



* B R 1 0 2 0 2 2 0 1 4 7 8 0 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022014780-9 A2

(22) Data do Depósito: 26/07/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
30/01/2024

(54) **Título:** ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE CALYPTRANTHES DARDANOI MATTOS (MYRTACEAE) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO

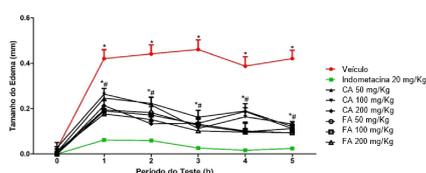
(51) **Int. Cl.:** A61K 36/61; A61P 29/00; A61P 39/06.

(52) **CPC:** A61K 36/61; A61P 29/00; A61P 39/06.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** RAYZA HELEN GRACIANO DOS SANTOS; MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA; ANTONIO FERNANDO MORAIS DE OLIVEIRA; JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA; VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA; JÚLIO CÉSAR RIBEIRO DE OLIVEIRA FARIAS DE AGUIAR; DANIELA MARIA DO AMARAL FERREZ NAVARRO.

(57) **Resumo:** ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE CALYPTRANTHES DARDANOI MATTOS (MYRTACEAE) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO. A presente invenção descreve a composição química encontrada no óleo essencial foliar de *C. dardanoi* obtido a partir de dois domínios fitogeográficos (Floresta Atlântica e Caatinga). Para tanto, o óleo essencial foi extraído em condições especiais de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger. Os componentes majoritários encontrados em *C. dardanoi* da Floresta Atlântica (FA) foram: (E) - Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%), α -Humuleno (9,09%) e Beta-Elemento (5,29%) e no óleo essencial de *C. dardanoi* oriundo da Caatinga (CA): (E) - Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%) e Alfa-Humuleno (9,86%). Os componentes encontrados na composição química apresentam grande relevância para as indústrias que fazem uso das propriedades antioxidantes e anti-inflamatória evidenciadas. A invenção indica o OE de *C. dardanoi* (FA e CA) como uma fonte natural promissora de substâncias químicas, compostos com baixos efeitos colaterais, que garante a seguridade para uso medicinal além de possuir potencial antioxidante e antiinflamatório.



ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata-se de o processo de obtenção do óleo essencial foliar de *Calyptanthes dardanoi* (Myrtaceae) a partir de dois domínios fitogeográficos (Mata Atlântica e Caatinga) e seu potencial biotativo. O óleo essencial da espécie obtido da Floresta Atlântica (FA) apresentou como componentes majoritários o (E) -Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%), α -Humuleno (9,09%). Enquanto que os componentes majoritários do óleo essencial foliar oriundos da Caatinga (CA) encontrados foram: (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%), α -Humuleno (9,86%). Os resultados sugerem que o óleo essencial de *C. dardanoi* obtido de Floresta Atlântica e Caatinga é detentor de diversas aplicações em algumas áreas, são elas: alimentícia, farmacêutica e da cosmética por ser uma fonte promissora de constituinte antioxidante, anti-inflamatório e não tóxico.

Fundamentos da Invenção

[002] Muitas plantas são utilizadas de maneira indireta na medicina popular sendo essa prática estendida através de séculos. Essa prática despertou na comunidade científica um grande interesse em ampliar o conhecimento de forma multidisciplinar através das áreas da etnobotânica, fitoquímica e farmacologia, a fim de buscar subsídios que possam classificar a utilização ou a não utilização da espécie como medicamentosa (MACIEL et al., 2002).

[003] Os óleos essenciais são agentes terapêuticos e constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis que são 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, e isso se deve as condições específicas de clima, solo, localização geográfica, exposição à luz solar e temperatura.

[004] A Floresta Atlântica também representa um importante domínio fitogeográfico brasileiro que possui elevada biodiversidade, devido às variações de relevo, regimes pluviométricos e unidades fitogeográficas (RAMBALDI et al., 2003; PINTO et al., 2006).

[005] Tanto na Caatinga como na Floresta Atlântica inúmeras espécies endêmicas possuem um potencial medicinal subexplorado. A necessidade pela busca de tratamentos mais eficazes, acessíveis e de fácil obtenção vem crescendo há alguns anos, este fato é atribuído devido ao interesse pela pesquisa de novas substâncias bioativas que são derivadas de produtos naturais (MEOT-DUROS et al., 2008; SILVA-CARVALHO et al., 2015), e, entre essas substâncias se encontram os óleos essenciais.

[006] Os óleos essenciais oriundos das plantas medicinais e aromáticas, são detentores de muitas potencialidades, além das atividades biológicas que lhes são atribuídas: antioxidantes, bactericidas, fungicidas, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, anti-inflamatórias. Dentre essas citadas, o potencial antioxidante e anti-inflamatório evidenciado em algumas espécies são de grande interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2007; MIGUEL, 2010; ZUZARTE et al., 2011).

[007] Os óleos essenciais e seus constituintes possuem propriedades terapêuticas que lhes são conferidas, pela ação de algum dos seus diversos constituintes ou pelo sinergismo entres eles (PROENÇA DA CUNHA et al., 2010). Portanto, por muitas vezes a bioatividade dos óleos essenciais é devida não apenas a um componente, mas sim à ação combinada entre os seus constituintes.

[008] 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).

[009] 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).

[0010] Os óleos voláteis, são capazes de eliminar alguns radicais livres, principalmente aqueles que possuem compostos com um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados ao anel aromático, instaurações e elétrons disponíveis para serem doados (CARVALHO, 2004). Além disso, eles podem atuar como agentes anti-inflamatórios, uma vez que a resposta inflamatória está relacionada ao poder oxidativo que ocorre em diversas células (monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos).

[0011] A atividade anti-inflamatória que é evidenciada em alguns óleos essenciais pode ser atribuída não apenas à sua atividade antioxidante, como também às suas interações com cascatas de sinalização intracelular que conseqüente aumentam da expressão de genes pró-inflamatórios, que são denominadas citocinas (MIGUEL, 2010).

[0012] As plantas medicinais e seus metabólitos são muito utilizados na medicina popular para o tratamento de diferentes condições inflamatórias (SILVEIRA E SÁ et al., 2013). Neste sentido, a utilização de fármacos anti-inflamatórios constitui uma ferramenta eficaz na prevenção ou tratamento de doenças associadas a um componente inflamatório.

[0013] Analisando o grande percentual de plantas que ainda não foram cientificamente estudadas, ou que são desconhecidas, existe um considerável número de espécies e

compostos bioativos a serem explorados. O Brasil é detentor de quase um terço do total da flora mundial além de possuir grande biodiversidade, indicando, portanto, um caminho a ser explorado na classe de compostos fitoquímicos (GRANATO et al., 2013).

[0014] Após a realização de uma busca detalhada pelos pedidos de patentes com o gênero *Calyptranthes* foi observado que não possui nenhum registro do gênero e nem da espécie *C. dardanoi*, acerca do processo de obtenção do óleo essencial, composição química e o potencial bioativo. Sendo feita a busca por registros de patentes da família Myrtaceae, foram encontrados alguns registros de *Eugenia uniflora* L (BR1020160250064), *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. BERG (BR1020120177889), *Eugenia pyriformis* Cambess (BR1020120152452), *Myrcia multiflora* e *Myrcia uniflora* (PI0001842-2). Portanto, só foi possível identificar registros da família vegetal, sendo de grande importância o conhecimento do perfil químico do óleo essencial foliar de *Calyptranthes dardanoi* Mattos ainda bem como, suas potencialidades bioativas associadas ao gênero.

Vantagens da Invenção

[0015] O óleo essencial de *C. dardanoi* obtido de Floresta Atlântica e Caatinga demonstra ser uma fonte promissora de constituinte antioxidante, sendo de grande interesse na pesquisa de novas moléculas com possível impacto em doenças que apresentam o estresse oxidativo como fenomenologia básica.

[0016] Além de possuir propriedades anti-inflamatórias reduzindo significativamente a inflamação nos testes realizados, corroborando com a caracterização química do óleo essencial, uma vez que, alguns dos componentes majoritários presentes na composição (cariofileno, germacreno D e α -Humuleno) são agentes anti-inflamatórios, onde, além de ações anti-inflamatórias, podem ter ação analgésica, antipirética e antioxidante.

[0017] E sobretudo, não tóxico, não causando alterações nos níveis séricos dos parâmetros hematológicos (Leucócitos, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, VCM,

HCM, CHCM, RDW, Linfócito, Monócito e Granulócito) e bioquímicos (Creatinina, Colesterol Total, Glicose, ALT, AST, Ureia). Pode-se 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).

Breve Descrição da Invenção

[0018] A presente invenção resultou em uma composição química do óleo essencial semelhante entre os dois domínios fitogeográficos onde foram obtidos. Os componentes majoritários encontrados em *C. dardanoi* da Floresta Atlântica (FA) 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%). Enquanto que para o óleo essencial de *C. dardanoi* oriundos da Caatinga (CA) 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%). Além disso, o óleo essencial não apresentou toxicidade e são fontes de potenciais antioxidantes e anti-inflamatórios.

Breve descrição das Figuras

Figura 1 – Representante de *Calypttranthes dardanoi*. Figura 2 – Demonstração do processo de obtenção do óleo essencial. Figura 3 – Rendimento percentual do óleo essencial foliar de *Calypttranthes dardanoi* (FA e CA). Figura 4 – Composição química do óleo essencial de *Calypttranthes dardanoi* ocorrente na Floresta Atlântica (FA) e na Caatinga (CA). Figura 5 – Atividade Antioxidante Total do óleo essencial de *Calypttranthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA) em relação ao ácido ascórbico. Figura 6 – 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.

Figura 7 – Concentração peritoneal de TNF- α em camundongos tratados com o óleo essencial foliar de *Calyptanthes dardanoi* ocorrentes na Floresta Atlântica (FA) e Caatinga (CA). Figura 8 – Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptanthes 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. Figura 9 – Efeito do óleo essencial foliar de *Calyptanthes 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.

Descrição detalhada da Invenção

[0019] As folhas de *Calyptanthes dardanoi* foram coletadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque - PE (Caatinga) e na Usina São José, Igarassu - PE (Floresta Atlântica), ambas no ano de 2018 (Figura 1). 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).

[0020] 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) (Figura 2). Após 4 horas de extração, o óleo essencial extraído foi armazenado em frasco do tipo âmbar à temperatura de -15 °C. Ao final da extração, foi obtido 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 3), 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).

[0021] Para a análise química, 1 mg do óleo essencial foi diluído em 1 mL de hexano bidestilado 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). A caracterização química do óleo essencial foliar de *C. dardanoi* coletado na Floresta Atlântica (FA) apresentou como componentes majoritários: (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%). Enquanto que para o óleo essencial foliar de *C. dardanoi* oriundos da Caatinga (CA) 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%) (Figura 4). A composição química do

óleo essencial da espécie foi semelhante entre as diferentes áreas de coleta, no entanto, há o destaque apenas para o cis-calameneno que foi encontrado apenas no óleo essencial da espécie coletada na Caatinga. A composição é semelhante a encontrada no estudo realizado por Limberger et al. (2002), inclusive o cis-calameneno encontrado no óleo essencial de *C. dardanoi* (11,40%) coletado na Caatinga, é encontrado em *C. concinna* (10,3%).

[0022] 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 absorvência correspondente a 100% de 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 5). Essa diferença significativa evidenciada se deve a fatores de diferença entre os locais de coleta, uma vez que, os metabólitos secundários são influenciados por fatores externos como variações de temperatura, umidade, exposição à radiação ultravioleta (UV), entre outros (ATSA, 1989). 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 -Humuleno) que quando presentes, conferem a espécie um potencial antioxidante.

[0023] Para os testes de anti-inflamatória, foram utilizados camundongos Swiss machos e para avaliação da toxicidade aguda foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (ambos com 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.

[0024] Para o teste de anti-inflamatória com edema de pata induzido por carragenina, foram utilizados camundongos (machos) que foram divididos em seis grupos com 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). 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% (Figura 6). Esses resultados demonstram que o óleo essencial da espécie possui propriedades anti-inflamatórias, reduzindo significativamente o edema de pata induzido por carragenina, corroborando com a composição química do óleo que possui compostos com propriedades anti-inflamatórias (cariofileno, germacreno D e α -Humuleno).

[0025] Para avaliação do potencial anti-inflamatório pelo teste de peritonite induzida por carragenina, 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). Os resultados obtidos mostram 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 7). Como os componentes majoritários presentes na composição química da espécie são relatados por possui potencial antioxidante, esse fator contribuiu para a redução do processo inflamatório induzido pela carragenina nos modelos testados.

[0026] 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). 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. Os resultados demonstram que a espécie coletada em domínio de Floresta Atlântica e Caatinga (FA e CA) não desencadeou nenhuma resposta inflamatória imunossupressora na análise destes parâmetros hematológicos (Figura 8), uma vez que, não houve alteração nos níveis séricos dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo controle. Na avaliação dos parâmetros bioquímicos (Figura 9), não foi observada nenhuma alteração nos níveis séricos avaliados. 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, além disso, não houve alterações nos níveis séricos de ALT e AST, ou seja, a administração via oral não causou danos ao fígado dos animais tratados. 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).

REIVINDICAÇÕES

01. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** conter um processo de hidrodestilação a vapor tendo condições espécies de coleta e extração.

02. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** possuir coleta da espécie em dois domínios fitogeográficos diferentes (Floresta Atlântica e Caatinga) afim de compreender diferenças significativas em relação ao local de coleta na composição química bem como no potencial bioativo.

03. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** possuir como componentes majoritários: (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%) em domínio de Floresta Atlântica (FA) e em domínio de Caatinga (CA): (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%), α -Humuleno (9,86%), bicyclogermacreno (9,62%) e β -Elemeno (4,56%).

04. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** não ser tóxico (2000 mg/Kg) podendo ser utilizado em formulações farmacêuticas e cosmética sendo considerado seguro de acordo com as diretrizes da OCDE.

05. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** ser uma fonte promissora de constituintes antioxidante, sendo de grande interesse na pesquisa de novas de moléculas.

06. PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptanthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE) A PARTIR DE DIFERENTES LOCALIDADES **caracterizado por** possuir propriedades anti-inflamatórias, reduzindo 69,06% da inflamação do edema de pata e reduzindo a expressão do TNF- α de 48,44% no teste de peritonite aguda.

FIGURAS



Figura 1.



Figura 2.

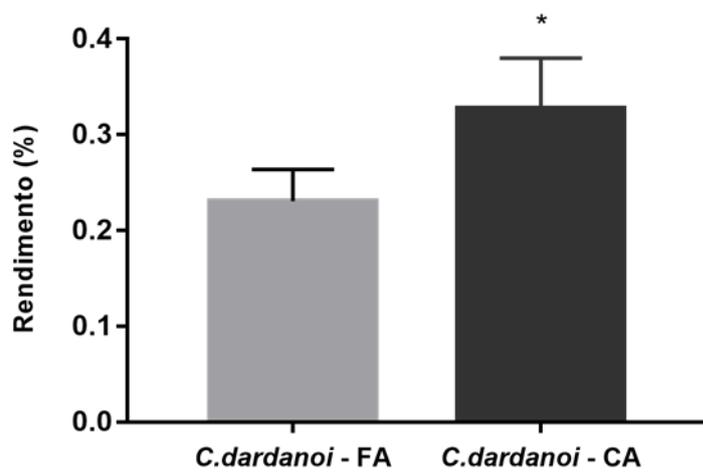


Figura 3.

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-metóxi-4-metil	1015	1020	0,04	benzeno, 1-metóxi-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	11,4
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
-	-	-	-	spathulenol	1577	1578	1,99
óxido de cariofileno	1582	1584	2,78	-	-	-	-
-	-	-	-	hexadecano	1600	1597	1,6
-	-	-	-	ledol	1602	1604	0,59
-	-	-	-	humuleno epóxide 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).

Figura 4.

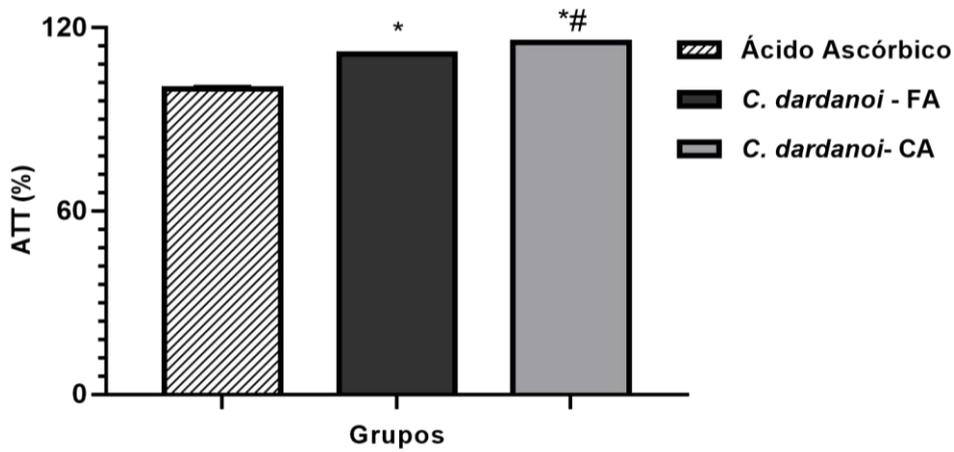


Figura 5.

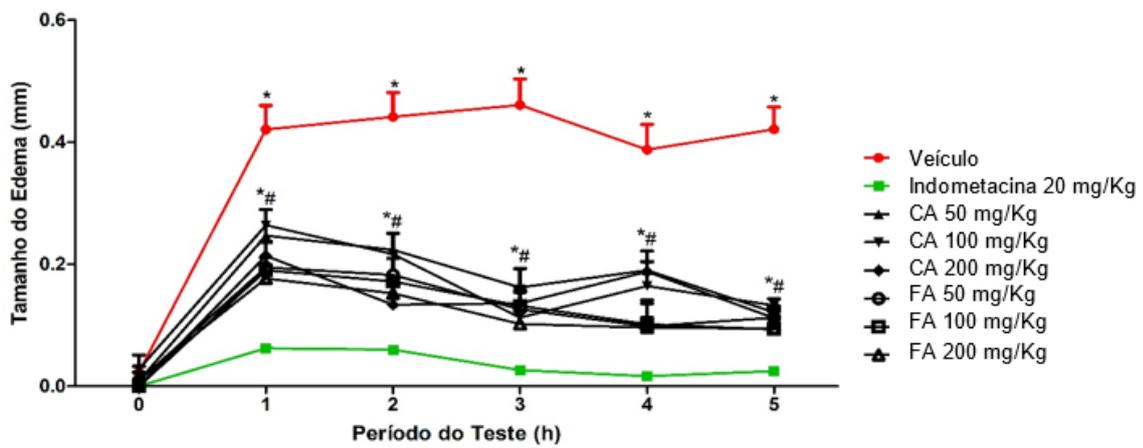


Figura 6.

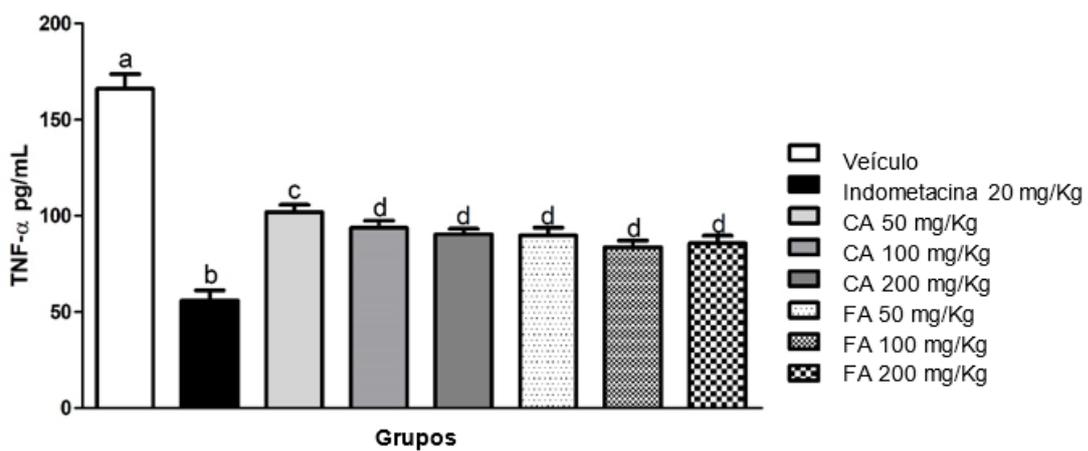


Figura 7.

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

Figura 8.

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

Figura 9.

RESUMO**ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Calyptranthes dardanoi* MATTOS (MYRTACEAE)
COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIO**

A presente invenção descreve a composição química encontrada no óleo essencial foliar de *C. dardanoi* obtido a partir de dois domínios fitogeográficos (Floresta Atlântica e Caatinga). Para tanto, o óleo essencial foi extraído em condições especiais de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger. Os componentes majoritários encontrados em *C. dardanoi* da Floresta Atlântica (FA) foram: (E) - Cariofileno (47,80%), Germacreno-D (10,07%), α -Humuleno (9,09%) e β -Elemeno (5,29%) e no óleo essencial de *C. dardanoi* oriundo da Caatinga (CA): (E) -Cariofileno (15,59%), cis-calameneno (11,40%), Germacreno-D (10,22%) e α -Humuleno (9,86%). Os componentes encontrados na composição química apresentam grande relevância para as indústrias que fazem uso das propriedades antioxidantes e anti-inflamatória evidenciadas. A invenção indica o OE de *C. dardanoi* (FA e CA) como uma fonte natural promissora de substâncias químicas, compostos com baixos efeitos colaterais, que garante a seguridade para uso medicinal além de possuir potencial antioxidante e anti-inflamatório.