
Figura 6 –	Biossíntese de compostos terpênicos.....	33
Figura 7 –	Estrutura dos compostos que apresentam atividade antioxidante.....	36
Figura 8 –	Procedimento experimental de dosagens iniciais para testes de toxicidade aguda com produtos químicos (OECD, 423)	40
Figura 9 –	Rendimento percentual do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> (FA e CA)	55
Figura 10 –	Atividade Antioxidante Total do óleo essencial de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) em relação ao ácido ascórbico	59
Figura 11 –	Resposta anti-inflamatória do tratamento com o óleo essencial de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) avaliado pelo método de Edema de Pata induzido por Carragenina	60
Figura 12 –	Concentração peritoneal de TNF- α em camundongos tratados com o óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA)	62
Figura 13 –	Efeito do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre a massa absoluta (g) do Fígado, Rim, Baço e Pulmão de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos.....	67

Figura 14 –	Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço e pulmão de camundongos <i>Mus musculus</i> do grupo controle e dos grupos tratados com o óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) na dose de 2000 mg/Kg.....	69
Figura 15 –	Avaliação da atividade hemolítica do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição química do óleo essencial de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrente na Floresta Atlântica (FA) e na Caatinga (CA).....	57
Tabela 2 –	Efeito do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg), por via oral sobre o peso corporal de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas, consumo de água e consumo de ração.....	63
Tabela 3 –	Efeito do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos.....	65
Tabela 4 –	Efeito do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	ÁREAS DE ESTUDO	20
2.1.1	Caatinga	20
2.1.2	Floresta Atlântica	23
2.2	A FAMÍLIA MYRTACEAE E O SEU POTENCIAL BIOATIVO	24
2.3	O GÊNERO CALYPTRANTHES	26
2.3.1	<i>Calypttranthes dardanoi</i> Mattos.....	27
2.4	METABOLISMO SECUNDÁRIO	28
2.4.1	Terpenos	30
2.5	ÓLEOS ESSENCIAIS	31
2.5.1	Característica, Composição e Biossíntese	31
2.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	33
2.6.1	Atividade Antioxidante	34
2.6.2	Potencial Anti-inflamatório	36
2.6.3	Estudos Toxicológicos	38
2.6.3.1	Toxicidade Aguda	39
3	OBJETIVO	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	ÁREAS DE ESTUDO	41
4.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	42
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
4.4.1	Método de Fosfomolibdênio ou Atividade Antioxidante Total (AAT%)	43
4.5	ANIMAIS	43
4.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	44

4.6.1	Edema de Pata Induzido por Carragenina	44
4.6.2	Peritonite Induzida por Carragenina	44
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	45
4.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS	47
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE <i>Calypttranthes dardanoi</i> MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES.....	47
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – Cromatograma caracterização química do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrente na Floresta Atlântica (FA)	92
	APÊNDICE B – Cromatograma da caracterização química do óleo essencial foliar de <i>Calypttranthes dardanoi</i> ocorrente na Caatinga (CA)	93
	ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética Animal (CEUA – UFPE)	94

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são compostos naturais, voláteis e complexos formados a partir do metabolismo secundário de plantas que são amplamente usados na medicina popular, em alimentos, em perfumaria e na obtenção de medicamentos. Os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas que têm sido atribuídas à presença de uma mistura de componentes característicos em que os tipos mais abundantes de compostos químicos são terpenoides especificamente monoterpenos e sesquiterpenos (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008). Eles constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000).

A composição química e o teor de óleo essencial podem sofrer alterações durante as estações do ano. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH et al., 1987; HARTMANN, 1996). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Dentre os biomas brasileiros, a Floresta Atlântica é um importante ecossistema brasileiro que apresenta elevada biodiversidade sendo considerada um dos maiores repositórios de biodiversidade do planeta e um dos cinco mais importantes “hotspots” mundiais devido às variações de relevo, solo, latitudinal e regimes pluviométricos, o que resulta em diferentes unidades fitogeográficas (RAMBALDI et al., 2003; PINTO et al., 2006). Acredita-se que a região abrigue de 1 a 8% da biodiversidade mundial, com 20.000 espécies de plantas, sendo 40% endêmicas (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2004). Uma das atividades que tem se intensificado na Floresta Atlântica é a extração ou exploração de plantas medicinais, onde, essa atividade é incentivada por um mercado promissor (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

Diferentemente da Floresta Atlântica, o domínio fitogeográfico da Caatinga é provavelmente o menos conhecido e o mais desvalorizado, dada a reduzida exploração sustentável dos recursos naturais e a elevada proporção de terras desmatadas para pecuária (GIULIETTI et al., 2010). Uma das alternativas para uma exploração sustentável desse bioma é o uso racional de seus bioprodutos. Uma opção promissora é o uso da flora para fins farmacológicos em diversas patologias, visto que vem crescendo nos últimos 30 anos a aprovação de novas drogas para consumo humano, com destaque para os produtos naturais e suas estruturas químicas (NEWMAN E CRAGG, 2012).

As espécies vegetais dos referidos biomas, Zona da Mata e Caatinga, apresentam potencial para a indústria de cosméticos e de preservação de alimentos, por meio da extração de óleos essenciais, que neste tipo de vegetação constituem fontes potenciais de antioxidantes naturais (HYLDGAARD et al., 2012). Além disso, estudos diversos apontam que essas substâncias possuem efeito antifúngico (MACHADO et al., 2013), anti-inflamatórios, antinociceptivo e antiespasmódico (DANIEL et al., 2009; ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; PINHO et al., 2012), antitumoral (WANG et al., 2012; QUASSINTI et al., 2013) e inseticida (LIMA et al., 2014), dentre outras atividades cientificamente comprovadas.

Neste contexto, a escolha da planta *Calypttranthes dardanoi* Mattos pertencente à família Myrtaceae, teve como base sua aplicação etnofarmacológica e vem ao encontro das necessidades científicas, uma vez que seus potenciais farmacológicos e componentes bioativos não são conhecidos. Não foram encontrados relatos referentes à composição química do óleo essencial da espécie até o presente, havendo apenas registros da presença de propriedades farmacológicas associadas a outras espécies desta mesma família e alguns relatos do potencial bioativo do gênero (BANSAL et al., 2006; DELVING, 2015; DEXHEIMER, 2017; KICH et al., 2016).

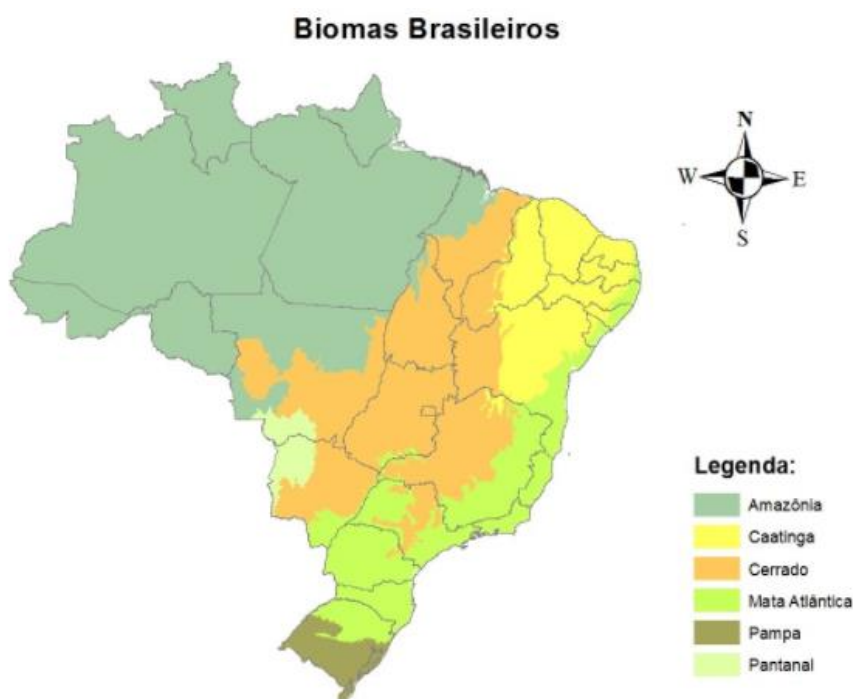
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÁREAS DE ESTUDO

2.1.1 Caatinga

A Caatinga é um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro, ocupando uma área de 844.453 Km², sendo o principal ecossistema da região nordeste (MMA, 2012). Estende-se pelos estados do Ceará (100%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Pernambuco (83%), Piauí (63%), Bahia (54%), Sergipe (49%), Alagoas (48%), até uma pequena porção no Maranhão (1%) e Minas Gerais (2%) (ALMEIDA et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1 – Mapa dos biomas do Brasil.



Fonte: IBGE - SFB (Serviço Florestal Brasileiro), 2016 (adaptado).

Seu clima é caracterizado como semiárido (Köppen BSh) e, em comparação com as outras formações brasileiras, possui características extremas diante os parâmetros meteorológicos como: a mais alta radiação solar, baixa nebulosidade, a mais alta temperatura média anual, as mais baixas taxas de umidade relativa do ar,

evapotranspiração potencial mais elevada e precipitações baixas e irregulares durante um período muito curto no ano (PRADO, 2003; ARAÚJO et al., 2007).

A Caatinga tem como característica o potencial hídrico reduzido no solo com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses, sua flora nativa apresenta então caracteres anatômicos, morfológicos e funcionais especializados para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (DRUMOND et al. 2000). Algumas dessas adaptações são: plantas caducifólias, estrato herbáceo anual, suculência, acúleos e espinhos, predominância de arbustos e árvores de pequeno porte, cobertura descontínua de copas. Além disso, há espécies endêmicas que só ocorrem em áreas semiáridas e não nas áreas arredores mais úmidas (GIULIETTI et al., 2004). Dessa forma, as plantas possuem características singulares, sendo assim excelentes alvos para a busca de novas substâncias ativas.

Diante da velocidade do fenômeno de devastação da Caatinga, unidades de conservação têm sido criadas. Atualmente, ela conta com 208 unidades de conservação (UC) que somam 77.537 km², aproximadamente 8,5% total UCs (Cadastro Nacional de Unidades de Conservação - CNUC/MMA, 2020). Dentre essas unidades temos o Parque Nacional da Serra do Catimbau (PARNA Catimbau), localizado no Sertão Pernambucano, distribuída entre os municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, com área de 607 km². Criado em 13 de dezembro de 2002, o PARNA Catimbau está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (MMA, 2012) (Figura 2).

Figura 2 – Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque – PE.



Fonte: A autora.

Este domínio tem uma vegetação bastante diversificada, sendo representada por aproximadamente 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies e dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas distribuídas em 42 famílias (PRADO, 2003; GIULIETTI et al., 2004; FORZZA et al., 2013). Entre as diversas espécies encontradas na Caatinga, várias plantas são consideradas como medicamentosas de uso popular, pois diversos tecidos como folhas, cascas e raízes são comercializados em calçadas e ruas das principais cidades, bem como em mercados e feiras livres (MOSCA, 2009).

A Caatinga apresenta diversas espécies cuja presença de óleos essenciais tem sido relatada e investigada perante diversas ações biológicas ao longo dos anos (ZENGIN et al., 2018; SILVA et al., 2019)

2.1.2 Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica é um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro, ocupando uma área de 1.315.460 km², sendo o principal ecossistema da região nordeste (MMA, 2020). Estende-se pelos estados do A Mata Atlântica se estende ao longo de 17 estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí (MMA, 2020) (Figura 1).

Este domínio fitogeográfico, se estende do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, incluindo partes da Argentina e Paraguai (SILVA; CASTELETTI, 2005), ocorrendo em regiões costeiras e do interior sobre montanhas e platôs. É constituída pelas formações florestais conhecidas como: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; Manguezais; Restingas; Campos de altitude; Brejos de Altitude e Encraves Florestais do Nordeste (MMA, 2020).

O clima de Florestas Pluviais tropicais é definido por temperaturas continuamente altas, umidade abundante, podendo receber até 2000 mm de precipitação ao longo do ano (RICKLEFS, 2003). Segundo o mesmo autor, devido a essas características, essas florestas são detentoras de um acelerado processo de reciclagem de nutrientes, o que garante a alta produtividade desses ecossistemas.

A Floresta Atlântica é um dos centros de diversidade da família Myrtaceae, a qual é a sexta mais representativa (STEHMANN et al., 2009) com 636 espécies, sendo 77,5% endêmicas (SOBRAL et al., 2009).

Contudo, este domínio vem sofrendo um processo intensivo de destruição pelo corte ilegal, cultivo e ocupação humana, onde cerca de 1,45 milhões de km² foram desmatados entre 2018 e 2019 (SOS MATA ATLÂNTICA, 2020). Isso torna a Mata Atlântica uma das regiões mais devastadas e seriamente ameaçadas do planeta (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

Neste contexto, a Usina São José (USJ) contém fragmentos de Floresta Atlântica de Terras Baixas ao norte do estado de Pernambuco (Figura 3). Na USJ, Myrtaceae está entre as famílias com maior diversidade taxonômica, com 23 espécies (ALVES-ARAÚJO et al., 2008). Destas, *Eugenia* é o gênero mais representativo com dez espécies, seguido de *Myrcia* com oito, *Psidium* com duas e *Calypttranthes*,

Campomanesia e *Myrciaria* com uma espécie cada. A família é composta por espécies endêmicas da Floresta Atlântica (próximo de 50%) e espécies que apresentam ampla distribuição na América do Sul (AMORIM; ALVES 2011).

Figura 3 – Usina São José, Igarassu – PE.



Fonte: A autora.

2.2 A FAMÍLIA MYRTACEAE E O SEU POTENCIAL BIOATIVO

Myrtaceae compreende cerca de 130 gêneros e 4000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo seus maiores centros de dispersão a América e a Oceania (JOLY, 1998). Na flora brasileira é uma das maiores famílias, com cerca de 23 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Ela corresponde a 1,32% do total das Angiospermas conhecidas, o que é bastante representativo, considerando-se um total de 400 famílias (JUDD et al., 1999) e apresenta-se distribuída na maioria das formações vegetais do Brasil (SOARES-SILVA, 2000).

São árvores ou arbustos lenhosos que têm folhas inteiras, penínérveas, de disposição alterna (gêneros não nativos) ou oposta, de margens inteiras e coloração sempre verde, com estípulas muito pequenas e pontos translúcidos (cavidades secretoras) (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2005).

O grupo é rico em espécies frutíferas, como jabuticaba (*Myrciaria* spp.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.) goiaba (*Psidium guajava* L.), araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), cereja-nacional (*Eugenia retusa* (O. Berg) Nied.), guabiroba (*Campomanesia* spp.) e uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), entre outras.

Economicamente, Myrtaceae é muito importante; algumas espécies são cultivadas, como o *Eucalipto* spp., do qual a madeira é usada para produzir papel, poste de luz e carvão, além de ser muito utilizada por ser uma planta aromática na fabricação de produtos de limpeza. Outro exemplo é o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), que é utilizado como especiaria, e também o jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), cujo fruto comestível é comum no litoral nordestino (METCALFE; CHALK, 1950; JOLY, 1988; SOUZA; LORENZI, 2005).

Ao longo do tempo, a família Myrtaceae vem sendo amplamente empregada na medicina popular. Algumas já foram estudadas e tiveram sua composição química e propriedades medicinais descritas na literatura, atuando no combate a doenças infecciosas (CRUZ; KAPLAN, 2004; FRANCO et al., 2005; LEITÃO et al., 2014).

Os componentes químicos de maior valor econômico em Myrtaceae são os terpenoides. Do ponto de vista da composição fitoquímica na família encontra-se grande quantidade de taninos, enquanto os alcaloides e glicosídeos, com raras exceções, são poucos conhecidos (FONT QUER, 1988).

Uma característica marcante encontrada no grupo é a presença de canais oleíferos nas folhas, flores e frutos dessa família (BARROSO, 1991; LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Óleos voláteis destilados de diversos membros da família, como por exemplo, o óleo de eucalipto, apresentam uso medicinal amplamente difundido e elevada importância econômica (METCALFE; CHALK, 1950). Quimicamente a família Myrtaceae é bastante diversa, caracterizando-se pela produção de taninos, sesquiterpenos, estilbenos e de flavonoides, apresentando propriedades medicinais, sendo algumas atribuídas ao gênero *Calyptanthus*. (CERQUEIRA, 2002).

Segundo Cruz e Kaplan (2004), as propriedades adstringentes da Myrtaceae geralmente são usadas em afecções gastrointestinais, hemorragia e doenças infecciosas, sendo que as partes mais utilizadas são as folhas, cascas e os frutos. A família apresenta diversos gêneros que apresentam propriedades biológicas diversas já relatadas, incluindo a *Eugenia* spp (antipirético, anti-inflamatório, diurético, hipoglicemiante, antioxidante, antitumorais, antidiarreicos e antimicrobianas), a

Myrciaria spp, como por exemplo a Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), rica em compostos fenólicos e com atividades farmacológicas antioxidantes e antitumorais (ANNADURAI et al., 2012; COLE, et al., 2007; WANG et al., 2014).

2.3 O GÊNERO *Calypttranthes*

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Calypttranthes* com propriedades biológicas citadas na literatura, destaca-se *C. pallens*. Essa espécie, apresenta predominância de terpenoides e mostrou citotoxicidade seletiva contra células tumorais do câncer prostático humano (LNCap) e moderada citotoxicidade contra outras linhagens tumorais de pulmão, mama e mucosa oral, conforme o estudo feito por Echeverri-Lobo et al. (2005).

Estudos com *C. grandifolia* que é muito utilizada tradicionalmente para desordens inflamatórias por uma população local no sul do Brasil. Segundo Kich et al. (2016), a espécie demonstrou ter a capacidade de reduzir o dano oxidativo e a apoptose. Além disso, demonstrou grande efeito inibitório contra as enzimas relacionadas aos neurodegenerativos.

O benzopireno ou cromeno, é um importante componente estrutural presente em compostos naturais e apresenta uma atividade biológica importante (REN et al., 2011). Alguns de seus derivados apresentam atividade antitumoral, antivascular, antimicrobiana, antioxidante, inibidora de *TNF- α* , antifúngica, entre outras. Um exemplo destes compostos como 2-metil-5,7-dimetóxi-2H-cromeno e 2,8-dimetil-5,7-dimetóxi-31 2H-cromeno foram isolados do óleo essencial de *C. tricona* o qual apresentou atividade antifúngica (HENRIETTE et al., 2004; CHETAN et al,2012; MILAN et al., 2011; CHENG et al., 2003; SURESH et al., 2010).

O estudo de novas plantas com potencial anti-inflamatório, antioxidante apresenta grande importância biotecnológica, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças. Apesar de não terem sido encontrados registros na literatura científica especificamente associados à espécie *C. dardanoi* e suas propriedades farmacológicas, outros gêneros da família *Myrtaceae* já foram relatados com diversas aplicações ou potenciais terapêuticos, como descrito no subtítulo acima, indicando um caminho a ser explorado dentro desta família.

2.3.1 *Calyptranthes dardanoi* Mattos

O gênero *Calyptranthes* apresenta mais de 100 espécies diferentes (LIMBERGER et al., 2002). *C. dardanoi* Mattos é uma espécie nativa, porém não é endêmica do Brasil sendo encontrada no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, nos domínios fitogeográficos de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. É definida como arvoretas a arbustos ca. 3–5 m de altura (AMORIM; ALVES, 2011; FLORA DO BRASIL, 2020) (Figura 4).

Figura 4 – Representante de *Calyptranthes dardanoi*



Fonte: A autora.

2.4 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo compreende um complexo de reações químicas que ocorrem no interior das células responsáveis pela sua atividade e reprodução. As plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação direta com crescimento e desenvolvimento da planta, mas nem por isso são menos importantes (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os metabólitos secundários têm importantes funções ecológicas nas plantas, tais como a proteção das plantas contra herbívoros e patógenos, podem favorecer a atração de polinizadores de dispersores de sementes por conferirem aroma, cor, sabor as plantas, e funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, a produção destes componentes pode proteger a planta de fatores externos como variações de temperatura, umidade, exposição à radiação ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (ATSA, 1989).

Tem sido verificado que muitos dos compostos secundários são benéficos à saúde humana principalmente por suas ações farmacológicas amplamente evidenciada na literatura (PICOLI et al., 2010). São conhecidos por serem sintetizados em células especializadas e em diferentes estágios de desenvolvimento, por isso cada família, gênero ou espécie de planta produz uma categoria química característica ou uma mistura deles, podendo em alguns casos serem utilizados para classificação taxonômica dos vegetais (BELL et al., 1980).

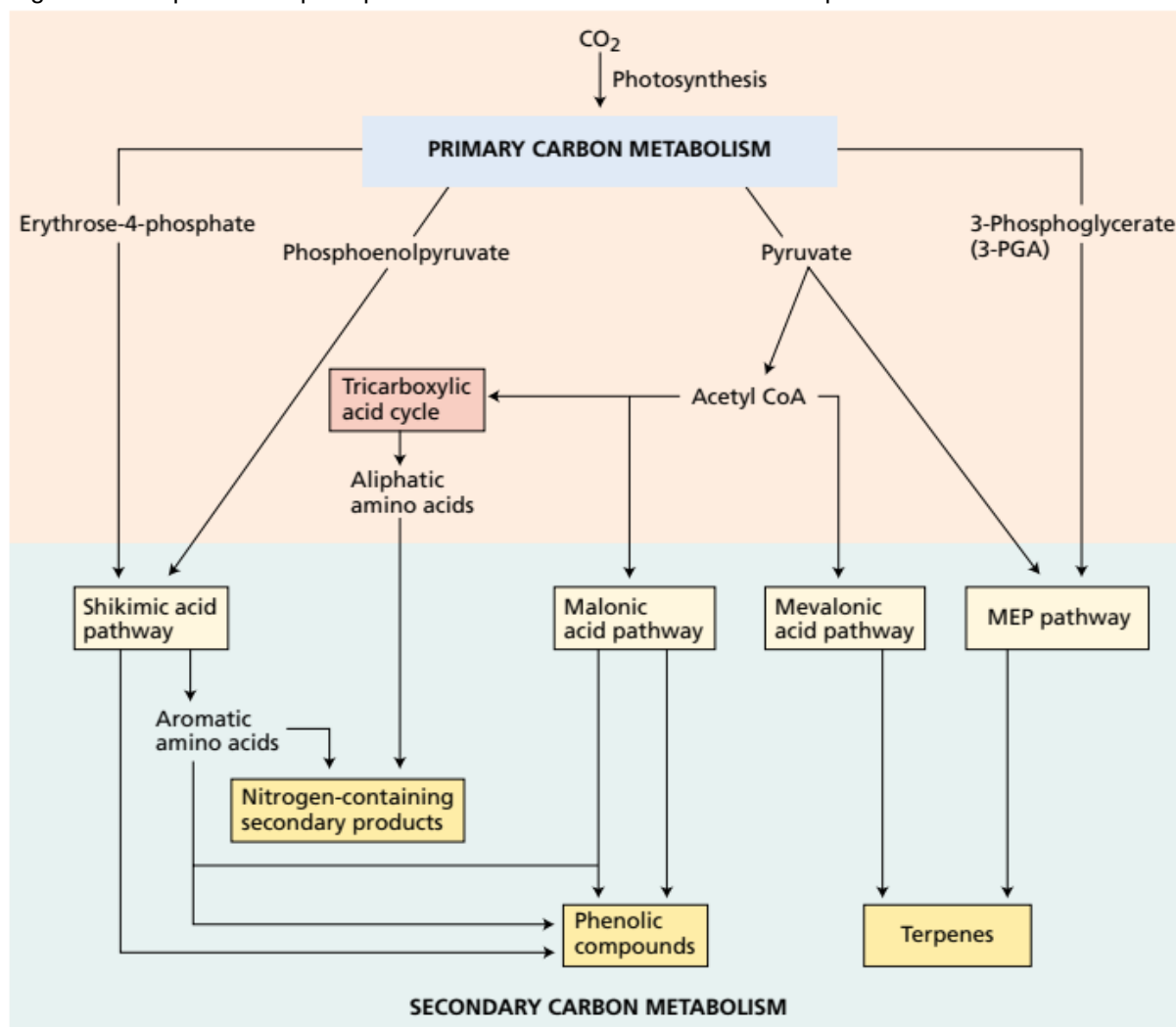
Uma das estratégias de sobrevivência de plantas em ambientes adversos é o aumento na síntese de produtos do metabolismo secundários. A literatura tem comprovado que esses compostos estão envolvidos nos efeitos biológicos das plantas medicinais.

Os produtos resultantes deste metabolismo são comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para determinado táxon. A química de produtos naturais (QPN) de vegetais – fitoquímica, como é concebida atualmente, se dedica

principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintética de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (KERRIGAN, 1999).

Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (SHAHIDI, 1997; CROTEAU et al., 2000; SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI; HO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e do ácido malônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico ou piruvato e 3-fosfoglicerato. Os alcaloides, compostos secundários nitrogenados, são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos. Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; saponinas, carotenoides e a maioria dos hormônios vegetais são terpenos (BELL et al., 1980) (Figura 5).

Figura 5 – Esquema das principais vias de biossíntese de metabólitos primários e secundários.



Fonte: TAIZ; ZIEGER, 2004.

2.4.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenoides são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN et al., 2001). São formados pela fusão de unidades de cinco carbonos (isopreno) e classificados de acordo com o número dessas unidades: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos, (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e carotenos (C40) (OLIVEIRA et al., 2003).

Os hemiterpenos são referidos como o menor grupo dos terpenos e seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000). Os monoterpenos e os

sesquiterpenos, devido a sua baixa massa molecular, costumam ser voláteis, sendo os principais constituintes dos óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2003).

Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos e antimicrobianos (ROBBERS et al., 1997, CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Os triterpenos formam os componentes das resinas, látex e, ceras cuticulares das plantas. Entre os triterpenos encontra-se uma importante classe de substâncias, os esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas, que nas plantas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microrganismos (PERES, 2004).

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenoides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Os terpenos apresentam inúmeras atividades biológicas de interesse farmacêutico, dentre elas estão as ações anestésica local (DOLARA et al., 2000), citotóxica (KHIEV et al., 2009), anti-helmíntica (NIRMAL et al., 2007) e, mais notadamente, antimicrobiana (GALVÃO et al., 2012).

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

2.5.1 Característica, Composição e Biossíntese

O termo óleo essencial parece proceder da alquimia, praticada na Idade Média. A palavra óleo indica insolubilidade em água, e solubilidade em solventes orgânicos e gorduras (SIMÕES et al., 1999; PROENÇA DA CUNHA et al., 2012). O qualificativo “essencial” resulta do “destilado” ter sido considerado um produto ativo e essencial da planta (MORALES, 1986).

Esses compostos são normalmente misturas complexas e singulares de compostos voláteis aromáticos resultantes do metabolismo secundário das plantas

(BAKKALI et al., 2008). São caracterizados pelo seu aspecto oleoso, por possuírem um forte odor, por serem raramente coloridos e, em geral, possuírem uma densidade menor que a da água (SIMÕES et al., 1999; MIGUEL, 2010).

Extraídos a partir de diversos órgãos da planta (flores, folhas, sementes, cascas, madeira, frutos e raízes) (PROENÇA DA CUNHA et al., 2012), são produzidos majoritariamente em células secretoras, bolsas, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008). E conferem importantes características às plantas que os produzem, sendo muito utilizados nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (BURT, 2004; EDRIS, 2007).

A composição e rendimento dos óleos essenciais nas plantas depende não só da diversidade genética, mas também de outros fatores conhecidos por influenciar o seu rendimento e composição. Entre estes fatores estão, a evolução das espécies, variações fisiológicas, condições ambientais e variações geográfica (FIGUEIREDO et al., 2007).

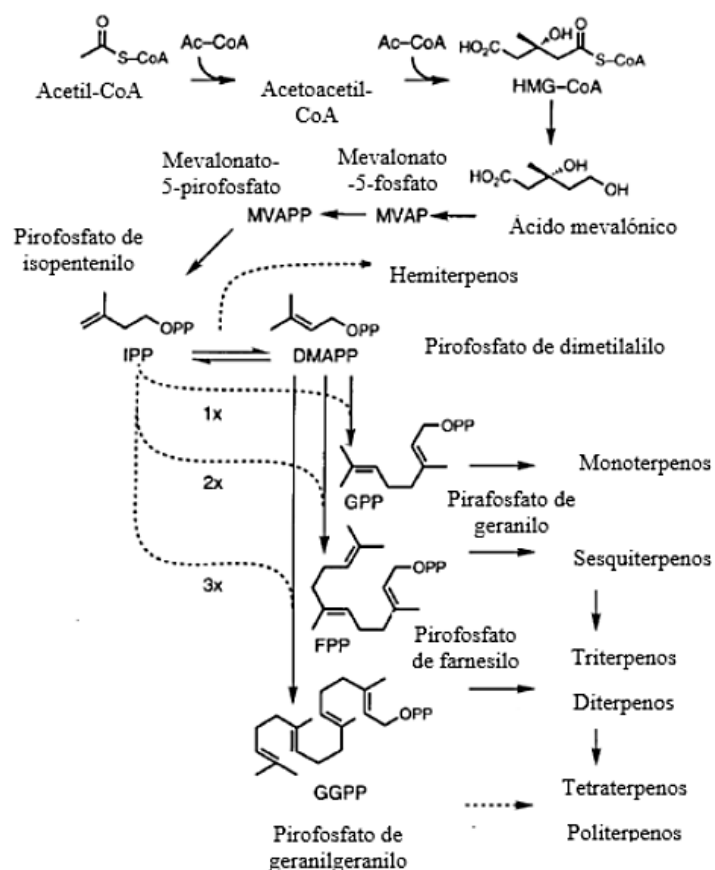
Constituídos, muitas vezes, por várias dezenas de compostos em diferentes concentrações, nos óleos essenciais predominam os compostos terpênicos e/ou fenilpropanoides (TAPPIN et al., 2004). Biogeneticamente, os terpenoides e fenilpropanoides têm diferentes precursores metabólicos e são gerados por meio de diferentes vias biossintéticas. As vias envolvidas nos terpenoides são a do ácido mevalônico e a via independente do ácido mevalônico, enquanto que os fenilpropanoides são originados através da via do ácido chiquímico (DEWICK, 2002; TOLONEN, 2003).

Frequentemente sujeitos a fatores abióticos, os compostos terpênicos voláteis são os mais frequentes nos óleos essenciais (LIMA et al., 2003), sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os que ocorrem com mais frequência nos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). Estes são responsáveis pelas propriedades odoríferas, pelas características farmacológicas, relacionadas com a atividade da planta aromática de onde provem, e pelos produtos aromáticos industriais deles obtidos (PROENÇA DA CUNHA et al., 2012).

A biossíntese dos compostos terpênicos (Figura 6) inicia-se com a condensação de dois compostos com cinco átomos de carbono, o pirofosfato de isopentenilo (PPI) e o seu isômero, o pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), que são produtos da via do acetatomevalonato (MCGARVEY; CROTEAU, 1995; PROENÇA

DA CUNHA et al., 2010). Esta condensação origina um composto intermediário em C10, o pirofosfato de geranilo, precursor imediato dos monoterpênicos. O pirofosfato de geranilo, por sua vez, pode condensar com outra unidade de PPI e formar um novo intermediário em C15, o pirofosfato de farnesilo, precursor dos sesquiterpênicos. Uma nova condensação do intermediário em C15 com o PPI vai originar o pirofosfato de geranilgeranilo, precursor dos diterpênicos, terpenóides em C20, sendo estes últimos menos frequente nos óleos essenciais, principalmente nos que são isolados por destilação (MCGARVEY; CROTEAU, 1995; PROENÇA DA CUNHA et al., 2010).

Figura 6 – Biossíntese de compostos terpênicos.



Fonte: MCGARVEY & CROTEAU, 1995 (adaptado).

2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

De maneira indireta, a utilização de plantas na medicina popular, através dos séculos, trouxe à comunidade científica um grande interesse em ampliar, de forma multidisciplinar – através da etnobotânica, fitoquímica e farmacologia – os

conhecimentos sobre a flora mundial, sempre à procura de subsídios que possam determinar ou não a sua utilização como “medicamento” (MACIEL et al., 2002).

As plantas aromáticas e medicinais, nomeadamente os seus óleos essenciais, apresentam inúmeras potencialidades, e são diversas as atividades biológicas que lhes são atribuídas, tais como: antioxidantes, bactericidas, fungicidas, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, anti-inflamatórias, sendo a atividade antioxidante e anti-inflamatória de grande interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2007; INOUE et al., 2001; MIGUEL, 2010; ZUZARTE et al., 2011).

Os óleos essenciais e seus constituintes aplicam-se a nível da saúde humana e animal, pelas suas propriedades com interesse terapêutico, resultantes da ação de algum dos seus múltiplos constituintes ou sinergismos entre vários deles (PROENÇA DA CUNHA et al., 2010). Com efeito, muitas vezes a bioatividade dos óleos essenciais é devida, não apenas a um componente, mas sim à ação combinada dos seus diversos constituintes.

Diversas plantas aromáticas que são amplamente utilizadas na medicina tradicional nunca foram caracterizadas quimicamente, tampouco foram submetidas a avaliações do potencial bioativo que possuem. Todavia, torna-se imprescindível a busca pelo conhecimento nesta área de conhecimento, de forma que essas espécies de plantas medicinais possam vir a serem utilizadas tendo por base critérios de qualidade, eficácia e segurança toxicológica (RODRIGUES, 2014).

Observando o vasto percentual de plantas que ainda não foram cientificamente investigadas, ou são desconhecidas, existe um importante reservatório de compostos a serem descobertos e que podem exercer atividade farmacológica, inclusive podendo apresentar propriedades anticarcinogênicas. O Brasil por deter quase um terço do total da flora mundial com grande biodiversidade, dispõe de uma variedade de compostos fitoquímicos a serem explorados (GRANATO et al., 2013).

2.6.1 Atividade Antioxidante

Nas plantas, a síntese de metabólitos secundários antioxidantes que absorvem em 300-400 nm é significativamente aumentada por radiação UV (GOTTLIEB et al.,

1996) fornecendo, portanto, um alto nível de proteção contra oxidantes prejudiciais gerados termicamente ou pela luz (LARSON, 1998).

Em sistemas biológicos os radicais livres reagem com os elétrons das biomoléculas que estão a sua volta, ou seja, proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas reações podem, conseqüentemente, levar a alterações de função e a morte celular (LAGUERRE et al., 2007).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) são compostos formados quando as moléculas de oxigênio ou nitrogênio se combinam com outras moléculas gerando um grande número de elétrons livres (SILVA et al., 2010).

No organismo humano são formados compostos que contém um ou mais elétrons não pareados, conhecidos como radicais livres. São moléculas extremamente reativas, que causam danos oxidativos nas células e tecidos, os quais têm sido relacionados com a citologia de várias doenças, dentre aquelas degenerativas como o câncer, aterosclerose e cardiopatias, dentre outras (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

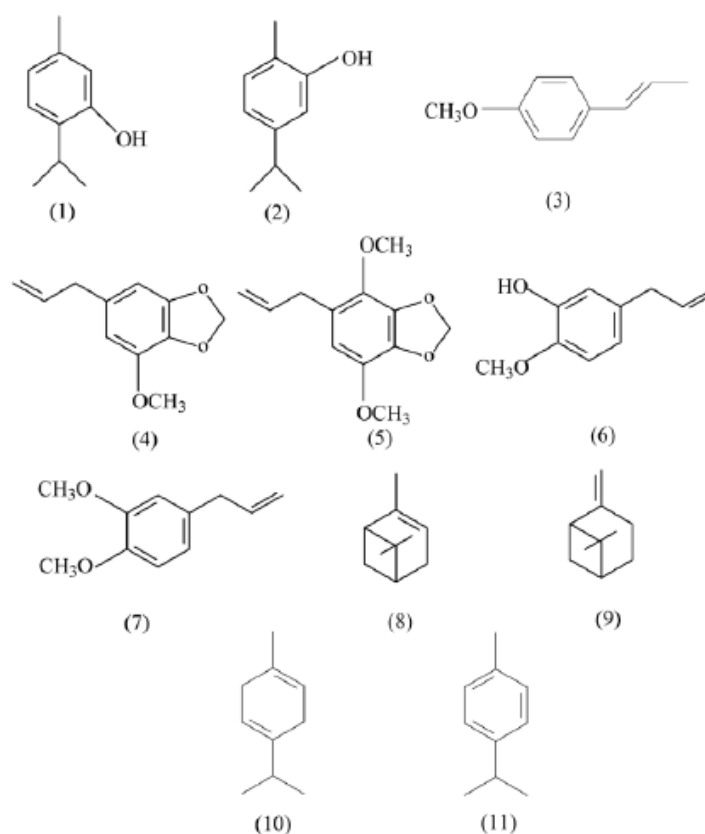
A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, processo no qual uma série de reações é iniciada originando alterações em proteínas extracelulares e modificações celulares sendo que o maior dano é a peroxidação de ácidos graxos presentes na dupla camada lipídica das células causando morte celular (PODSEDEK, 2007).

Assim, devido a formação desses radicais, a utilização de elementos antioxidantes na alimentação e em bebidas podem ajudar a combatê-lo. Vários compostos presentes em plantas possuem esta atividade, como são os exemplos das vitaminas (α -tocoferol, β - caroteno, ácido ascórbico), clorofilina, curcumina, flavonoides e também alguns óleos essenciais (BIANCHI; ANTUNES, 1999; RUBERTO; BARATTA, 2000).

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante conferida a alguns óleos essenciais, são principalmente aqueles que possuem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados ao anel aromático, instaurações e elétrons disponíveis para serem doados (CARVALHO, 2004). O timol (1) e o carvacrol (2) (Figura 7), comumente encontrados em óleos essenciais do gênero *Tymus* e *Origanum*, da família Lamiaceae, são exemplos de terpenoides antioxidantes (possuem um grupo hidroxila ligado ao anel aromático).

Outros compostos estudados que apresentam atividade antioxidante são os fenilpropanoides, que apresentam em sua estrutura os grupos metóxi (CH_3O) e hidroxila (OH). Dentre estes, citam-se o trans-anetol (3), miristicina (4), apiol (5), eugenol (6) e metil-eugenol (7). Por outro lado, o α -pineno (8), β -pineno (9), γ -terpineno (10) e *p*-cimeno (11) citados por Ruberto e Baratta (2000); Zhang et al. (2006), apresentam baixa atividade, sendo, entretanto, capazes de aumentar a atividade ao agir sinergisticamente com outros compostos (DORMAN et al., 1995) (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura dos compostos que apresentam atividade antioxidante.



Fonte: LIMA E CARDOSO, 2007.

2.6.2 Potencial Anti-inflamatório

A inflamação é uma resposta biológica complexa do hospedeiro contra agentes agressivos, tais como agentes patogênicos, irritantes, ou células danificadas. Pode ser classificada como aguda ou crônica e envolve uma cascata de eventos

bioquímicos que constituem o sistema vascular local, o sistema imunológico, e diferentes tipos de células encontradas no tecido lesionado. A inflamação aguda é a resposta inicial e é caracterizada pelo recrutamento e ativação de células do sistema imune inato, tais como neutrófilos e monócitos, do sangue para os tecidos lesionados. A inflamação crônica, por sua vez, refere-se a uma mudança progressiva no tipo de células presentes no local da reação inflamatória e caracteriza-se pela destruição e posterior cicatrização do tecido lesionado (FERRERO-MILIANI et al., 2007).

Independentemente do fator desencadeante, os mecanismos envolvidos no processo inflamatório são comuns a todos os sinais padrão e de inflamação, e são expressos por um aumento do fluxo de sangue, elevado metabolismo celular, vasodilatação, libertação de mediadores solúveis, extravasamento de fluidos e influxo celular (FERRERO-MILIANI et al., 2007).

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é altamente ativo em locais de inflamação em diversas patologias e pode induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (TAK; FIRESTEIN, 2001).

O aumento da expressão de diversas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL) -1 β e IL-6, facilitam a migração de leucócitos para o local da inflamação. A produção destas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS), que está localizada na parede celular de bactérias Gram-negativas, capazes de ativar macrófagos que libertam mediadores inflamatórios, incluído o óxido nítrico (NO), exercendo funções regulatórias a fim de restaurar a homeostase do tecido (SILVEIRA E SÁ et al., 2014).

Neste sentido a utilização de fármacos anti-inflamatórios constitui uma ferramenta eficaz na prevenção ou tratamento de doenças associadas a um componente inflamatório. Neste contexto, as plantas medicinais e seus metabolitos são muito utilizados na medicina popular para o tratamento de diferentes condições inflamatórias (SILVEIRA E SÁ et al., 2013). A título de exemplo, os óleos essenciais do eucalipto, rosmaninho, lavanda, milefólio, juntamente com outras plantas (pinho, cravo e mirra) que têm sido utilizados em formulações mistas como agentes anti-inflamatórios (DARSHAN; DORESWAMY, 2004).

Se os óleos essenciais são capazes de eliminar alguns radicais livres, eles também podem atuar como agentes anti-inflamatórios, uma vez que a resposta

inflamatória está associada ao poder oxidativo que ocorre em diversas células (monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos). A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais pode ser atribuída não apenas à sua atividade antioxidante, mas também às suas interações com cascatas de sinalização intracelular que envolvem a ativação de fatores de transcrição com consequente aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, nomeadamente citocinas (MIGUEL, 2010).

Na busca contínua de novos produtos naturais anti-inflamatórios, os óleos essenciais e os seus compostos isolados são cada vez mais referidos como uma fonte rica em tais compostos bioativos (SILVEIRA E SÁ et al., 2013).

2.6.3 Estudos Toxicológicos

A toxicologia é uma ciência que tem como objetivo estudar os efeitos nocivos provocados por um agente tóxico aos sistemas biológicos. Por meio de ensaios toxicológicos, ela avalia as modificações que ocorre no organismo vivo quando expostos, em condições propícias, a uma dada substância. Essas alterações podem ser reversíveis ou não, com efeito molecular, celular ou tecidual e até levar à morte do indivíduo (TAHRAOUI, 2010; VALADARES, 2006).

Tendo em vista que várias substâncias oriundas do reino vegetal apresentam elevada toxicidade, as plantas medicinais não são 100% seguras como parece (SANDINI et al., 2013). Vale salientar que o potencial tóxico de uma substância química depende da dose, da via de administração e do tempo de exposição. Sua toxicidade pode ser avaliada pelo consumo alimentar, mudanças no comportamento, peso ponderal, análise macroscópica dos órgãos e histologia dos tecidos. As análises hematológicas e bioquímicas também são de extrema importância, pois fornecem informações relevantes de como a substância teste influencia na homeostase e nos parâmetros hepáticos e renais. Para serem consideradas seguras, as condições de exposição devem estar abaixo dos níveis de tolerância (OECD, 2001).

A execução dos testes toxicológicos deve ser feita segundo os protocolos aceitos pela comunidade científica. Mundialmente são aceitos o da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), da *Food and Drug Administration* (FDA) e do ministério da Saúde do Japão. No Brasil, a regulamentação desses testes é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013;

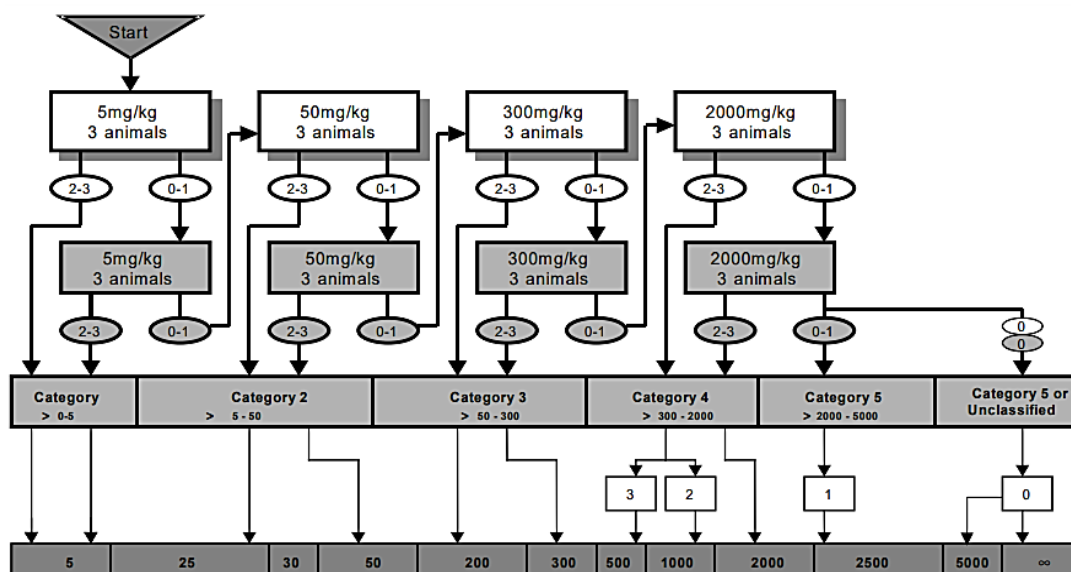
TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Esses testes são necessários para assegurar o uso das plantas medicinais (FERNANDES, 2016).

A toxicidade sistêmica é dividida em dois parâmetros, os ensaios de dose única e os de exposição repetida que são realizados animais de laboratório sob condições adequadas, onde a escolha da espécie, via de administração e dose são fundamentais para o sucesso do teste além de ter aplicabilidade para espécie humana, uma vez que a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada, pois esbarram nos princípios legais, morais e éticos (VALADARES, 2006).

2.6.3.1 Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda é a etapa inicial para investigar o potencial tóxico sistêmico de uma substância administrada em única dose. Este teste pode sugerir a escolha da dose para os testes de toxicidades adicionais e fornecer informações relevantes sobre os riscos que essa substância pode causar à saúde animal e humana (PURCHASE et al., 1998; HAYES; DISPASQUALE, 2001). O principal objetivo do teste não é calcular a dose letal mediana (DL_{50}), que representa a dose capaz de matar metade dos animais em estudo, e sim obter informações suficientes para permitir a classificação de acordo com o grau de toxicidade ou letalidade da substância. Para realização do teste, a OECD recomenda que sejam utilizados camundongos ou ratos fêmeas e um número de três animais em cada etapa do experimento, onde a ausência ou presença de morte dos animais tratados determinará a necessidade de etapas seguintes (Figura 8). Além disso, a administração oral é a mais aconselhada, e a dose limite de 2000 mg/Kg é suficiente para estimar a DL_{50} (OECD, 2001).

Figura 8 – Procedimento experimental de dosagens iniciais para testes de toxicidade aguda com produtos químicos (OECD, 423).



Fonte: OECD, 2011 (adaptado).

Diversas informações podem ser obtidas a partir da avaliação da toxicidade sistêmica aguda, como o potencial tóxico em um órgão específico, a relação dose resposta e indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica. Por isso, o estudo da toxicidade aguda oral é fundamental para avaliar a segurança de drogas vegetais e fitoterápicas (CUNHA et al., 2009; VALADARES, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição do óleo essencial foliar de *Calyptanthes dardanoi* Mattos ocorrente em áreas de Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) do estado de Pernambuco e seu potencial frente às atividades biológicas.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- 1) Obter o óleo essencial foliar de *C. dardanoi* coletados no domínio fitogeográfico de Floresta Atlântica e Caatinga;
- 2) Caracterizar quimicamente o óleo essencial e identificar os compostos majoritários;
- 3) Avaliar o potencial antioxidante;
- 4) Avaliar o potencial anti-inflamatório por peritonite aguda e edema de pata induzido com carragenina;
- 5) Avaliar a toxicidade aguda em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), parâmetros hematológicos, bioquímicos, histológicos e patológicos dos camundongos submetidos à toxicidade aguda;
- 7) Avaliar a toxicidade através do ensaio de toxicidade *in vitro* da atividade hemolítica.

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREAS DE ESTUDO

Calypttranthes dardanoi foi coletada em maio de 2018 no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque, PE (Caatinga) e dezembro de 2018 na Usina São José, Igarassu, PE (Floresta Atlântica). A espécie foi identificada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade de Lima – IPA com o voucher: 92921 (Vale do Catimbau) e 93554 (Usina São José).

O Parque Nacional Vale do Catimbau está localizado a 285 Km do Recife e situa-se entre o Agreste e o Sertão de Pernambuco, abrangendo terras do município de Buíque. O Parque é formado por elevações montanhosas de topo suave, encostas abruptas e vales abertos, a temperatura e precipitação médias anuais são de 25°C e 1.095,9 mm com maior pluviosidade entre abril a junho (SILVA; SCHLINDWEIN; RAMALHO, 2007).

A Usina São José (USJ) localiza-se na Zona da Mata Norte, a 28 km de Recife, no município de Igarassu, Pernambuco (7°40'21,25"– 7°55'50,92"S e 34°54'14,25"– 35°05'21,08"W) (TRINDADE et al., 2008). Possui uma área total de 280 km² e cerca de 100 fragmentos florestais com diferentes áreas e formatos.

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Após a coleta, o material foi seco em temperatura ambiente e posteriormente triturado para atingir baixa granulometria. A extração do óleo essencial das folhas foi realizada por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger. As folhas da planta secas foram submetidas ao processo de hidrodestilação na proporção de 1:15 material vegetal: água (m/m), durante 4 horas (PEREIRA et al., 2011). Após 4 horas de extração, o óleo essencial extraído foi armazenado em frasco do tipo âmbar à temperatura de -15 °C. O rendimento do óleo essencial foi expresso em percentagem (%) volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (SANTOS et al., 2014).

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

As análises por cromatografia gasosa (GC) foram realizadas para determinar as proporções relativas dos componentes dos óleos. A amostra, 1 µL da solução em *n*-hexano (1 mg do óleo essencial diluído em 1 mL de hexano biodestilado) foi injetada e analisada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C série GC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna apolar Agilent J&W HP-5 (60 m × 0,25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 40 °C (mantida por 2 min), rampa de aquecimento de 4°C/min e temperatura final de 230 °C, que foi mantida por 5 minutos. O hélio (He) foi usado como gás de arraste a um fluxo 1 mL/min, mantido a uma pressão constante de 7,0 psi. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. Os espectros de massa foram obtidos no modo scan com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de *m/z* de 35 a 550. Uma alíquota de 1µL de cada óleo essencial foi injetada em modo split 1:50. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massas de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes do óleo utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de *n*-alcanos

(C9 a C25) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (Adams, 2007; NIST WebBook, 2014).

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Método de Fosfomolibdênio ou Atividade Antioxidante Total (AAT%)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi baseada no método de Prieto et al. (1999). Foi combinado 0,1mL de óleo essencial com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, Fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos com as soluções foram colocados em banho maria a 95 °C durante 90 minutos, depois foram arrefecidas até à temperatura ambiente e a absorvência de cada amostra medida a 695 nm contra um branco (1 mL de reagente e 0,1 mL de metanol). A curva padrão foi construída utilizando soluções de ácido ascórbico nas concentrações 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicata (PRIETO et al., 1999).

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação ao Ácido Ascórbico (AA), considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante, de acordo com a fórmula:

$$AAT(\%) = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do controle}}{\text{Absorbância do ác. ascórbico} - \text{Absorbância do controle}} \times 100$$

4.5 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e machos (60 dias e peso corporal entre 28 g e 31 g), provenientes e mantidos no biotério setorial do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC). Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições normais de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60 ± 1%), sob ciclo natural claro e escuro de 12-12 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o processo nº0049/2019 (Anexo A)

4.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.6.1 Edema de Pata Induzido por Carragenina

Os camundongos (machos) foram divididos em seis grupos de seis animais cada. O edema de pata foi induzido por carragenina 2%, injetada em um volume de 15 µL/animal na região subplantar da pata direita do camundongo (WINTER et al., 1962) e 15 µL/animal de salina 0,9% na pata esquerda. Os animais foram pré-tratados com: óleo essencial de *C. dardanoi* – FA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), óleo essencial de *C. dardanoi* – CA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (solução salina 0,9%) e indometacina (20 mg/Kg, v.o.) 1 h antes das injeções subplantares. O volume da pata foi mensurado por paquímetro por um período de 1, 2, 3, 4 e 5h após a injeção (HUANG et al., 2012). A inibição do edema foi calculada por (pataD-PataE).

4.6.2 Peritonite Induzida por Carragenina

Previamente, os camundongos (machos) foram separados em oito grupos de seis animais cada, nos quais, os animais foram pré-tratados com: óleo essencial de *C. dardanoi* – FA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), óleo essencial de *C. dardanoi* – CA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (solução salina 0,9%) e indometacina (20 mg/Kg, v.o.) 1 h antes.

Posteriormente, foi realizada a indução da peritonite aguda com carragenina 2%, injetada em um volume de 15 µL/animal na região peritoneal do animal (SOUZA; FERREIRA, 1985). Passado o período de 4 h de indução da peritonite, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal lavada, injetando-se 3 mL de salina estéril contendo 5 µL/mL de heparina.

Após massagem do peritônio, a cavidade peritoneal foi aberta através de uma incisão longitudinal e o exsudato coletado em condições assépticas, para a quantificação do fator de necrose tumoral (TNF-α) realizada a partir de kit (eBioscience, USA).

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL50

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o protocolo experimental proposto por Guideline 423 (OECD, 2001). Inicialmente um grupo com três animais foram submetidos a administração da dose máxima preconizada de 2000 mg/Kg do OE de *C. dardanoi* (Floresta Atlântica) e o outro grupo com três animais também serão submetidos a administração da dose máxima de 2000 mg/Kg do OE de *C. dardanoi* (Caatinga), caso fosse observado morte após a administração, essa dose seria reduzida para 300 mg/Kg, e sequencialmente para 50 e 5 mg/Kg caso necessário.

A administração foi realizada por gavagem e foi feita a observação individual nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, e periodicamente durante 14 dias. Os animais foram privados da alimentação por duas horas antes do início do procedimento experimental e por mais duas horas após a administração, por via oral, da substância teste. A água foi administrada *ad libitum* até o término do experimento. Ao final do 14º dia de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados por overdose de anestésicos (Ketamina (100 mg/Kg) + Xilazina (10 mg/Kg), intraperitoneal).

Os órgãos foram retirados e preservados em solução de formaldeído para processamento histológico e as amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca, sendo alocado em dois tubos, um com EDTA para análise hematológica de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina e índices hematimétricos como: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e outro tubo com gel separador, o qual foi centrifugado por 15 minutos a uma velocidade de 3.500 Rotações por Minuto (RPM), para obtenção de soro que foi utilizado para as dosagens bioquímicas de: ureia, creatinina e transaminases.

4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade foi realizada seguindo a metodologia de Rangel et al. (1997). A amostra de sangue (5 - 10 mL) foi obtida a partir voluntários saudáveis, não-fumantes, por punção venosa, após consentimento informado por escrito. Eritrócitos humanos a partir de sangue tratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rpm

por 10 min. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e posteriormente, uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparado como mesmo tampão. Uma alíquota de 1,0 mL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 5 µL de cada óleo em várias concentrações, ficando na concentração de 5 µg/mL e a partir desta concentração foram feitas diluições seriadas (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 µg/mL). O controle negativo e controle positivo receberam 0,5 mL de Tween 80% e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em triplicata.

A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula seguinte: atividade hemolítica (%) = $(A_a - A_s) \times 100 / (A_c - A_s)$, onde: A_a = absorbância da amostra; A_s = absorbância do solvente (controle negativo); A_c = absorbância do controle positivo (Triton X-100).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados no GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ou Bonferroni. Foi fixado um nível de significância de $p < 0,001$ foi considerado significativo (anti-inflamatório) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (composição química, potencial antioxidante, atividade hemolítica e avaliação da toxicidade).

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO A SER SUBMETIDO A INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calypttranthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o potencial bioativo do óleo essencial de *Calypttranthes dardanoi* (Myrtaceae) quanto à toxicidade, potencial antioxidante e anti-inflamatório a partir de dois diferentes domínios fitogeográficos brasileiro (Floresta Atlântica – FA e Caatinga – CA). O óleo essencial (OE) das folhas de *C. dardanoi* foi obtido por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. A avaliação do potencial antioxidante foi realizada pelo Método de Atividade Antioxidante Total (AAT%). O potencial anti-inflamatório foi avaliado em modelos de edema de pata e peritonite aguda induzida por carragenina. Para avaliação da segurança do uso, foi utilizado o ensaio de toxicidade aguda e atividade hemolítica. O óleo essencial foliar apresentou um rendimento percentual médio de 0,23% FA e 0,33% CA. Os componentes majoritários do óleo essencial extraído das folhas coletadas em áreas de Floresta Atlântica (FA) foram: (E) -Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%) e α -Humuleno (9,09%). Por outro lado, o óleo obtido da espécie coletada em área de Caatinga (CA) apresentou como componentes majoritários: (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%) e α -Humuleno (9,86%). A atividade antioxidante total do óleo essencial de *C. dardanoi* apresentou-se maior quando comparado ao ácido ascórbico (100%) que é um padrão utilizado. Não foram observadas mortes de camundongos com a administração oral do óleo essencial em 2000 mg/Kg, além disso, não foram observadas alterações nas análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Os óleos de ambas localidades também não apresentaram hemólise nas concentrações testadas. No teste de edema de pata, foi observado que o OE

apresentou uma diminuição significativa no edema (67,42% FA e 69,06% CA). No modelo de peritonite aguda foi observado que o OE apresentou uma redução na expressão do TNF- α de 48,44% FA e 45,59% CA. Os resultados sugerem que o óleo essencial de *C. dardanoi* obtido de Floresta Atlântica e Caatinga é uma fonte promissora de constituinte antioxidante, anti-inflamatório e não tóxico.

Palavras-chave: Anti-inflamatória. Antioxidante. Cariófileno. Segurança toxicológica.

INTRODUÇÃO

Em todo mundo, em especial em países em subdesenvolvimento, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas empiricamente pela população. No Brasil, este consumo é ainda mais evidente devido à grande biodiversidade do país. Atualmente o uso de plantas medicinais não se restringe apenas às zonas rurais ou a regiões onde a assistência médica e farmacêutica são precárias, essa prática é também adotada no ambiente urbano, como uma forma complementar aos medicamentos alopáticos (CAMPOS et al., 2016).

Inúmeros estudos vêm demonstrando a potencialidade e a eficácia das plantas medicinais no combate a diversas doenças, entretanto existem sérios problemas em relação ao uso indiscriminado de produtos de origem vegetal. O principal deles é o fato da população subestimar a toxicidade de plantas medicinais acreditando que não apresentam efeitos tóxicos ao organismo (FERREIRA-MACHADO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2010).

As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. A riqueza destes compostos fundamenta a exploração das espécies vegetais desde a antiguidade, pois são capazes de conferir resistência ao ataque de pragas e de doenças. Com isso, as plantas se tornaram uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL; WANI, 1996).

Dentre os agentes terapêuticos vegetais, os óleos essenciais constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (COSTA et al., 2008). No nordeste do Brasil, a Caatinga (Floresta Tropical Sazonalmente Seca) apresenta-se como um domínio fitogeográfico promissor para o estudo de plantas medicinais como possíveis fontes de moléculas com atividade farmacológica, devido suas condições específicas de clima, solo, localização geográfica, exposição à luz solar e temperatura.

A Floresta Atlântica representa um importante ecossistema brasileiro com elevada biodiversidade, devido às variações de relevo, regimes pluviométricos e unidades fitogeográficas (RAMBALDI et al., 2003; PINTO et al., 2006). Estima-se que essas florestas abriguem de 1 a 8% da biodiversidade mundial, com 20.000 espécies de plantas, sendo 40% endêmicas (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2004).

Tanto na Caatinga como na Floresta Atlântica inúmeras espécies endêmicas possuem um potencial medicinal subexplorado. Atualmente, o interesse e pesquisa de novas substâncias bioativas derivadas de produtos naturais está crescendo, fato atribuído à constante necessidade de tratamentos mais eficazes e acessíveis e de fácil obtenção (MEOT-DUROS et al., 2008; SILVA-CARVALHO et al., 2015), entre essas substâncias se encontram os óleos essenciais.

A família Myrtaceae compreende cerca de 150 gêneros, com aproximadamente 3.600 espécies. No Brasil, a família abrange 23 gêneros e cerca de 1.000 espécies (SOBRAL et al., 2015) e é considerada uma das famílias mais importantes economicamente, ocupando a oitava posição em diversidade no Nordeste (SOBRAL; PROENÇA, 2006). Uma das características marcantes desta família é a presença em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (CRONQUIST, 1981). O gênero *Calypttranthes* pertence à família Myrtaceae e agrupa cerca de 100 espécies distribuídas através de América, do México ao Uruguai.

Embora possuam alguns estudos relatando a composição química do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Calypttranthes* (CHAVES et al., 2007; CORRÊA et al., 1972; LIMBERGER et al., 2002; COLE et al., 2007) o perfil químico do óleo essencial foliar de *Calypttranthes dardanoi* Mattos ainda é desconhecido, assim como suas potencialidades bioativas. Deste modo, o OE de *C. dardanoi* oriunda da Floresta Atlântica e Caatinga foi analisado e seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e toxicológico avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E ÁREAS DE ESTUDO

Calypttranthes dardanoi foi coletada em maio de 2018 no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque, PE (Caatinga) e dezembro de 2018 na Usina São José, Igarassu, PE (Floresta Atlântica). A espécie foi identificada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima – IPA com o voucher: 92921 (Vale do Catimbau) e 93554 (Usina São José).

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Após a coleta, o material foi seco em temperatura ambiente e posteriormente triturado para atingir baixa granulometria. A extração do óleo essencial das folhas foi realizada por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger. As folhas da planta secas foram submetidas ao processo de hidrodestilação na proporção de 1:15 material vegetal: água (m/m), durante 4 horas (PEREIRA et al., 2011). Após 4 horas de extração, o óleo essencial extraído foi armazenado em frasco do tipo âmbar à temperatura de -15 °C. O rendimento do óleo essencial foi expresso em percentagem (%) volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (SANTOS et al., 2014).

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Para a análise química, 1 mg do óleo essencial foi diluído em 1 mL de hexano biodestilado e 1 µL da solução foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C série GC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna apolar Agilent J&W HP-5 (60 m × 0,25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 40 °C (mantida por 2 min), rampa de aquecimento de 4 °C/min e temperatura final de 230 °C, que foi mantida por 5 minutos. O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo 1 mL/min, mantido a uma pressão constante de 7,0 psi. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. Os espectros de massas foram obtidos no modo scan com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de m/z de 35 a 550. Uma alíquota de 1 µL de cada óleo essencial foi injetada em modo split 1:50. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes do óleo utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de *n*-alcanos (C9 a C25) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram

comparados com os índices de retenção publicados na literatura (Adams, 2007; NIST WebBook, 2014).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Método de Fosfomolibdênio ou Atividade Antioxidante Total (AAT%)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi baseada no método de Prieto et al. (1999). 0,1 mL de óleo essencial foi combinado com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, Fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos com as soluções foram colocados em banho maria a 95 °C durante 90 minutos, depois foram arrefecidas até à temperatura ambiente e a absorvência de cada amostra medida a 695 nm contra um branco (1 mL de reagente e 0,1 mL de metanol). A curva padrão foi construída utilizando soluções de ácido ascórbico nas concentrações 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação ao Ácido Ascórbico (AA), considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante.

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (60 dias e peso corporal entre 28g e 31g), provenientes do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC). Os animais foram e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da mesma instituição e receberam água e ração ad libitum, e foram mantidos em condições agradáveis de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade ($60 \pm 1\%$), sob ciclo natural claro e escuro de 12 / 12 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o processo nº0049/2019.

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Edema de Pata Induzido por Carragenina

Os camundongos (machos) foram divididos em seis grupos de seis animais cada. O edema de pata foi induzido por carragenina 2%, injetada em um volume de 15 µL/animal na região subplantar da pata direita do camundongo (WINTER et al., 1962) e 15 µL/animal de salina 0,9% na pata esquerda. Os animais foram pré-tratados com: óleo essencial de *C. dardanoi* – FA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), óleo essencial de *C. dardanoi* – CA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (solução salina 0,9%) e indometacina (20 mg/Kg, v.o.) 1 h antes das injeções subplantares. As concentrações foram definidas após a toxicidade aguda (2000mg/Kg). O volume da pata foi mensurado por paquímetro por um período de 1, 2, 3, 4 e 5h após a injeção (HUANG et al., 2012). A inibição do edema foi calculada por (pataD-PataE).

Peritonite Induzida por Carragenina

Previamente, os camundongos (machos) foram separados em oito grupos de seis animais cada, nos quais, os animais foram pré-tratados com: óleo essencial de *C. dardanoi* – FA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), óleo essencial de *C. dardanoi* – CA (50, 100 e 200 mg/Kg, v.o.), veículo (solução salina 0,9%) e indometacina (20 mg/Kg, v.o.) 1 h antes. As concentrações foram definidas após a toxicidade aguda (2000mg/Kg).

Posteriormente, foi realizada a indução da peritonite aguda com carragenina 2%, injetada em um volume de 15 µL/animal na região peritoneal do animal (SOUZA; FERREIRA, 1985). Passado o período de 4 h de indução da peritonite, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal lavada, injetando-se 3 mL de salina estéril contendo 5 µL/mL de heparina. Após massagem do peritônio, a cavidade peritoneal foi aberta através de uma incisão longitudinal e o exsudato coletado em condições assépticas, para a quantificação do fator de necrose tumoral (TNF-α) realizada a partir de kit (eBioscience, USA).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o protocolo experimental proposto por Guideline 423 (OECD, 2001). Inicialmente um grupo com três animais (fêmeas) foram submetidos a administração da dose única preconizada

de 2000mg/Kg do OE de *C. dardanoi* - FA e o outro grupo com três animais também foram submetidos a administração da dose única de 2000mg/Kg do OE de *C. dardanoi* - CA. A administração foi realizada por gavagem e foi feita a observação individual nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, e periodicamente durante 14 dias. A água foi administrada *ad libitum* até o término do experimento. Ao final do 14º dia de observação, os animais foram anestesiados e eutanasiados por overdose de anestésicos (Ketamina (100mg/Kg) + Xilazina (10 mg/Kg), intraperitoneal).

Os órgãos foram retirados e preservados para processamento histológico e as amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca, sendo alocado em dois tubos, um com EDTA para análise hematológica de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina e índices hematimétricos como: Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e outro tubo com gel separador, destinado a análises dos parâmetros bioquímicos como ureia, creatinina e transaminases. Este tubo foi centrifugado por 15 minutos a uma velocidade de 3.500 Rotações por Minuto (RPM) e armazenado a -20 °C.

Análises histológicas do fígado, rim, baço, pulmão e coração de camundongos do grupo controle e dos grupos de tratamento foram realizadas por microscopia óptica. As seções dos órgãos foram fixadas em formalina tamponada (10%, v/v), desidratadas por uma série de etanol graduado (70-100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Os cortes histológicos (5 µm) foram corados com hematoxilina-eosina e montadas usando lamínulas com resina Entellan (Merck, Alemanha) (KIERNAN, 2008).

ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade foi realizada segundo Rangel et al. (1997). Foram coletadas amostra de sangue (5 - 10 mL) obtida a partir voluntários saudáveis, não-fumantes, por punção venosa, após consentimento informado por escrito. Eritrócitos humanos a partir de sangue tratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e posteriormente, uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparado como mesmo tampão. O óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA)

foi testado em concentrações de 1000 a 15,625 µg/mL. O controle negativo e controle positivo receberam 0,5 mL de Tween e de Triton X-100, respectivamente. Após incubação à temperatura ambiente durante 30 min, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em triplicata.

A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula seguinte: atividade hemolítica (%) = $(A_a - A_s) \times 100 / (A_c - A_s)$, onde: A_a = absorbância da amostra; A_s = absorbância do solvente (controle negativo); A_c = absorbância do controle positivo (Triton X-100).

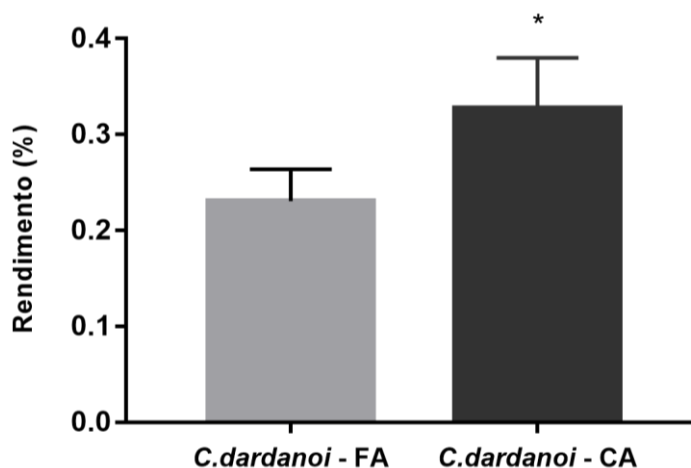
RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A hidrodestilação do óleo essencial das folhas de *C. dardanoi* (FA e CA), produziram um óleo transparente e límpido com rendimento percentual médio de $0,23\% \pm 0,03$ para as coletas realizadas na Floresta Atlântica (FA) e $0,33\% \pm 0,05$ para as amostras provenientes da Caatinga (CA). O óleo essencial foliar da espécie apresentou diferença significativa ($p > 0,02$) em relação ao local de coleta (Figura 9), onde o óleo de CA apresentou um rendimento percentual maior quando comparado ao de FA. Essa diferença observada, se deve a fatores que influenciam diretamente o rendimento e a composição química, são eles: a evolução das espécies, variações fisiológicas, condições ambientais e variações geográfica (FIGUEIREDO et al., 2007).

Portanto, pode-se inferir, que o óleo essencial da espécie obtido em ambiente de Caatinga possui um maior rendimento devido a estratégia de sobrevivência das plantas em ambientes adversos, que consistem em aumentar a síntese de produtos do metabolismo secundário.

Figura 9: Rendimento percentual do óleo essencial foliar de *Calypttranthes dardanoi* (FA e CA).



Símbolo diferente significa diferença estatística entre as amostras. Teste t não pareado, $p < 0,02$.

Segundo a literatura, o teor de óleo essencial de diferentes espécies de *Calypttranthes* é muito variável. O rendimento do óleo destilado de *C. spruceana* Berg ocorrente na Amazônia, por exemplo foi de 1,7%, enquanto que para outra espécie do gênero não identificada foi de 2,2% (CORRÊA et al., 1972), sendo maior que o obtido no presente estudo com *C. dardanoi* (Figura 9). Por outro lado, Cole et al. (2007), extraiu o óleo essencial foliar de *C. pittieri* coletadas nos Estados Unidos da América e obteve um rendimento de 0,23%, valor este, semelhante ao encontrado no presente estudo para *C. dardanoi* (Figura 9).

Em relação a composição química da espécie foram identificados 27 compostos presentes no óleo essencial foliar de *C. dardanoi* da Floresta Atlântica (FA) totalizando 96,62% de compostos identificados. Os componentes majoritários do óleo essencial foram: (E) -Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%), α -Humuleno (9,09%), β -Elemeno (5,29%), bicyclogermacreno (3,99%) e óxido de cariofileno (2,78%) (Tabela 1).

Para o óleo essencial foliar de *C. dardanoi* oriundos da Caatinga (CA) foram identificados 33 compostos representando uma área total de 90,69% (Tabela 1). Para a área da Caatinga, a espécie apresentou como componentes majoritários: (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%), α -Humuleno (9,86%), bicyclogermacreno (9,62%) e β -Elemeno (4,56%) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *Calyptanthus dardanoi* ocorrente na Floresta Atlântica (FA) e na Caatinga (CA).

Composição química							
<i>C. dardanoi</i> - (FA)				<i>C. dardanoi</i> - (CA)			
Composto	RI ^a	RI ^b	%	Composto	RI ^a	RI ^b	%
α -pineno	932	930	0,06	α -pineno	932	930	0,03
β -pineno	974	973	0,12	β -pineno	974	973	0,07
benzeno, 1-metoxi-4-metil	1015	1020	0,04	benzeno, 1-metoxi-4-metil	1015	1018	0,07
1,8-cineol	1026	1029	0,23	1,8-cineol	1026	1029	0,14
fenchone	1083	1086	0,09	fenchone	1083	1086	0,07
-	-	-	-	nonanal	1100	1104	0,02
δ -elemeno	1335	1337	0,14	δ -elemeno	1335	1337	0,76
α -cubebeno	1348	1349	1,00	α -cubebeno	1348	1349	1,51
α -copaeno	1376	1376	2,71	α -copaeno	1376	1376	2,83
β -bourboneno	1387	1385	2,21	β -bourboneno	1387	1385	1,45
β -elemeno	1389	1392	5,29	β -elemeno	1389	1392	4,56
-	-	-	-	metil eugenol	1403	1400	0,94
α -gurjuneno	1409	1410	0,14	α -gurjuneno	1409	1409	0,75
(E)- cariofileno	1417	1421	47,80	(E)- cariofileno	1417	1420	15,59
β -copaeno	1430	1429	0,82	β -copaeno	1430	1429	1,54
aromadendreno	1439	1439	0,19	aromadendreno	1439	1439	1,11
α -humuleno	1452	1454	9,09	α -humuleno	1452	1454	9,86
allo-aromadendreno	1458	1461	0,72	allo-aromadendreno	1458	1461	2,02
germacreno D	1480	1482	10,07	germacreno D	1484	1482	10,22
biciclogermacreno	1500	1496	3,99	biciclogermacreno	1500	1497	9,62
germacreno A	1508	1505	1,15	germacreno A	1508	1506	2,81
-	-	-	-	cis-calameneno	1528	1524	11,40
γ -cadineno	1513	1514	0,58	-	-	-	-
δ -cadineno	1522	1524	3,80	-	-	-	-
trans cadina-1,4-dieno	1533	1533	0,25	trans-cadina-1,4-dieno	1533	1533	2,47
α -cadineno	1537	1538	0,15	-	-	-	-
α -calacoreno	1544	1544	0,07	-	-	-	-
-	-	-	-	germacreno B	1559	1558	0,6
-	-	-	-	palustrol	1567	1568	0,22
-	-	-	-	espatulenol	1577	1578	1,99
óxido de cariofileno	1582	1584	2,78	-	-	-	-
-	-	-	-	hexadecano	1600	1597	1,6
-	-	-	-	ledol	1602	1604	0,59
-	-	-	-	humuleno epóxido II	1608	1610	0,56
-	-	-	-	epi- α -muurolol	1640	1643	1,4
α -muurolol	1644	1642	1,74	-	-	-	-
α -cadinol	1622	1655	1,39	α -cadinol	1652	1655	0,95
-	-	-	-	heptadecano	1700	1698	2,54
-	-	-	-	octadecano	1800	1797	0,23

Total (%)	96,62	Total (%)	90,69
-----------	-------	-----------	-------

RI^a = literatura especializada sobre índice de retenção; RI^b = Taxa de retenção determinada; % = área do composto em relação ao OE de *C. dardanoi* (FA ou CA).

Em geral, a composição química do óleo essencial da espécie foi semelhante entre as diferentes áreas de coleta, no entanto, há o destaque para o cis-calameneno que foi encontrado apenas no óleo essencial da espécie coletada na Caatinga.

Os óleos essenciais de folhas de algumas espécies de *Calypttranthes* já foram estudados e relatados na literatura, incluindo *C. concinna*, *C. grandifolia*, *C. pallens*, *C. spruceana* e *C. tricona*. A composição química do óleo dessas espécies mostra variações quali e quantitativas (COLE et al., 2007).

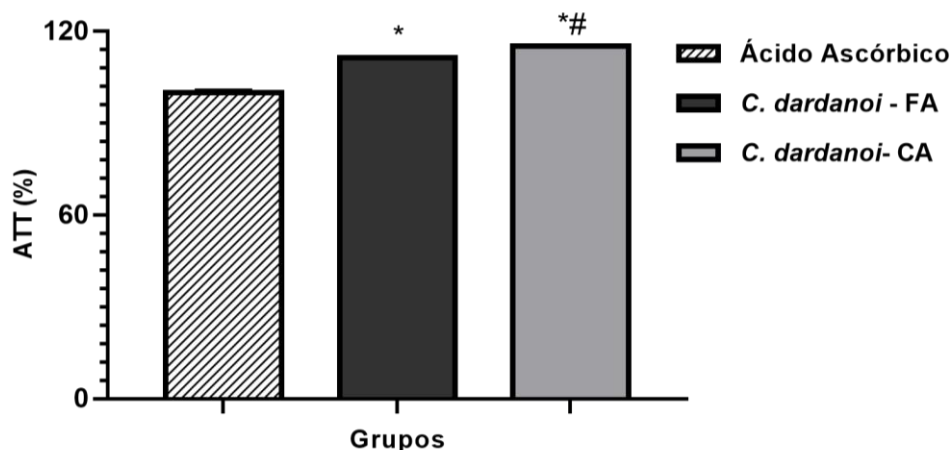
Limberger et al. (2002), descrevem a composição química de três espécies do gênero *Calypttranthes*: *C. concinna*, *C. lucida* e *C. rubella*, o óleo essencial dessas espécies tem a predominância de sesquiterpenos pertencentes a diferentes grupos como bisabolano, cariofileno e germacreno. A composição é semelhante a encontrada no presente estudo, inclusive o cis-calameneno encontrado no óleo essencial de *C. dardanoi* (11,40%) coletado na Caatinga, também é encontrado em *C. concinna* (10,3%).

Na Amazônia são encontradas algumas espécies de *Calypttranthes* e a comparação do óleo essencial de suas folhas varia de espécie para espécie. Segundo Corrêa et al. (1972) na composição química obtida por cromatografia gasosa de *Calypttranthes spruceana* Berg. foram observados os terpenos: α -pineno (5,8%), β -pineno (8,1%), limoneno (54,6%), um álcool monoterpênico (1,2%), neral (2,0%), geranial (3,2%) e perilaldeído (25,0%); enquanto que o óleo essencial destilado de uma espécie de *Calypttranthes* não identificada, sua composição química é de natureza monoterpênica sendo rica em metilchavicol de alilbenzeno (98,7%) e uma pequena quantidade de terpenos (1,3%).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante total do óleo essencial de *C. dardanoi* apresentou diferença estatística entre as amostras que foram coletadas na Floresta Atlântica - FA e na Caatinga - CA (111,48% e 115,33%, respectivamente), como também quando comparado ao ácido ascórbico (100%) que é um padrão conhecido utilizado para avaliar o potencial antioxidante (Figura 10).

Figura 10 – Atividade Antioxidante Total do óleo essencial de *Calyptanthus dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) em relação ao ácido ascórbico.



Símbolos diferentes significam diferença estatística entre os grupos tratados. Símbolos diferentes significam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,0001$ vs ácido ascórbico; # $p = 0,0008$ vs FA, ANOVA unidirecional, seguida de Teste de Bonferroni.

No presente estudo é possível verificar que o ensaio realizado com o método de AAT% o óleo essencial da espécie demonstra uma atividade antioxidante total maior que o padrão (AA). Esse potencial evidenciado é corroborado com os componentes majoritários presentes na composição química do OE (cariofileno, α -cubeno, β -elemeno, e α -Humulene) que quando presentes, conferem um potencial antioxidante a espécie. Não há relatos na literatura sobre o potencial antioxidante total do gênero e nem de *C. dardanoi*.

Sendo comprovado esse potencial, a fração da planta pode ser de interesse na pesquisa de novas moléculas com possível impacto em doenças que apresentam o estresse oxidativo como fenomenologia básica.

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

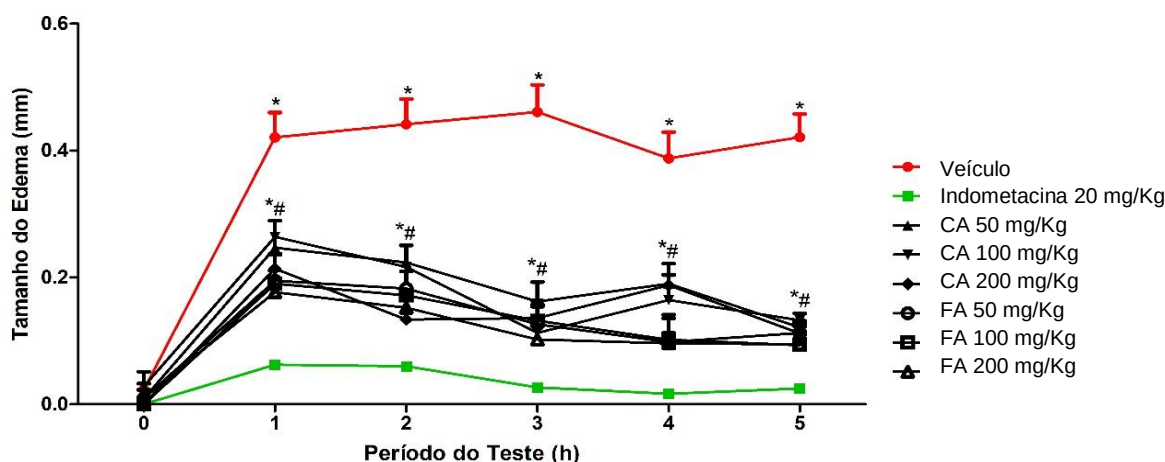
Edema de Pata Induzido por Carragenina

Diversos tipos de modelos experimentais de inflamação podem ser utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória de drogas. No presente estudo, analisamos o efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *Calyptanthus dardanoi* (FA e CA) em dois modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos: edema de pata

induzido por carragenina (WINTER et al., 1962) e peritonite aguda induzida por carragenina (SOUZA; FERREIRA, 1985).

O óleo essencial de *C. dardanoi* oriundo de Floresta Atlântica e Caatinga (FA e CA) nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, reduziu cerca de 60% do edema de pata. Na concentração mais alta testada (200 mg/Kg), o óleo essencial oriundo de Floresta Atlântica reduziu 67,42% o edema de pata, enquanto que o óleo essencial obtido da Caatinga reduziu 69,06%. Entre as concentrações testadas dos óleos obtidos dos diferentes domínios fitogeográficos (FA e CA), não houve diferença significativa entre as amostras e as concentrações testadas. No entanto, houve diferença significativa quando comparado ao veículo (salina 0,9%) e a indometacina 20 mg/Kg v.o, onde, a indometacina reduziu 92,59% do edema de pata (Figura 11). A indometacina é um conhecido agente anti-inflamatório esteroidal.

Figura 11 – Resposta anti-inflamatória do tratamento com o óleo essencial de *Calypttranthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) avaliado pelo método de Edema de Pata induzido por Carragenina.



Símbolos diferentes significam diferença estatística entre os grupos tratados. *p<0.01 vs indometacina; #p<0.01 vs veículo, ANOVA bidirecional, seguida de Teste de Bonferroni.

Esses resultados mostram que o óleo essencial da espécie possui propriedades anti-inflamatórias, reduzindo significativamente o edema de pata induzido por carragenina, corroborando com a caracterização química do óleo essencial, uma vez que, alguns dos componentes majoritários presentes na composição são: o cariofileno (47,80% FA e 15,59% CA), germacrene D (10,07% FA e 10,22% CA) e α -Humuleno (9,09% FA e 9,86% CA). O cariofileno é um agente anti-

inflamatório de natureza não esteroide, onde, além de ações anti-inflamatórias, ele tem ação analgésica, antipirética e inibidora de plaquetas (FIDYT et al., 2016; MACHADO et al., 2018; OLIVEIRA-TINTINO et al., 2018). O α -cubeno quando presente no óleo essencial confere a espécie um potencial anti-inflamatório e antioxidante (SALLEH et al., 2015). O α -Humuleno é citado por ter potencial inseticida, inibição da proliferação de células tumorais, além de possuir propriedades anti-inflamatórias (FERNANDES et al., 2007; BENELLI et al., 2018; CHEN et al., 2019).

Espécies pertencentes a família Myrtaceae apresentam potencial anti-inflamatório relatado na literatura. Os decoctos das folhas de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambos* foram efetivos como agentes anti-inflamatórios nos modelos de edema de pata e de artrite induzida em ratos (SLOWING et al., 1994).

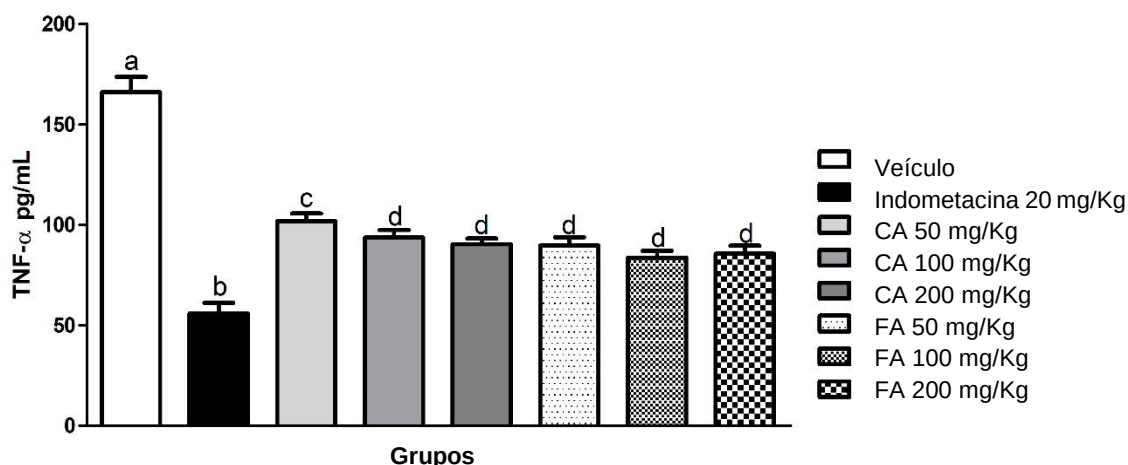
O óleo essencial de folhas de espécies de *Psidium* apresentou efeito antinociceptivo, nos modelos de contorção induzida por formalina ou ácido acético, além de inibir o edema de pata em camundongos (SANTOS et al., 1996a; SANTOS et al., 1996b; SANTOS et al., 1998).

Peritonite Induzida por Carragenina

Os óleos essenciais da espécie obtida de Floresta Atlântica e Caatinga (FA e CA, respectivamente) não apresentaram diferença significativa em relação a localidade que a espécie foi coletada, apenas a concentração de 50 mg/Kg CA, obteve diferença significativa em relação as outras concentrações de OE testadas. As concentrações testadas de FA (50, 100 e 200 mg/Kg) e CA (100 e 200 mg/Kg) obtiveram diferença significativa em relação a indometacina que é um agente anti-inflamatório não esteroide e em relação ao veículo (salina 0,9%) (Figura 12).

Foi observada uma redução na expressão do TNF- α de 48,44% (FA) e 45,59% (CA) na concentração de 200 mg/Kg. Os resultados obtidos com o grupo controle apoiam o efeito do OE das folhas, uma vez que, o veículo não apresentou atividade e a droga controle indometacina (20 mg/Kg, 1 h antes, n=6) reduziu 66,35% a expressão do TNF- α induzida por carragenina para a cavidade peritoneal (Figura 12).

Figura 12 – Concentração peritoneal de TNF- α em camundongos tratados com o óleo essencial foliar de *Calyptanthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA).



Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos. $p < 0.01$, ANOVA unidirecional, seguida de Teste de Tukey.

Sabe-se apenas informalmente sobre o uso popular das folhas *C. grandifolia* em forma de chás ou infusões, principalmente para afecções gastrointestinais e inflamatórias. No entanto, não foram encontrados registros na literatura científica especificamente associados à espécie *C. grandifolia* e suas propriedades farmacológicas. Outros gêneros da família Myrtaceae já foram relatados com diversas aplicações ou potenciais terapêuticos, indicando um caminho a ser explorado dentro desta família. Diante do exposto, foi realizado a avaliação do potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *C. dardanoi* afim de que seja explorado o gênero que já é relatado por reduzir a expressão de TNF- α NF- κ B e p38 α (DEXHEIMER, 2015).

É comprovado que compostos com potencial antioxidante ou que funcionem como cofatores para elementos antioxidantes, é capaz de reduzir o estresse oxidativo e o processo inflamatório, principalmente por modular fatores de transcrição gênica responsáveis pela geração de resposta a estímulos extracelulares ou de modificação do meio interno da célula (MONTERA et al., 2007). Como os componentes majoritários presentes na composição química da espécie são relatados por possuir potencial antioxidante, esse fator contribuiu para a redução do processo inflamatório induzido pela carragenina nos modelos testados.

Não há trabalhos na literatura científica que referenciem às possíveis atividades farmacológica atribuídas a espécie *C. dardanoi*. Entretanto vários outros estudos

mostram que outras espécies de plantas já estão sendo testadas frente à citocinas, entre elas o TNF- α , com resultados promissores, havendo evidências da supressão da inflamação e do estresse oxidativo, com vias envolvendo o TNF- α e a MAPK, ou de inibição da expressão de receptores de citocinas (ex. TNF-R) potencialmente envolvidos em migração celular e metástase (KIM et al., 2012; TAN et al., 2011).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL50

Uma maneira de avaliar a segurança das plantas medicinais é determinar sua toxicidade. Portanto, foi avaliada a toxicidade aguda do óleo essencial foliar de *C. dardanoi* obtido de Floresta Atlântica e Caatinga (FA e CA, respectivamente) em camundongos, além de avaliar seus possíveis efeitos sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos e histologia de órgãos.

O óleo essencial foliar de *C. dardanoi* (FA e CA) na dose de 2.000 mg/Kg administrado por via oral em camundongos fêmeas, não produziu morte e não causou alteração comportamental no período de 14 dias de observação. A massa corpórea, o consumo de água e o consumo de ração (Tabela 2) foram diferentes do grupo controle.

Tabela 2: Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptanthus dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg), por via oral sobre o peso corporal de camundongos *Mus musculus* fêmeas, consumo de água e consumo de ração.

	Variação de peso (g)		Consumo de água (mL/dia/animal)		Consumo de ração (g/dia/animal)	
	Δ 7° dia	Δ 14° dia	Δ 7° dia	Δ 14° dia	Δ 7° dia	Δ 14° dia
Controle	0,67 $\pm$ 1,15	2,67 $\pm$ 1,54	0	8	-9	4
FA	2,67 $\pm$ 1,15	1,67 $\pm$ 2,08	8	4	4	-1
CA	2,33 $\pm$ 0,57	0,67 $\pm$ 0,57	4	2	8	-1

Em relação ao peso corporal dos animais, o grupo controle do 7° ao 14° dia apresentou ganho de peso, já os grupos tratados com FA e CA obtiveram perda de peso ao final do experimento (14° dia). O consumo de água é possível observar um aumento no grupo controle partindo de 0 a 8 mL/dia/animal ao 14° dia, enquanto que, os grupos tratados (FA e CA) diminuiram o consumo de água. Inicialmente há uma

redução no consumo de ração observado no grupo controle, no entanto, a partir do 7º dia até o final dos 14º dias houve aumento no consumo de ração, e os grupos tratados obtiveram uma diminuição no consumo (-1 g/dia/animal) ao 14º dia e finalização do experimento (Tabela 2). Apesar de haver variações no peso dos animais, no consumo de água e ração entre o grupo controle e os grupos tratados, os animais não apresentaram patologias ou grandes alterações relacionadas a diferença evidenciada.

A variação de massa corporal e o consumo de água e ração são dados de fácil obtenção, mas são variáveis de extrema importância no que se refere à toxicidade. Um rato saudável pode ingerir até 20 g de alimento seco por dia, equivalente a 50 kcal. Alterações na massa e consumo de água e alimentos de modo diferente do esperado podem ser sinal do desenvolvimento de doenças e alterações tanto centrais como periféricas (SUCKOW et al., 2006).

Alterações hematológicas e bioquímicas também podem expressar a toxicidade sistêmica de uma substância. Os parâmetros hematológicos são importantes devido à alta sensibilidade do sistema hematopoiético a agentes tóxicos, que podem resultar em alterações transitórias ou permanentes (SILVA et al, 2015).

A Tabela 3 mostra o perfil hematológico dos animais controles e dos animais tratados com o óleo essencial foliar de *C. dardanoi* (FA e CA). Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos parâmetros analisados no grupo das fêmeas tratadas em relação aos animais do grupo controle, como também não foi observado diferença significativa em relação aos domínios fitogeográficos em que os óleos essenciais foram obtidos. Este resultado sugere que *C. dardanoi* (FA e CA) não desencadeou nenhuma resposta inflamatória imunossupressora na análise destes parâmetros hematológicos.

Tabela 3: Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptroanthus dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos *Mus musculus* fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos.

Parâmetros Hematológicos			
Parâmetros	Controle	<i>C. dardanoi</i> - FA (2000 mg/Kg)	<i>C. dardanoi</i> - CA (2000 mg/Kg)
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,50 $\pm$ 0,95	5,83 $\pm$ 3,54	8,23 $\pm$ 3,11
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,15 $\pm$ 0,50	7,0 $\pm$ 0,51	7,37 $\pm$ 0,13
Hemoglobina (g/dL)	13,87 $\pm$ 0,68	14,40 $\pm$ 0,66	13,10 $\pm$ 1,10
Hematócrito %	22,67 $\pm$ 1,64	22,07 $\pm$ 1,63	23,30 $\pm$ 0,36
VCM (fm^3)	32,00 $\pm$ 0	31,33 $\pm$ 0,58	32,00 $\pm$ 0
HCM (pg)	19,40 $\pm$ 0,44	20,63 $\pm$ 1,03	17,77 $\pm$ 1,62
CHCM (g/dL)	61,20 $\pm$ 1,39	65,57 $\pm$ 3,36	56,23 $\pm$ 5,10
RDW (%)	8,23 $\pm$ 0,06	8,27 $\pm$ 0,06	8,30 $\pm$ 0
Linfócito (%)	88,53 $\pm$ 3,33	90,33 $\pm$ 2,61	87,97 $\pm$ 5,24
Monócito (%)	8,23 $\pm$ 0,60	7,20 $\pm$ 2,59	9,60 $\pm$ 3,14
Granulócito (%)	3,23 $\pm$ 3,18	2,47 $\pm$ 2,00	2,43 $\pm$ 2,24

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão da média (n = 3/ grupo). Não houve diferença estatística entre os parâmetros dos grupos tratados e o controle. $p < 0,05^*$, ANOVA unidirecional, seguida de Teste de Tukey. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias.

As Tabela 4 mostra os parâmetros bioquímicos dos animais dos grupos controle e tratado. Não foram observadas diferenças nos níveis de creatinina, colesterol total, glicose, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e ureia em relação aos grupos tratados (2.000 mg/Kg) e o grupo controle. Como também não foi observado diferença significativa em relação aos domínios fitogeográficos em que o óleo essencial da espécie foi obtido (Floresta Atlântica – FA e Caatinga – CA).

Tabela 4: Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptrothrix dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos *Mus musculus* fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos.

Parâmetros Bioquímicos			
Parâmetro	Controle	<i>C. dardanoi</i> - FA (2000 mg/Kg)	<i>C. dardanoi</i> - CA (2000 mg/Kg)
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,03	0,50 ± 0,09	0,47 ± 0,03
Colesterol Total (mg/dL)	164,70 ± 7,33	156,31 ± 0,10	159,61 ± 5,19
Glicose (mg/dL)	201,73 ± 11,95	215,29 ± 8,51	182,64 ± 10,71
ALT (U.I./L)	53,38 ± 3,87	51,27 ± 6,47	95,32 ± 5,95
AST (U.I./L)	184,77 ± 6,18	189,05 ± 10,06	177,07 ± 10,27
Ureia (mg/dL)	48,91 ± 4,18	41,46 ± 4,08	45,09 ± 2,97

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 3/ grupo). Não houve diferença estatística entre os parâmetros dos grupos tratados e o controle. $p < 0,05^*$, ANOVA unidirecional, seguida de Teste de Tukey. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

A creatinina é o biomarcador mais utilizado para avaliação da injúria renal, é um produto residual da creatina e produzida em uma taxa praticamente constante no corpo. Ela é livremente filtrada pelos glomérulos e não é reabsorvida nos túbulos renais, além disso, os níveis séricos da creatinina não são influenciados pela idade, sexo ou dieta (SODRÉ et al., 2007; SÁ, 2014).

A ureia, principal metabólito derivado da degradação proteica, é 90% excretada pelos rins, e também utilizada como marcador da função renal. Entretanto, apesar de ser livremente filtrada pelo glomérulo, 40% desse produto é reabsorvido pelos túbulos renais, com isso, os níveis plasmáticos da ureia pode subestimar a taxa de filtração glomerular (COSTA et al., 2012).

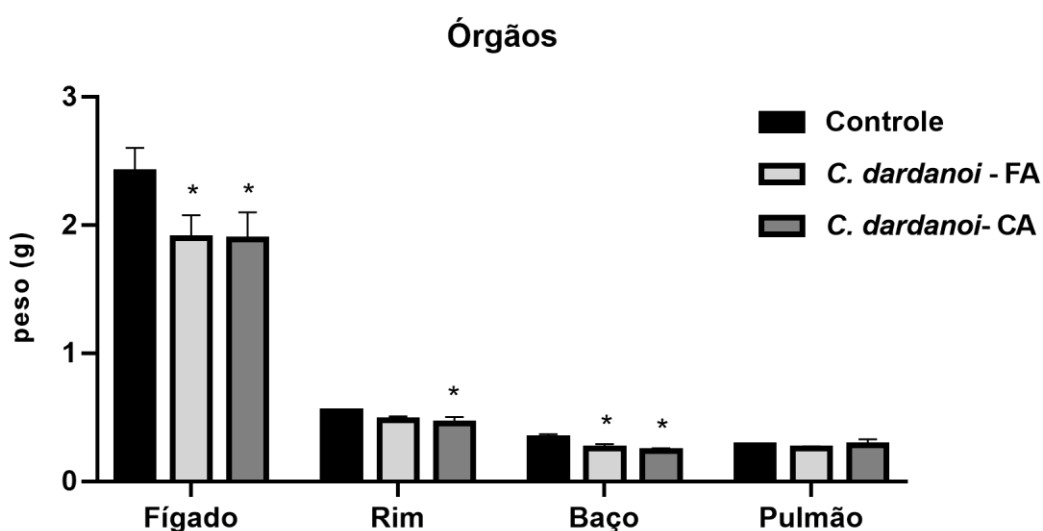
A elevação desses marcadores (ureia e creatinina) no plasma fornece indícios de sobrecarga renal e insuficiência renal aguda (SODRÉ et al., 2007). No presente trabalho, o óleo essencial foliar de *C. dardanoi* (FA e CA) não foi capaz de causar alterações significativas nos marcadores de lesão renal, independente do domínio fitogeográfico em que foi obtido (Floresta Atlântica e Caatinga), sugerindo que a administração subaguda do óleo essencial da espécie não provoca toxicidade renal.

Alterações nos valores séricos das transaminases (AST e ALT) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões no fígado. Vários processos patológicos podem causar perturbações hepáticas e com isso elevar os níveis dessas enzimas, como por exemplo, mudanças induzidas por fármacos (SHARON; CENTER, 1995). A aspartato aminotransferase é encontrada em diversos tecidos como coração,

músculos, rins, pâncreas e fígado, é liberada no sangue quando existe algum dano tecidual. A aminotransferase de alanina está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. Quando ocorre um dano hepático, a ALT é logo liberada na circulação sanguínea tornando-a um indicador bastante específico do estado do fígado. AST e ALT podem fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (AL-HABORI et al., 2002; MILLER; GONÇALVES, 1999). O óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) não provocou alterações nos níveis séricos de ALT e AST, ou seja, a administração via oral não causou danos ao fígado dos animais tratados.

A toxicidade sistêmica de uma substância também pode se manifestar por meio de alterações na massa relativa dos órgãos (PIRES JR et al., 2010). Como os óleos essenciais não ocasionaram óbito aos animais, ao fim do período de observação de catorze dias os mesmos foram eutanasiados. Os órgãos de todos os animais dos grupos *C. dardanoi* – FA e CA foram submetidos a análise macroscópica externa dos órgãos e não demonstrou alterações na cor ou textura, quando comparados ao grupo controle. A administração do óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) alterou o peso absoluto e relativo do fígado (FA e CA), rim (CA) e baço (FA e CA) das fêmeas tratadas (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptanthus dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) (2000mg/Kg) administrado por via oral sobre a massa absoluta (g) do Fígado, Rim, Baço e Pulmão de camundongos *Mus musculus* fêmeas tratadas por 14 dias consecutivos.

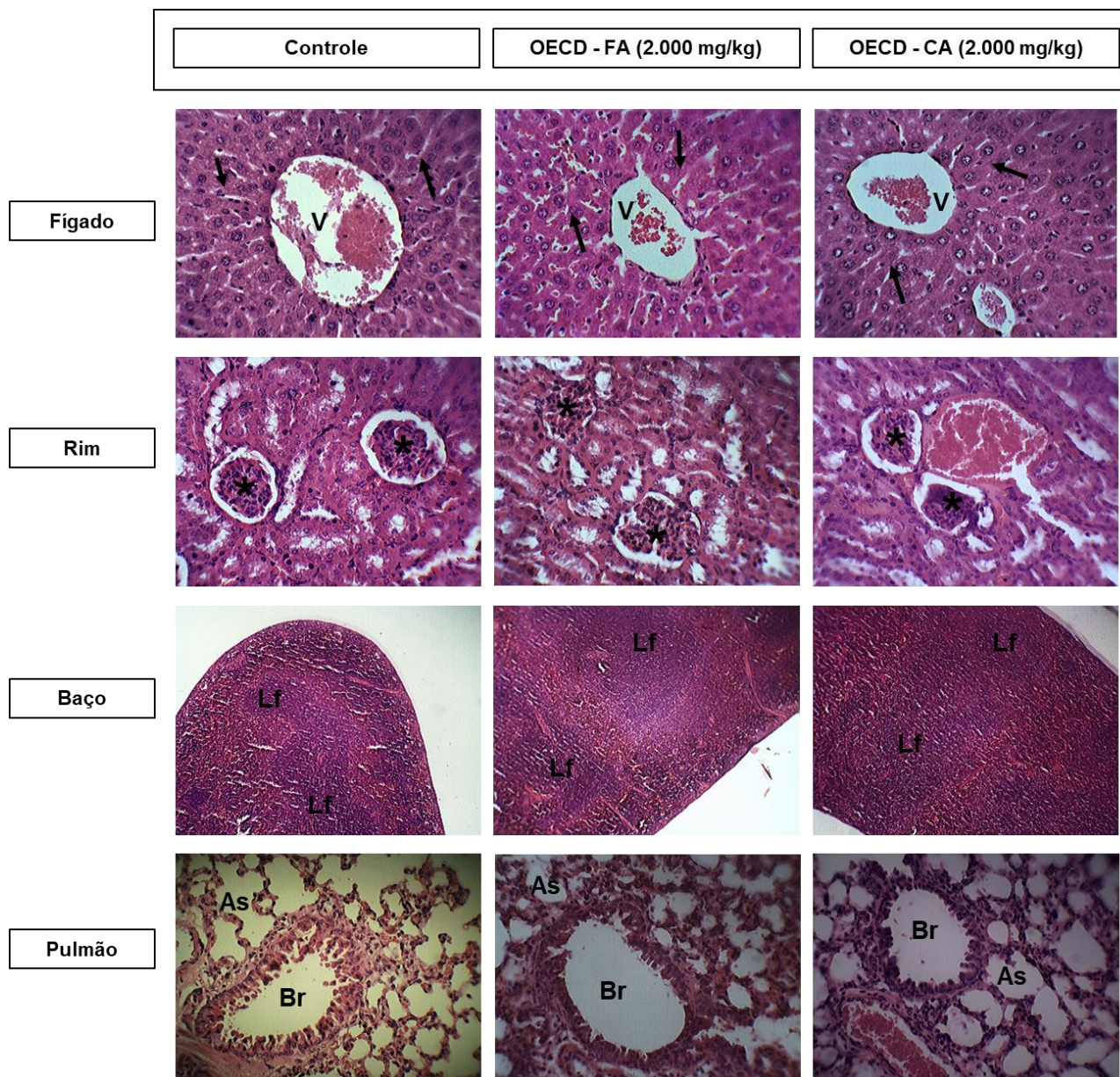


Símbolos diferentes significam diferença estatística em relação ao controle. Símbolos diferentes significam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ANOVA unidirecional, seguida de Teste de Tukey.

Nos estudos de toxicidade, é mais comum observar o aumento da massa relativa dos órgãos como sinal de alterações estruturais decorrentes da toxicidade da preparação avaliada (DIALLO et al., 2010; BEVILACQUA et al., 2011). O aumento da massa tecidual pode caracterizar uma resposta inespecífica do organismo frente à droga e pode ocorrer devido à formação de edema, nódulos ou expansão fibrosa, por exemplo (BOGLIOLO, 2006). O aumento de massa absoluta dos órgãos foi observado para alguns órgãos no presente estudo com *C. dardanoi* (FA e CA).

A Figura 14 apresenta fotomicrografias do fígado, rim, baço e pulmões dos grupos controle e tratados. O fígado de camundongos tratados com o óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) revelou hepatócitos bem delimitados, núcleos com cromatina visível, ductos biliares, veias lobulares centrais com características preservadas e ausência de fibrose. Não foram observadas alterações nos rins, sugerindo que camundongos tratados com a dose mais alta não apresentaram processo patológico. O baço dos camundongos tratados não apresentou alterações histológicas quando comparado aos controles e não apresentou ativação dos linfonodos. Além disso, o parênquima e os septos interalveolares nos pulmões dos grupos de camundongos tratados não apresentaram alterações. De maneira geral a diferença de locais de coleta e obtenção do óleo essencial da espécie (Floresta Atlântica – FA e Caatinga – CA) não alterou os resultados de toxicidade aguda nos animais testados.

Figura 14 - Fotomicrografias representativas do fígado, rim, baço e pulmão de camundongos *Mus musculus* do grupo controle e dos grupos tratados com o óleo essencial foliar de *Calypttranthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) na dose de 2000 mg/Kg.



OECD - FA: *C. dardanoi* – FA; **OECD - CA:** *C. dardanoi* – CA. **Fígado:** a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. No controle e nos grupos tratados, os feixes de hepatócitos (pontas de seta) são preservados e ordenados. **Rim:** glomérulos renais (*) e túbulos contorcidos, sem alterações visíveis nos grupos controle e tratados com o óleo essencial. **Baço:** o grupo controle e os grupos tratados com o óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) nas doses de 2000 mg/Kg não demonstra alterações. Os linfonodos (Lf) estão bem definidos nos grupos controle e tratado. **Pulmão:** bronquíolo (Br), saco alveolar (As) e septos interalveolares podem ser visualizados, com arquitetura preservada no controle e nos grupos tratados com *C. dardanoi* (FA e CA) na concentração de 2000 mg/Kg. O ducto alveolar também pode ser visto em uma imagem. Não há sinais de degeneração, necrose/inflamação ou outras alterações. Em todas as preparações foi utilizada coloração com hematoxilina-eosina e as fotomicrografias retiradas com ampliação 100×.

Determinação de tais parâmetros é importante no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica, como nutrientes adequados e ingestão de água sendo essencial para o estado fisiológico dos animais (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003). Podemos ressaltar que nenhuma mortalidade foi observada, com $DL_{50} > 2000$ mg/Kg; classificando o óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) como seguro, de acordo com as diretrizes da OCDE (2001). Portanto, o óleo volátil da espécie poderia ser incluído na categoria 5 (baixo tóxico ou atóxico), de acordo com a classificação do Sistema Harmonizado Globalmente de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Brito (1994) e Vasconcellos et al. (2005) apontaram a importância dos ensaios hemolíticos resultantes da relevância e sua aplicação ao desenvolvimento de pesquisas científicas com materiais derivados de plantas, uma vez que determina o potencial tóxico da planta e a continuidade dos estudos.

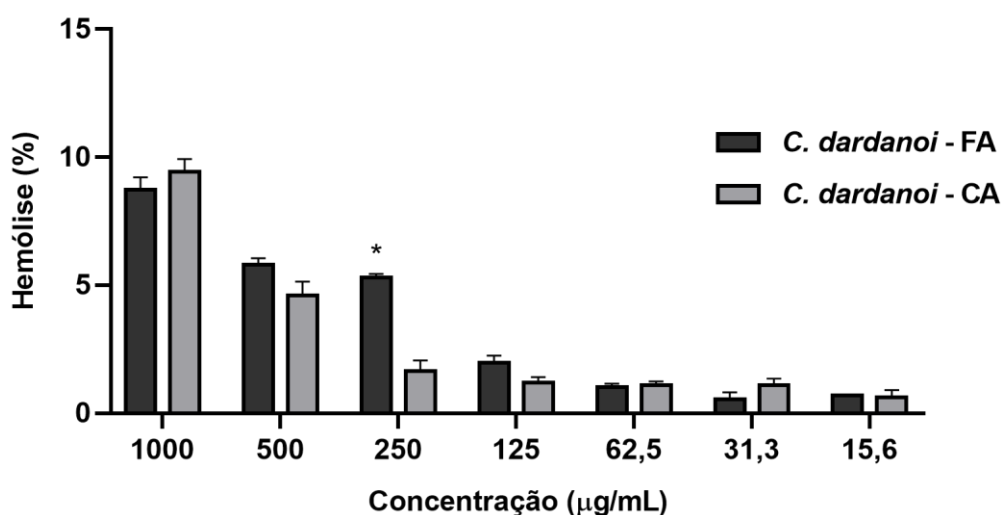
No teste de hemólise em eritrócitos de humanos *in vitro*, as taxas de hemólise variaram de $(8,73\% \pm 0,49$ FA a $9,44\% \pm 0,49$ CA) na concentração mais alta testada ($1.000 \mu\text{g/mL}$), permanecendo límpida a solução de soro fisiológico após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha havido a lise das células. Houve diferença significativa apenas na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$ entre os óleos de FA e CA, enquanto que as outras concentrações testadas não apresentaram diferença significativa entre os óleos obtidos dos dois domínios fitogeográficos (FA – Floresta Atlântica e CA – Caatinga) (Figura 15).

Esse resultado demonstrou que o óleo essencial de *C. dardanoi* (FA e CA) possui baixa toxicidade, uma vez que, a falta de atividade hemolítica e não danifica as membranas (JIMENEZ et al., 2003).

A realização deste teste torna-se necessário, pois a hemólise é caracterizada pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina e a hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (CARVALHO et al., 2007). O teste da hemólise é preconizado pela OMS no seu

manual de controle de qualidade de produtos vegetais (WHO, 1998), e também é encontrado como parte dos ensaios toxicológicos recomendados no Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003).

Figura 15 – Avaliação da atividade hemolítica do óleo essencial foliar de *Calyptanthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA).



Símbolos diferentes significam que houve diferença estatística entre os óleos essenciais para a mesma concentração. Teste t, não pareado * $p < 0,0001$ (FA e CA).

Na busca por novas substâncias que tem promissora atividade farmacológica e que não causem efeitos nocivos para o corpo, ensaios investigando a capacidade dos produtos naturais de causar ação hemolítica, dissolvendo ou aumentando a permeabilidade da membrana celular dos eritrócitos, são amplamente usados (ARAÚJO et al., 2013).

CONCLUSÃO

As folhas de *Calyptanthes dardadnoi* (FA e CA) proporcionaram uma composição química semelhante com predomínio de (E) - cariofileno. O óleo essencial não apresentou toxicidade na dose de 2.000 mg/Kg a mais alta preconizada pela OECD 423, como também não foi observado toxicidade às membranas dos eritrócitos avaliados pelo ensaio da atividade hemolítica. Foi evidenciado um potencial antioxidante e uma redução no processo inflamatório do edema de pata e redução na expressão de TNF- α observada nos modelos de inflamação aguda induzida por

carragenina, o que pode estar relacionada à capacidade de redução de migração celular. Pela primeira vez foi demonstrada a atividade farmacológica *in vivo* do óleo essencial de *C. dardanoi*, o que contribui para a validação dos dados etnofarmacológicos que já forma relatadas do gênero. No geral, o estudo indica o OE de *C. dardanoi* (FA e CA) como uma fonte natural promissora de substâncias químicas, compostos com baixos efeitos colaterais e potencial antioxidante e anti-inflamatório, que garante a seguridade para uso medicinal.

6 CONCLUSÃO

As folhas de *Calypttranthes dardanoi* coletadas em domínios fitogeográficos de Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) proporcionaram uma composição química semelhante com predomínio de (E) - cariofileno. Além disso, não foi apresentada toxicidade aguda do OE foliar da espécie (FA e CA) na dose (2.000mg/Kg) mais alta preconizada pela OECD 423, como também não foi observado toxicidade às membranas dos eritrócitos avaliados pelo ensaio da atividade hemolítica.

Observou-se uma redução do processo inflamatório no edema de pata e uma redução significativa da expressão de TNF- α no teste de peritonite aguda, ambos modelos de inflamação aguda induzida por carragenina. O que pode estar relacionado à capacidade de *C. dardanoi* reduzir a migração celular.

Este estudo indicou *C. dardanoi* como uma fonte natural promissora de compostos químicos com baixos efeitos colaterais e potencial antioxidante e anti-inflamatório, o que garante a seguridade para uso medicinal. Pela primeira vez foi demonstrada a atividade farmacológica *in vivo* do óleo essencial de *C. dardanoi*, o que contribui para a validação dos dados etnofarmacológicos que já forma relatadas do gênero.

REFERÊNCIAS

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, 25: 407–426, 2010. doi: 10.1002/ffj.2024.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2003.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**, 83: 209-217, 2002.

ALMEIDA, C.O.; COELHO FILHO, M.A.; ALBUQUERQUE, A.F.A.; ALVES, A.A.C.; SILVA, T.S.M. **Mapeamento de unidades de produção com variedades de mandioca recomendadas pela Embrapa: biomas Caatinga e Mata Atlântica**. Cruz das Almas, BA. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2015. 28 p.

ALVES-ARAÚJO, A.; ARAÚJO, D.; MARQUES, J.; MELO, A.; MACIEL, J.R.; UIRAPUÃ, J.; PONTES, T.; LUCENA, M.F.A.; BOCAGE, A.L.D; ALVES, M. Diversity of angiosperms in fragments of Atlantic Forest in the State of Pernambuco, northeastern Brazil. Bioremediation, **Biodiversity and Bioavailability**, 2: 14-26, 2008.

AMORIM, B. S.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Myrtaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, 62: 499-514, 2011.
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602011000300499&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 28 de dezembro de 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201162306>.

ANNADURAI, G.; ROSE, B.; MASILLA, P.; JOTHIRAMSHEKAR, S.; PALANISAMI, E.; PUTHIYAPURAYIL, S.; PARIDA, A.K. Antimicrobial, antioxidant, anticancer activities of *Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston Full Text Introduction. **Int J of Green Pharm**, 4: 4–5, 2012.

ARAÚJO, E.L.; CASTRO, C.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of Brazilian Caatinga a Review Concerning the Plants, Environment and People. **Functional Ecosystems and Communities**, 1: 15-29, 2007.

ARAÚJO, L.C.C.; AGUIAR, J.S.; NAPOLEÃO, T.H.; MOTA, F.V.B.; BARROS, A.L.S. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS ONE**, 8: e81973, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0081973.

ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, 81: 495-502, 2003.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 446-475, 2008.

BANSAL, A.; BOEHME, A.; EITER, L.M.; SCHMIDT, J.; SETZER, W.; VINCENT, M. Chemical composition and bioactivity of the leaf oil of *Calyptanthus pallens* (Poir.) Griseb. from Abaco Island, Bahamas. **Natural Product Communications**. 1: 303-306, 2006.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H.C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.2, Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 1991. 377p.
BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**, 334: 1717–1725, 1996.

BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. **Secondary plant products, in Encyclopedia Plant Physiology**. New York: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v. 8, 1980.

BENELLI, G.; GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; VASEEHARAN, B.; ALYAHYA, S.A.; ALHARBI, N.S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J.M.; MAGGI, F. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 148: 781-786, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.044>.

BEVILACQUA, A.H.; SUFFREDINI, I.B.; ROMOFF, P.; LAGO, J.H.; BERNARDI, M.M. Toxicity of apolar and polar *Lantana camara* L. crude extracts in mice. **Research in Veterinary Science**, 90: 106-115, 2011. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.001.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta- free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, 123-130, 1999.

BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1472p, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Renome 2013**, 8. ed. Brasília, 2013.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, São Paulo, 33, 2010.

BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C.; OLIVEIRA JR., R.S.; SCAPIM, C.A.; VOLL, E.; GAZZIERO, D.L.P. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, 22: 251-257, 2004.

BRITO, A.R.M.S. Toxicidade aguda (dose simples e doses repetidas), subcrônica e crônica. In: Brito, A.R.M.S. (Ed.), **Manual De Ensaio Toxicológicos in Vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP; Rio de Janeiro: Ed. Três, 15–50, 1994.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94: 223-253, 2004.

Calypttranthes in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10278>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, 18: 373-382, 2016.

CARVALHO, E.B.; BORGES, E.L.; CARLOS, L.M.B.; SILVA, M.A.M.; MAGALHÃES, S.M.M.; GOMES, F.V.B.A. F.; CARVALHO, M.J.C.; QUIXADÁ, A.T.S.; PITOMBEIRA, M.H.S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre os graus de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 29: 149-152, 2007.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004.

CECHINEL FILHO, V. **Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química - atividade biológica**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Florianópolis – SC, 1995. 99p.

CERQUEIRA, M.D. **Estudo Fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (Berg.) Legrand. (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado) - Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2002. 119 f.

CHAVES, F.C.M.; BILBY, M.R.C.; HIDALGO, A.F.; ÂNGELO, P.C.S.; BIZZO, H.R. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Calypttranthes* sp. (Myrtaceae). **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2007.

CHEN, H.; YUAN, J.; HAO, JI; WEN, Y.; LV, Y.; CHEN, LU; YANG, X. α -Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling. **Food and Chemical Toxicology**, 134:110830, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110830>.

CHENG, J.F., ISHIKAWA, A., ONO, Y., ARRHENIUS, T., NADZAN, A. Novel Chromene Derivatives as TNF- α Inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, 13: 3647–3650, 2003.

CHETAN, B.S.; NIMESH, M.S.; MANISH, P.P.; RANJAN, G.P. Microwave assisted synthesis of novel 4H-chromene derivatives bearing phenoxy pyrazole and their antimicrobial activity assess. **J Serb ChemSoc**, 77: 1165-1174, 2012.

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**, 35: 877–886, 2007.

CORREA, R.G.C.; SILVA, M.L.; MAIA, J.G.S.; GOTTLIEB, O.R.; MOURÃO, J.C.; MARX, M.C.; MORAIS, A.A.; MOURA, L.L.; MAGALHÃES, M.T. Óleos essenciais de espécies do gênero *Calypttranthes*. **Acta Amaz.** 2: 53, 1972.

COSTA, M.A.C.; JESUS, J.G.; FARIAS, J.G.; NOGUEIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, A.L.R.; FERRI, P.H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, 5: 53-65, 2008.

COSTA, J.P.; LOURENÇO, N.V.; SANTOS, C.C.M.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, G.F.; SOUSA, D.P.; AMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Apl**, 33: 421-428, 2012.

CRAGG, G.; NEWMAN D.J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.**, 77: 7–24, 2005.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia University: New York, 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**. 11: 47-52, 2004.

CUNHA, L.C. AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, Â.A.S.; JUNIOR, R.S.L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 403-411, 2009.

DANIEL, N.A.; SARTORETTO, S.M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ- ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 212-217, 2009. DOI: 10.1590/ S0102-695X2009000200006.

DARSHAN, S.; DORESWAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research: PTR**, 18: 343–57, 2004.

DAVEY, M.W.A.; VAN DEN BERGH, I.; MARKHAM, B.R.; SWENNEN, R.; KEULEMANS, J. Genetic variability in Musa fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutriente contentes. **Food Chemistry**, 115: 806-813, 2009.

DE SOUZA, L.I.O.; BEZZERA-SILVA, P.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; DA SILVA, A.G.; CORREIA, M.T.S.; DA SILVA, M.V.; DE FIGUEIREDO, R.C.B.Q. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomed Pharmacother*. 96:1055-1064, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.12.

DELVING, L.K.O.B. **Avaliação dos potenciais citotóxico e anti-inflamatório dos extratos etanólico e hexânico da *Calyptranthes grandifolia* O. Berg em cultura celular**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES – Lajedo - RS, 2015.

DEWICK, P.M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, 19:181–222, 2002.

DEXHEIMER, G.M. **Efeito do extrato de *Calypttranthes grandifolia* O. Berg (Myrtaceae) na expressão do TNF- α , NF- κ B e p38 α em células de adenocarcinoma colorretal (CACO-2).** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES – Lajedo - RS, 2015.

DEXHEIMER, G.M.; BECKER DELVING, L.K.O.; SULZBACH DE OLIVEIRA, H.; BIOLCHI, V.; GOETTERT, M.; POZZOBON, A. *Calypttranthes grandifolia* O.Berg (Myrtaceae) ethanolic extract inhibits TNF- α gene expression and cytokine release in vitro. **Molecular Medicine Reports**, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.6319.

DIALLO, A. Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 9: 463-467, 2010.

DOLARA, P.; LUCERI, C.; GHELARDINI, C.; MONSERRAT, C. Local Anaesthetic, Antibacterial and Antifungal Properties of Sesquiterpenes from Myrrh. **Planta Medica**, 66: 356-358, 2000.

DORMAN, D.H.J., DEANS, S.G., NOBLE, R.C. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural anti-oxidants. **Journal of Essential Oil Research**, 7: 645–651, 1995.

DRUMOND, M.A.; KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. **EMBRAPA/CPATSA**, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina, 2000.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. **Phytother. Res.**, 21: 308-323, 2007.

FALEIRO, D.; IMMICH, S.M.; MAJOLO, F.; MAYER, L.; ETHUR, E.M.; GOETTERT, M.I. GC/MS analysis and potential cytotoxic activity of *Calypttranthes grandifolia* (O. Berg), *Calypttranthes triconda* (D. Legrand) and *Myrciaria plinioides* (D. Legrand) essential oil in RAW264.7 and CHO-K1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 89: 1431-1441, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.040>.

FARIAS, M.R. Em Farmacognosia da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK. Avaliação da Qualidade de matéria primas vegetais. 5.ed. **Porto Alegre: UFSC e UFRGS**, 1999.

FERNANDES, C.P.M., FÉLIX, S.R., NOBRE, M.O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão Toxicity of herbal medicines with interest to SUS: a review, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, 37: 83-96, 2016.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenácea*. **European Journal of Pharmacology**, 569: 3: 228-236, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>.

FERREIRA-MACHADO, S.C., GAGLIARDI, R.F., NUNES, A.P.M., RODRIGUES, M.P., DANTAS, F.J.S., DE MATTOS, J.C.P., PEREGRINO, C.A.F., MOURA, E.G., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Antidiabetic and genotoxic effects on Wistar rats treated with aqueous extract from *Chrysobalanus icaco* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, 8: 52-57, 2014. doi: <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5312>.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O.H.; ANDERSEN, P.S.; GIRARDIN, S.E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clinical and Experimental Immunology**, 147: 227–35, 2007.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZĄDAŁA, L.; SZUMNY, A. β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, 10: 2045-7634, 2016. doi: 10.1002/cam4.816.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção, 2007. In: FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3rd ed., pp. 1–18. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food Composition and Analysis**, 24: 1043–1048, 2011.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Barcelona: Labor, 1988.

FORZZA R.C.; STEHMANN, J.R.; NADRUZ, M.; COSTA, A.; CARVALHO JÚNIOR, A.A. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>>. Acesso em: 29 de dezembro de 2019.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade microbiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 191-194, 2005.

FRODE, T.S. **Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida por carragenina em camundongos**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis – SC, 2000.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e

perspectivas. **Fundação SOS Mata Atlântica Conservação Internacional**. Belo Horizonte, 2005. pp. 3-11.

GALVÃO, L.C.C.; FURLETTI, V.F.; BERSAN, S.M.F.; CUNHA, M.G.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/751435>.

GIULIETTI, A.M.; BOCAGE NETA, A.L.; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO, J.F.; QUEIROZ, L.P.; FIGUEIREDO, M.A.; RODAL, M.J.N.; BARBOSA, M.R.V.; HARLEY, R.M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010.

GIULIETTI, A.M.; NETA, A.L.B.; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO, J.F.; QUEIROZ, L.P.; FIGUEIREDO, M.A.; RODAL, M.J.N.; BARBOSA, M.R.V.; HARLEY, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.M.T.; FONSECA, M.T. (Eds). **Biodiversidade da Caatinga, Áreas e Ações Prioritárias para a Conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 48–90, 2004.

GIULLIETTI, A.M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L.P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 488, 2006.

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.; BORIN, M. **Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico**, Ed. UFRJ: Rio de Janeiro, 1996.

GRADSTEIN, S.R.; RAEYMAEKERS, G. Regional overviews. Tropical America (incl. Mexico). pp. 38-44. In: T. Hallinbäck & N. Hodgetts (eds.) Mosses, liverworts and hornworts. Status Survey and Conservation Action Plan for Bryophytes. **IUCN SSC Bryophyte Specialist Group**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2000.

GRANATO, E.M.; GRANATO, M.M.; GERENUTTI, M.; SILVA, M.G.; FERRAZ, H.O.; MARIA, M.; CARVALHO, D. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Revista Brasileira de Farmácia**, 94: 130–135, 2013.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27: 1–93, 2006.

HANÈNE, M.; AMEUR, E.; LARBI, K.M. et al. Chemical composition of the essential oils of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *rufescens* (L. K.) and *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* (S. & m.) Ball. and their antioxidant activities. **Nat Prod Res.**, 26:810-820, 2012. doi:10.1080/14786419.2011.558014.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 80: 177-188, 1996.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, London, 32: 1141-1148, 1983.

HAYES, W.A.; DISPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritation. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4 ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HENRIETTE, G.; LORRAINE, L.; BETTINA, H.; CLEMENCE, D.; DONG, K.; IRENEJ, K.; CUSTEAU, D.; BOUDREAU, C.; GEERTS, L.; CAI, S.X.; DREWE, J.; LABRECQUE, D.; KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. **Mol Cancer Ther.** 3: 1375-84, 2004.

HUANG, G.J.; PAN, C.H.; LIU, F.C.; WU, T.S.; WU, C.H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide stimulated RAW246.7 macrophages and the k-carrageenan- induced paw edema model. **Food Chemical Toxicology**, 50: 1485-1493, 2012.

HUBER, L.S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Phytochemistry**, 66: 1427-1439, 2005.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, 3: 1-24, 2012. doi: 10.3389/FMICB.2012.00012.

IBGE. Departamento de Recurso Naturais e Estudos Ambientais. **Manual técnico da vegetação brasileira, 2006**. Série Manuais técnicos em geociências, número 1. Rio de Janeiro, 1992. 93 p.

IBGE. **IBGE lança o Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade**, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47: 565–573, 2001.

IVERSEN, P.O.; NICOLAYSEN, G. Water-for Life. **Tidsskrift for Den Norske Laegeforening**, 123: 3402–3405, 2003.

JIMENEZ, P.C.; FORTIER, S.C.; LOTUFO, T.M.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **J. Exp. Mar. Bio. Ecol.**, 287: 93–101, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00499-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00499-9).

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics**. A phylogenetic approach. Inglaterra, Sinauer Associates Inc., 1999. p. 383.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 87: 1–7, 2010.

KERRIGAN, P.K. Natural Product Chemistry: A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach, Second Edition (Torssell, Kurt B. G.). **Journal of Chemical Education**, 76: 759, 1999. doi: 10.1021/ed076p759.2.

KHIEV, P.; CAI, X.F.; CHIN, Y.W.; AHN, K.S.; LEE, H.K.; OH, S.R. Cytotoxic Terpenoids from the Methanolic Extract of *Bridelia cambodiana*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. 52, 2009. doi: 10.3839/jksabc.2009.104.

KICH, D.M.; BITENCOURT, S.; ALVES, C.; SILVA, J.; PINTEUS, S.; PEDROSA, R.; LAUFER, S.A.; SOUZA, C.F.; GOETTERT, M.I. Neuromodulatory effects of *Calyptanthus grandifolia* extracts against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Biomedecine & pharmacotherapie**, 84: 382-386, 2016.

KIERNAN, J. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Long Island, 2008.

KIM, K.J.; YOON, K.Y.; LEE, B.Y. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. **Fitoterapia**, 83: 1628–1635, 2012.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, Maryland, 125: 58-60, 2001.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, M. J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Review. Progress in Lipid Research**, 46: 244-282, 2007.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil ñ an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, 49: 508-536, 1997.

LARSON, R.A. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 195, 1997.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; FONSECA-KRUEL, V.S; SILVA, I.M; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24: 225- 247, 2014.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, 3: 4-11, 2007.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; MELO, B.A.; VIEIRA, S.S. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphisgraminum* (Rondani, 1852). **Arquivos do Instituto Biológico**, 81: 22-29, 2014. doi: 10.1590/S1808-16572014000100005.

LIMBERGER, R.P.; SIMÕES-PIRES, C.A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, 38: 355-360, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000300011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 de dezembro de 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000300011>.

LIMBERGER, R.P.; SIMÕES-PIRES, C.A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38: 355-360, 2002.

LINDROTH, R.L.; HSIA, M.T.S.; SCRIBER, J.M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **BIOCHEM. Syst. Ecol.**, 15: 681, 1987.

LOBO-ECHEVERRI, T.; RIVERO-CRUZ, J.F.; SU, B.; CHAI, H.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Constituents of the Leaves and Twigs of *Calyptanthes pallens* Collected from an Experimental Plot in Southern. **J. Nat. Prod.**, 68: 577-580, 2005. doi: <https://doi.org/10.1021/np0496688>.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, 104: 487–501, 2001.

MACHADO, K.C.; ISLAM, M.T.; ALI, E.S.; ROUF, R.; UDDIN, S.J.; DEV, S.; SHILPI, J.A.; SHILL, M.C.; REZA, H.M.; DAS, A.K.; SHAW, S.; MUBARAK, M.S.; MISHRA, S.K.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, 32: 2376–2388, 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.6199>.

MACHADO, R.M.A.; MUSSI-DIAS, V.; SOUZA, C.L.M.; SILVA, L.B.; FREIRE, M.G.M. Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento in vitro do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Biologia e Saúde**, 8: 64-75, 2013.

MACIEL, M.A.; PINTO, J.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas Medicinais: A necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, 25, 2002.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, 7:1015–26, 1995.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.**, 15: 127-130, 2001.

MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; NTALANI, H.; VERIN, P.; HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R. Two chromene derivatives from *Calyptanthus tricona*. **Phytochemistry**, 53: 975–979, 2000.

MEOT-DUROS, L.; LE FLOCH, G.; MAGNÉ, C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. **J. Ethnopharmacol**, 116: 258–262, 2008.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. **Oxford: Clarendon**, 1: 621-31, 1950.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, 15: 9252–87, 2010.

MILAN, M.; MIRJANA, M.; DESANKA, B.; SANJA, M.; NEDA, N.; VLADIMIR, M.; NENAD, V.; SLOBODAN, S.; SLAVICA, S. In vitro antioxidant of selected 4-Hydroxy-chromene-2-one derivatives SAR, QSAR and DFT studies. **Int J Mol Sci**, 12: 2822-41, 2011.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8 edição. São Paulo: Editora Arheneu, 1999. 607p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Instituto Chico Mendes. Caatinga**, 2012. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/caatinga>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

MIRDEHGHAN, S.H.; RAHEMI, M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Scientia Horticulturae**, 111: 120-127, 2007.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOUREX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington DC: Cemex, 2004. 392p.

MONTERA, V. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. **Revista da SOCERJ**, 20: 20–27, 2007.

MORALES, R. Taxonomia de los géneros *Thymus* (excluida la sección Serpyllum) y *Thymbra* en la Península Ibérica. **Ruiza**, 3: 1–324, 1986.

MOSCA, V.P.; LOIOLA, M.I.B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, 22: 225-234, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2012. **Journal of Natural Products**, 75: 311-35, 2012. doi: 10.1021/np200906s.

NIRMAL S.A.; GIRME, A.S.; BHALKE, R.D. Major constituents and anthelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. **Natural Product Research**, 13: 1217-1220, 2007.

OECD. **OECD Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**, 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocus/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2019.

OLIVEIRA, R.B., GODOY, S.A.P., COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 64, 2003.

OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; PESSOA, R.T.; FERNANDES, M.N.M.; ALCÂNTARA, I.S.; SILVA, B.A.F.; OLIVEIRA, M.R.C.; MARTINS, A.O.B.P.B.; SILVA, M.S.; TINTINO, S.R.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; LIMA, S.G.; KERNTOPF, M.R.; SILVA, T.G.; MENEZES, I.R.A. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in vivo models, **Phytomedicine**, 41: 82-95, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.004>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005**. Ginebra: OMS, 2002.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. São Paulo: Annablume: FAPESP, 2000. 216 p.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; FUTURO, D.O.; PAIVA, S.R.; KAPLAN, M.A.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, 104: 225-233, 2006.

PEREIRA, A.Q.; CHAVES, F.C.M.; PINTO, S.C.; LEITÃO, S.G.; BIZZO, H.R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Essent. Oil Res.**, 23: 20–23. 2011.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1-10, 2004.

PICOLI, A.A.; FARIA, D.B.; JOMORI, M.L.L.; KLUGE, R.A. Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. **Bragantia**, Campinas, 69, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052010000400025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 de janeiro de 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000400025>.

PINHO, J.P.; SILVA, A.S.; PINHEIRO, B.G.; SOMBRA, I.; BAYMA, J.C.; LAHLOU, S.; SOUSA, P.J.; MAGALHÃES, P.J. Antinociceptive and antispasmodic effects of the essential oil of *Ocimum micranthum*: potential anti-inflammatory properties. **Revista Planta Medica**, 78: 681-685, 2012. doi: 10.1055/s-0031-1298372.

PINTO, L. P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. (Ed.). **Biologia da conservação: essências**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 91-118.

PIRES JUNIOR, H.B. **Efeitos toxicológicos agudos de estrato de frutos verdes de *Meliaazedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattusnovergiucus*), camundongos (*Musmusculares*) e *Artemia salina***. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás – GO, 2010. 70f.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Sci. Technol**, 40: 1-11, 2007.

PRADO, P.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R; TABARELLI, M; SIVAL, J.M.C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**, Recife, 3-74, 2003.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Anal Biochem**. 269: 337–341, 1999.

PROENÇA DA CUNHA, A.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. **Fármacos Aromáticos (Plantas Aromáticas e Óleos essenciais**. Fundação Calouste Gulbenkian, Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa, 2010. p. 670.

PROENÇA DA CUNHA, A.; ROQUE, O.; NOGUEIRA, M. **Plantas aromáticas e óleos essenciais composição e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 2012. p. 678.

PURCHASE, I.F.; BOTHAM, P.A.; BRUNER, L.H.; FLINT, O.P.; FRAZIER, J.M.; STOKES, W.S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, 43: 86-101, 1998.

RAMBALDI, D.M.; MAGNANI, A.; ILHA, A.; LARDOSA, E.; FIGUEIREDO, P.; OLIVEIRA, R.F. **A reserva da biosfera da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro**. Caderno 22, 2 edição. CETESB, São Paulo. 2003. 61p.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, 35: 305-309, 1997.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613, 2001. doi: 10.1016/s0041-0101(00)00154-9.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.

REN, Q.; SIAU, W.Y.; DU, Z.; ZHANG, K.; WANG, J. Expeditious assembly of a 2-Amino-4H-chromene skeleton by using an enantioselective mannich intramolecular ring cyclization–tautomerization cascade sequence. **Chem Eur J**, 17: 7781–7785, 2011.

RICKILEFS, R.E. 2003. **A economia da natureza**. 5. Ed. Guanabara Koogan, 542 p. RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 18: 373-386, 2007.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20: 981-991, 2010.

RODRIGUES, V.R.F. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Thymus zygis subsp. sylvestris* e dos seus compostos principais**.

Dissertação de mestrado em Segurança Alimentar, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra - Portugal, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008.

ROUPHAEL, Y.; SCHWARZ, D.; KRUMBEIN, A.; COLLA, G. Impacto f grafting on product quality of fruit vegetables. **Scientia Horticulturae**, 127: 172-179, 2010.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, 69: 167-174, 2000.

SÁ, B.M. **ESTUDO DA TOXIDADE NÃO CLÍNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, MACAPÁ, 2014. 111 f.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine modelo f pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, 118: 811-819, 1996.

SALLEH, W.M.N.H.; KAMMIL, M.F.; AHMAD, F.; SIRAT, H. M. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Essential Oil and Extracts of *Piper miniatum*. **Natural Product Communications**, 2015. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001151>.

SANDINI, T.M.; BERTO, M.S.; SPINOSA, H.S. Senecio brasiliensis e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, 26: 83-92, 2013.

SANTOS, F.A.; COSTA, A.M.L.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Estudo da atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Psidium guayanensis* Pers. (araçá-azedo). **Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**: F-012, 1996a.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Atividade antinociceptiva resistente ao naxolone do óleo essencial de *Psidium pholianum* Berg (araçá-doce). **Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**: F-050, 1996b.

SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**, 19: 16573-16587, 2014. doi: 10.3390/molecules191016573.

SHAFAGHAT, A.; OJI, K. Nepetalactone content and antibacterial activity of the essential oils from different parts of *Nepeta persica*. *Nat Prod Commun.*, 5(4):625-628, 2010.

SHAHIDI, F. **Antinutrients and phitochemicals in food**. Washington, DC.: American Chemical Society, 1997. 344 p. (ACS Symposium Series, 662).

SHAHIDI, F.; HO, C-T. **Phenolic compounds in foods and natural health products**. Washington, DC.: American Chemical Society, 2005. 320 p. (ACS Symposium Series, 909).

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 576 p.

SHAKRI, N.M.; SALLEH, W.M.N.H.W.; KHAMIS, S.; MOHAMAD, ALI N.A.; SHAHARUDIN, S.M. Chemical composition of the essential oils of four *Polyalthia* species from Malaysia [published online ahead of print, 2020 Jul 7]. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2020. doi:10.1515/znc-2020-0097.

SHARON, A.; CENTER, D.M.V. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, 1166-1183, 1995.

SHEWFELT, R.L. Sources of variation in the nutriente contente of agricultural commodities from the farm to the consumer. **Journal of Food Quality**, 13: 37-54, 1990.

SILVA, E. A. J. et al. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Braz. J. Biol.**, 79: 697-702, 2019. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842019000400697&lng=en&nrm=iso>. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.189089>.

SILVA, F.C.A.; TEIXEIRA, A.A.C.; TEIXEIRA, V.W. Efeito da iluminação constante sobre a placenta de ratas: um estudo morfológico, morfométrico e histoquímico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 67: 698-706, 2015.

SILVA, J.M.C.; CASTELETI, C.H.M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. pp. 43-60. In: C. Galindo-Leal, & I.G. Câmara (eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica, Belo Horizonte, Conservação Internacional, 2005.

SILVA, M.; SCHLINDWEIN, C.; RAMALHO, M. Padrão De Forrageio de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *Ordinaria* (Hymenoptera, Apidae) Em Ambiente De Caatinga, Vale Do Catimbau-Pernambuco. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Minas Gerais, 2007.

SILVA, M.I.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: ciências agrárias**, 31: 669-682, 2010.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can Be explored for drug development, Evid.-Based Complement. **Alternat. Med.**, 1: 29, 2015.

SILVEIRA E SÁ, R.; ANDRADE, L.; OLIVEIRA, R.; SOUSA, D. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, 19: 1459–1480, 2014.

SILVEIRA E SÁ, R.; ANDRADE, L.; SOUSA, D. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, 18: 1227–1254, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 1999.

SINGH, J.; UPADHYAY, A.K.; PRASAD, K.; BAHADUR, A.; MATHURA RAIJAGDISH SINGH A.K. UPADHYAY, PRASAD, K.; BAHADUR, A.; RAI M. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in brassica vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20: 106-112, 2007.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 16: 38-43, 2000.

SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 43: 9-11, 1994.

SOARES-SILVA, L.H. **A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Campinas – SP, 2000.

SOBRAL, M.; LUCAS, E.; LANDRUM, L.; SOARES-SILVA, L. Myrtaceae. In: STHEMAN, J.R.; FORZZA, R.C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D.P.; KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**, Rio de Janeiro, 2009. pp. 352-366.

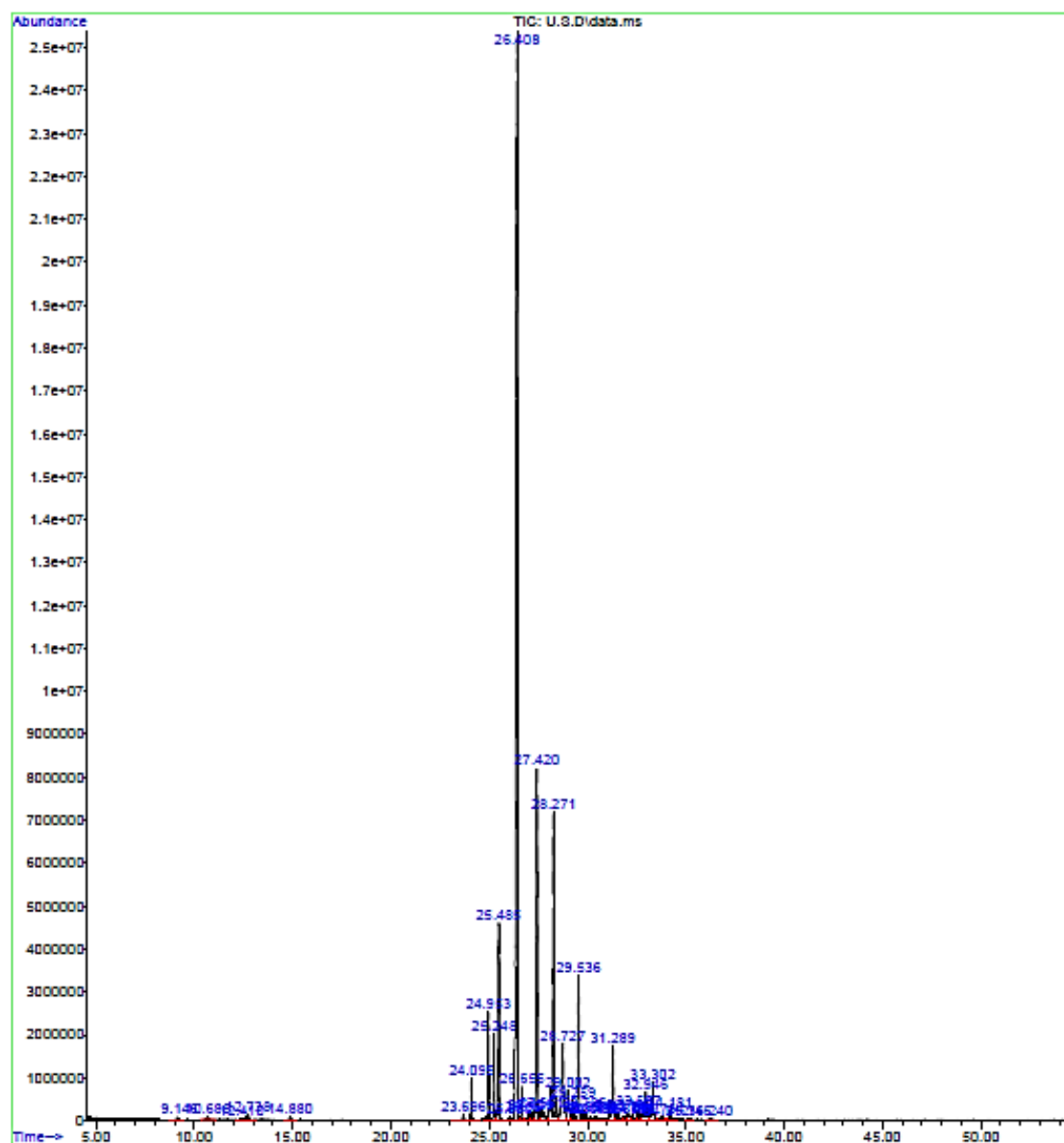
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 03 de novembro de 2019.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.E.B. *Siphoneugena delicata* (Myrtaceae), a new species from the Montane Atlantic Forests of Southeastern Brazil. **Novon**, 16: 530-532, 2006.
- SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial**, 43, 2007.
- SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, 17: 97-103, 1985.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1ª. ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005. p. 640.
- STEHMANN, J.R.; FORZZA, R.C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COST, D.P.; KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 505 p.
- SUCKOW, M.A.; FRANKLIN, C.L.; WEISBROTH, S.H. **The Laboratory Rat**, Academic Press, Londres: Elsevier, 2. ed., 2006.
- SURESH, T.; ARUNIMA, V.; ATIN, K.; SANDEEP, G.; PRARTHANA, V.R.; GANESH, R.K. Novel chromeneimidazole derivatives as antifungal compounds: synthesis and in vitro evaluation. **Acta Pol Pharm**, 67: 423-427, 2010.
- TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraeain* rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 132: 48-55, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.
- TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. (Trad.). SANTAREM E.R. et al. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAK, P.P.; FIRESTEIN, G.S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, 107:7–11, 2001.
- TAN, W.; LU, J.; HUANG, M.; LI, Y.; CHEN, M.; WU, G.; WANG, Y. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese Medicine**, 6: 27-36. 2011.
- TAPPIN, M.R.R., PEREIRA, J.F.G., LIMA, L.A., SIANI, A.C., MAZZEI, J.L., RAMOS, M.F. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, 27: 236–240, 2004.

- THOMAS, N.; ZACHARIAH, S.M. PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF CHROMENE DERIVATIVES: AN OVERVIEW. **Asian Journal of Pharmaceutival and Clinical Research**, 6: 2–6, 2013.
- TOLONEN, A. **Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L and *Rhodiola Rosea* L.** Department of Chemistry, University of Oulu, Oulu, 2003.
- TUROLA DOS REIS, M.S.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42: 289-306, 2006.
- VALADARES, M.C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3: 93-98, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 15 de dezembro de 2019.
- VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITÃO, G.C.G.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. Zeitschrift fur Naturforsch. **Sect. C J. Biosci.**, 60: 394–398, 2005. doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2005-5-605>.
- VITALE, R.F.; RIBEIRO, F.A.Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha media. **Rev.Bras Otorrinolaringologia**, 1: 123 – 127, 2007.
- WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin. Discovery to clinic. **Annals of New York Academy of Science**, 803: 1-12, 1996.
- WANG, W.; LI, N.; LUO, H.; ZU, Y.; EFFERTH, T. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. **Molecules**, 17: 2704-2713, 2012. doi: [10,3390/molecules17032704](https://doi.org/10.3390/molecules17032704).
- WANG, W.; TYAN, Y.; CHEN, Z.; LIN, C.; YANG, M.; YUAN, S.; TSAI, W. Evaluation of the Antioxidant Activity and Antiproliferative Effect of the Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seed Extracts in Oral Carcinoma Cells. **BioMed Research International**, 7: 1–7, 2014.
- WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**, 1998. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced oedema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 111: 544-547, 1962.
- ZENGIN, G. et al. Chromatographic Analyses, In Vitro Biological Activities, and Cytotoxicity of Cannabis sativa L. Essential Oil: A Multidisciplinary Study. **Molecules** 2018, 23, 3266.

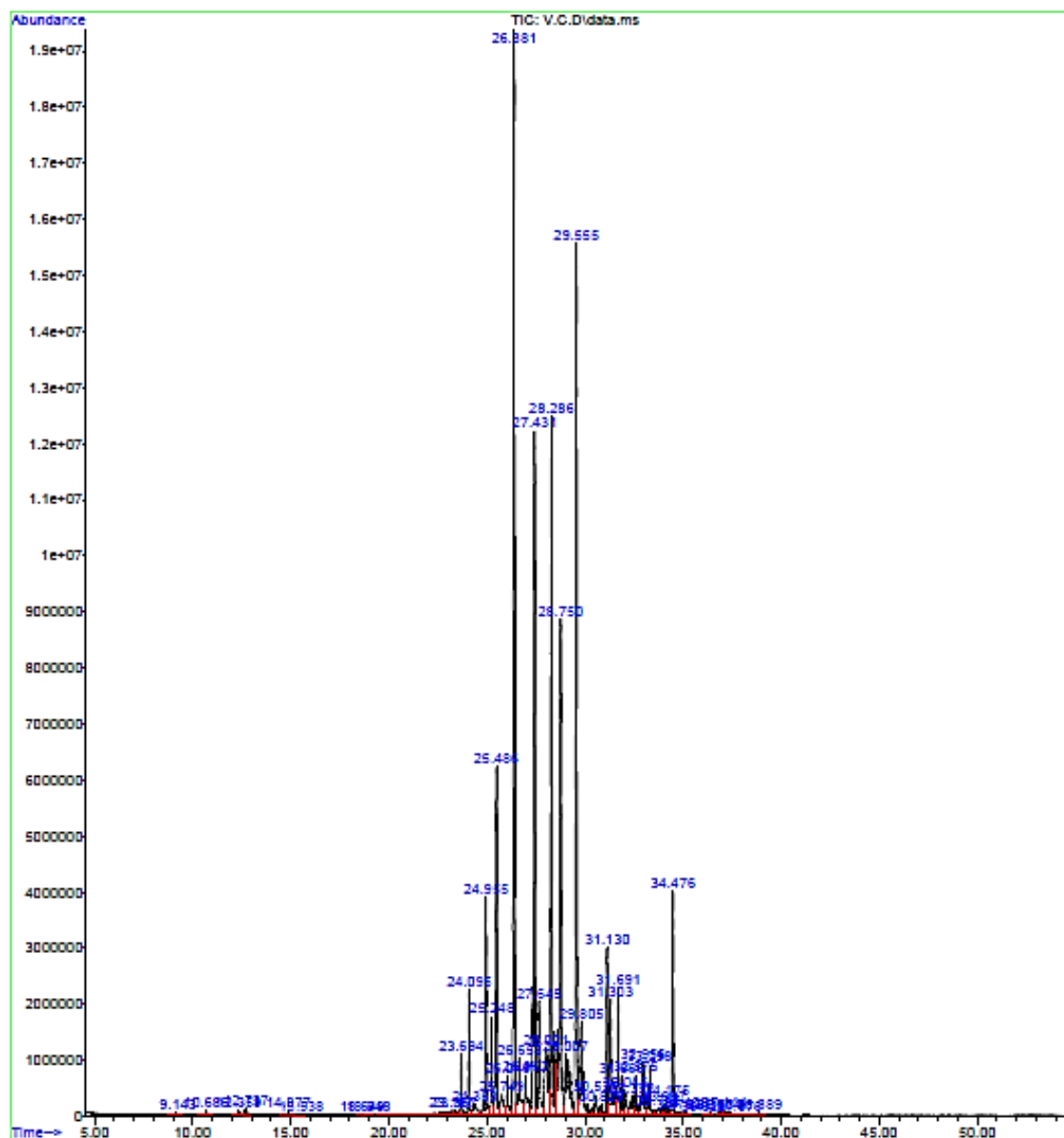
ZHANG, H.; CHEN, F.; WAN, X.; YAO, H.Y. Evaluation of antioxidant activity of arslay (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, 39: 833–839, 2006.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M.J.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Antidermatophytic activity of essential oils. **Formatex**, 1167–1178, 2011.

Apêndice A – Cromatograma caracterização química do óleo essencial foliar de *Calyptroanthus dardanoi* ocorrente na Floresta Atlântica (FA).



Apêndice B – Cromatograma da caracterização química do óleo essencial foliar de *Calyptroanthus dardanoi* ocorrente na Caatinga (CA).



Anexo A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética Animal (CEUA – UFPE).



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 3126 0042
ceua@ufpe.br

Recife, 16 de outubro de 2019

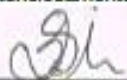
Ofício nº 88/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº0049/2019

Certificamos que a proposta intitulada " Composição e Atividade Biológica do Óleo Essencial Foliar de *Calyptranthes dardanoi* Mattos (Myrtaceae) Ocorrente na Zona da Mata e Caatinga". registrado com o nº 0049/2019 sob a responsabilidade de Prof. Maria Tereza dos Santos Correia o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 24/09/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro de 2019/ janeiro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	171
Peso/Idade	190-220 g / 60 dias
Sexo	Machos (48) e Fêmea (123)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (LAFAC) da Universidade Federal de Pernambuco
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos (Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental – LAFAC)

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUAUFPE
SIAPE 2345601