

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA DIAS MACHADO

Schinus molle L.: PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATO AQUOSO

PONTA GROSSA

2024

CAMILA DIAS MACHADO

Schinus molle L.: PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATO AQUOSO

Tese apresentada para obtenção do título de doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Área de Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

PONTA GROSSA

2024

M149 Machado, Camila Dias
Schinus molle L.: perfil químico e biológico de óleos essenciais e extrato aquoso / Camila Dias Machado. Ponta Grossa, 2024.
113 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

1. Anacardiaceae. 2. Aroeira. 3. Antioxidante. 4. Genotoxicidade. 5. Óleo volátil. I. Manfron, Jane. II. Gasparotto Junior, Arquimedes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa	
---	--	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **12/2024** DA DOUTORANDA **CAMILA DIAS MACHADO**, REALIZADA NO DIA 25 DE OUTUBRO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e cinco dias do mês de outubro de dois mil e vinte e quatro, às 9 horas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência da Profa. Dra. Jane Manfron, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **CAMILA DIAS MACHADO**, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pela Professora Doutora JANE MANFRON e demais Doutores (membros titulares): DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES (UFRRJ/RJ); VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS (UNINTER/PR); PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR); e ADRIANA YURIKO KOGA (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: “**SCHINUS MOLLE L.: PERFIL QUÍMICO SAZONAL COMPARATIVO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL E CARDIOVASCULAR DE EXTRATO AQUOSO**”. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: ☒ sim ☐ não

Novo título: Schinus molle L.: perfil químico e biológico de óleos essenciais e extrato aquoso.

 Documento assinado digitalmente DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES Data: 29/10/2024 08:40:28-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br	Documento assinado digitalmente  JANE MANFRON Data: 26/10/2024 11:04:20-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br (UEPG) Presidente	Documento assinado digitalmente  VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS Data: 27/10/2024 10:36:24-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES (UFRRJ/RJ) Documento assinado digitalmente  PAULO VITOR FARAGO Data: 26/10/2024 20:22:53-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br	VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS (UNINTER/PR) Titular Documento assinado digitalmente  ADRIANA YURIKO KOGA KOZU Data: 27/10/2024 17:27:46-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br	ADRIANA YURIKO KOGA (UEPG/PR) Titular

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
 Fone (42) 2102.8937 Email – ppgcf@uepg.br
 Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Dedico esta tese aos meus pais, Isaac e Cristina, pelo apoio e incentivo para que eu sempre buscasse o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por eu estar presente nesse momento com saúde e por me dar forças para encarar as dificuldades da vida com sabedoria e fé.

Agradeço à UEPG por toda a minha formação acadêmica, pós-acadêmica e atuação profissional, pela qual tenho um imenso carinho e reconhecimento por essa instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, que tornou possível a realização desta tese.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Jane Manfron, por me aceitar novamente na realização de mais um trabalho, por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, para que eu pudesse me aperfeiçoar profissionalmente e pessoalmente.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, pela oportunidade em aprender novos conhecimentos e pela a realização de mais experimentos farmacológicos em seu laboratório de Farmacologia e Cardiologia Vascular da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Mato Grosso do Sul (MS). Agradeço pela disponibilidade e dedicação em tornar os nossos trabalhos cada vez melhores no setor acadêmico.

À Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) e à sua equipe de laboratório pelas análises cromatográficas do óleo essencial de *Schinus molle* L e avaliação anti-inflamatória.

Ao Wilmer H. Perera pelas análises dos óleos essenciais feitas em cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), na Camag, Estados Unidos.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago da UEPG por ceder o seu laboratório para a rotaevaporação dos extratos e pelas leituras de absorbâncias no espectrofotômetro para as análises antioxidantes.

Ao auxílio da Dra. Barbara Justus e da Profa. Dra. Josiane Padilha nas análises microbiológicas com o óleo essencial.

Às técnicas do Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-LABMU) pelo processo de liofilização dos extratos aquosos e pelas análises antioxidantes.

À técnica do laboratório, Luciane Mendes Monteiro, pelo auxílio na secagem das amostras, na extração do óleo essencial e nas análises antioxidantes, bem como

na preparação e na disponibilidade de reagentes. Além de sua amizade que iniciou desde à minha graduação em Farmácia.

Aos meus pais, Isaac e Ana Cristina Dias Machado, pelo apoio e incentivo em sempre estudar, para que eu pudesse atingir uma melhor formação possível.

Às minhas queridas amigas Ana Beatriz Klosowski, Lislaine Maria Klider e Lorene Armstrong, pelo companheirismo e amizade. Lis, obrigada por me ajudar em algumas coletas de *S. molle*. Ana, agradeço pelo seu auxílio em algumas análises antioxidantes. E Lorene, obrigada pelos conselhos, risadas e por ser a minha parceira de trabalho no laboratório 54.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia pelo companheirismo e amizade por todo esse tempo.

Ao pessoal do herbário da UEPG pelo auxílio na confecção da exsicata.

E a todos que de alguma forma colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

(Albert Einstein)

RESUMO

Schinus molle L. (Anacardiaceae) é uma árvore nativa do Sul do Brasil e conhecida popularmente como aroeira, aroeira-da-praia e aroeira-salsa. Na medicina tradicional, é utilizada como analgésico, antifúngico, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antimicrobiano, antisséptico, diurético e inseticida. Considerando a ampla utilização, o potencial terapêutico e a variabilidade química em diferentes épocas do ano, o trabalho objetivou determinar o perfil fitoquímico das folhas de *S. molle* nas quatro estações do ano e avaliar as atividades biológicas e investigar a genotoxicidade, além de avaliar os efeitos cardioprotetores dos extratos aquosos. Os óleos essenciais foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE). A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e TBARS. A atividade antimicrobiana do óleo essencial (verão) foi avaliada frente a *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* pela análise da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). A atividade citotóxica foi verificada pela viabilidade celular de linhagens celulares derivados do câncer humano e células renais normais. A ação anti-inflamatória do óleo essencial foi avaliada pelos testes de sensibilidade mecânica (Von Frey), ao frio e edema de pata. A fração solúvel em etanol de *S. molle* (FSESM) foi submetida à estudos de toxicidade aguda, genotoxicidade e efeitos cardioprotetores em animais. O perfil químico dos óleos essenciais evidenciou para o verão - óxido de cariofileno (8,88%), β -pineno (8,84%), *E*-cariofileno (7,53%), limoneno (6,11%), α -muuroleno (5,42%) e espatulenol (5,88%); primavera – limoneno (5,27%); outono – zonareno (9,27%), globulol (7,84%) e canfeno (5,19%); inverno – muurolol (19,40%), α -cadinol (16,32%), ledol (14,46%) e óxido de cariofileno (11,44%). A CCDAE identificou a variabilidade química dos óleos essenciais nas quatro estações. A atividade antimicrobiana evidenciou-se em 0,203 g/mL (CIM) para *E. coli*. A citotoxicidade foi comprovada para três linhagens de células tumorais: BT-549 (câncer de mama), SK-MEL (melanoma) e KB (células tumorais formadoras de queratina) para IC₅₀ (concentração inibitória média) com valores de 70 µg/mL, 92 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E para as células renais normais (células VERO), a citotoxicidade em IC₅₀ foi de 79 µg/mL. A ação anti-inflamatória do óleo essencial foi considerada significativa. Além disso, a atividade antioxidante também foi comprovada. O perfil químico da FSESM revelou ácidos orgânicos, derivados do ácido benzóico, álcool benzílico, derivados do ácido fenilpropanóide, flavonoides, procianidinas, megaestigmanos *o*-glicosilados e ácidos graxos. FSESM não demonstrou efeitos tóxicos na dose máxima de 2000 mg/kg. Nos testes de genotoxicidade, FSESM (5, 50 e 300 mg/kg) não causou danos no DNA e nos eritrócitos. Os efeitos cardioprotetores de FSESM não foram comprovadas pela avaliação da atividade diurética e reatividade vascular em leito mesentérico. Para essa pesquisa, os resultados identificaram a variabilidade química da composição, a atividade antimicrobiana, citotóxica e antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *S. molle*, e a ausência de genotoxicidade e a segurança da administração oral de FSESM.

Palavras-chave: Anacardiaceae. Aroeira. Antioxidante. Genotoxicidade. Óleo volátil.

ABSTRACT

Schinus molle L. (Anacardiaceae) is a medicinal tree native from South of Brazil and traditionally known as aroeira, aroeira-da-praia and aroeira-salsa. In the traditional medicine, is used as analgesic, antifungic, antihypertensive, anti-inflammatory, antimicrobial, antiseptic, diuretic and insecticide. Considering, the wide utilization of the medicinal specie in the traditional medicine, the therapeutic potential and the chemical variability in the different seasons of the year, the work aimed to determine the phytochemical profile of the essential oil of *S. molle* leaves in four seasons of the year and to evaluate the biological activities and investigating the genotoxicity and cardioprotective effects of the aqueous extracts. The essential oils were characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance thin layer chromatography (HPLC). The antioxidant activity was determined by phosphomolybdenum assay, DPPH and TBARS. For the essential oil (summer), the antimicrobial activity was evaluated against *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by minimal inhibitory concentration (MIC). The cytotoxic activity was verified by cell viability of tumor cell and normal kidney cell lines. The anti-inflammatory action of the essential oil was evaluated by mechanical sensitivity test (Von Frey), to cold and paw edema. The fraction soluble in ethanol of *S. molle* (FSESM) was submitted to acute toxicity studies, genotoxicity and cardioprotective effect in animals. The chemical profile for the essential oils evidenced to summer - the caryophyllene oxide (8,88%), β -pinene (8,84%), *E*-caryophyllene (7,53%), limonene (6,11%), α -muurolene (5,42%) and spatulenol (5,88%); spring – limonene (5,27%); fall – zonarene (9,27%), globulol (7,84%) and camphene (5,19%); winter – muurolol (19,40%), α -cadinol (16,32%), ledol (14,46%) and caryophyllene oxide (11,44%). The HPLC identified the chemical variability of essential oils in the four seasons. The antimicrobial activity showed in 0,203 g/mL (MIC) against *E. coli*. The cytotoxicity was verified to three lineages of tumoral cells: BT-549 (breast cancer), SK-MEL (melanoma) and KB (keratin-forming tumor cells) for IC₅₀ (mean inhibitory concentration) for values of 70 μ g/mL, 92 μ g/mL and 100 μ g/mL, respectively. And to the normal kidney cells (VERO cells), the cytotoxicity in IC₅₀ 79 μ g/mL was verified. The anti-inflammatory activity was considered significant. In addition, the antioxidant activity was proved it. The FSESM chemical profile revealed organic acids, derived from benzoic acid, derivates of phenylpropanoid acid, flavonoids, procyanidins, o-glycosylated megastigmanes and fatty acids. FSESM did not demonstrate toxic effects at maximum dose of 2000 mg/kg. In the genotoxicity assay, FSESM (5, 50 and 300 mg/kg) did not caused damages in the DNA and erythrocytes. The cardioprotective effects of FSESM were not proven by evaluation of diuretic activity and vascular reactivity in mesenteric beds. For this research, was identified a chemical variability of the composition, the antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of the oil essential from leaves of *S. molle*, in addition to prove the absence of genotoxicity and the safety oral administration of FSESM.

Keywords: Anacardiaceae. Aroeira. Antioxidant. Genotoxicity. Volatile oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 AS PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL.....	16
3.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE R. BR.	17
3.3 GÊNERO <i>SCHINUS</i> L.	19
3.4 <i>Schinus molle</i> L.	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	24
4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>SCHINUS MOLLE</i> L.....	28
4.3 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	30
4.4 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)	31
4.5 INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	31
4.5.1 Identificação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo	31
4.5.2 Investigação do efeito anti-inflamatório	32
4.5.2.1 Edema de pata induzido por carragenina	32
4.5.2.2 Análises estatísticas.....	33
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO CCK-8 EM CÉLULAS DE LINHAGENS DERIVADOS DE CÂNCER HUMANO E DE CÉLULAS RENAIIS NORMAIS	33
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	34
4.7.1 Determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio.....	34
4.7.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	35
4.7.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	36
4.8 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO	37

4.8.1 Preparação dos extratos aquosos purificados de <i>Schinus molle</i> L.	37
4.8.2 Caracterização química dos extratos aquosos de <i>Schinus molle</i>	38
4.8.3 Estudos toxicológicos.....	38
4.8.3.1 Animais	38
4.8.3.2 Toxicidade aguda.....	39
4.8.3.3 Genotoxicidade	39
4.8.3.3.1 Teste de micronúcleos	39
4.8.3.3.2 Ensaio Cometa.....	40
4.8.4 Atividade cardiovascular: avaliação dos efeitos cardioprotetores em modelo de hipertensão arterial sistêmica.....	41
4.8.4.1 Animais	41
4.8.4.2 Desenho experimental e avaliação da função renal	42
4.8.4.3 Eletrocardiograma	42
4.8.4.4 Medidas das pressões arteriais.....	43
4.8.4.5 Reatividade vascular em leito mesentérico	43
4.8.4.6 Análises estatísticas.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 O ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>S. MOLLE</i>	45
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>S. MOLLE</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	48
5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>S. MOLLE</i> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)	54
5.4 INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	59
5.4.1 Identificação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Schinus molle</i>	60
5.4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por carragenina	61
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO CCK-8 EM CÉLULAS DE LINHAGENS DERIVADOS DE CÂNCER HUMANO E DE CÉLULAS RENAIIS NORMAIS.....	65
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL <i>IN VITRO</i>	66
5.7 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO	74
5.7.1 Caracterização química dos extratos aquosos de <i>Schinus molle</i> L.	74

5.7.2 Estudos toxicológicos.....	80
5.7.2.1 Toxicidade aguda.....	80
5.7.2.2 Genotoxicidade	86
5.7.2.2.1 Teste de micronúcleos	87
5.7.2.2.2 Ensaio Cometa.....	89
5.7.3 Atividade cardiovascular	91
5.7.3.1 Avaliação da função renal	91
5.7.3.2 Efeitos sobre a atividade elétrica cardíaca	95
5.7.3.3 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca	95
5.7.3.4 Avaliação da reatividade vascular em leito mesentérico.....	98
6 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA	111
ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA	112
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AO ASSUNTO DA PESQUISA	113

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas desde o surgimento das civilizações. Ao longo dos anos, diferentes espécies medicinais continuaram sendo utilizadas pela população, geralmente para tratar problemas de saúde menos complexas, em regiões como a Ásia, África e América Latina. Atualmente, o uso de plantas medicinais está cada vez mais sendo difundida pela indústria de medicamentos, bem como aplicadas na medicina alternativa ou complementar (Jamshidi-Kia; Lorigooini; Amini-Khoei, 2018).

Nos últimos anos, no Brasil, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos está inserido na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) em conformidade com os princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente na Atenção Básica. Com isso, as plantas medicinais são oferecidas pelo o sistema da seguinte maneira: planta fresca (*in natura*), planta seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado - preparado em farmácias, de acordo com a autorização da Vigilância Sanitária, fitoterápico industrializado – produzido e comercializado mediante registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2006).

Para isso, foi necessário o cultivo dessas plantas medicinais em hortos para o fornecimento da matéria-prima. Em consequência, surgiu um novo Programa dentro da Política Nacional de Assistência Farmacêutica e do SUS, a Farmácia Viva. E esse Programa pode compreender “todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos”. Além do mais, a Farmácia Viva está instaurada no SUS, desde abril de 2010 (Brasil, 2012).

Atualmente, preparações ou substâncias derivadas de espécies medicinais, tais como extratos aquosos e óleos essenciais, tem a sua aplicação na área clínica, por expressarem atividades medicinais (Do Rosário Martins *et al.*, 2014; Rios; Recio, 2005).

De maneira geral, os óleos essenciais estão em destaque na área científica por inúmeros estudos e têm revelado diversas atividades biológicas, como

antimicrobianas, antifúngicas, citotóxicas, antioxidantes, inseticidas e antiparasitárias (Machado *et al.*, 2019). Contudo, a composição química dos óleos essenciais pode sofrer variações por influências sazonais, geográficas e climáticas, bem como de acordo com o órgão da planta escolhido para extração, podendo ser, por exemplo de folhas (Machado *et al.*, 2019) ou de frutos (Bendaoud *et al.*, 2010). Todas essas características, refletem na efetividade ou na intensidade da atividade medicinal ou biológica (Machado *et al.*, 2019).

Vários gêneros botânicos são representados por espécies aromáticas e dentre eles destaca-se *Schinus* L. (Anacardiaceae) que compreende 29 espécies distribuídas em regiões desde a América Central à Argentina (Lorenzi; Matos, 2008), enquanto que no Brasil, ocorrem 9 espécies. Dentre as espécies de *Schinus* mais estudadas estão *S. areira* L., *S. engleri* F. A. Barkley, *S. fasciculata* (Griseb.) I. M. Johnst., *S. ferox* Hassl., *S. latifolia* (Gillies ex Lindl.) Engl., *S. lentiscifolia* Marchand, *S. longifolia* (Lindl.) Speg., *S. molle* L., *S. polygama* (Cav.) Cabrera, *S. ramboi* F. A. Barkley, *S. spinosa* Engl., *S. terebinthifolia* Raddi e *S. weinmanniifolia* Mart. ex Engl. (Silva-Luz *et al.*, 2022).

Schinus molle L. é uma espécie medicinal aromática e conhecida tradicionalmente como aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-periquita, aroeira-salsa, bálsamo e pimenteiro (Lorenzi; Matos, 2008). É uma árvore semidecídua de 5-8 m de altura, com copa globosa, folhas aromáticas e frutos esféricos amarronzados; tronco cilíndrico medindo entre 25-35 cm de diâmetro, sendo uma espécie nativa do Sul do Brasil. Além da utilização como planta ornamental na arborização urbana, é utilizada também na medicina tradicional como adstringente, balsâmico, diurético, emenagogo, purgativo, estomáquico, tônico, vulnerário, anti-inflamatório, analgésico, antitumoral, antisséptico, antifúngico (Lorenzi; Matos, 2008), além de ser utilizada como antimicrobiano (Do Rosário Martins *et al.*, 2014), repelente (Goldstein; Coleman, 2004) e anti-hipertensivo (Maema; Potgieter; Mahlo, 2016).

Estudos dos extratos de folhas de *S. molle* evidenciaram atividade analgésica (Barrachina *et al.*, 1997), antidepressiva (Machado *et al.*, 2007), anti-helmíntica (Zenebe; Feyera; Assefa, 2017), antimicrobiana (Deveci *et al.*, 2010; Turchetti *et al.*, 2020), citotóxica (Garzoli *et al.*, 2019), inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Olafsson *et al.*, 1997), inseticida (Ferrero *et al.*, 2007; Girmay *et al.*, 2014) e repelente (Deveci *et al.*, 2010).

Considerando que há um número reduzido de estudos sobre a sazonalidade dos óleos essenciais das folhas de *S. molle* e de que faltam pesquisas sobre a atividade cardioprotetora dos extratos aquosos da espécie medicinal, visto o potencial terapêutico que possui, o presente trabalho teve como objetivo determinar o perfil químico do óleo essencial extraído das folhas nas quatro estações do ano, além de verificar as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial, além de avaliar a toxicidade aguda, a genotoxicidade e a eficácia cardioprotetora do extrato aquoso das folhas de *S. molle*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e comparar o perfil químico do óleo essencial extraído de folhas de *Schinus molle* L., nas quatro estações do ano, bem como analisar as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica do óleo essencial, e avaliar a toxicidade aguda, a genotoxicidade e a eficácia cardioprotetora do extrato aquoso das folhas de *S. molle*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) o óleo essencial de folhas de *S. molle* nas quatro estações do ano;
- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial frente à *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo essencial (30 mg/kg) pelo ensaio de edema de pata, hiperalgesia mecânica, ao frio (acetona) em camundongos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial pelos métodos de formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e TBARS;
- Verificar a atividade citotóxica do óleo essencial contra células de linhagens derivadas do câncer humano (câncer de mama, melanoma e células tumorais formadoras de queratina) e de células renais normais (células VERO);
- Analisar a toxicidade aguda e a genotoxicidade do extrato aquoso de folhas de *S. molle* em ratos da linhagem Wistar;
- Avaliar a eficácia cardioprotetora em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos está inserido na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que constitui a base das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. Esta Política foi aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelece diretrizes com o objetivo de garantir o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Dentre essas estão, a regulamentação do cultivo; o manejo sustentável; a produção, a distribuição, e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando as experiências da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização. Além de fomentar a pesquisa, o desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população (Brasil, 2006).

Além dessas diretrizes, há outra que incentiva a formação e a capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos, além de promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e Organizações Não Governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos (Brasil, 2006). Nesse contexto, as plantas medicinais e fitoterápicos possuem um grau de importância relevante na saúde pública brasileira com a finalidade de garantir um tratamento seguro, racional e efetivo para a população (Brasil, 2012).

Adicionalmente, a Portaria GM/MS nº 971, de 3 de maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) que visa a prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção primária para o cuidado humanizado e integral em saúde (Brasil, 2006).

Nos últimos anos ocorreram alterações nas políticas nacionais com a elaboração de novas normas e revisões das legislações. Uma das principais mudanças está na instituição da Farmácia Viva no SUS por meio da Portaria GM nº 886, de 20 de abril de 2010, pelo Ministério da Saúde. As Farmácias Vivas foram

criadas com o objetivo de promover a assistência farmacêutica à comunidade, devido à dificuldade de acesso aos serviços de saúde. Portanto, elas têm grande importância no desenvolvimento e na utilização de plantas medicinais na comunidade, resgatando o conhecimento empírico e promovendo o uso racional (Brasil, 2012).

Visto a importância e o crescimento do uso de plantas medicinais em todo o território brasileiro, percebe-se a necessidade do aprimoramento do conhecimento científico sobre as espécies medicinais, bem como a realização de novos estudos com as espécies que ainda não foram estudadas e até mesmo, pesquisar sobre novas atividades terapêuticas que possam ser desempenhadas por meio de novas preparações ou formulações (Süntar, 2020).

Schinus molle é uma espécie medicinal que não é encontrada em compêndios científicos como a Farmacopeia Brasileira e não consta da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Acredita-se que com o presente trabalho, *S. molle* passe, em breve, a integrar essas obras, como é o caso de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

3.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE R. BR.

A família Anacardiaceae está inserida entre os principais grupos de Angiospermas, incluindo cerca de 81 gêneros, nos quais se distribuem 800 espécies (Silva-Luz *et al.*, 2022). No Brasil, a família compreende 13 gêneros e 57 espécies e estão distribuídas em todas as regiões do país como arbustos, subarbustos e árvores, habitando os biomas amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal (Silva-Luz; Pirani, 2015).

Os 20 principais gêneros que fazem parte da família *Anacardiaceae* são: *Anacardium* L., *Antrocaryon* Pierre, *Apterokarpos* Rizzini, *Astronium* Jacq., *Camphosperma* Thwaites, *Cyrtocarpa* Kunth, *Garuga* Roxb., *Harpephyllum* Bernh. Ex C.Krauss, *Lithraea* Miers ex Hook. & Arn., *Loxopterygium* Hook. f., *Mangifera* L., *Mauria* Kunth, *Poupartia* Comm. ex Juss., *Schinopsis* Engl., *Schinus* L., *Sorindeia* Thouars, *Spondias* L., *Tapirira* Aubl., *Thyrsodium* Salzm. ex Benth. e *Toxicodendron* Mill. (Silva-Luz *et al.*, 2022).

As árvores e os arbustos são eretos e muito raramente epífitos, sendo a seiva caracterizada como acre e com cheiro de terebintina, ficando escura quando exposta ao ar. As folhas se localizam nas extremidades dos galhos, e são geralmente

espessas, espiraladas ou alternadas, e algumas vezes são subverticiladas, simples, uni ou tri-foliolada, imparipinadas e raramente paripinadas (Hou, 1974). As folhas ainda possuem a margem do limbo inteira e raramente crenada ou denteada, pecioladas, sendo raramente sésseis ou subsésseis (Hou, 1974).

As inflorescências são terminais e/ou axilares, raramente paniculiformes, sendo algumas vezes racemosas ou espiciformes, raramente com flores solitárias; as brácteas e bractéolas geralmente são caducas e algumas vezes persistentes; os pedicelos são distintos e geralmente articulados. As flores são regulares, bissexuadas ou unissexuadas (plantas monoicas, dioicas ou polígamas); os frutos são drupáceos e variam de tamanho, podendo ser de 2 cm a 25 cm de comprimento. Essas drupas (endocarpo) podem ser comestíveis e são dispersas por pássaros, morcegos, esquilos, macacos, entre outros animais (Hou, 1974).

Taxonomicamente, a família foi dividida em 1883 por Engler, em quatro tribos, dentre elas: *Mangifereae*, *Spondieae*, *Rhoideae* e *Semercapeae*; e em 1892, mais uma tribo foi adicionada, *Dobineeae*. Entretanto, de acordo com Erdtman, em 1952, *Dobineeae* deveria ser excluída da família *Anacardiaceae* segundo a morfologia do pólen (Hou, 1974).

Anacardiaceae possui algumas afinidades com outras famílias, tais como: *Burseraceae* Kunth (pelas características macromorfológicas), bem como em maior ou em menor grau com: *Sapindaceae* Juss., *Meliaceae* Juss., *Sabiaceae* Blume, *Rutaceae* Juss., *Simaroubaceae* DC., *Zygophyllaceae* R.Br., etc. (Hou, 1974).

Quimicamente, os extratos das folhas de *Anacardiaceae* possuem na sua composição diferentes ácidos, como o ácido quínico, principalmente em folhas jovens e o ácido chiquímico. Além disso, ocorre a presença de outros compostos, tais como alcaloides indólicos e biflavonoides, além de taninos de resinas triterpênicas em espécies de *Mangifera* L. e *Schinus terebinthifolia* Raddi (Hou, 1974).

Espécies de *Anacardiaceae* possuem diversas atividades biológicas que foram comprovadas, tais como: atividade antimicrobiana (*Schinus lentiscifolius* Marchand) (Gehrke et al., 2013), atividade larvívica (*Gluta renghas* L.) (Zuharah et al., 2021), atividade antioxidante e antifúngica (*Anacardium occidentale* L., *Schinopsis brasiliensis* Engl., *Spondias mombin* L., *Mangifera indica* L.) (Neves et al., 2021).

3.3 GÊNERO *Schinus* L.

Schinus pertence à família Anacardiaceae e inclui 147 espécies (POWO, 2022) sendo que 12 espécies estão distribuídas por todo o território nacional, nos biomas pampa, caatinga, cerrado e mata atlântica (Silva-Luz *et al.*, 2022). O gênero é nativo da América Latina (POWO, 2022) e compreende arbustos, subarbustos e árvores (Silva-Luz *et al.*, 2022). As folhas são caracterizadas como simples ou compostas, imparipinadas, paripinadas ou as folhas terminando com um múcron ou projeção estreitamente elíptica, coriáceas ou membranáceas; folíolos opostos, subopostos ou alternos, margem inteira, crenada, sinuoso-dentada ou sinuoso-crenada, serrada ou crenado-serrada, com base simétrica ou assimétrica; peciolada, raque cilíndrica, alada ou estreitamente alada. A inflorescência é axilar ou terminal, pedunculada ou séssil; as brácteas e bractéolas são persistentes ou decíduas. As flores são pediceladas, sendo o pedicelo articulado e o fruto é do tipo drupa globosa (Silva-Luz *et al.*, 2022)

Algumas espécies de *Schinus* possuem folhas compostas como *Schinus areira* L., *S. engleri* F.A. Barkley, *S. fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst., *S. ferox* Hassl., *S. latifolia* (Gillies ex Lindl.) Engl., *S. lentiscifolia* Marchand, *S. longifolia* (Lindl.) Speg., *S. molle* L., *S. pampeana* Bordignon & Vog. Ely, *S. polygama* (Cav.) Cabrera, *S. ramboi* F.A. Barkley, *S. rhoifolia* Mart., *S. spinosa* Engl., *S. terebinthifolia* Raddi, *S. uruguayensis* (F.A. Barkley) Silva-Luz e *S. weinmanniifolia* Engl. (Silva-Luz *et al.*, 2022).

O gênero *Schinus* tem grande importância econômica, pois possui espécies que são utilizadas na culinária, em arborizações urbanas e reflorestamentos, a exemplo de *Schinus molle* L. e *S. terebinthifolia*. As sementes destas espécies, conhecidas como pimenta-rosa ou pimenta-da-jamaica, são utilizadas na culinária nacional e internacional por apresentarem um sabor suave e levemente picante (Silva-Luz *et al.*, 2022).

Espécies de *Schinus* L. são utilizadas na medicina popular brasileira por apresentarem atividade antifúngica, antimicrobiana, inseticida, antibacteriana e cicatrizante (Silva-Luz *et al.*, 2022), além de possuírem ação analgésica, antioxidante e anticancerígena (Murray; Rodriguez; Alza, 2012). Essas propriedades medicinais são aplicadas pela presença de metabólitos secundários ou componentes bioativos,

a exemplo de monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, ácidos graxos e flavonoides (Murray; Rodriguez; Alza, 2012).

3.4 *Schinus molle* L.

Schinus molle possui como sinonímia científica: *Schinus molle* var. *molle* e *Schinus molle* var. *rusbyi* F.A.Barkley (POWO, 2024). É uma planta medicinal distribuída pela América do Sul em países como Paraguai, Uruguai, Brasil, norte da Argentina (Silva-Luz *et al.*, 2022), Chile e Peru (POWO, 2022). No Brasil, *S. molle* possui distribuição geográfica na região Sul, abrangendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, distribuindo-se pelos biomas pampa e a mata atlântica (Silva-Luz *et al.*, 2022).

Schinus molle é popularmente conhecida como “aguaribay”, “bálsamo”, “chichita”, “gualaguay”, “molle”, “pimenteiro”, “terebinto” (Murray; Rodriguez; Alza, 2012), aroeira-folha-de-salso, aroeira-mansa (Silva-Luz *et al.*, 2022), anacaita, araguaraíba, aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-mole, aroeira-periquita, aroeira-salsa, aroeira-salso, aroeira-vermelha, cambu, corneíba, corneita e fruto-de-sabiá (Lorenzi; Matos, 2008).

Outras espécies vegetais que fazem parte da família Anacardiaceae, também possuem o mesmo nome popular de aroeira, são elas: *S. terebinthifolia*, *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. e *Myracrodruon urundeuva* Allemão. A mesma denominação comum entre essas espécies favorece uma possível ocorrência de adulteração nas preparações fitoterápicas, além da morfologia similar com *S. terebinthifolia* e *M. urundeuva* (Brasil, 2021; Lorenzi; Matos, 2008).

Dentre as características morfológicas, *S. molle* é uma árvore que atinge até 15 m de altura (Goldstein; Coleman, 2004), sendo as folhas compostas (folíolos), alternas e imparipinadas, raque foliar cilíndrica e com margens serreadas (Silva-Luz *et al.*, 2022). As flores são pequenas e amareladas, dispostas em inflorescências paniculadas pendentes e os frutos são esféricos amarronzados (Lorenzi; Matos, 2008).

Essa espécie de *Schinus* foi muito utilizada pelos povos andinos no passado pela riqueza de propriedades medicinais (Goldstein; Coleman, 2004). Atualmente, seus frutos com aroma de pimenta, são utilizados nas regiões Andinas na preparação de xaropes, vinagres e bebidas (vinho), além de serem utilizados na adulteração ou

na substituição da pimenta-do-reino. Todas as partes de *S. molle*, como folhas, frutos, sementes, casca, e especialmente o óleo essencial são utilizados pela população para os mais variados fins terapêuticos, a exemplo do efeito cicatrizante, analgésico e purgativo. Adicionalmente, no Peru, a espécie é utilizada externamente como antisséptica e no tratamento de feridas, e na Argentina, o decocto de suas folhas secas é utilizado para problemas menstruais, urinários e respiratórios. Ainda, no Brasil, cascas e folhas secas são usadas contra a febre, problemas do sistema urinário (cistites, uretrite), problemas brônquicos (tosse e bronquite), diarreia e para tratar inflamações em geral (Lorenzi; Matos, 2008).

Adicionalmente, folhas, cascas e raízes de *S. molle* são utilizadas, na medicina tradicional para o tratamento de algumas patologias como a ansiedade, hipertensão, infecções do sistema respiratório, inflamações dérmicas, reumatismo, tumores e úlceras (Murray; Rodriguez; Alza, 2012).

No país africano Zimbábue, as folhas de *S. molle* são utilizadas na preparação de vinhos, enquanto que na medicina tradicional são utilizadas como diurético, e topicamente como anti-inflamatório e cicatrizante. O extrato aquoso obtido de folhas de *S. molle* também é utilizado no tratamento de amenorreia e dismenorreia (Gundidza, 1993).

O óleo essencial de *S. molle* é o principal responsável pelas atividades medicinais, agindo contra vários tipos de bactérias, fungos e vírus, além de possuir atividade repelente contra os insetos (Lorenzi; Matos, 2008). A efetividade do óleo essencial de *S. molle* já foi identificada por alguns pesquisadores tais como, a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (Guerra-Boone *et al.*, 2013), tripanocida (Molina-Garza *et al.*, 2014), repelente e inseticida contra *Triatoma infestans* (Ferrero *et al.*, 2006), contra bed bugs (*Cimex lectularius*) (Machado *et al.*, 2019), *Trogoderma granarium* e *Tribolium castaneum* (Abdel-Sattar *et al.*, 2010), repelente contra o inseto *Sitophilus oryzae* (Benzi; Stefanazzi; Ferrero, 2009), larvicida contra *Culex quinquefasciatus* (De Castro Oliveira *et al.*, 2022) e atividade anti-inflamatória (Yueqin *et al.*, 2003), além da atividade fungistática contra os patógenos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* (Dikshit; Naqvi; Husain, 1986). A atividade citotóxica também foi comprovada para o óleo essencial, contra o carcinoma hepatocelular frente a células humanas Hep G2 (Ruffa *et al.*, 2002) e em células de câncer de mama (MCF-7) (Bendaoud *et al.*, 2010).

Em estudo de Salem *et al.* (2016), os extratos aquosos de caules de *S. molle* evidenciaram atividade antibacteriana frente as seguintes cepas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Pseudomas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, enquanto que o extrato metanólico foi mais efetivo contra *Staphylococcus aureus*.

O extrato metanólico das sementes de *S. molle* demonstraram ação antimalárica *in vivo* em estudos de Habte *et al.* (2020), enquanto que para o extrato etanólico de folhas evidenciou propriedades anti-linfoma em camundongos com um EC₅₀ de 9,5 mg/kg devido à presença do flavonoide rutina como composto majoritário no extrato (Calzada *et al.*, 2018).

Quimicamente *S. molle* possui um conjunto de metabólitos secundários, que incluem terpenos (Goldstein; Coleman, 2004) e flavonoides (Bvenura; Kambizi, 2022). Entretanto, a composição química do óleo essencial de *S. molle* é variável conforme a região ou o continente onde habita a espécie (Do Rosário Martins *et al.*, 2014). Essas diferenças foram confirmadas em estudos com plantas coletadas da Europa, da África e da América. Além disso, a composição química do óleo essencial de *S. molle* varia a partir da extração dos diferentes órgãos da planta (Do Rosário Martins *et al.*, 2014). É importante ainda destacar, que as atividades biológicas do óleo essencial de *S. molle* estão relacionadas aos compostos majoritários presentes em sua composição (Salem *et al.*, 2016).

Em estudos de Bendaoud *et al.* (2010) realizados na Tunísia, foi identificado para o óleo essencial extraído de frutos de *S. molle*, alta concentração de monoterpenos hidrocarbonados (79,69%) e pouca quantidade de monoterpenos oxigenados (11,75%) e de sesquiterpenos hidrocarbonados (3,69%), além da presença de α -felandreno, β -felandreno, α -terpineol e α -pineno. Entretanto, em estudo de Machado *et al.* (2019) com folhas de *S. molle* foi identificado uma menor concentração de monoterpenos hidrocarbonados (38,8%), e a presença de β -pineno, α -pineno, limoneno e muurolol. Em estudo de Gomes *et al.* (2013) foram coletadas folhas de *S. molle* em 11 localidades diferentes do Rio Grande do Sul e foram identificadas diferentes substâncias na composição química do óleo essencial, como sabineno, α -cadinol e mirceno.

Schinus molle é uma espécie vegetal utilizada na medicina tradicional também pelas propriedades anti-hipertensivas, contudo estudos relacionados a essas atividades são escassos. Dois estudos, o primeiro realizado em ratos (fêmeas) com a administração por via intravenosa de extratos metanólicos e diclorometano de folhas de *S. molle* (Bello *et al.*, 1996) e outro estudo *in vitro*, utilizando extratos aquoso, etanólico e acetona de folhas de *S. molle*, demonstrando atividade inibidora da ECA pela ação do composto triterpeno (Olafsson *et al.*, 1997).

Portanto, considera-se importante investigar os efeitos cardioprotetores de *S. molle* de forma mais detalhada para entender e demonstrar os mecanismos envolvidos em tal atividade, relacionando todas as possíveis variações de compostos químicos pertencentes à *S. molle*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Schinus molle* L. (Figura 1) foram coletadas no Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brasil, com coordenadas (25° 5' 23" S e 50° 6' 23" W), durante os meses de março, junho, setembro e dezembro de 2020, no período da manhã, nas diferentes estações do ano, totalizando seis espécimes a cada estação. Uma amostra da espécie coletada foi identificada por um taxonomista e depositada no Herbário da UEPG, e se encontra sob o código HUPG 22239 (Figura 2). O acesso ao material vegetal foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético do Conhecimento Tradicional Associado (CGEN / SISGEN) de acordo com o registro A8C5B94.

A partir das amostras coletadas, os estudos foram desenvolvidos de acordo com o fluxograma de experimentos (Figura 3).

Figura 1 – *Schinus molle* L. no hábito

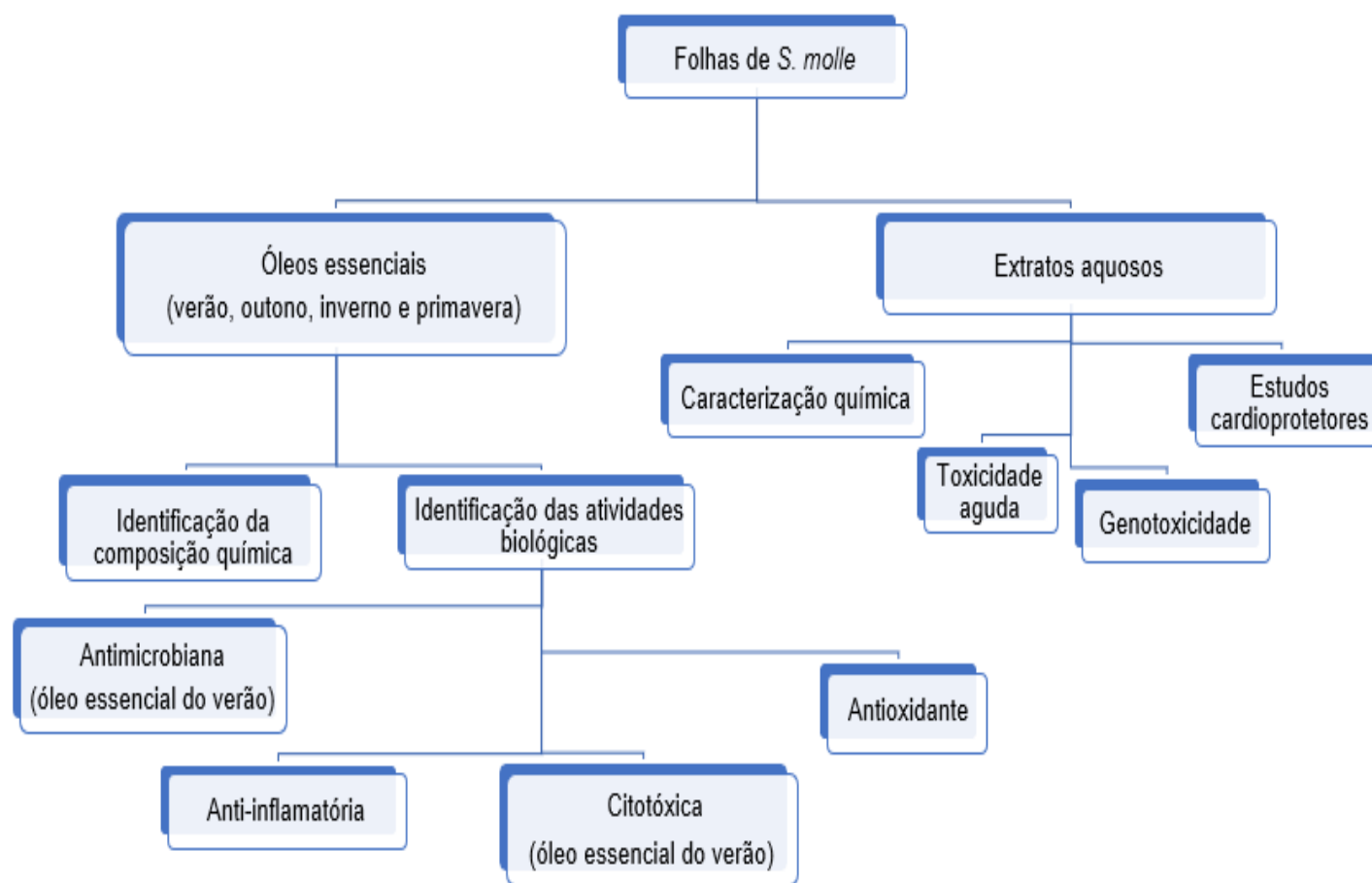


Fonte: A autora.
Escala: 250 cm.

Figura 2 – Exsicata de *Schinus molle* L.

Fonte: A autora.

Figura 3 – Fluxograma de experimentos



Fonte: A autora.

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus molle* L.

Folhas de *S. molle* coletadas nas quatro estações do ano foram secas em estufa a 35 °C, por três dias, e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação (destilação por arraste de vapor de água) usando o aparato Clevenger por 4 h (Figura 4) de acordo com a metodologia descrita por Santos *et al.* (2004) com modificações. O óleo essencial (Figura 5) foi obtido a partir de 365 g de folhas secas e para a retirada de excesso de água na amostra, sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi acrescentado.

O valor de rendimento do óleo essencial foi calculado pela relação volume do óleo obtido em mililitros (**V**) no sistema de extração, dividido pela massa seca da amostra em gramas (**M**), para cada estação do ano, em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem (**R%**). Portanto, o valor de rendimento foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{V}{M} \cdot 100 \quad (1)$$

Os óleos extraídos foram estocados em recipientes de vidro âmbar e revestidos com uma capa de alumínio e mantidos sob congelamento (4 ± 0,5 °C) até o momento da caracterização química e da realização das avaliações biológicas, antioxidantes e citotóxicas. O procedimento de extração do óleo essencial foi realizado no laboratório de Farmacognosia da UEPG.

Figura 4 – Extração do óleo essencial de *Schinus molle* por meio do aparato Clevenger



Fonte: A autora.

Figura 5 – Extração e separação do óleo essencial de *Schinus molle* L.



Fonte: A autora.

4.3 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Para a separação e identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial de *S. molle*, foi utilizado um cromatógrafo à gás equipado a um detector espectrométrico de massas (CG-MS; QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan), utilizando a coluna DB-5 (5% de dimetilpolisiloxano – fase estacionária) e filtro com dimensões de 30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura, sendo a cromatografia realizada de acordo com as seguintes condições: a fase móvel consistiu de gás hélio (99,999 %, gradiente de vazão 1,0 mL/min, 1 μ L de volume injetado); split ratio (1:20), com temperatura inicial acima de 40 °C e aquecimento de 40 – 250 °C (variação de 3 °C/ min). A temperatura do injetor e do analisador do tipo quadruplo foi de 250 °C e a linha de transferência foi mantida à 250 °C. A cromatografia foi realizada em modo de ionização (energia de colisão em 70 eV), com intervalo de 40 – 650 m/z e intervalo de tempo de 0,5 s. Os índices de retenção de temperatura foram de 12, sendo calculada usando uma série de alcanos (parafina, C₈ – C₂₅) como referências externas. O índice de retenção foi calculado para uma mistura de alcanos de cadeia linear (C₈-C₃₀) como referência externa. A identificação dos compostos para as

amostras foi realizada por comparação com os espectros de massa da biblioteca NIST21, WILEY229 e dados da literatura (Adams, 2005).

4.4 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

As análises foram realizadas por um equipamento automatizado no laboratório CAMAG® (Wilmington, NC), Estados Unidos, utilizando o método de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE). O procedimento foi desenvolvido em placa de sílica gel 60 F₂₅₄, 20x10 cm de coluna de CCDAE (Merck), sendo a fase móvel a solução de acetato de etila: tolueno (5:95, v/v). A curva de calibração foi preparada com α -bisabolol (HWI Analytik) e borneol (Extrasynthese) em que soluções de cada reagente (100 µg/mL) foram aplicados em placas. Um volume de 2 – 5 µL das amostras de óleo essencial de *S. molle* para cada estação do ano (50 µL de óleo diluídos em 950 µL de tolueno) foram injetados por um aplicador automático ATS4 CAMAG-Linomat IV spray com aplicador de banda equipado com uma seringa (1 – 5 µL) e desempenhou sob as seguintes condições: comprimento da banda (8 mm), distância entre as faixas (11,4 mm) e posição da aplicação X (20 mm) e Y (8 mm). O processo de derivatização pós cromatografia foi realizada em placa aquecida por um equipamento TLC Plate Heater, a 100 °C por 3 min e imersa em 3 mL de reagente anisaldeído (85 mL de metanol em uma mistura de 10 mL de ácido acético, 5 mL de ácido sulfúrico e 0,5 mL de *p*-anisaldeído). A fotodocumentação foi feita por um fotodocumentador (Visualizer) com a luz ultravioleta (UV 366 nm) e luz branca após a derivatização com anisaldeído.

4.5 INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1 Identificação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *S. molle* foi avaliada sobre isolados de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e a atividade antifúngica sobre *Candida albicans*. A metodologia dos “testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico” foi feita de

acordo com o protocolo M7-A6 (microdiluição em caldo) do NCCLS/CLSI (National Committee on Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards) (2004) com algumas adaptações. A técnica da microdiluição tem o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial capaz de inibir o crescimento microbiano para as cepas avaliadas (Araújo; Longo, 2016).

As amostras bacterianas foram semeadas em tubos contendo caldo de BHI (*Brain Heart Infusion*). Em uma placa de 96 poços foram adicionados o óleo essencial de *S. molle* (estação verão) com 1% de tween 20 e caldo BHI (1:1, v/v). As diluições avaliadas do óleo essencial foram: 0,203 g/mL; 0,1015 g/mL; 0,0507 g/mL; 0,0253 g/mL e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, uma suspensão bacteriana foi inoculada em salina e foi obtido uma concentração final de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL. Um volume de 10 µL da suspensão preparada foi adicionado em poços de placas e estas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, foram utilizados 15 µL do corante 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e aguardado 30 min em estufa (37°C). O método colorimétrico foi realizado para a identificação da concentração inibitória mínima (CIM) através da leitura visual dos resultados, em que a coloração vermelha (redução à formazano) caracteriza a presença de microrganismos viáveis em concentrações não inibitórias. E para a identificação da atividade bactericida (concentração bactericida mínima – CBM) ou fungicida mínima foi semeado em ágar Mueller-Hinton, o conteúdo dos poços de placas que não apresentaram a coloração vermelha com a adição do corante TTC. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h para a confirmação do crescimento microbiano.

4.5.2 Investigação do efeito anti-inflamatório

4.5.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

Camundongos Swiss machos foram adquiridos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA conforme o protocolo nº 07/2017). Os animais ($n = 6$ /grupo) foram tratados por uma única vez, por gavagem, com o óleo essencial das diferentes estações de *Schinus molle* (30 mg/kg), controle (0,9 % de salina). Prednisolona (3 mg/kg) foi administrado por via subcutânea e usado como controle positivo. Após um período de 1h, a inflamação foi induzida por injeção de carragenina

(300 µg/pata, 50 µL em soro fisiológico 0,9% estéril) na pata direita e 50 µL de solução salina 0,9% na pata contralateral foi utilizada como controle. Após 3 e 4h, o edema foi mensurado por um pletismômetro de pata (PANLAB, Harvard), e a diferença nas medidas entre os volumes da pata foi quantificado (Henriques *et al.*, 1990).

Neste mesmo experimento, os animais foram submetidos à alodinia ao frio com acetona (Choi *et al.*, 1994) e a hiperalgesia mecânica (g), avaliada por meio de aparelho eletrônico de Von Frey (Insight®, EFF 301, analgesiômetro digital) (Möller; Johansson; Berge, 1998). A sensibilidade mecânica nas patas foi determinada pelo número de vezes que o animal retirou a pata enquanto recebia o estímulo, indicando o nível de sensibilidade mecânica induzida por sensibilização 3 e 4h após a administração de carragenina.

Para determinar a sensibilidade da pata a um estímulo ao frio, foram aplicados 30 µL de acetona sobre a superfície da pata traseira direita. A duração do teste foi de 30s, e os indicadores eram lambear, tremer ou esfregar a pata.

4.5.2.2 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). Diferenças entre os grupos foram avaliados pela análise de Variância de uma via (ANOVA) seguido do teste Student Newman-Keuls. Resultados significativos foram considerados para um valor de $p \leq 0,0001$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL *in vitro* UTILIZANDO CCK-8 EM CÉLULAS DE LINHAGENS DERIVADOS DE CÂNCER HUMANO E DE CÉLULAS RENAIIS NORMAIS

A avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial de *S. molle* da estação verão foi realizada a partir do ensaio de proliferação celular em quatro linhagens celulares derivados do câncer humano como células de câncer de mama BT-549, células de câncer ovariano SK-OV-3, células de melanoma SK-MEL, células tumorais formadoras de queratina KB e duas linhagens celulares renais normais (LLC-PK1 e VERO). O cultivo das células foi feito em meio RPMI 1640 (pH 7,2) sendo um sistema de tamponamento contendo aminoácidos essenciais e vitaminas, com adição de 10%

de soro fetal bovino e 1% de amicacina (antibiótico). O cultivo foi mantido em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. E essas células foram semeadas em placas de 96 poços (densidade de 10.000 células/poço) e incubadas a 5% de CO₂ a 37°C por 24 h.

Para esse ensaio, uma solução mãe foi preparada por meio da dissolução do óleo essencial em dimetilsulfóxido (DMSO), atingindo a concentração de 20 mg/mL. A partir dessa solução foram feitas seis diluições do óleo essencial em meio RPMI: 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13 µg/mL e incubadas por 48 h. O mesmo procedimento foi realizado para a doxorrubicina (quimioterápico) e DMSO, os quais foram considerados como controle positivo e negativo, respectivamente. Após o período de incubação, as diluições previamente preparadas foram adicionadas nas mesmas placas contendo as células e incubadas novamente a 5% de CO₂ a 37°C por 48 h. Posteriormente, foram acrescentados 10 µL do corante CCK e novamente as placas foram incubadas por cerca de 40 min. Em seguida, a leitura da absorbância ($\lambda = 450$ nm) referente a quantidade produzida de formazan, foi realizada em um leitor de placas (Synergy-HT; BioTek), sendo que a leitura é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O percentual de viabilidade das células tratadas com o óleo essencial foi calculado em relação as células tratadas com o DMSO. A redução da viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi calculada a partir das curvas de resposta à cada concentração (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 µg/mL). Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguido do teste de Dunnett post hoc. Os valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. O procedimento experimental foi realizado no National Center for Natural Products Research (NCNPR) da Universidade do Mississippi, Estados Unidos.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

4.7.1 Determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio

O experimento foi desenvolvido segundo a metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), pelo método da formação do complexo fosfatomolibdênio. O reativo de fosfomolibdênio foi preparado pela adição de uma solução com fosfato de

sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL) para 100 mL de água destilada. Soluções etanólicas do óleo essencial de *S. molle* para cada estação do ano, foram testadas na concentração de 200 µg/mL, e soluções padrão de vitamina C (ácido ascórbico) e ácido gálico foram preparadas na mesma concentração do óleo essencial. Em seguida, foi adicionado em tubo de ensaio 3 mL do reativo de fosfomolibdênio e 300 µL do óleo essencial (200 µg/mL), bem como para os padrões e o branco (etanol). Esses tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria a 95 °C por 90 min. E após o resfriamento, a leitura das absorbâncias (abs) foi realizada no comprimento de onda de 695 nm, em um espectrofotômetro UV/VIS (1601 Shimadzu®). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR %) à vitamina C (200 µg/mL) e ao ácido gálico (200 µg/mL). Os resultados foram calculados conforme a seguinte equação, onde **abs** representa a absorbância e **c** representa a concentração.

$$AAR \% = \left[\frac{C \text{ Padrão } \mu\text{g/mL} \cdot Abs (amostra) - Abs (branco)}{C \text{ da Amostra } \mu\text{g/mL} \cdot Abs (padrão) - Abs (branco)} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

E os resultados foram avaliados pela análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguido do teste de Tukey e expressos pela média ± desvio padrão da média (DP). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram feitas com a utilização do Software GraphPad Prism 7.

4.7.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A identificação do potencial de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) através da permuta de elétrons ou átomos de hidrogênio foi realizada segundo a metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001). Para o preparo do reagente, foi acrescentado 4 mg de DPPH em 5 mL de metanol. Em seguida, foi retirado 100 µL do reagente preparado adicionado a 20 µL de metanol em três poços de uma microplaca de acrílico de 96 poços. Posteriormente, foi feita uma leitura da absorbância desses reagentes, no comprimento de onda de 517 nm, para verificar se os valores estavam próximos de 0,5. Como padrões, foram usados o ácido gálico (1 mg/mL) e a vitamina C (1 mg/mL). Os padrões (100 µL) e as amostras (20 µL) do óleo

essencial de *S. molle* sofreram seis diluições seriadas nas seguintes concentrações: 500; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µg/mL, em uma microplaca de 96 poços, em triplicata. E o metanol (120 µL), colocado em três poços da microplaca, foi utilizado como branco. As absorbâncias foram identificadas em 517 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo, em um espectrofotômetro (Genesys-10S Bio). As análises foram feitas em triplicata e os resultados representados pela porcentagem de inibição, para avaliar o grau de captura dos radicais livres pelas amostras. A porcentagem foi calculada conforme a fórmula a seguir, onde **Ac** representa a absorbância da solução controle e **Aa** representa a absorbância dos óleos no tempo de 30 min.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{Ac - Aa}{Ac} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

E ao final, os resultados foram expressos pela % de inibição da oxidação pelos radicais livres. As análises estatísticas foram feitas pela análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguido do teste de Tukey e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.7.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O procedimento foi realizado segundo a metodologia de Moraes *et al.* (2006) com modificações. O princípio do método consiste em oxidar os lipídeos (peroxidação lipídica) por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para isso, uma solução de gema de ovo foi preparada a 5% (m/v) para fornecer um meio rico de lipídeos. Em tubos de ensaio, foram colocados 500 µL da solução de gema de ovo com 100 µL de solução das amostras de óleo essencial (verão, outono, inverno e primavera) (diluídos em 1 mL de etanol a 95%), e essas amostras foram testadas na concentração de 70 µg/mL. Em seguida, foram adicionados a cada tubo, 50 µL de ABAP (Cloreto de 2,2 – azo – bis – ácido) a 0,035%, para promover a indução da peroxidação lipídica. Bem como, foram adicionados em cada tubo, 1500 µL da solução de ácido acético (20%) e da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,035% (m/v), sendo esta diluída em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,55% (m/v). Os tubos de ensaio foram levados à banho-maria a 95 °C, por 1 h, e após o resfriamento desses tubos, foram adicionados 1500 µL de butanol em cada solução. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 10 min e centrifugados a 3000

rpm, por 3 min. A leitura do sobrenadante (fase orgânica) no espectrofotômetro (Genesys-10S Bio) ocorreu em 532 nm. A solução preparada descrita acima em que a amostra foi substituída por 100 µL de etanol foi considerada como o controle negativo. O antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como o controle positivo na mesma concentração da amostra. O experimento foi realizado em quintuplicata e as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$IA \% = \left(1 - \frac{A}{C}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: **IA%** - porcentual do índice antioxidante da amostra; **A** – média aritmética das absorbâncias das amostras; **C** – absorbância do controle positivo totalmente oxidado.

E os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey e expressos pela média ± desvio padrão da média (DP). Para valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.8 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO

4.8.1 Preparação dos extratos aquosos purificados de *Schinus molle* L.

Folhas de *S. molle* foram secas em estufa a 35 °C por 3 dias, no laboratório de Farmacognosia da UEPG. O material seco foi cortado e pulverizado, e os extratos foram obtidos com a infusão das folhas coletadas no verão. O infuso foi preparado com a adição de 100 g de planta pulverizada para 1 L de água destilada em ebulição (93 °C) com rendimento de 1,56%. A extração dos metabólitos secundários ocorreu no intervalo de 5 a 6 h, até atingir a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, a infusão foi tratada com três volumes de etanol que originou um precipitado e uma fração solúvel em etanol de *S. molle* (FSESM) contendo os metabólitos secundários. Esta fração foi filtrada, concentrada através de um rotaevaporador (44 °C, 4h) e liofilizada. O processo de liofilização foi realizado por um liofilizador (Terroni LD 1500) no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C- Labmu) da UEPG. Após o procedimento, FSESM foi mantida sob congelamento (- 20 °C) até o momento das análises fitoquímicas e farmacológicas.

4.8.2 Caracterização química dos extratos aquosos de *Schinus molle*

A análise química dos metabólitos secundários foi desenvolvida por cromatografia líquida ultra rápida acoplada à detectores de arranjo de diodos (UHPLC-DAD, Shimadzu) e espectrometria de massas (MS) equipado a uma fonte de ionização por eletrospray e analisador de tempo de voo quadruplo (microTOF-Q III, Bruker Daltonics).

A fração solúvel em etanol de *S. molle* (FSESM) foi preparada na concentração de 2 mg/mL, filtrada por uma seringa com membrana de PTFE (Politetrafluoretileno) (0,22 mm x 13 mm, Millex, Millipore®), e 2 µL foi injetado no cromatógrafo. Uma coluna cromatográfica Kinetex C-18 (2,6 µm, 150 x 2,2 mm, Phenomex) foi utilizada e mantida numa temperatura de 50 °C. A fase móvel consistiu de água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B), ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição aplicado foi de: 0-2 min – 3% B; 2-25 min – 3-25% B; 25-40 min – 25-80% B. E a vazão foi de 0,3 mL/min.

Os componentes foram monitorados num comprimento de onda (λ) de 240 a 800 nm. A análise por espectrometria de massas (MS) a partir da criação de íons foi obtida em modo polo positivo (4500 kV) e polo negativo (2500 kV). Esses íons foram separados em função da sua relação massa/carga (m/z) 120-1200. Para essa análise, o nitrogênio foi utilizado como gás de arraste (9L/min, 4 Bar). As fórmulas moleculares dos constituintes foram determinadas pela espectrometria de massas considerando erros de até 8 ppm e 20 mSigma. A identificação dos metabólitos foi estabelecida com base em dados espectrais UV, mensuração das massas e padrões de fragmentação em comparação com dados da literatura.

4.8.3 Estudos toxicológicos

4.8.3.1 Animais

Ratos Wistar de ambos os sexos (210-306 g) foram adquiridos pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (12 h de ciclo de luz/escuro); e acesso livre de ração e água. Todos os procedimentos experimentais

foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFGD (protocolo nº 14/2022) e conduzidos de acordo com a Legislação Brasileira para o Uso Científico de Animais.

4.8.3.2 Toxicidade aguda

Para avaliar a toxicidade oral aguda, diferentes doses de FSESM (5, 50, 300 e 2000 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) foram administradas em ratos fêmeas ($n = 5$), por via oral, de acordo com as recomendações do protocolo nº 420 estabelecidas pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2001). Parâmetros comportamentais e clínicos que evidenciam toxicidade ou morte foram monitorados durante as primeiras 8 h após a administração de FSESM, e diariamente por 14 dias.

No 15º dia, os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras sanguíneas foram coletadas. O soro foi separado da porção sedimentada pela centrifugação (1000 x g, 10 min) e enviado para as análises hematológicas e bioquímicas, que foram realizadas através de analisadores automatizados (Sysmex® XN – 3000; Roche® Cobas Integra 400 plus, respectivamente). Órgãos reprodutivos (ovários e útero) e vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rins) foram removidos para a determinação do peso relativo (peso absoluto do órgão x 100 / peso corporal de cada animal) e examinados macroscopicamente. Amostras dos órgãos vitais e reprodutivos foram enviadas para análises histopatológicas.

4.8.3.3 Genotoxicidade

4.8.3.3.1 Teste de micronúcleos

Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do protocolo nº 474 estabelecidas pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2016a). Ratos machos e fêmeas foram divididos em cinco grupos ($n = 6$). Cada grupo foi tratado, por via oral (gavagem) com FSESM em diferentes doses (5, 50 e 300 mg/kg) ou água filtrada (5 mL/kg – grupo controle negativo). A ciclofosfamida monoidratada (20 mg/kg, Sigma-Aldrich® - grupo controle positivo) foi administrada intraperitonealmente. Os tratamentos foram realizados uma

vez ao dia, por dois dias. Ao final dos tratamentos, os animais foram eutanaziados por decapitação.

Após esse processo, a epífise proximal do fêmur foi removida de cada animal, para expor o canal medular e retirada da medula. O material foi transferido para tubos de vidro e centrifugado (5 min, 1500 x g). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado com uma solução de formaldeído (4%) e suavemente homogeneizado. Uma gota da suspensão celular foi colocada em uma lâmina de vidro e em seguida foi realizado o esfregaço. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e, após 24 h, foram coradas com eosina-azul de metileno (corante Leishman) e analisadas à um microscópio óptico. Para a determinação do número de micronúcleos, 2000 eritrócitos policromáticos foram contados por animal (1000 células em cada lâmina), em um aumento de 400 x. A escolha das lâminas foi feita de forma aleatória e a análise foi realizada por somente um observador.

4.8.3.3.2 *Ensaio Cometa*

Para este ensaio foram usados os mesmos grupos experimentais de ratos descritos para o teste de micronúcleos. O ensaio cometa foi realizado de acordo com as recomendações do protocolo nº 489 (OECD, 2016b). Ao final dos tratamentos, amostras do sangue periférico foram colocadas em tubos contendo um anticoagulante, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e os animais foram eutanasiados.

O sangue total coletado foi introduzido em um aparelho de eletroforese em gel para a avaliação de possíveis danos no DNA. Um volume de 10 µL de suspensão de células foi homogeneizado com 120 µL de agarose em gel (Low Melting Point – LMP, 5%) a 37 °C, e depositada em uma lâmina pré-coberta com agarose normal (1,5 %). Em seguida, a amostra (coberta com lamínula) foi refrigerada (4 °C, 10 min) para o endurecimento da agarose.

As lamínulas sobre as lâminas foram retiradas cuidadosamente e estas armazenadas em uma solução de lise celular sob refrigeração a 4 °C, por 1 h. Após o tempo estimado, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, e um tampão alcalino foi adicionado para sobrepor a amostra. Em seguida, a cuba foi imersa em um recipiente contendo gelo a 4 °C, por 25 min, para a desnaturação do DNA celular e a corrida da eletroforese foi feita em uma voltagem de

25 V e uma corrente elétrica de 300 A. O processo da eletroforese ocorreu em aproximadamente 25 min. Após essa etapa, as lâminas foram removidas e neutralizadas, por 5 min, com 5 mL de uma solução tampão. As lâminas secas foram fixadas com etanol por 5 min. Para as análises, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio, cobertas com lamínulas e analisadas após 5 min da coloração. Para a visualização dos danos no DNA, as lâminas foram observadas em um aumento de 400 x, por um microscópio de fluorescência equipado com um filtro de excitação de elétrons (515 – 5610 nm) e um filtro de barreira (590 nm). Para cada animal foram analisadas 100 células.

4.8.4 Atividade cardiovascular: avaliação dos efeitos cardioprotetores em modelo de hipertensão arterial sistêmica

4.8.4.1 Animais

Ratos machos da variedade espontaneamente hipertensos (SHR) com 3 meses de idade, pesando entre 300-350 g, foram utilizados para os procedimentos. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os ratos foram mantidos no biotério de pesquisa da FCS/UFGD, em ambiente controlado, com uma temperatura de 22 - 25 °C, e um ciclo claro/escuro de 12 h cada. Para manutenção, os animais foram agrupados em grupos de 3 a 4 indivíduos em uma caixa retangular para ratos (49 x 34 x 16 cm – comprimento x largura x altura), utilizando maravalha como cama e com disponibilidade de comida e água à vontade. Para os diferentes protocolos experimentais o número de animais por grupo foi de 8 indivíduos. Este número foi estimado com base em estudos prévios, dos quais se extraiu a variabilidade esperada (variância) e permite que se detecte uma diferença maior ou igual a 20% nos parâmetros a serem investigados. Os protocolos descritos neste projeto foram baseados nos trabalhos de Gasparotto Junior *et al.* (2011), que caracterizam o rato SHR como um bom modelo para experimentos da atividade cardioprotetora. Todos os procedimentos executados apresentaram GRAU DE INVASIVIDADE = 2 e estão de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), e foram submetidos e aprovados previamente pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UFGD (nº 14/2022).

4.8.4.2 Desenho experimental e avaliação da função renal

Para este protocolo, os ratos SHR e Wistar-Kyoto foram divididos em diferentes grupos experimentais ($n = 8$) e submetidos, diariamente, por 4 semanas, aos seguintes tratamentos:

- 1) Naive ($n = 8$): ratos Wistar-Kyoto tratados pela via oral (gavagem) com o veículo (água filtrada) em um volume de 5 mL/kg;
- 2) Controle negativo ($n = 8$): ratos SHR tratados por gavagem com o veículo (água filtrada) em um volume de 5 mL/kg;
- 3) SEI-teste ($n = 8$): ratos SHR tratados por gavagem com três doses (30, 100 e 300 mg/kg) de FSESM;
- 4) Controle positivo: ratos SHR ($n = 8$) tratados por gavagem com hidroclorotiazida (HCTZ, 25 mg/kg).

Semanalmente, a fim de promover a uniformidade corporal de sal e água, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio (NaCl) à 0,9% (5 mL/100 g) uma hora antes do início dos tratamentos. Para cada rato, a urina produzida após 8 horas (nos dias 1 e 28) foi coletada (com auxílio de gaiolas metabólicas) em cilindros graduados. Além disso, as taxas de mortalidade foram monitoradas diariamente e o peso corporal foi registrado por uma balança analítica semanalmente.

Ao final do período experimental (dia 29), todos os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) administrada por via intramuscular. Quando necessário, a anestesia foi suplementada com uma nova dose de anestésico a cada 45 a 60 minutos. Posteriormente, todos os animais foram submetidos aos experimentos descritos abaixo.

4.8.4.3 Eletrocardiograma

Após a anestesia, todos os animais foram mantidos em decúbito dorsal. Quatro eletrodos (RL, RA, LL e LA) foram posicionados em ambos os pulsos e tornozelos. O eletrodo V1 foi posicionado no 4º espaço intercostal à direita do esterno. Uma pequena quantidade de gel condutor foi aplicada em cada interface dos eletrodos para melhor condutância elétrica. Um período de aclimatização de 5 minutos foi aguardado e, em seguida, as ondas (P, R e T) e os intervalos (PR, QRS, ST e QT)

eletrocardiográficos foram registrados por 5 minutos através de um eletrocardiógrafo (WinCardio, Micromed, Brasília, Brasil).

4.8.4.4 Medidas das pressões arteriais

Após a eletrocardiografia, uma injeção subcutânea de heparina (30 UI) foi administrada em *bolus* em todos os animais. Posteriormente, a artéria carótida esquerda foi isolada, canulada e conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Australia), onde os dados de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram mensurados e gravados. Após 15 minutos necessários para a estabilização da pressão arterial, os valores das pressões sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca foram registrados por 5 minutos.

4.8.4.5. Reatividade vascular em leito mesentérico

Antes da eutanásia, os leitos vasculares mesentéricos foram rapidamente isolados e preparados para a perfusão como descrito previamente (Kawasaki *et al.*, 1988, 1991). A artéria mesentérica superior foi canulada e lavada delicadamente por uma solução de PSS (119 mM de NaCl; 4,7 mM de KCl; 2,4 mM de CaCl₂; 1,2 mM de MgSO₄; 25,0 mM de NaHCO₃; 1,2 mM de KH₂PO₄; 11,1 mM de dextrose e 0,03 mM EDTA) para eliminar o sangue de seu interior. Após a remoção do intestino inteiro e do leito vascular associado, o leito mesentérico foi delicadamente separado. Somente quatro filiais arteriais principais do tronco mesentérico superior co-localizada próximo ao íleo terminal foram utilizadas. Os leitos mesentéricos isolados foram acondicionados em cubas de vidro, mantidos a 37 °C, aerados com carbogênio (O₂ 95% e CO₂ 5%) e perfundidos a um fluxo constante de 4 mL/min com uma solução de PSS com auxílio de uma bomba peristáltica. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Australia). Após um período de 30 minutos para estabilização, a integridade da preparação foi verificada por uma administração em bolus de 120 mmol de KCl. Em seguida, uma curva dose-resposta de fenilefrina (Phe; 0,1; 0,3 e 1 nmol; 10-30 µL), angiotensina II (Ang II; 0,1; 0,3 e 1 nmol; 10-30 µL) e endotelina (End; 0,1; 0,3 e 1 nmol; 10-30 µL) foi

realizada. Após um novo período de estabilização (30 minutos), as preparações foram continuamente perfundidas com PSS associado com 3 μ M de Phe para induzir um aumento prolongado na pressão de perfusão. Nestas condições, foram investigadas as alterações da reatividade vascular induzidas pela administração de nitroprussiato de sódio (SNP; 1, 3 e 10 pmol; 10-30 μ L) e acetilcolina (ACh; 1, 3 e 10 pmol; 10-30 μ L). Os resultados obtidos foram comparados entre os diferentes grupos experimentais.

4.8.4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism versão 10.3 (GraphPad® Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *S. molle*

O óleo essencial extraído das folhas (folha e pecíolo) coletadas de *S. molle* (6 espécimes) para as quatro estações do ano de *S. molle*, apresentou-se como incolor nas primeiras horas da extração e posteriormente apresentou-se como levemente amarelado, viscoso e com uma fragrância acre. A coloração amarelada é uma característica observada para os óleos extraídos de plantas da família Anacardiaceae (Hou, 1974).

A coloração amarelada é uma característica presente no óleo essencial de folhas (Simionatto *et al.*, 2011; Zahed *et al.*, 2010) e de frutos de *S. molle* (Erygit *et al.*, 2017; Zahed *et al.*, 2010). No entanto, Díaz *et al.* (2008) caracterizou o óleo essencial como incolor para folhas de *S. molle*, em uma extração de 2h, na região da Costa Rica. A fragrância do óleo essencial de *S. molle* pode ser considerado um indicativo da presença de metabólitos constituintes, sendo que um odor picante sugere a presença de terpenoides hidrocarbonados, o aroma cítrico é um indicativo da presença de monoterpenos hidrocarbonados enquanto que o odor amadeirado podendo indicar a presença de sesquiterpenos (Bernhard *et al.*, 1983; Maffei; Chialva, 1990).

Os resultados obtidos para o rendimento do óleo essencial extraído de folhas de *S. molle*, sendo o tempo para cada extração de 4 horas e a massa de planta seca de 365g, estão apresentados na tabela 1.

De acordo com a apresentação dos dados, o rendimento de extração do óleo essencial foi maior para a estação verão e inverno e menor para a estação outono. Além do mais, o óleo essencial extraído no período de outono foi considerado mais denso.

O rendimento do óleo essencial é variável para cada extração por hidrodestilação obtido de folhas de *S. molle*. Alguns autores relatam diferentes valores de rendimento para o óleo essencial sendo estes: de 0,9% (Gundidza, 1993), 1,09% (Do Rosário Martins *et al.*, 2014), 1,1% (Zahed *et al.*, 2010), 1,2% (Díaz *et al.*, 2008; Simionatto *et al.*, 2011), 1,67% (Baser *et al.*, 1997), 2,11% (Belhamel; Abderrahim; Ludwig, 2008) e 2,7 % (Bendaoud *et al.*, 2010). E para o óleo extraído dos frutos de

S. molle o rendimento calculado para os estudos de outros pesquisadores foi de 0,91% (Do Rosário Martins *et al.*, 2014), 2,5% (Bendaoud *et al.*, 2010), 3,14 % (Zahed *et al.*, 2010) e 3,14% - 4,3% (Baser *et al.*, 1997). Portanto, os valores de rendimento dos óleos essenciais extraídos de *S. molle* é variável e dependente da região geográfica.

Tabela 1 – Valores de rendimento para o óleo extraído das folhas de *Schinus molle*

Estações do ano	Volume extraído (mL)	Rendimento (%)
Óleo essencial (verão)	4,10 ± 0,85	1,12 ± 0,23
Óleo essencial (outono)	3,47 ± 0,78	0,95 ± 0,10
Óleo essencial (inverno)	4,18 ± 0,32	1,14 ± 0,05
Óleo essencial (primavera)	3,95 ± 0,92	1,08 ± 0,25

Fonte: A autora

Nota: Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão da média. O valor do volume foi obtido pela extração do óleo em triplicata.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *S. molle* POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

O óleo essencial extraído das folhas de *S. molle* para as quatro estações do ano foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-MS) e os resultados estão expressos na tabela 2. Compostos identificados com rendimento $\geq 5\%$ foram considerados majoritários. Ao observar os resultados obtidos, existe uma variação na composição química entre os óleos essenciais das diferentes estações do ano. Dentre os principais compostos identificados temos para o **verão** – óxido de cariofileno (8,88%), β -pineno (8,84%) e *E* – cariofileno (7,53%), limoneno (6,11%), espatulenol (5,88%) e α -muuroleno (5,42%); **primavera** – limoneno (5,27%), **outono** – zonareno (9,27%), globulol (7,84%) e canfeno (5,19%); **inverno** – muurolol (19,40%), α -cadinol (16,32%), ledol (14,46%) e óxido de cariofileno (11,44%). Para a estação da primavera foram identificados 14,61% e para o outono 14,47% de compostos com concentrações $< 1\%$.

A tabela 3 mostra a porcentagem na classificação química de todos os compostos identificados para os óleos essenciais de cada estação do ano, verificando a predominância de sesquiterpenos hidrocarbonetos (32,4%) e oxigenados (32%) para o **verão**; monoterpenos hidrocarbonetos (14%) sesquiterpenos oxigenados (14,44%) para a **primavera**; sesquiterpenos hidrocarbonetos (17,48%) e oxigenados (16,78%) para o **outono**; sesquiterpenos oxigenados (69,67%) para o **inverno**.

Sesquiterpenos oxigenados predominam na composição química do óleo essencial obtido de folhas de *S. molle* para as quatro estações do ano. No entanto, monoterpenos hidrocarbonetos foram identificados somente em amostras da primavera. Adicionalmente, o óleo essencial obtido no inverno é o que demonstra alta porcentagem de sesquiterpenos oxigenados (69,67%). Os sesquiterpenos hidrocarbonetos também foram majoritariamente encontrados na composição química do óleo essencial, estando ausentes na primavera.

A composição química dos óleos essenciais das diferentes estações do ano corrobora com os estudos feitos por Batista *et al.* (2016) ao afirmar que os óleos essenciais de *S. molle* são ricos em terpenos, dos quais são monoterpenos e sesquiterpenos. O perfil de sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos também foram reportados por Da Silveira *et al.* (2020) para o óleo essencial de folhas de *S. molle*.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas de *Schinus molle* L. nas quatro estações do ano

(continua)

Composto	Índice de retenção		Verão	Primavera	Outono	Inverno
	Determinado	Literatura	(%)			
3-metil-pentanol	843	864	-	0,23	0,13	-
n-octano	861	800	-	0,49	-	-
Isopropil-2-metil butirato	874	880	-	1,74	-	-
α -Pineno	938	936	4,23	3,82	2,81	-
Camphene	946	948	0,87	2,23	5,19	1,19
β -felandreno	961	967	-	-	1,93	0,88
Sabineno	963	974	-	-	1,77	1,02
β -Pineno	980	977	8,84	2,68	2,86	-
Limoneno	1026	1024	6,11	5,27	1,14	2,57
Trans-pinocarveol	1139	1135	-	-	2,06	1,54
Trans-verbenol	1142	1140	3,17	1,47	-	-
Pinocarvona	1161	1165	0,45	2,67	0,42	-
Trans-óxido de linalol	1182	1174	0,16	1,63	1,11	3,55
Mirtenol	1198	1195	2,45	2,55	1,40	-
Trans-carveol	1225	1215	-	1,45	0,33	-
Carvona	1232	1239	-	-	1,70	1,20
<i>p</i> -cimeno	1275	1273	-	0,39	0,94	-
Acetato de trans-verbenol	1293	1291	-	0,30	1,03	-
α -Cubebeno	1356	1345	0,14	-	1,68	-
β -Cubebeno	1383	1387	0,69	-	0,87	-
β -Elemeno	1399	1389	4,76	-	1,16	-
<i>E</i> -Cariofileno	1427	1417	7,53	-	3,33	4,44
Aromadendreno	1447	1439	3,58	-	0,33	1,50
α -Humuleno	1461	1452	1,10	-	-	-
9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	1469	1464	2,03	-	-	1,59

(conclusão)

Composto	Índice de retenção		Verão	Primavera	Outono	Inverno
	Determinado	Literatura	(%)			
γ -Muuroleno	1485	1478	1,63	-	-	-
Trans-Muurolo-4(14),5-dieno	1489	1493	1,46	-	-	-
β -Selineno	1494	1489	2,58	-	-	-
α -muuroleno	1504	1500	5,42	3,58	-	-
Germacreno A	1513	1508	1,08	-	-	-
γ -Cadineno	1523	1513	2,80	2,44	-	3,85
Zonareno	1536	1528	1,32	1,42	9,27	0,67
Espatuleno	1588	1577	5,88	-	0,67	1,78
Óxido de cariofileno	1592	1582	8,88	-	0,75	11,44
Viridiflorol	1600	1592	1,64	-	-	-
Globulol	1609	1590	0,96	2,26	7,84	1,98
Ledol	1619	1602	3,05	1,97	2,22	14,46
Epóxido de humuleno II	1620	1608	0,44	0,84	-	0,68
1,10,di-epi-cubenol	1612	1618	1,67	1,44	0,70	3,61
Muurolol	1642	1644	5,82	-	-	19,40
α -cadinol	1664	1652	1,20	1,58	2,60	16,32
α -terpineol	1695	1694	1,44	-	-	-
14-hidroxi- α -humuleno	1723	1713	-	0,91	-	-
Biciclogermacreno	1728	1726	-	1,32	1,17	1,95
γ -Costol	1747	1745	0,97	0,72	0,94	-
α -Costol	1775	1773	1,49	0,35	0,44	-
β -quenopodiol	1817	1811	-	2,21	-	-
Total identificado			98,3	51,3	60,69	97,14

Fonte: A autora

Nota: Compostos majoritários identificados para os óleos essenciais extraídos nas quatro estações do ano com rendimento $\geq 5\%$. Os índices de retenção foram determinados e comparados com as bibliotecas NIST 21 e WILEY229 (Adams, 2005).

Tabela 3 - Classificação química dos compostos majoritários (rendimento $\geq 5\%$) identificados no óleo essencial das folhas de *Schinus molle* em % de índice de retenção pela cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) para cada estação do ano

Classificação química						
Estações do ano	Monoterpenos hidrocarbonetos	Monoterpenos oxigenados	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	Sesquiterpenos oxigenados	Sesquiterpenos tricíclicos	Monoterpenos acíclicos
Óleo essencial de verão	20,05%	3,89%	32,4%	32%	3,58%	-
Óleo essencial de outono	15,7%	7,88%	17,48%	16,78%	0,33%	1,11%
Óleo essencial de inverno	5,66%	2,74%	12,5%	69,67%	1,50%	3,55%
Óleo essencial de primavera	14%	8,83%	8,76%	14,44%	-	1,63%

Fonte: A autora.

De acordo com Simionatto *et al.* (2011), o óleo essencial extraído de folhas de *S. molle*, estação verão, coletadas na região do Mato Grosso do Sul, evidenciou 16 compostos químicos, incluindo monoterpenos oxigenados (20%) como o 1,8-cineol (7,6%) e terpin-4-ol (6,1%) e sesquiterpenos (69,1%) (57,5% de sesquiterpenos oxigenados; *epi- α* -cadinol (27,3%), óxido de cariofileno (8,88% - verão; 11,44% - inverno); γ -cadineno (9,1%), espatulenol (8,6%), 1,10-di-*epi*-cubenol (4,4%) e *epi- α* -eudesmol (2,3%). Óxido de cariofileno também foi encontrado no presente estudo.

No que se refere aos grupos de terpenos, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos alcoólicos foram encontrados como principais classes de voláteis presentes no óleo essencial extraído de folhas e de frutos de *S. molle*, além de monoterpenos hidrocarbonetos que estão em menor quantidade tanto nos frutos quanto nas folhas. Os monoterpenos hidrocarbonetos estavam mais presentes no óleo essencial extraído de folhas do que de flores. Enquanto que os monoterpenos oxigenados são mais abundantes no óleo essencial dos frutos do que em folhas de *S. molle* (Zahed *et al.*, 2010). Díaz *et al.* (2008) também identificou monoterpenos na composição do óleo essencial de folhas de *S. molle*, destacando os compostos α e β -pineno.

Na pesquisa de Machado *et al.* (2019) para o óleo extraído das folhas de *S. molle* na região dos Campos Gerais, Paraná, Brasil, foi identificado 52,8% de monoterpenos, dos quais 38,8% são monoterpenos hidrocarbonetos. Os principais monoterpenos encontrados foram α -pineno (14,1%), β -pineno (14,7%) e limoneno (9,4%). Além disso, foi identificado o sesquiterpeno muurolol (11,8%). Em contrapartida, ao comparar o composto muurolol (19,40%) consta em maior quantidade no óleo da estação inverno para o presente estudo e o limoneno (6, 11%) para o verão em menor quantidade.

Maffei e Chialva (1990) afirmaram que os sesquiterpenos eram o grupo mais presente em folhas de *S. molle*, contudo Zahed *et al.* (2010) identificaram uma maior porcentagem de sesquiterpenos hidrocarbonetos no óleo essencial de frutos em comparação com as folhas de *S. molle*. Sesquiterpenos hidrocarbonetos encontrados em frutos de espécies de *Schinus* apareceram em menor quantidade no óleo essencial de *S. molle* em comparação à *S. terebinthifolia* (Bendaoud *et al.*, 2010).

E também, monoterpenos hidrocarbonetos estão em maior porcentagem nos óleos de frutos do que em folhas de *S. molle* (Erygit *et al.*, 2017). O mesmo ocorre,

em estudos de Eryigit *et al.* (2017), monoterpenos hidrocarbonetos (70,16%) são majoritários no óleo essencial de frutos de *S. molle*, enquanto que sesquiterpenos (0,39%) são a minoria na composição total, apresentando somente δ -cadineno como compostos volátil representante do grupo. Monoterpenos oxigenados (13,66%) também foram encontrados no óleo essencial desses frutos, coletados em uma região da Turquia, porém em menor quantidade quando extraído de folhas, em estudos de Simionatto *et al.* (2011).

Alguns estudos também foram feitos com o óleo essencial extraído dos caules de *S. molle*, dos quais foram identificados como a maioria na composição, os monoterpenos hidrocarbonetos (40,90%) e sesquiterpenos (54,6%) (Salem *et al.*, 2016).

Adicionalmente, estudos de Bendaoud *et al.* (2010) também evidenciaram a presença de monoterpenos hidrocarbonetos em alta concentração no óleo essencial obtido de frutos de *S. molle*, bem como em *S. terebinthifolius*. No entanto, Do Rosário Martins *et al.* (2014) encontraram alta concentração de monoterpenos (69,3%) no óleo essencial extraído de folhas de *S. molle*.

Indubitavelmente, verifica-se uma alta variabilidade nos constituintes voláteis e na quantidade destes na composição dos óleos essenciais de frutos e de folhas de *S. molle*. A composição química dos óleos essenciais de plantas medicinais é variável devido à fatores geográficos, ecológicos, variabilidade genética, processo de extração, estações do ano, solo e germinação (Barroso *et al.*, 2011; Eryigit *et al.*, 2017). Além desses fatores, diferenças na via da cadeia metabólica interfere na produção de diferentes compostos químicos em óleos essenciais de frutos e folhas de *S. molle* (Schwob *et al.*, 2004; Vekiari *et al.*, 2002; Zahed *et al.*, 2010). Adicionalmente, diferentes quimiotipos de espécies medicinais influenciam na diferenciação química na composição do óleo essencial, a exemplo disso, está a *Artemisia absinthium* L. em estudos comprovados de Llorens-Molina e Vacas (2015).

No que se refere aos compostos voláteis, Maffei e Chialva (1990) identificaram em folhas de *S. molle*, α e β -felandreno (monoterpenos hidrocarbonetos), limoneno, elemol (sesquiterpeno oxigenado), D-germacreno, γ -eudesmol e *T*-cadinol. Belhamel; Abderrahim e Ludwig (2008) também identificaram α e β -felandreno e limoneno como principais componentes do óleo essencial de folhas de *S. molle*. Dentre a classe de

monoterpenos hidrocarbonetos, o α -pineno é o mais abundante no óleo essencial das folhas em comparação aos frutos (Belhamel; Abderrahim; Ludwig, 2008).

Eryigit *et al.* (2017) encontraram como principais compostos o α -felandreno, β -felandreno (limoneno) e *p*-cimoneno no óleo essencial de frutos de *S. molle*. Dentre os monoterpenos hidrocarbonetos, o composto α -felandreno apareceu em maior porcentagem (31,74%) na composição do óleo essencial de frutos. Os compostos α -felandreno e β -felandreno também foram encontrados como principais constituintes nos óleos essenciais de frutos de *S. molle* e *S. terebinthifolius* (Bendaoud *et al.*, 2010). Para a questão da biossíntese de metabólitos secundários de uma planta medicinal, a produção de monoterpenos requer moléculas precursoras menores e a atuação de enzimas do que para a produção de sesquiterpenos (Baby *et al.*, 2010; Do Rosário Martins *et al.*, 2014). Desta forma, relacionando a variação na composição química dos óleos essenciais, sugere-se a presença de diferentes quimiotipos de *S. molle* (Do Rosário Martins *et al.*, 2014; Rossini *et al.*, 1996).

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *S. molle* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

O perfil químico do óleo essencial de *S. molle* para cada estação do ano foi analisado por cromatografia em camada delgada de alta eficiência. A tabela 4 mostra os detalhes da aplicação das amostras e dos padrões em placas de CCDAE, podendo ser observados a identificação das amostras e dos padrões, o tipo das amostras (estações do ano), o volume (2 – 5 μ L) e a posição das aplicações.

A aplicação das amostras contendo óleo essencial de *S. molle* revelou um *fingerprint* mais evidente para todas as estações do ano (verão, outono, inverno e primavera) sendo identificados nas colunas 7 a 10. Portanto, as análises foram feitas de acordo com as colunas 7 a 10, sendo destacas em branco nas figuras 6 e 7.

As análises demonstraram as bandas dos principais marcadores para os óleos essenciais de *S. molle* em diferentes estações do ano, em que pequenas variações de intensidade das colorações foram observadas, sendo elas:

- $R_F \sim 0,4$: bandas alaranjadas (UV 366 nm) e bandas rosadas em luz branca;
- $R_F \sim 0,22$: bandas alaranjadas (UV 366 nm) e bandas acinzentadas em luz branca.

Para esses resultados, o óleo essencial da estação primavera (T1795) demonstrou uma maior intensidade na coloração em $R_F \sim 0,4$ quando comparado com as outras estações do ano, e além disso, foi identificado uma banda azulada (mais intensa) abaixo da alaranjada. Entretanto, em $R_F \sim 0,22$ é um dos menos intenso na análise de luz branca. Em UV 366 nm foi observado uma banda evidente em $R_F \sim 0,68$ somente para o óleo essencial da estação primavera. Portanto, o óleo essencial da estação primavera de *S. molle* possui uma variação múltipla na sua composição química.

As amostras de óleo essencial da estação verão (T1792) e da estação outono (T1793) possuem uma composição química semelhante com pequenas variações entre elas. Para essas duas estações, a análise em UV 366 nm evidenciou uma intensidade maior da luz verde em $R_F \sim 0,53$, quando comparadas com amostras de inverno e primavera. Ao analisar as bandas $R_F \sim 0,8$ e $R_F \sim 0,27$, as colorações são mais intensas para as amostras de verão e menos intensas para o outono. Portanto, o óleo essencial da estação verão de *S. molle* possui maior número de constituintes voláteis que o óleo essencial da estação outono. Esse fato também foi observado na CG-EM.

Para o óleo essencial de inverno (T1794), observou-se uma banda com $R_F \sim 0,27$. Em UV 366 nm as bandas com $R_F \sim 0,53$ e $R_F \sim 0,6$ apresentaram-se com baixa intensidade de coloração. Comparando-se as quatro estações, o óleo essencial da estação inverno de *S. molle* apresentou uma quantidade menor de compostos voláteis, o mesmo observado em CG-EM.

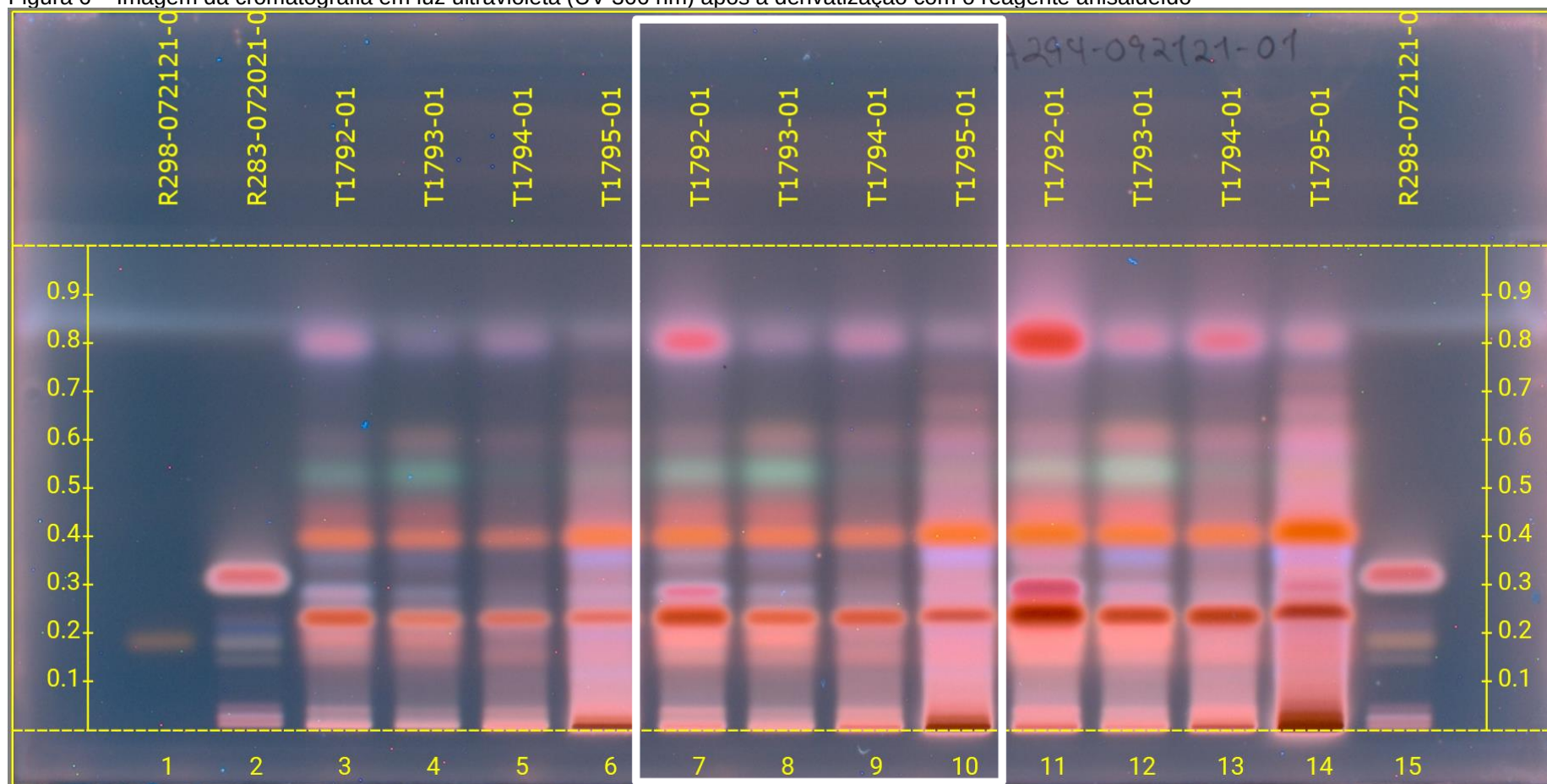
O método CCDAE é considerado como uma metodologia complementar a cromatografia em camada delgada (CCD) e à CG-EM (Do *et al.*, 2021). Não há estudos prévios relatando o perfil químico do óleo essencial de *S. molle* por CCDAE, sendo este o primeiro trabalho a descrever tais resultados.

Tabela 4 – Descrição das amostras do óleo essencial de *Schinus molle* aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

Numeração	Identificação	Descrição	Volume (μL)	Posição	Tipo
1	R298-072121-01-1	Borneol	2,0	A1	Padrão
2	R283-072021-01	α -bisabolol	2,0	A2	Padrão
3	T1792-01	Óleo essencial de verão	1,0	B1	Amostra
4	T1793-01	Óleo essencial de outono	1,0	B2	Amostra
5	T1794-01	Óleo essencial de inverno	1,0	B3	Amostra
6	T1795-01	Óleo essencial de primavera	1,0	B4	Amostra
7	T1792-01	Óleo essencial de verão	2,0	B1	Amostra
8	T1793-01	Óleo essencial de outono	2,0	B2	Amostra
9	T1794-01	Óleo essencial de inverno	2,0	B3	Amostra
10	T1795-01	Óleo essencial de primavera	2,0	B4	Amostra
11	T1792-01	Óleo essencial de verão	5,0	B1	Amostra
12	T1793-01	Óleo essencial de outono	5,0	B2	Amostra
13	T1794-01	Óleo essencial de inverno	5,0	B3	Amostra
14	T1795-01	Óleo essencial de primavera	5,0	B4	Amostra
15	R298-072121-01-1	Borneol	2,0	A1	Padrão
+	R283-072021-01	α – bisabolol	2,0	A2	Padrão

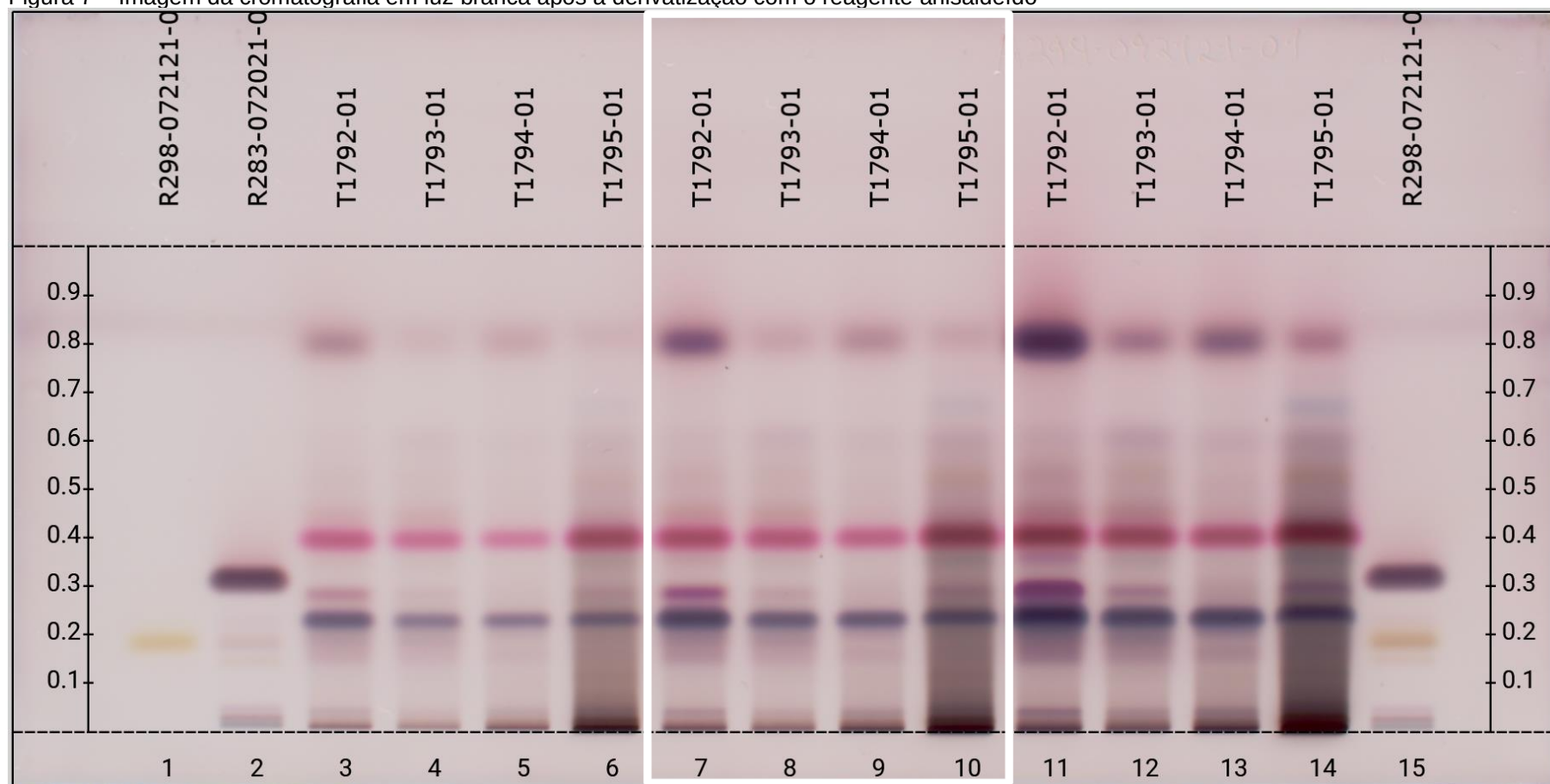
Fonte: A autora.

Figura 6 – Imagem da cromatografia em luz ultravioleta (UV 366 nm) após a derivatização com o reagente anisaldeído



Fonte: A autora.

Figura 7 – Imagem da cromatografia em luz branca após a derivatização com o reagente anisaldeído



Fonte: A autora.

5.4 INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.4.1 Identificação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Schinus molle*

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *S. molle* da estação verão foi analisada pelo método de microdiluição em caldo frente à sete microrganismos sendo cepas de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e o fungo *Candida albicans* com o objetivo de se determinar concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). O óleo essencial da estação verão foi selecionado por ter apresentado uma maior variabilidade química identificada pela cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) entre as estações do ano, contendo maior teor de sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos.

Para as amostras analisadas foram avaliadas quatro diluições da mais concentrada para a menos concentrada: 0,203 g/mL, 0,1015 g/mL, 0,0507 g/mL e 0,0253 g/mL. Foi observada uma inibição do crescimento microbiano (CIM) apenas para *E. coli* na maior concentração da diluição, ou seja, a de 0,203 g/mL do óleo essencial. Enquanto que, para *P. mirabilis*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* as diluições não inibiram qualquer crescimento microbiano.

A diluição de 0,203 g/mL que inibiu o crescimento bacteriano de *E. coli* foi a escolhida para avaliar a CBM, sendo essa diluição semeada em ágar Mueller-Hinton. O resultado desse parâmetro foi a presença de crescimento bacteriano, indicando que não houve atividade bactericida para essa diluição avaliada, ou seja, a concentração de 0,203 g/mL de óleo essencial de verão de *S. molle* não é o suficiente para eliminar o crescimento bacteriano de *E. coli*.

Diferentes diluições dos óleos essenciais de *S. molle* feitas em álcool absoluto foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana, sendo identificada tal atividade contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, mas não para *S. aureus*. A atividade antifúngica também não foi observada frente à *C. albicans* nas concentrações de 32, 30, 27 e 21 µL/mL de óleo essencial (Gundidza, 1993).

Simionatto *et al.* (2011) observou atividade antimicrobiana das folhas de *S. molle* por meio da concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas de bactérias como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e para o fungo *C. albicans* em

uma concentração de 5 mg/mL de óleo essencial. Relacionando esses resultados com o presente estudo, em concentrações maiores que 5 mg/mL (0,203 g/mL, 0,1015 g/mL, 0,0507 g/mL e 0,0253 g/mL), não houve atividade antimicrobiana para esses microrganismos.

Algumas substâncias foram identificadas em estudos prévios quanto à intensidade da ação antimicrobiana, dentre elas estão os monoterpenos hidrocarbonetos (pinenos e sabinenos) que estão envolvidos na atividade antimicrobiana de bactérias gram-positivas, como *S. aureus* (Rocha *et al.*, 2012).

Martins *et al.* (2014) avaliaram o óleo essencial de folhas de *S. molle* contra cepas de *S. epidermis* (63 µg/mL), *S. aureus* (125 µg/mL), *E. faecalis* (500 µg/mL) e observaram uma atividade antibactericida pelo método de disco-difusão. No entanto, o óleo essencial apresentou uma atividade menos intensa contra *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium*, com CIM > 1000 µg/mL. Também foi observada uma atividade efetiva contra o fungo *Rhizopus* spp.

De acordo com Martins *et al.* (2014), o óleo essencial de folhas de *S. molle* foi efetivo na atividade antimicrobiana frente à *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. albicans*. Em outro estudo, o óleo essencial de folhas de *S. molle* foi eficiente contra *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* e *Vibrio vulnificus* (Belhamel; Abderrahim; Ludwig, 2008).

Os compostos α e β -felandreno estão envolvidos no efeito fungicida do óleo essencial de *S. molle* (Maffei; Chialva, 1990).

De acordo com o estudo de Eryigit *et al.* (2017) o óleo essencial de frutos de *S. molle* apresentou uma efetividade da inibição do crescimento para *E. faecalis*, além de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, houve uma menor inibição do crescimento para *C. albicans*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*. Além disso, o óleo essencial de frutos de *S. molle* também inibiu o crescimento de *E. faecalis*, bem como de *S. aureus* (Martins *et al.*, 2014).

Além desses estudos, o óleo essencial extraído de caules de *S. molle* apresentou atividade antibactericida contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Sarcina lutea*, *P. aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, com valores de CIM de 250, 32, 64, 125, 125, 250 e 500 µg/mL, respectivamente (Salem *et al.*, 2016).

Essas diferenças na atividade antimicrobiana podem ser influenciadas pela composição química do óleo essencial das folhas e frutos de *S. molle* onde a predominância de um dado constituinte pode apresentar maior ou menor atividade (Do

Rosário Martins *et al.*, 2014; Erygit *et al.*, 2017; Marino; Bersani; Comi, 2001). Além do mais, existe a possibilidade de ocorrer um sinergismo entre as substâncias químicas presentes no óleo essencial que influenciam na ação antimicrobiana (Belhamel; Abderrahim; Ludwig, 2008; Dorman; Deans, 2018). Diante disso, sugere-se que ao analisar a composição química do óleo essencial de verão de *S. molle* ocorra um sinergismo entre os dois compostos majoritários, os sesquiterpenos óxido de cariofileno e *E*-cariofileno. Em estudo de Montanari *et al.* (2011), o *E*-cariofileno, um dos constituintes do óleo essencial de algumas espécies de Verbanaceae, demonstrou a ação antimicrobiana contra cepas de *E. coli*.

5.4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por carragenina

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial das diferentes estações do ano das folhas de *S. molle* foi avaliada *in vivo* numa concentração de 30 mg/kg. O modelo experimental selecionado foi por meio da produção de edema de pata induzido por carragenina. O mecanismo de hiperalgesia foi avaliada pelo teste de Von Frey (sensibilidade mecânica) e a hiperalgesia em resposta ao frio foi verificada pelo teste da acetona (sensibilidade ao frio).

O tratamento oral com todas as amostras do óleo essencial das folhas de *S. molle* na dose de 30 mg/kg ($p < 0,001$) entre as estações do ano apresentaram significativa inibição do edema de pata quando comparado ao grupo controle em 2 h e 4 h (Figura 8A). O fármaco prednisolona 3 mg/kg, como o esperado, apresentou efeito anti-inflamatório evidente, com inibição de 85,26 % (2 h) e 78,20 % (4 h).

Em relação a hiperalgesia, todos os tratamentos com o óleo essencial de *S. molle* (30 mg/kg) ($p < 0,001$) foram capazes de reduzir a hiperalgesia mecânica e ao frio induzida por carragenina em camundongos em 3h e 4h, quando comparado ao grupo controle (Figura 8B, C). O controle positivo expressou 94,44 % (3 h) e 93,11 % (4h) quando avaliado na hiperalgesia mecânica (Figura 8B) e 84,26% (3h) e 80,90% (4h) na hiperalgesia ao frio (Figura 8C).

Diante dos resultados, todos os óleos essenciais das folhas de *S. molle*, independente da estação do ano da qual foi extraído, demonstrou atividade anti-inflamatória significativa em percentuais acima de 60%, quando comparado ao grupo controle para os modelos avaliados.

Alguns pesquisadores, como Jimenez-Estrada *et al.* (2006) e Paço *et al.* (2022), relacionam a classe dos sesquiterpenos com a atividade anti-inflamatória. Diante dessa premissa, os sesquiterpenos foram identificados majoritariamente para os óleos de *S. molle* nas quatro estações do ano. Portanto, sugere-se que os compostos: ϵ -cariofileno, globulol, muurolol, α -cadinol, ledol e α -muuroleno estão envolvidos na ação anti-inflamatória identificada no óleo essencial das folhas de *S. molle*. Além disso, ocorre uma maior predominância de sesquiterpenos para o óleo essencial extraído do inverno, comprovando a resposta anti-inflamatória evidenciada para o teste de Von Frey e à sensibilidade ao frio.

No estudo de Yueqin *et al.* (2003), foi identificado a atividade anti-inflamatória dos triterpenos presentes no extrato metanólico dos frutos de *S. molle* em modelo de edema de pata em diferentes tempos (30, 60 e 90 minutos) em ratas da linhagem *Swiss*. Para esse modelo de estudo, o triterpeno ácido isomasticadienonálico apresentou uma redução do edema produzido em 66% para 60 minutos. Para o composto biflavonoide chamaejasmin reduziu a inflamação em 46% em 3 horas após a indução da inflamação por carragenina em modelo de edema de pata. E para a inflamação crônica induzida pela aplicação tópica repetida de 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) foi observado a atividade inibitória dos triterpenos ácido epi-isomasticadienolálico (39%), ácido isomasticadienonálico (48%) e chamaejasmin (26%) presentes nos extratos metanólicos dos frutos de *S. molle*.

Feriani *et al.* (2021) também realizou a avaliação da atividade anti-inflamatória com extratos metanólicos de frutos de *S. molle* (25, 50 e 100 mg/kg) em modelo de edema de pata (ratos machos Wistar), porém comparando com extratos de frutos de *S. terebinthifolius* (25, 50 e 100 mg/kg). Esses extratos reduziram significativamente a ação inflamatória em diferentes períodos de tempo (1h, 2h, 3h, 4h e 5h). No entanto, o extrato de *S. terebinthifolius* apresentou maior potencial de atividade anti-inflamatória nesse estudo. Os autores descreveram que essa ação é dependente da dose-resposta, ou seja, maior atividade com uma dose maior (100 mg/kg).

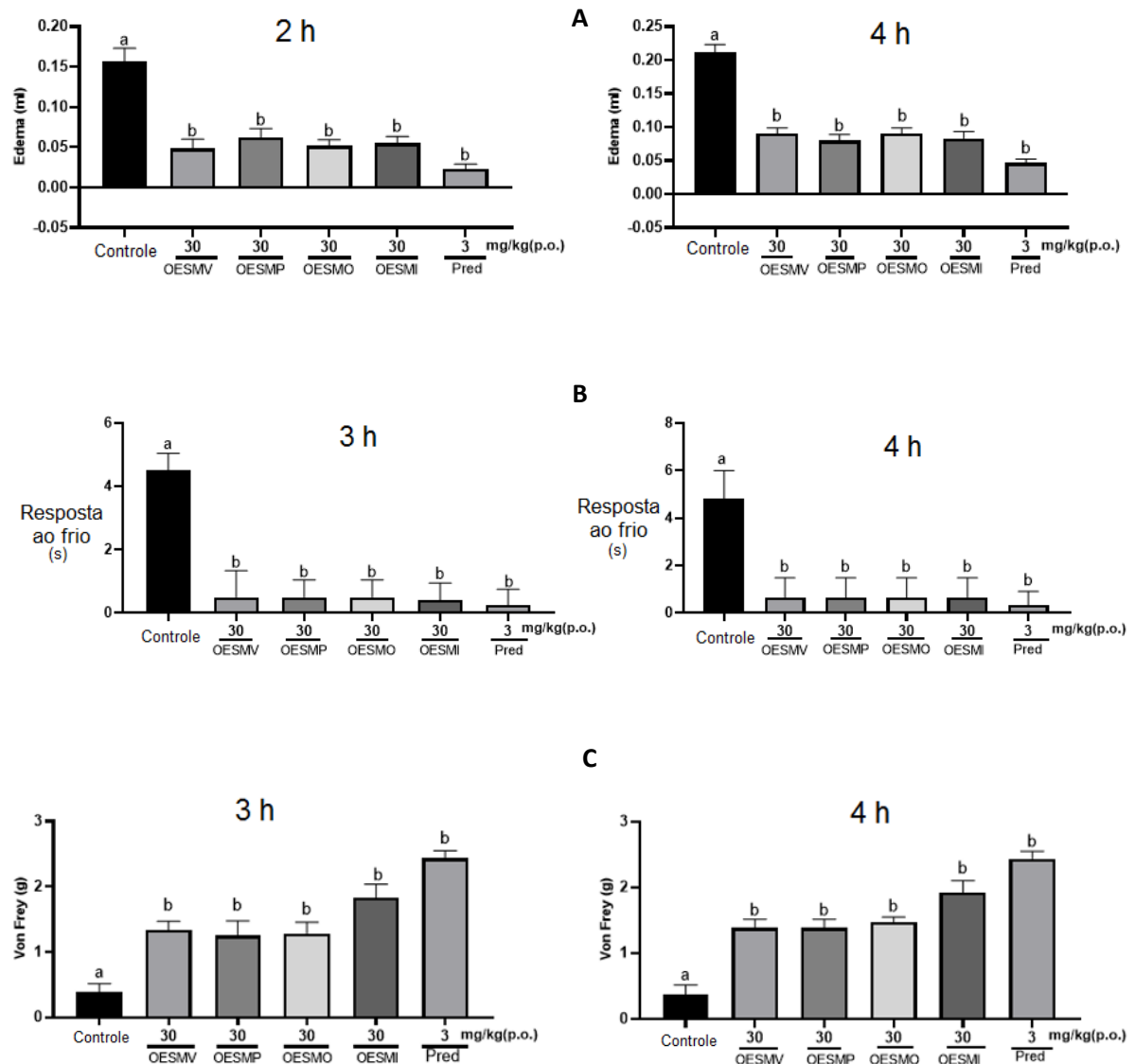
Para o mesmo modelo experimental, no estudo de Davicino *et al.* (2010), extratos aquosos à frio, infusão e decoctos de folhas e pecíolos de *S. areira* (1, 2 e 4 mg/mL) foram avaliados em ratos machos e fêmeas da linhagem Rockland. Dentre as três preparações de *S. areira*, o extrato à frio apresentou uma atividade anti-inflamatória significativa quando comparado ao grupo controle, uma taxa percentual de 72,22 % (18h). No entanto, a infusão e o decocto apresentaram sinais de atividade

pró-inflamatória. Para os autores, a atividade anti-inflamatória está relacionada ao modo de preparo do extrato. Para um outro modelo avaliado, o edema de ouvido, também demonstrou a ação anti-inflamatória do extrato aquoso à frio de *S. areira*, em contrapartida, a infusão e decocto apresentaram ação pró-inflamatória. Entretanto, o decocto possui atividade pró-inflamatória maior que a infusão (Davicino *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória de *S. terebinthifolius* devido a sua composição ser rica em compostos fenólicos (Rosas; Correa; Das Graças Henriques, 2019).

Marangoni *et al.* (2023) realizaram um estudo comparativo da atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius* (30 mg/kg) em diferentes estados brasileiros, como Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP). Os óleos extraídos para cada estado revelaram uma redução significativa do edema de pata em camundongos Swiss machos quando comparado ao grupo controle em 2h. Os resultados demonstraram um percentual de $39,99 \pm 3\%$ (PR), $37,00 \pm 4\%$ (BA), $34,90 \pm 2\%$ (MS), $32,05 \pm 6\%$ (ES e RS) e $27,52 \pm 8\%$ (SP). Após um período de 4h, somente o óleo essencial extraído das folhas originárias de SP não apresentou atividade em relação à outros estados. Isso sugere a dependência do composto em revelar a atividade anti-inflamatória, na qual o composto α -felandreno não possui relação com a atividade pesquisada, enquanto que os óleos essenciais de folhas de *S. terebinthifolius* dos outros estados (BA, ES, MS, PR e RS) inibiram o mecanismo de hiperalgesia no teste de Von Frey.

Figura 8 – Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *Schinus molle* (30 mg/kg) em diferentes estações do ano para avaliação da atividade anti-inflamatória



Fonte: A autora.

Nota: Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. de 6 animais/grupo em comparação com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Controle (a) e $p \leq 0,001$ (b). Volume de edema produzido (A), teste da acetona (B) e teste de Von Frey (C). Óleos essenciais de *Schinus molle* de verão (OESMV), primavera (OESMP), outono (OESMO) e inverno (OESMI); pred (prednisolona).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL *in vitro* UTILIZANDO CCK-8 EM CÉLULAS DE LINHAGENS DERIVADOS DE CÂNCER HUMANO E DE CÉLULAS RENAIIS NORMAIS

A atividade citotóxica de *S. molle* foi avaliada a partir de seis diluições do óleo essencial da estação verão, contendo maior teor de sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13 µg/mL) em linhagens de proliferação celular tais como: células de câncer de mama BT-549, células de câncer ovariano SK-OV-3, células de melanoma SK-MEL, células tumorais formadoras de queratina KB e células renais normais (LLC-PK1 e VERO).

A análise dos resultados demonstrou que o óleo essencial de *S. molle* apresentou atividade citotóxica contra três linhagens de células tumorais BT-549, SK-MEL e KB para IC₅₀ (concentração inibitória média) com valores de 70 µg/mL, 92 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente, enquanto que para as células SK-OV-3 não foi observado atividade citotóxica em nenhuma das concentrações avaliadas. E para as células renais normais, o óleo essencial apresentou atividade frente as células VERO sendo um IC₅₀ de 79 µg/mL. Não houve atividade citotóxica frente às células LLC-PK1. Como esperado, o controle positivo doxorrubicina apresentou tal atividade em todas as linhagens celulares e concentrações avaliadas.

Esse processo experimental caracteriza-se como o primeiro estudo que avalia o potencial citotóxico do óleo essencial de folhas de *S. molle* contra as linhagens de células cancerígenas SK-OV-3, BT-549, SK-MEL, KB e células renais normais LLC-PK1 e VERO, contudo, estudos com outros extratos ou linhagens celulares foram desenvolvidos. De acordo com Ruffa *et al.* (2002), extratos metanólicos de *S. molle* apresentaram atividade citotóxica com IC₅₀ de 50 µg/mL contra linhagens de células tumorais de fígado HepG2 em dose dependente. O óleo essencial extraído de frutos de *S. molle* possui citotoxicidade contra linhagens de células de câncer do cólon humano (IC₅₀ 1,15 µg/mL), HepG2 (IC₅₀ 0,95 µg/mL) e de mama MCF-7 (54 mg/mL), enquanto que para o óleo essencial de flores de *S. molle* mostrou um grande potencial de atividade citotóxica contra MCF-7 com um IC₅₀ de 0,98 µg/mL (Bendaoud *et al.*, 2010; Hamdan; Al-Gendy; El-Shazly, 2016). Destaca-se, estudos de Simionatto *et al.* (2011) e Abdel-Hameed e Bazaid (2017) que evidenciaram atividade citotóxica com o óleo essencial extraído de folhas de *S. molle* contra linhagens de células humanas de eritroleucemia K562 (leucemia eritróide aguda) em uma concentração de 0,89 µg/mL e de HepG2 (IC₅₀ 16,33 µg/mL).

Simionatto *et al.* (2011) também observou atividade citotóxica de 50% contra nove linhagem de células humanas, utilizando o óleo essencial extraído de folhas de *S. molle* da estação verão. As linhagens utilizadas foram MCF-7 (adenocarcinoma de mama), K562 (leucemia), NCI.ADR (câncer ovariano expressando o fenótipo de resistência à adriamicina), NCI.460 (câncer de pulmão), UACC.62 (melanoma), 786-0 (carcinoma renal), OVCAR03 (carcinoma ovariano humano), PCO.3 (adenocarcinoma de próstata) e HT-29 (câncer de cólon). O resultado mais significativo de citotoxicidade foi para as células K562 (0,89 µg/mL) e NCI-ADR (3,40 µg/ mL). Os autores destacam que tal atividade se deve à presença dos sesquiterpenos no óleo essencial.

No entanto, o óleo essencial de folhas de *S. molle* não foi eficiente contra algumas células tumorais, dentre elas o hepatoma humano - Hep3B (IC₅₀ = 211,2 µg/mL) e hepatoma humano - HepG2 (IC₅₀ = 108,9 µg/mL), carcinoma de bexiga - ECV-304 (IC₅₀ = 118,8 µg/mL). Contudo, para o carcinoma de mama, o óleo essencial demonstrou atividade citotóxica (IC₅₀ = 75,5 µg/mL) em estudos de Díaz *et al.* (2008). Esses autores relacionaram a atividade citotóxica à presença dos monoterpenos α e β -pineno) e ressaltaram que o mecanismo de citotoxicidade do óleo essencial de *S. molle* está relacionado aos efeitos apoptóticos (ruptura da membrana celular) que foram observados para altas concentrações do óleo essencial (IC₅₀ = 242,2 µg/mL) pelo ensaio de [3 - (4,5 - dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 - difenil brometo de tetrazolina].

Comparando-se a atividade citotóxica de espécies de *Schinus*, o óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius* (IC₅₀ = 47 ± 9 mg/mL) foi mais eficiente do que o óleo essencial de frutos de *S. molle* (IC₅₀ = 54 ± 10 mg/mL), ambos frente à linhagem de células de câncer de mama (Bendaoud *et al.*, 2010). Esses autores relacionam a atividade citotóxica à presença de alta concentração de sesquiterpenos no óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL *in vitro*

A busca de novos recursos naturais com atividade antioxidante tem se tornado frequente, pois os antioxidantes naturais são uma alternativa para os aditivos químicos usados na indústria de alimentos e também para prevenir e tratar enfermidades (TLILI *et al.*, 2018).

Nesse sentido, foram avaliados o potencial da atividade antioxidante do óleo essencial extraído de folhas de *S. molle* por meio de três metodologias, a saber: atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e TBARS.

A avaliação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio foi realizada em amostras de óleo essencial de *S. molle* em uma concentração de 200 µg/mL. Enquanto que para a metodologia do DPPH, diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. molle* (500; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µg/mL) foram avaliadas, para cada estação do ano. Para o teste TBARS, a atividade antioxidante foi avaliada pela oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Todas as metodologias foram aplicadas para amostras nas quatro estações do ano.

Primeiramente, para a metodologia de identificação da formação do complexo fosfomolibdênio, a atividade antioxidante relativa (AAR) foi calculada em porcentagem para os óleos essenciais em cada estação do ano, sendo utilizados dois antioxidantes padrões comparativos: o ácido gálico e a vitamina C.

De acordo com os resultados expressos na tabela 5, os óleos essenciais de *S. molle* obtido de folhas coletadas no verão, inverno, primavera e outono demonstraram uma atividade antioxidante relativa, com diferenças significativas para o padrão vitamina C. Além do mais, para as amostras de óleos essenciais quando comparados ao ácido gálico não foram identificadas diferenças negativas. No entanto, todas as amostras mostraram atividade antioxidante relativa em 100%.

Para a análise da atividade antioxidante do óleo essencial de *S. molle* pelo método DPPH, foram obtidos os seguintes valores expressos em porcentagem, sendo comparados aos mesmos padrões ácido gálico (tabela 6) e vitamina C (tabela 7).

A metodologia do DPPH consiste na redução do radical DPPH, de coloração púrpura em difenil-picril-hidrazina de cor amarelada por um antioxidante. Portanto, os óleos essenciais de *S. molle* comportaram-se como um antioxidante que reduziu os radicais livres em difenil-picril-hidrazina.

Os óleos essenciais da estação verão e primavera apresentaram valores com diferenças significativas quando comparadas ao antioxidante ácido gálico, em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, as amostras do outono e inverno demonstraram atividade antioxidante em porcentagem, mas não significativamente (Tabela 6).

Tabela 5 – Avaliação da atividade antioxidante relativa em porcentagem (AAR%) para o óleo essencial de *Schinus molle* pela formação do complexo fosfomolibênio. Amostras comparadas à vitamina C e ao ácido gálico

Amostra	AAR% ± DP (Vitamina C)	AAR% ± DP (Ácido gálico)
Óleo essencial de verão	48,74 ± 8,15 ^a	100,00 ± 38,96
Óleo essencial de outono	68,65 ± 3,81 ^b	100,00 ± 13,07
Óleo essencial de inverno	40,81 ± 16,00 ^c	100,00 ± 76,47
Óleo essencial de primavera	88,12 ± 5,51 ^d	100,00 ± 26,32

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores são expressos como a média ± DP. ^{a,b,c,d} $p \leq 0,05$ quando comparados entre si.

Tabela 6 – Avaliação da atividade antioxidante relativa em porcentagem (AAR%) para o óleo essencial de *Schinus molle* pelo método DPPH. Amostras comparadas ao ácido gálico

Concentrações (µg/mL)	Ácido gálico (AAR% ± DP)	Óleo de verão (AAR% ± DP)	Óleo de outono (AAR% ± DP)	Óleo de inverno (AAR% ± DP)	Óleo de primavera (AAR% ± DP)
500	95,04 ± 1,21	14,01 ± 2,99 ^a	99,50 ± 2,36	95,40 ± 2,30	61,49 ± 7,74 ^b
25	90,52 ± 1,38	14,51 ± 1,19 ^a	95,69 ± 2,99	100,00 ± 1,06	60,34 ± 5,79 ^b
12,5	89,66 ± 2,04	14,87 ± 4,73 ^a	95,04 ± 1,20	100,00 ± 0,99	59,55 ± 7,59 ^b
6,25	88,36 ± 1,89	14,94 ± 1,75 ^a	93,39 ± 5,66	95,58 ± 0,76	60,20 ± 6,52 ^b
3,125	90,30 ± 3,12	14,87 ± 0,37 ^a	95,91 ± 3,93	96,22 ± 1,07	51,22 ± 2,86 ^b
1,5	90,30 ± 2,15	18,03 ± 2,93 ^a	97,27 ± 1,62	94,47 ± 6,56	64,80 ± 2,81 ^b

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores são expressos como a média ± DP. ^{a,b} $p \leq 0,05$ quando comparados ao grupo controle.

Tabela 7– Avaliação da atividade antioxidante relativa em porcentagem (AAR%) para o óleo essencial de *Schinus molle* pelo método DPPH. Amostras comparadas à vitamina C

Concentrações (µg/mL)	Vitamina C (AAR% ± DP)	Óleo de verão (AAR% ± DP)	Óleo de outono (AAR% ± DP)	Óleo de inverno (AAR% ± DP)	Óleo de primavera (AAR% ± DP)
500	100,00 ± 0,85	14,01 ± 2,99 ^a	99,50 ± 2,36	95,40 ± 2,30	61,49 ± 7,74 ^b
25	90,95 ± 1,63	14,51 ± 1,19 ^a	95,69 ± 2,99	100,00 ± 1,06	60,34 ± 5,79 ^b
12,5	90,30 ± 1,76	14,87 ± 4,73 ^a	95,04 ± 1,20	100,00 ± 0,99	59,55 ± 7,59 ^b
6,25	90,30 ± 2,34	14,94 ± 1,75 ^a	93,39 ± 5,66	95,58 ± 0,76	60,20 ± 6,52 ^b
3,125	85,99 ± 1,89	14,87 ± 0,37 ^a	95,91 ± 3,93	96,22 ± 1,07	51,22 ± 2,86 ^b
1,5	90,73 ± 1,96	18,03 ± 2,93 ^a	97,27 ± 1,62	94,47 ± 6,56	64,80 ± 2,81 ^b

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores são expressos como a média ± DP. ^{a,b} $p \leq 0,05$ quando comparados ao grupo controle.

Para a análise dos resultados pelo teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o percentual do índice antioxidante (IA%) foi calculado para cada amostra (Tabela 8), dos quais os óleos essenciais da estação verão, outono, inverno e primavera não apresentaram diferenças significativas na atividade antioxidante. No entanto, todas as amostras de óleos essenciais das folhas de *S. molle* mostraram atividade antioxidante em 100%.

No presente estudo, a atividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos de folhas de *S. molle* em diferentes estações do ano foi avaliada e comparada. Considerando os resultados significativos, o óleo essencial de verão apresentou menor atividade antioxidante para o teste DPPH em diferentes concentrações (500; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$), no entanto, para a metodologia TBARS, evidenciou a atividade antioxidante em 100% quando comparado ao BHT.

O óleo essencial de outono apresentou atividade antioxidante nos testes de DPPH e TBARS, sendo para este alto potencial de atividade verificada. Enquanto que, o óleo essencial da estação inverno demonstrou menor atividade antioxidante no método do fosfomolibdênio (200 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado à vitamina C, mas para o teste TBARS e fosfomolibdênio em comparação ao ácido gálico apresentou forte índice de capacidade antioxidante.

O óleo de primavera demonstrou alta atividade antioxidante somente para o teste do fosfomolibdênio (200 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que para as demais metodologias, não foi verificada uma resposta significativa.

Portanto, o óleo essencial de folhas de *S. molle* apresenta uma atividade antioxidante, independente da estação do ano em que as folhas foram coletadas.

Uma variação da atividade antioxidante pode ocorrer devido a diversos fatores, sendo principalmente os fatores edáfico-climáticos que influenciam diretamente na composição química dos óleos essenciais e na concentração dos compostos voláteis (Erygit *et al.*, 2017). Há compostos voláteis com boa ação antioxidante e outros nem tanto. Normalmente, quando o óleo essencial apresenta alta concentração em monoterpenos, a atividade antioxidante é baixa ou não é verificada (Bendaoud *et al.*, 2010; Erygit *et al.*, 2017). Portanto, diante dessa premissa, a atividade antioxidante do óleo essencial de *S. molle* identificada na atual pesquisa,

está relacionada com a predominância de compostos sesquiterpenos, dos quais estão envolvidos em tal atividade (Sghaier *et al.*, 2011).

Simionatto *et al.* (2011), utilizando o método de DPPH, verificaram uma atividade antioxidante menor para o óleo essencial de folhas de *S. molle* ($IC_{50} > 100,0 \mu\text{g/mL}$) devido a composição química ser majoritária em sesquiterpenos.

Comparando-se os óleos essenciais de frutos de *S. molle* e *S. terebinthifolius*, Bendaoud *et al.* (2010) demonstraram, pelo método DPPH, uma atividade antioxidante menos intensa do que pela metodologia do ABTS, sendo que o óleo essencial de *S. molle* possui uma atividade antioxidante mais expressiva que o de *S. terebinthifolius*. A metodologia do DPPH foi realizada em metanol, enquanto que o ABTS utilizou um meio heterogêneo (água/etanol) (Bendaoud *et al.*, 2010).

Considerando os compostos voláteis, α e β -felandreno demonstraram baixa atividade antioxidante na metodologia DPPH, enquanto que o β -felandreno, apresentou alto grau de atividade antioxidante pela metodologia ABTS para o óleo essencial de frutos de *S. molle* e *S. terebinthifolius* em trabalho de Bendaoud *et al.* (2010). Outros autores ainda sugerem que o óleo essencial de *S. molle* tem baixa atividade na capturação de radicais livres pelo método DPPH (Díaz *et al.*, 2008). Adicionalmente, o óleo essencial extraído de caules de *S. molle* e obtiveram, pelo método do DPPH, um valor baixo para a atividade antioxidante com $IC = 12,66 \pm 2,15 \mu\text{g/mL}$ (Salem *et al.*, 2016).

Considerando o presente estudo, o óleo essencial das folhas de *S. molle* nas quatro estações do ano possui atividade antioxidante, dos quais foram efetivas pelas metodologias do complexo fosfomolibdênio e DPPH estatisticamente.

Tabela 8 – Avaliação da atividade antioxidante em porcentagem (IA%) para o óleo essencial de *Schinus molle* com o teste TBARS. Amostras das quatro estações do ano comparadas ao BHT

Amostra	IA% ± DP
Óleo essencial de verão	100,00 ± 4,54
Óleo essencial de outono	100,00 ± 35,08
Óleo essencial de inverno	100,00 ± 8,32
Óleo essencial de primavera	100,00 ± 3,52

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores são expressos como a média ± DP. ^a $p \leq 0,05$ quando comparados entre si.

5.7 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO

5.7.1 Caracterização química dos extratos aquosos de *Schinus molle* L.

Os componentes químicos da fração solúvel em etanol de *S. molle* (FSESM) foram identificados pela cromatografia líquida ultra rápida acoplada à detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas (UHPLC-DAD-MS). A cromatografia (Figura 9) identificou um total de 22 componentes (Tabela 9), incluindo **ácidos orgânicos** (ácido pentanóico e ácido quínico, picos 1 e 2), **derivados do ácido benzóico** (ácido *O*-hexosil gentísico e ácido *O*-hexosil hidroximetoxi-benzóico, picos 4 e 5), **álcool benzílico** (álcool *O*-hexosil-pentosil benzílico, pico 13), **derivados do ácido fenilpropanoide** (ácido 3-*O*- ϵ -cafeoilquínico, ácido *O*-hexosil *O*-cumaroil, ácido 5-*O*- ϵ -cafeoilquínico e ácido *O*-cumaroilquínico, picos 6, 9, 10 e 15), **flavonoides** (catequina, epicatequina, epi derivado da catequina, picos 7, 14 e 16), **procianidinas diméricas do tipo B** (picos 8, 11 e 12), **megaestigmanos o-glicosilados** (*O*-hexosil megaestigmano e *O*-hexosil-desoxihexosil eugenol, picos 17 e 19), **adi-*O*-flavonoides glicosilados** (rutina, pico 18), **ácidos graxos** (ácido tri-hidroxi-octadecadienóico e ácido tri-hidroxi-octadecenóico, picos 21 e 22).

Entre os ácidos orgânicos encontrados, estão o ácido pentanóico e ácido quínico. Os metabólitos 4 e 5 (derivados do ácido benzóico) apresentaram fragmentos principais relacionados à perda de um grupo hexosil (162 u), resultando em íons fragmento em m/z 197 e 153, consistentes com os dados encontrados na literatura para o ácido *O*-hexosil gentísico (4) e ácido *O*-hexosil hidroximetoxi-benzóico (5) (Danise *et al.*, 2021; Gómez-Caravaca *et al.*, 2008). Adicionalmente, o composto 13 exibiu uma perda da massa atômica de 146 u, indicando uma unidade pentosil, dando origem a um íon fragmento em m/z 269. Esse resultado é semelhante ao que já foi descrito por Danise *et al.* (2021), sendo o álcool *O*-hexosil-pentosil benzílico. Os compostos 6 (ácido 3-*O*- ϵ -cafeoilquínico) e 10 (ácido 5-*O*- ϵ -cafeoilquínico) apresentaram espectros UV semelhantes ao cromóforo ácido caféico ($\lambda_{\text{máx}} \approx 299$ e 325 nm), enquanto os compostos 9 (ácido *O*-hexosil *O*-cumaroil) e 15 (ácido *O*-cumaroilquínico) foram compatíveis com cromóforos de ácido cumárico ($\lambda_{\text{máx}} \approx 299$ e 313 nm). Os metabólitos 6 e 10 apresentaram fragmento de íons em m/z 191 e 179, correspondendo ao ácido quínico e ácido caféico, respectivamente. A posição da

esterificação do ácido caféico em ácido quínico (em C3 e C5 do ácido quínico) foi determinado pela intensidade dos íons de m/z 179 e comparado com a descrição feita por Clifford *et al.* (2003). Portanto, esses compostos foram identificados como ácido 3-O- ϵ -cafeoilquínico (6) e ácido 5-O- ϵ -cafeoilquínico (10).

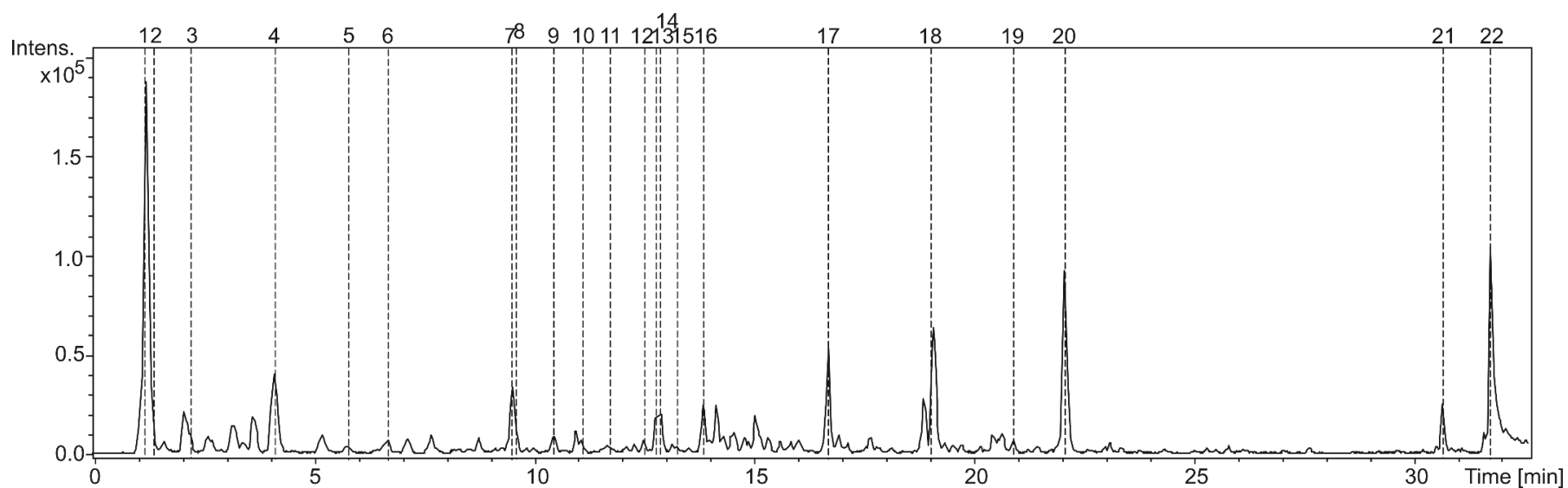
O pico 15 mostrou um fragmento de íon em m/z 173, que é gerado pela perda de uma molécula de água. Isso indica a presença de resíduo de ácido quínico e foi identificado como ácido O-cumaroilquínico (Marks; Mullen; Crozier, 2007). E além disso, o composto 9 exibiu um íon produto em m/z 163, produzido pela perda de uma unidade hexosil (162 u). Portanto, esse composto foi identificado como ácido O-hexosil o-cumaroil (15). Estes derivados de ácido cumárico descritos estão sendo relatados pela primeira vez para a espécie *S. molle*.

Os compostos 7 (catequina), 8-11-12 (dímero de procianidina), 14 (epicatequina) e 16 (epi-derivado de catequina) mostraram uma banda de absorção no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} \approx 280$ nm, que é semelhante ao observado para 3-flavonóis/proantocianidinas. Os metabólitos 7 e 14 revelaram fragmentos dos íons em m/z 245 com a perda de uma molécula de CO_2 . Esses metabólitos foram identificados como catequina (7) e epicatequina (14) (Marks; Mullen; Crozier, 2007) e a identificação foi confirmada por injeção do padrão autêntico. O composto 16 mostrou uma fragmentação do íon em m/z 289 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6^-$) e foi identificado com um derivado de (epi) catequina. Os flavonoides foram também identificados para extratos aquosos das raízes de *S. molle*, como rutina, quercetina, ácido quínico e ácido gálico (Hmed *et al.*, 2020).

Os metabólitos 8,11 e 12 exibiram íons do produto em m/z 425 devido a perda de 152 u, que foi produzido pela fragmentação da reação inversa de Diels-Alder ou Retro-Diels-Alder, seguida pela desidratação (m/z 407). Adicionalmente, a presença do íon fragmento m/z 289, relativo à catequina/epicatequina em forma monomérica, também foi confirmado a presença dessas unidades monoméricas por outros pesquisadores (Friedrich *et al.*, 2000; Marks; Mullen; Crozier, 2007). Portanto, esses compostos foram identificados como dímeros de procianidina do tipo B. O metabólito 17 não exibiu absorção de UV e houve uma perda de 162 u do íon desprotonado 387,2046 resultando no íon m/z 225, indicando um substituinte hexosil. O íon fragmento m/z 225 corresponde a uma porção aglicona com treze carbonos. Sendo assim, este metabólito foi classificado como O-hexosil megaestigmano (De Oliveira Dembogurski *et al.*, 2023).

Finalmente, O-flavonol glicosídico rutina (18) foi confirmada pela injeção do padrão que exibiu uma absorção das bandas em comprimentos de onda de 256 e 355 nm, sendo compatível com flavonoides. O íon desprotonado m/z 609,1445 exibiu uma perda de 162 e 146 u, indicando a presença dos substituintes hexosil e desoxihexosil. Além disso, o íon do fragmento aglicona em m/z 301 indicou a quercetina (Ghareeb *et al.*, 2018). Os compostos 21 e 22 foram identificados como ácido tri-hidroxi-octadienóico e ácido tri-hidroxi-octadecanóico, respectivamente. Estes ácidos graxos exibiram padrões de fragmentação semelhantes, com íons em m/z 311, 229 e 171, correspondendo à clivagem na posição C_9 (Khaled *et al.*, 2019). A diferença de massa de 2 u sugeriu um adicional de ligação dupla em ácido tri-hidróxi octadienóico (21) em comparação com o ácido tri-hidroxi octadecanóico (22).

Figura 9 – Picos obtidos pela cromatografia líquida ultra rápida acoplada a espectrometria de massas (modo polo negativo) dos extratos aquosos das folhas de *Schinus molle*



Fonte: A autora.

Tabela 9 – Identificação dos componentes químicos no extrato aquoso purificado de *Schinus molle* L. (FSESM) por UHPLC-DAD-MS

(continua)

Pico	TR (min)	UV	FM	Polo negativo		Polo positivo	Compostos
				MS [M-H] ⁻	MS/MS	MS [M+H] ⁺	
1	1,2	-	C ₅ H ₁₀ O ₆	165,0424	-	-	Ácido pentanóico
2	1,3	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0544	173	193,0716	Ácido quínico
3	2,1	285	C ₁₂ H ₁₄ O ₇	271,0857	161	-	Não identificado
4	4,1	320	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315,0705	153, 152	-	Ácido O-hexosil gentísico
			C ₁₄ H ₁₈ O ₉				Ácido O-hexosil hidroxi-
5	5,8	250, 289		329,0918	167, 152	-	metoxi-benzóico
			C ₁₆ H ₁₈ O ₉		289, 245, 191, 179,		
6	6,8	297, 320		353,0910	173	-	Ácido 3-O-E-cafeoilquínico ^{pd}
7	9,6	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0747	245, 203, 161	291,0816	Catequina ^{pd}
			C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂		425, 407, 289, 245,		Dímero de procianidina (tipo
8	9,7	280		577,1331	179	579,1570	B)
9	10,5	289, 313	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0975	163	-	Ácido O-hexosil O-cumaroil
			C ₁₆ H ₁₈ O ₉		289, 191, 179, 173,		
10	11,1	293, 320		353,1372	163	-	Ácido 5-O-E-cafeoilquínico ^{pd}
			C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂		465, 407, 363, 289,		Dímero de procianidina (tipo
11	11,7	280		577,1318	245, 161	579,1509	B)
			C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂		457, 425, 407, 289,		Dímero de procianidina (tipo
12	12,5	280		577,1318	245, 161	-	B)
			C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀				Álcool O-hexosil-pentosil
13	12,8	280		401,1453	289, 269, 245, 161	-	benzílico
14	12,9	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	245, 221, 203, 165	-	Epicatequina ^{pd}
15	13,3	299, 310	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,0925	191, 173	339,1045	Ácido O-cumaroilquínico
16	13,9	280	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	467,1559	383, 289, 191	-	(Epi) derivado da catequina
17	16,7	-	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	387,2049	225	-	O-hexosil megaestigmano

Tabela 9 – Identificação dos componentes químicos no extrato aquoso purificado de *Schinus molle* L. (FSESM) por UHPLC-DAD-MS

(conclusão)

Pico	TR (min)	UV	FM	Polo negativo		Polo positivo	Compostos
				MS [M-H] ⁻	MS/MS	MS [M+H] ⁺	
18	19,0	256, 355	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	609,1445 593,1512	463, 301, 300 519, 417, 357, 285, 151	611,1676 -	Rutina ^{pd} O-hexosil-desoxihexosil eugenol
19	20,9	280	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₁	471,1872	447, 417, 307, 273, 247, 163	495,1829	Não identificado
20	22,1	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2075	311, 295, 251, 233, 229, 211, 171	351,2142	Ácido tri-hidroxi-octadecadienóico
21	30,7	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2333	311, 291, 229, 221, 211, 171	-	Ácido tri-hidroxi-octadecanóico
22	31,6	-					

Fonte: A autora.

Nota: TR (tempo de retenção), FM (fórmula molecular), pd (confirmado por injeção do padrão).

5.7.2 Estudos toxicológicos

5.7.2.1 Toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda, nenhuma morte ocorreu e nenhuma mudança comportamental entre os animais (ratos Wistar fêmeas) foi identificada durante o período experimental de 15 dias. Todos os animais receberam uma dieta regular e o ganho de peso corpóreo foi homogêneo (Tabela 10). As análises hematológicas (Tabela 11) e bioquímicas (Tabela 12) não demonstraram qualquer alteração significativa para os animais tratados com FSESM (5, 50, 300 e 2000 mg/kg) ou veículo (água, 10 mL/kg). Os pesos relativos (Tabela 10) e as análises macroscópicas dos órgãos vitais e reprodutivos não revelaram diferenças ou anormalidades entre os grupos tratados. Além disso, as análises histopatológicas não demonstraram quaisquer sinais de lesão ou alterações em órgãos vitais e reprodutivos que sugere toxicidade aguda (Figura 10). Portanto, considerando os resultados obtidos com o screening hipocrático (Malone; Robichaud, 1962) que indica o grau de intensidade dos efeitos comportamentais através de uma escala, peso relativo dos órgãos, ingestão de ração e de água, e das análises patológicas (macroscópica e microscópica) dos órgãos (vitais e reprodutivos), FSESM, até a dose máxima de 2000 mg/kg, pode ser considerada segura.

Na literatura, existe uma escassez de estudos sobre os extratos aquosos de folhas de *S. molle* quanto à toxicidade dessas preparações. No entanto, alguns estudos foram feitos com os óleos essenciais extraídos de folhas e de frutos de *S. molle* em relação à avaliação da toxicidade. Martins *et al.* (2014) avaliaram os óleos essenciais de folhas e de frutos de *S. molle* para as doses de 175, 550, 1000 e 2000 mg/kg em ratos fêmeas e não houve qualquer indício de toxicidade. Entretanto, o óleo essencial de frutos demonstrou uma alteração de comportamento somente nas primeiras 24 h do experimento, em doses de 1000 e 2000 mg/kg. E ainda para esse estudo, os autores também não identificaram qualquer variação no peso ou na ingestão de comida para os animais. Da mesma forma, órgãos e tecidos não demonstraram qualquer sinal de danos pela análise macroscópica.

No entanto, em estudos de Ferrero *et al.* (2007) com extratos etanólicos de frutos de *S. molle* demonstraram um aumento significativo na ingestão alimentar em ratos machos da linhagem Wistar, bem como foi observado uma alteração significativa

no parâmetro agitação quando comparado com o grupo controle. Além disso, não foi observado ganho de peso, alterações clínicas e lesões histopatológicas em órgãos como, cérebro, fígado, rins, pulmão, coração, estômago e intestino no grupo experimental avaliado.

E dentro do mesmo modelo experimental para o atual estudo, ou seja, realizado com ratas em uma dose de 2000 mg/kg, Habte *et al.* (2020) também não observaram alterações comportamentais ou morte aparente para os extratos aquosos e metanólicos obtidos de frutos de *S. molle*.

Tabela 10 – Efeito da administração oral aguda da fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) em ratos Wistar fêmeas (%) sobre o peso corporal (g) e peso relativo para cada órgão por um período de 14 dias

Órgão	Controle	FSESM (5 mg/kg)	FSESM (50 mg/kg)	FSESM (300 mg/kg)	FSESM (2000 mg/kg)
Peso inicial (g)	200 ± 9,1	200 ± 7,4	195 ± 7,7	203 ± 9,9	201 ± 6,7
Peso final (g)	210 ± 7,2	209 ± 9,7	213 ± 8,1	210 ± 7,7	212 ± 7,1
Fígado (%)	3,33 ± 0,10	3,30 ± 0,10	3,36 ± 0,09	3,38 ± 0,10	3,30 ± 0,10
Coração (%)	0,20 ± 0,016	0,22 ± 0,016	0,21 ± 0,014	0,22 ± 0,012	0,20 ± 0,016
Baço (%)	0,20 ± 0,008	0,20 ± 0,013	0,21 ± 0,010	0,22 ± 0,011	0,21 ± 0,018
Rins (%)	0,37 ± 0,009	0,36 ± 0,012	0,38 ± 0,011	0,39 ± 0,012	0,38 ± 0,012
Ovários (%)	0,033 ± 0,002	0,033 ± 0,004	0,034 ± 0,002	0,033 ± 0,002	0,032 ± 0,002
Útero (%)	0,21 ± 0,036	0,22 ± 0,023	0,20 ± 0,020	0,22 ± 0,032	0,22 ± 0,023

Fonte: A autora.

Nota: Valores foram expressos como a média ± E.P.M. ($n = 5$) em comparação com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para as análises estatísticas.

Tabela 11 – Efeito da administração oral aguda da fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar fêmeas após 14 dias de tratamento

Parameters	Control	ESSM (5 mg/kg)	ESSM (50 mg/kg)	ESSM (300 mg/kg)	ESSM (2000 mg/kg)
Eritrócitos ($10^6/\text{mL}$)	$8,5 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,4$
Hemoglobina (g/mL)	$15,8 \pm 0,4$	$15,7 \pm 1,2$	$15,2 \pm 1,9$	$14,9 \pm 0,9$	$15,2 \pm 1,2$
Hematócrito (%)	$41,4 \pm 1,9$	$40,2 \pm 2,2$	$49,2 \pm 2,7$	$45,7 \pm 2,1$	$47,6 \pm 2,7$
VCM (fl)	$54,1 \pm 2,5$	$52,9 \pm 2,2$	$50,2 \pm 3,1$	$59,0 \pm 4,1$	$55,3 \pm 4,8$
HCM (pg)	$16,1 \pm 1,4$	$17,1 \pm 2,0$	$16,2 \pm 2,5$	$16,4 \pm 3,5$	$16,3 \pm 3,7$
CHCM (%)	$31,7 \pm 3,2$	$30,2 \pm 3,2$	$32,1 \pm 4,1$	$34,5 \pm 3,9$	$33,4 \pm 3,7$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1099 ± 88	1010 ± 99	1076 ± 81	1064 ± 86	1055 ± 77
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	$9,9 \pm 1,6$	$9,5 \pm 1,9$	$9,8 \pm 2,2$	$8,9 \pm 2,3$	$8,7 \pm 2,1$
Neutrófilos (%)	$15,9 \pm 1,1$	$15,3 \pm 1,9$	$16,8 \pm 2,1$	$16,5 \pm 2,5$	$16,3 \pm 2,3$
Linfócitos (%)	$79,2 \pm 3,3$	$78,4 \pm 3,1$	$76,6 \pm 5,3$	$76,2 \pm 5,5$	$76,7 \pm 4,2$
Monócitos (%)	$3,2 \pm 0,8$	$3,3 \pm 1,1$	$3,1 \pm 1,9$	$3,6 \pm 1,1$	$3,3 \pm 1,6$
Eosinófilos (%)	$1,6 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,4$
Basófilos (%)	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

Fonte: A autora.

Nota: Valores foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n = 5$) em comparação ao grupo controle utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 12 – Efeito da administração oral aguda da fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar fêmeas após a um período de 14 dias de tratamento

Parâmetros	Controle	FSESM (5 mg/kg)	FSESM (50 mg/kg)	FSESM (300 mg/kg)	FSESM (2000 mg/kg)
Colesterol total (mg/dL)	42 ± 4,2	43 ± 4,2	49 ± 3,3	48 ± 4,2	52 ± 6,4
Colesterol HDL (mg/dL)	46 ± 3,4	47 ± 3,9	49 ± 3,7	40 ± 4,6	50 ± 4,1
Triglicerídeos (mg/dL)	37 ± 3,2	35 ± 3,7	32 ± 4,9	39 ± 3,3	32 ± 3,2
Ureia (mg/dL)	52 ± 4,1	50 ± 4,1	49 ± 4,3	53 ± 6,4	48 ± 4,8
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,36 ± 0,02
Sódio (mEq/L)	145 ± 7,7	146 ± 9,6	149 ± 10,2	151 ± 12,2	147 ± 11,0
Potássio (mEq/L)	6,3 ± 0,7	6,0 ± 0,7	5,9 ± 0,6	6,0 ± 0,8	6,1 ± 0,9
Ácido úrico (mg/dL)	1,9 ± 0,5	2,1 ± 0,7	2,0 ± 0,6	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,8
Proteínas totais (g/dL)	6,1 ± 0,5	6,0 ± 0,6	5,9 ± 0,5	6,1 ± 0,9	6,0 ± 0,8
Albumina (g/dL)	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,7	4,3 ± 0,6	4,0 ± 0,6	4,2 ± 0,6
Globulina (g/dL)	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,3
Amilase (U/L)	1024 ± 88	1021 ± 85	999 ± 98	974 ± 102	930 ± 104
Fosfatase alcalina (U/L)	53 ± 11,3	58 ± 9,9	60 ± 10,9	60 ± 9,7	51 ± 8,2
AST (U/L)	58 ± 5,6	62 ± 9,6	60 ± 9,1	63 ± 7,7	65 ± 11,1
ALT (U/L)	33 ± 2,1	32 ± 3,3	29 ± 3,5	33 ± 3,1	29 ± 3,8

Fonte: A autora.

Nota: Valores foram expressos como a média ± E.P.M. ($n = 5$) em comparação com o grupo controle utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Figura 10 – Efeito da administração oral aguda da fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) sobre os parâmetros histológicos em ratos fêmeas após a um período de 14 dias de tratamento em comparação ao grupo controle

(continua)

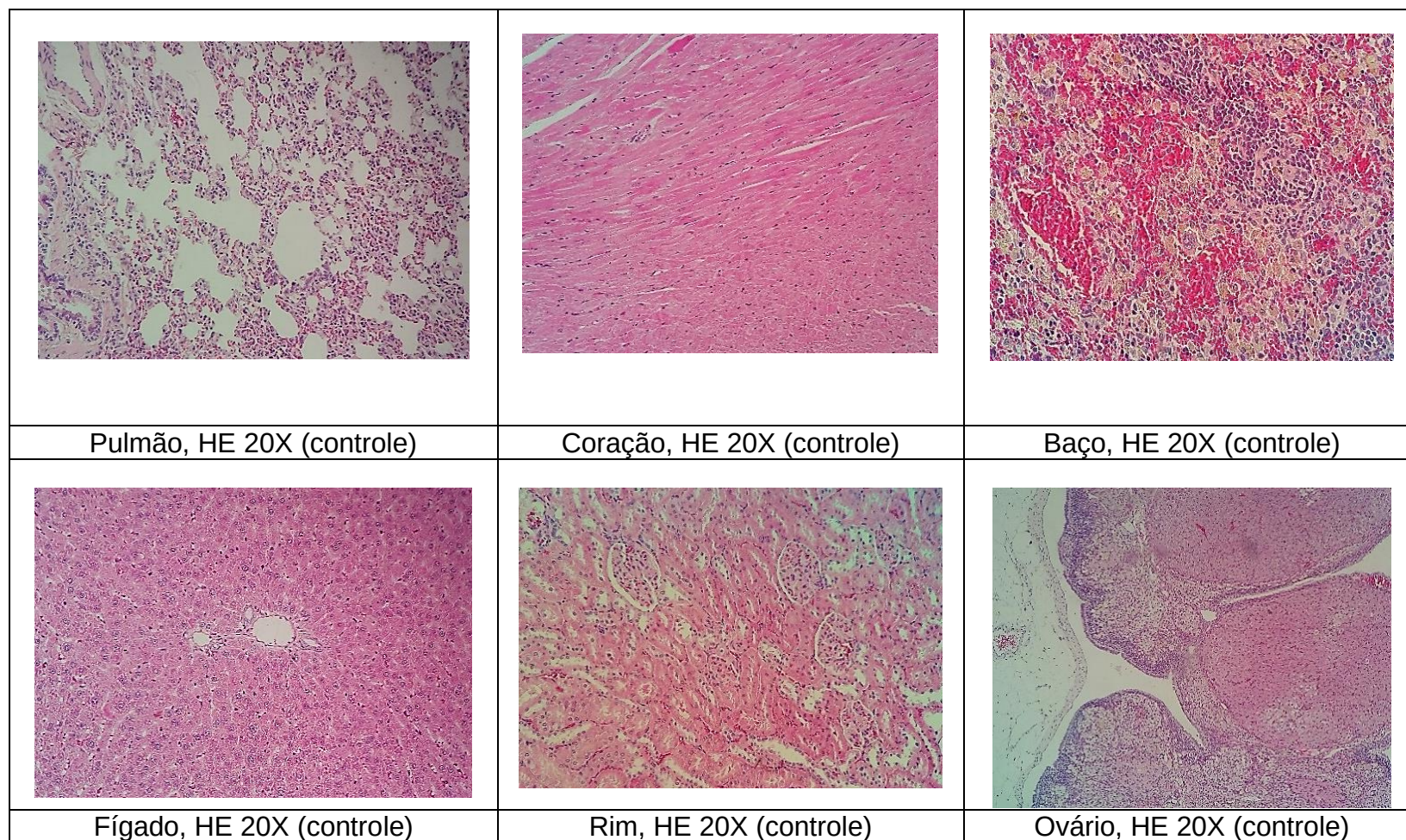
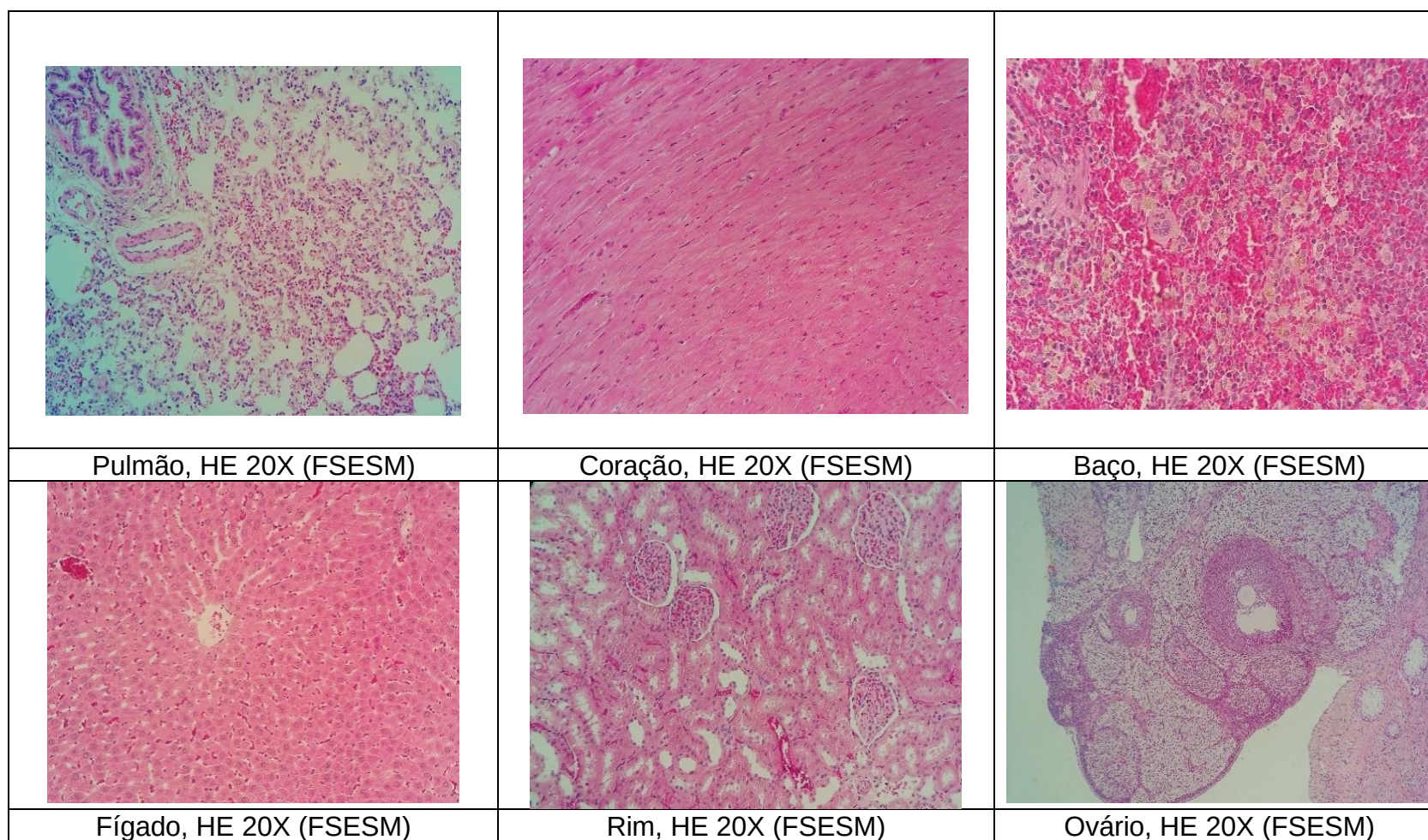


Figura 10 – Efeito da administração oral aguda da fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) sobre os parâmetros histológicos em ratos fêmeas após a um período de 14 dias de tratamento em comparação ao grupo controle

(conclusão)



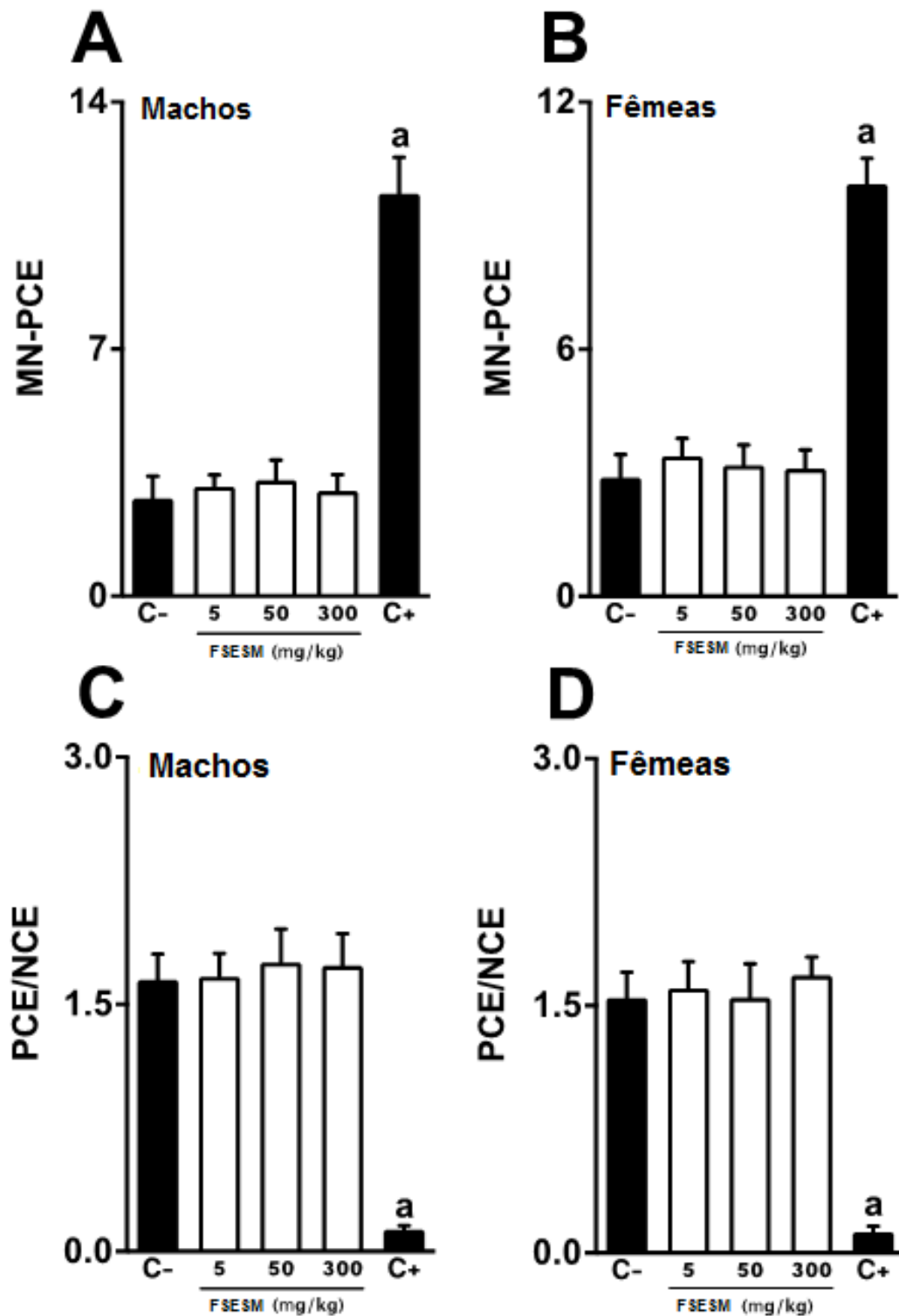
Fonte: A autora.

5.7.2.2 Genotoxicidade

5.7.2.2.1 Teste de micronúcleos

O número médio da quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados foi determinado entre os diferentes grupos tratados com FSESM (5, 50 e 300 mg/kg) ou ciclofosfamida (20 mg/kg - controle positivo) nas amostras analisadas (Figura 11A-B). Todos os ratos machos e fêmeas tratados com FSESM apresentaram um índice similar de eritrócitos policromáticos quando comparados com o grupo que recebeu o veículo (água filtrada). Entretanto, os animais (ratos machos e fêmeas) tratados com o controle positivo demonstram um aumento significativo na quantidade de policromáticos, indicando o elevado grau mutagênico da ciclofosfamida. Outro resultado semelhante foi a identificação de uma alteração significativa da relação numérica entre os eritrócitos policromáticos e os normocromáticos (PCE/NCE) para todos os grupos tratados (machos e fêmeas) com ciclofosfamida. Portanto, o tratamento feito com FSESM não causou qualquer alteração significativa nos eritrócitos quando comparados com o grupo controle negativo que indicasse uma possível genotoxicidade (Figura 11C-D).

Figura 11 – Efeitos do tratamento prolongado com FSESM e ciclofosfamida sobre os eritrócitos policromáticos micronucleados (MN-PCE) (A, B) e o índice de eritrócitos policromáticos/normocromáticos (PCE/NCE) (C, D) para ratos machos e fêmea



Fonte: A autora.

Nota: Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$). Os asteriscos mostram o índice de significância em comparação ao grupo controle negativo (C-) (one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni) (^a $p < 0,05$).

5.7.2.2.2 Ensaio Cometa

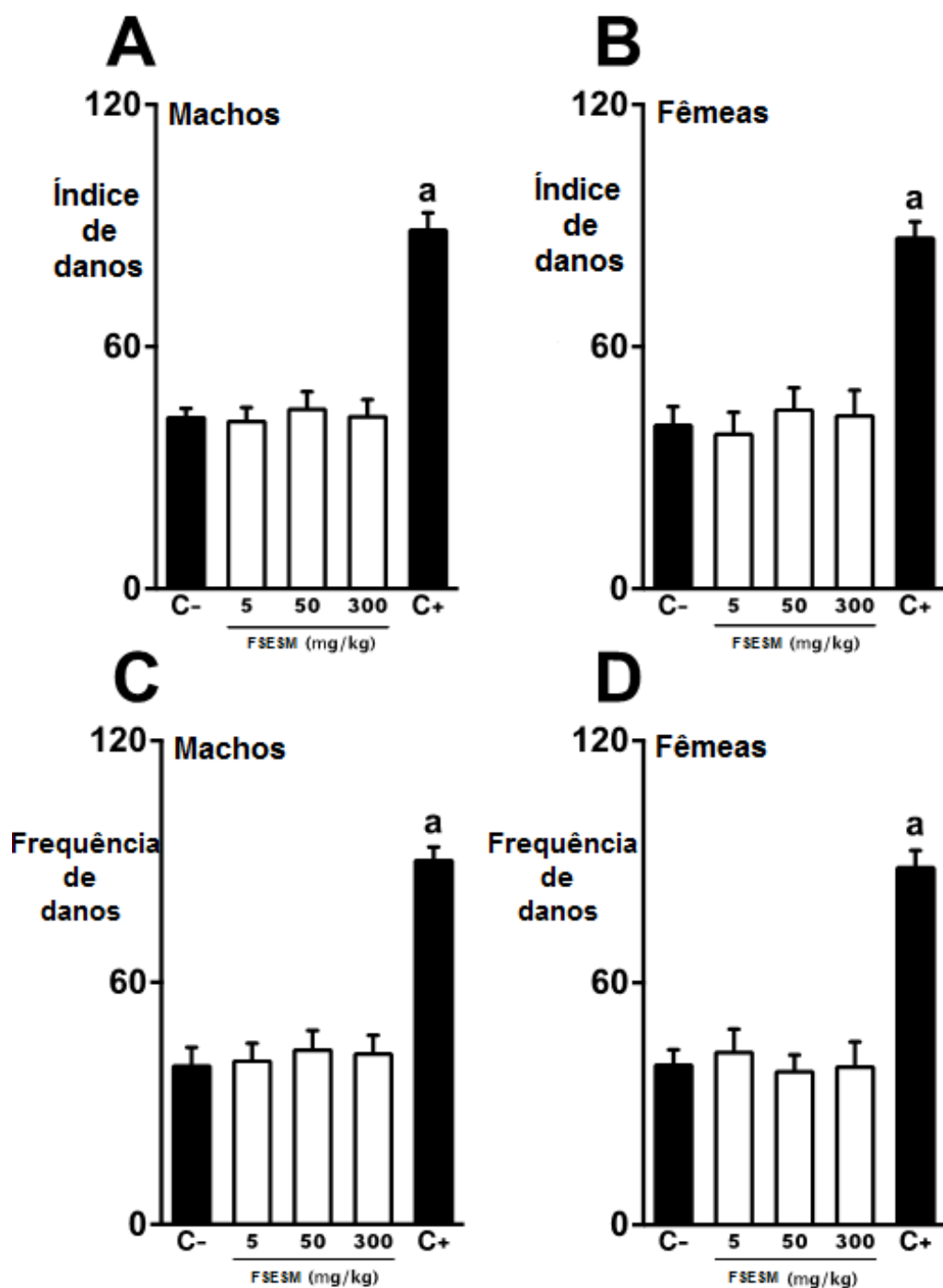
Os efeitos do tratamento prolongado com FSESM (5, 50 e 300 mg/kg) e ciclofosfamida (20 mg/kg - controle positivo) sobre o DNA de ratos machos e fêmeas foram observados através do índice de danos (Figura 12A-B) e da frequência de danos (Figura 12C-D). Todas as doses avaliadas de FSESM não induziram qualquer alteração significativa sobre o DNA dos animais quando comparado com o grupo controle negativo (água filtrada). No entanto, o grupo tratado com a ciclofosfamida induziu ou aumentou em aproximadamente 100% o índice e a frequência de danos sobre o DNA de todos os animais tratados.

A ciclofosfamida é um fármaco classificado como antineoplásico, um agente alquilante, em que se liga ao DNA, realizando a alquilação da principal base nitrogenada, a guanina (Almeida *et al.*, 2005).

Para o atual estudo, portanto, as doses dos extratos aquosos de *S. molle* de 5, 50 e 300 mg/kg não evidenciaram qualquer sinal de genotoxicidade. Entretanto, Duarte *et al.* (2018) utilizando óleo essencial de folhas de *S. molle* por meio do ensaio cometa, observou efeitos de genotoxicidade em doses altas do óleo essencial nos macrófagos. Além desses resultados, a mesma pesquisa demonstrou efeitos não mutagênicos do óleo essencial pelo teste de micronúcleos.

Radwan *et al.* (2018) realizaram pesquisas de genotoxicidade com extratos de partes aéreas de *S. molle* pelo teste de micronúcleos e pelo ensaio cometa, porém em camundongos machos *Swiss*. Esses pesquisadores compararam as espécies medicinais de áreas contaminadas e não contaminadas por metais (Co, Pb, Al, Cr, Cu, Mo, Fe, Mn, Ni, Zn e Sr) na região da Arábia Saudita. Como o esperado, *S. molle* de áreas contaminadas favoreceu em um aumento significativo do número de células micronucleadas (teste de micronúcleos), bem como a presença de danos no DNA (ensaio cometa) foram observados em comparação com o grupo controle. No entanto, para *S. molle* de áreas não poluídas não evidenciou qualquer indício de genotoxicidade para os grupos experimentais.

Figura 12 – Efeitos do tratamento prolongado com FSESM e ciclofosfamida sobre o índice de danos (tipo de dano multiplicado pelo número de células com danos) e a frequência de danos (número de células com danos para cada 100 células avaliadas) sobre o DNA de ratos machos (A, C) e fêmeas (B, D).



Fonte: A autora.

Nota: Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$). Os asteriscos mostram o índice de significância em comparação ao grupo controle negativo (C-) (one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni) (^a $p < 0,05$).

5.7.3 Atividade cardiovascular

5.7.3.1 Avaliação da função renal

O volume urinário observado para as amostras coletadas dos ratos SHR tratados com as diferentes doses do FSESM, nos dias 1 e 28, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com os demais grupos experimentais (Tabela 13). Para a análise do pH urinário (Tabela 14), no primeiro dia de tratamento, uma alteração significativa ocorreu somente no grupo que recebeu a hidroclorotiazida (HCTZ) após 8h de tratamento, em que houve uma redução significativa do valor do pH urinário. Os valores de pH também sofreram uma redução significativa no último dia de tratamento (dia 28), para os grupos tratados com o FSESM (300 mg/kg) após 12h e 24h. Apesar das alterações apresentadas, esses resultados não indicam uma alteração fisiologicamente significativa no modelo experimental utilizado.

Somente os animais tratados com a HCTZ apresentaram redução significativa da densidade urinária 8 horas após o tratamento agudo. Por outro lado, no último dia de tratamento (dia 28), houve redução da densidade urinária para os animais tratados com o FSESM na dose de 30 mg/kg (Tabela 14).

Pela primeira vez, a atividade diurética dos extratos aquosos das folhas de *S. molle in vivo* é avaliado. Na medicina popular, *S. molle* é utilizada pela comunidade pela atividade diurética que apresenta (Silva-Júnior *et al.*, 2015). E além disso, as folhas, cascas, raízes (Murray; Rodriguez; Alza, 2012) e os caules (Meresa *et al.*, 2017) de *S. molle* são usados com finalidade anti-hipertensiva.

Dentre o gênero *Schinus*, além de *S. molle*, poucas espécies são utilizadas com ação diurética na medicina popular, a exemplo de *Schinus dependens* Ortega (extrato dos frutos) (Schultes, 1980), sinônimo de *Schinus polygama* (Cav.) Cabrera (POWO, 2024). Para a família Anacardiaceae, espécies como: *Lithraea molleoides* (Vell) Engl. (folhas) (Goleniowski *et al.*, 2006) e *Mangifera indica* L. (caules) (Dutta, 2014) possuem atividade diurética.

Nesse contexto, pesquisadores realizaram experimentações para comprovar a ação de tal atividade para algumas espécies da família. Mathieu *et al.* (2018) pesquisaram sobre a diurese do extrato aquoso e da fração etil acetato dos caules de

Lannea microcarpa Engl. & K.Krause (10, 50 e 100 mg/kg) em ratos machos Wistar. Para esse experimento, os autores identificaram uma pequena diurese dose-dependente após 6h do início do tratamento.

Extratos alcoólicos, frações n-hexânica insolúvel e solúvel de frutos de *Buchanania angustifolia* Benth., sinônimo de *Buchanania arborescens* (Blume) Blume (POWO, 2024) e *Buchanania lanzan* Spreng apresentaram uma diurese significativa em 5 h nas doses de 250 e 500 mg/kg em relação ao grupo controle. Nesse comparativo *B. angustifolia* possui maior atividade diurética que a outra espécie de planta medicinal em ratos Wistar (Hullatti; Manjunatha; Kuppasth, 2014).

Ntchapda *et al.* (2022) investigaram a ação diurética da planta medicinal utilizada pela população na região da África, a *Haematostaphis barteri* Hook.f. O extrato aquoso dos caules (150, 200 e 250 mg/kg) foi avaliado em ratos hipertensos na administração aguda e subaguda. Os autores identificaram a atividade diurética para todas as doses em um tratamento de 7 dias.

E para a outra espécie de Anacardiaceae, Devi (2011) comprovou a atividade diurética das cascas, da planta nativa da Índia, a *M. indica*. Os experimentos revelaram a diurese dos extratos aquosos, acetato etílico e etanólico após 24h do início do tratamento. A ação diurética das cascas de *M. indica* também foram comprovadas por Thambi; Chacko; Chungath, 2008 em uma dose de 250 mg/kg após 1h de tratamento em ratos machos Wistar. Além disso, nos estudos de Nagisetty *et al.* (2022), as raízes de *M. indica* demonstraram atividade diurética dos extratos alcoólicos de maneira dose dependente (100, 200 e 400 mg/kg).

Tabela 13 – Efeitos do tratamento prolongado com a fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) em ratos SHR para o volume urinário (28 dias)

Grupo	Urina cumulativa (mL/100g/8h)	Urina cumulativa (mL/100g/12h)	Urina cumulativa (mL/100g/24h)
Dia 1			
Controle	3,88 ± 0,32	5,18 ± 0,55	10,92 ± 1,20
HCTZ (25 mg/kg)	5,00 ± 0,46	6,05 ± 0,56	10,72 ± 0,84
FSESM (30 mg/kg)	4,25 ± 0,28	5,60 ± 0,26	11,80 ± 0,64
FSESM (100 mg/kg)	3,70 ± 0,32	4,98 ± 0,50	10,66 ± 1,08
FSESM (300 mg/kg)	4,47 ± 0,43	5,15 ± 0,38	10,34 ± 0,68
Dia 28			
Controle	7,62 ± 0,59	9,90 ± 0,81	17,22 ± 1,32
HCTZ (25 mg/kg)	9,96 ± 0,72	11,60 ± 0,72	17,46 ± 0,98
FSESM (30 mg/kg)	9,62 ± 0,50	11,44 ± 0,47	20,70 ± 1,19
FSESM (100 mg/kg)	7,62 ± 0,56	9,3 ± 0,67	17,25 ± 1,38
FSESM (300 mg/kg)	8,8 ± 0,59	10,20 ± 0,58	17,92 ± 1,09

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os tratamentos com FSESM. Os grupos tratados com HCTZ foram comparados com o controle usando o teste t-Student's. Os valores foram expressos pela média ± E.P.M. ($n = 8$). ^a $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Tabela 14 – Efeitos do tratamento prolongado com a fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) em ratos SHR para o pH e densidade em amostras urinárias (28 dias)

Grupo	pH (8h)	pH (12h)	pH (24h)	Densidade (8h)	Densidade (12h)	Densidade (24h)
Dia 1						
Controle	8,32 ± 0,10	8,40 ± 0,10	8,79 ± 0,03	1016,2 ± 0,86	1018,2 ± 1,70	1024,0 ± 2,47
HCTZ (25 mg/kg)	5,83 ± 0,92 ^a	8,39 ± 0,07	8,78 ± 0,01	1012,2 ± 0,64 ^a	1014,2 ± 0,81	1023,8 ± 1,23
FSESM (30 mg/kg)	6,10 ± 0,69	8,26 ± 0,08	8,75 ± 0,04	1016,6 ± 1,03	1019,5 ± 0,83	1023,0 ± 1,76
FSESM (100 mg/kg)	7,04 ± 0,56	8,38 ± 0,07	8,76 ± 0,03	1014,2 ± 1,18	1021,7 ± 1,30	1025,0 ± 2,12
FSESM (300 mg/kg)	8,31 ± 0,04	8,40 ± 0,07	8,81 ± 0,03	1012,2 ± 0,66	1015,2 ± 0,80	1020,8 ± 0,48
Dia 28						
Controle	8,40 ± 0,04	8,66 ± 0,09	8,90 ± 0,02	1016,5 ± 2,03	1023,5 ± 2,30	1028,5 ± 2,51
HCTZ (25 mg/kg)	8,41 ± 0,10	8,74 ± 0,04	8,82 ± 0,01	1016,2 ± 0,64	1019,0 ± 1,14	1023,5 ± 1,06
FSESM (30 mg/kg)	8,20 ± 0,08	8,42 ± 0,05	8,81 ± 0,02	1016,0 ± 0,53	1016,5 ± 0,70 ^a	1025,0 ± 1,23
FSESM (100 mg/kg)	8,42 ± 0,06	8,52 ± 0,04	8,81 ± 0,04	1014,5 ± 1,45	1017,0 ± 1,06	1026,2 ± 2,01
FSESM (300 mg/kg)	8,30 ± 0,05	8,26 ± 0,11 ^a	8,52 ± 0,11 ^a	1018,0 ± 0,88	1021,8 ± 0,81	1027,0 ± 2,12

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os tratamentos com FSESM. Os grupos tratados com HCTZ foram comparados com o controle usando o teste t-Student's. Os valores foram expressos pela média ± E.P.M. ($n = 8$). ^a $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

5.7.3.2 Efeitos sobre a atividade elétrica cardíaca

O tratamento por 28 dias com diferentes doses do FSESM não foi capaz de alterar as ondas (P, R e T) e os intervalos (PR, QRS, ST e QT) eletrocardiográficos nos diferentes grupos experimentais. Os resultados indicam baixo potencial do FSESM em induzir alterações eletrocardiográficas no modelo experimental utilizado.

5.7.3.3 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

O tratamento prolongado (28 dias) com o FSESM (30, 100 e 300 mg/kg) em ratos SHR não revelou alterações significativas nos valores de pressão arterial sistólica, diastólica, média e na frequência cardíaca dos animais SHR (Tabela 15).

Estudos sobre a atividade cardiovascular dos extratos aquosos de *S. molle* são escassos na literatura. Alguns compostos químicos estão envolvidos na atividade hipotensora como sesquiterpenos, esteróis, monoterpenos, flavonóides e triterpenos (Castillo-España *et al.*, 2009).

Para a espécie, uma experimentação *in vitro* foi realizada com os extratos aquosos dos frutos de *S. molle* por outros pesquisadores (Ranilla *et al.*, 2010). Para essa análise, os autores comprovaram o efeito inibitório sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (IECA). Além disso, as amostras possuíam baixo teor de compostos fenólicos totais.

Outras preparações de *S. molle* foram avaliadas por outros pesquisadores. Bello *et al.* (1996) avaliaram os efeitos dos extratos metanólicos e das frações diclorometano das folhas de *S. molle*. Para esse experimento, todos os extratos na dose de 15 mg/kg reduziram o valor da pressão arterial média de forma significativa em ratos Wistar normotensos. Entretanto, o extrato metanólico na dose de 200 mg/kg não reduziu os efeitos hipertensivos induzidos pela noradrenalina, enquanto a fração diclorometano em uma concentração baixa (100 µg/mL) reduziu a pressão arterial após a administração da noradrenalina.

Outras espécies para o mesmo gênero possuem alguma atividade anti-hipertensiva comprovada. A exemplo disso está a *Schinus terebinthifolius* Raddi. De Lima Glória *et al.* (2017) comprovaram os efeitos hipotensores dos extratos metanólicos dos frutos de *S. terebinthifolius* em um modelo experimental realizado com ratos Wistar. Os autores sugerem que os efeitos vasodilatadores estão

relacionados com a presença de compostos fenólicos, dentre eles o ácido gálico identificado nos extratos.

Além dessa espécie, os óleos essenciais (folhas e flores) de *Schinus areira* L. foram estudados por Bigliani *et al.* (2012). Para esse experimento, a dose de 300 mg/kg foi administrada pela via intravenosa e revelou uma redução significativa da pressão arterial. Os autores sugerem a participação de terpenos nessa atividade.

Dentre as outras espécies da família Anacardiaceae, *Anacardium occidentale* Linn e *Sclerocarya birrea* (A.Rich) Hochts foram estudadas quanto aos efeitos anti-hipertensivos. Os extratos aquosos das cascas de *A. occidentale* em diferentes doses (12, 40, 90 e 167 mg/kg) reduziram os valores da pressão arterial (dose- dependente) em coelhos normotensos por via endovenosa (Tchikaya *et al.*, 2011). Zahoui *et al.* (2015) também avaliaram os efeitos hipotensores dos extratos aquosos das cascas de *A. occidentale*.

Além desse estudo, Herculano *et al.* (2018) realizaram um experimento em ratos machos hipertensos (SHR) em que foram administrados por via oral os extratos hexânicos das folhas de *A. occidentale*. Os dados obtidos mostraram significativa redução da pressão arterial média. Extratos metanólicos de *A. occidentale* também apresentaram efeitos anti-hipertensivos dependentes de concentração (0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 µg/mL) em ratos machos Wistar tratados intravenosamente (Omolaso; Emojevwe; Ajao, 2021).

Tabela 15 – Efeitos do tratamento prolongado (28 dias) com a fração solúvel em etanol de *Schinus molle* (FSESM) em ratos SHR sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

Grupo	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	PAM (mm Hg)	FC (bpm)
Controle	152,05 ± 6,12	114,78 ± 5,02	133,42 ± 2,85	346,96 ± 5,49
HCTZ (25 mg/kg)	136,01 ± 4,81	102,42 ± 7,94	119,21 ± 6,38	337,50 ± 5,11
FSESM (30 mg/kg)	138,14 ± 4,80	103,17 ± 4,37	120,66 ± 3,74	380,74 ± 9,95
FSESM (100 mg/kg)	143,95 ± 6,20	107,21 ± 9,74	125,58 ± 7,61	356,02 ± 7,94
FSESM (300 mg/kg)	152,63 ± 3,92	130,81 ± 6,16	141,72 ± 5,03	372,78 ± 6,05

Fonte: A autora.

Nota: As análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para os tratamentos com FSESM. Os grupos tratados com HCTZ foram comparados com o controle usando o teste t-Student's. Os valores foram expressos pela média ± E.P.M. ($n = 8$). ^a $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

5.7.3.4 Avaliação da reatividade vascular em leito mesentérico

O FSESM administrado em ratos hipertensos (SHR) não induziu quaisquer alterações na reatividade vascular mesentérica. Em todos os grupos experimentais, os animais responderam normalmente à ação vasodilatadora ou vasoconstritora das drogas testadas.

Na literatura, os efeitos vasodilatadores de outras espécies da família Anacardiaceae foram comprovados por estudos científicos. Nesse contexto, Herculano *et al.* (2018) pesquisaram e comprovaram tais efeitos a partir dos extratos hexânicos das folhas de *Anacardium occidentale* L. em anéis mesentéricos de ratos SHR. Os efeitos aparentam serem dependentes da liberação vascular de óxido nítrico (NO).

Os extratos das partes aéreas de *A. occidentale* estudados por Runnie *et al.* (2004) demonstraram um índice maior que 50% para os efeitos vasodilatadores em uma preparação isolada da artéria mesentérica perfundida. Para esse experimento, os autores definiram que a resistência vascular está relacionada com mediadores vasculares, dentre eles o NO, prostanóides e fatores hiperpolarizantes dependentes do endotélio.

6 CONCLUSÃO

Schinus molle é uma planta medicinal rica em metabólitos que são relacionadas às diversas atividades terapêuticas provenientes de diferentes preparações, compreendendo extratos e óleos essenciais.

Diante dessa premissa, o estudo sazonal dos óleos essenciais das folhas de *Schinus molle* L. entre as quatro estações do ano demonstrou efeitos biológicos comprovados: para o óleo essencial de verão, ação antimicrobiana contra *Escherichia coli* e atividade citotóxica frente a células tumorais (câncer de mama, melanoma e células tumorais formadoras de queratina) e células renais normais (células VERO), e atividade anti-inflamatória nos testes de sensibilidade mecânica (Von Frey) e ao frio, e edema de pata, evidenciou que todos os óleos essenciais das diferentes estações do ano de *S. molle* foram ativos. Adicionalmente, todas as amostras do óleo essencial apresentaram atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e TBARS..

O estudo do perfil químico evidenciou uma variação na composição química dos óleos essenciais entre as quatro estações, dividindo-se em monoterpenos hidrocarbonetos, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados. Os compostos majoritários foram: óleo de verão – óxido de cariofileno (8,88%), β -pineno (8,84%), *E*-cariofileno (7,53%), limoneno (6,11%), espatulenol (5,88%), muurolol (5,82%) e α -muuroleno (5,42%); óleo de primavera – limoneno (6,11%); óleo de outono – zonareno (9,27%), globulol (7,84%) e canfeno (5,19%); óleo de inverno – muurolol (19,40%), α -cadinol (16,32%), ledol (14,46%) e óxido de cariofileno (11,44%). Além do mais, o óleo essencial da estação verão apresentou maior variabilidade química entre as quatro estações do ano.

Para o perfil químico dos extratos aquosos de *S. molle* foi identificado 22 compostos, dos quais ácidos orgânicos, derivados do ácido benzóico, álcool benzílico, derivados do ácido fenilpropanóide, flavonoides, procianidinas, megaestigmanos o-glicosilados e ácidos graxos.

O estudo de toxicidade aguda evidenciou a segurança dos extratos aquosos obtido de folhas de *S. molle* em uma dose oral de até 2000 mg/kg. A análise de genotoxicidade dos extratos não revelou danos no material genético (DNA) em ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar após a administração oral das doses de 5, 50 e 300 mg/kg.

E por fim, o tratamento com a fração solúvel em etanol obtida do extrato aquoso de *S. molle* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não resultou em efeitos diuréticos, anti-hipertensivos ou vasodilatadores, mostrando ausência de efeitos cardiovasculares significativos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A. Chemical Composition of Essential Oil from Leaves of *Schinus molle* L. Growing in Taif KSA. **TEOP**, v. 20, n. 1, p. 45-58, 2017.
- ABDEL-SATTAR, E. *et al.* Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. **Nat. Prod. Res.**, v. 24, n. 3, p. 226-235, 2010.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **J. Am. Soc. Mass Spect.** v. 16, p. 1902–1903, 2005.
- ALMEIDA, V. L. de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ARAÚJO, M. M. de; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 83, 2016.
- BARRACHINA, M. D. *et al.* Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products**, v.11, n. 4, p. 317-319, 1997.
- BARROSO, M. S. T. *et al.* Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 28, p. 305-312, 2011.
- BASER, K. H. C. *et al.* Composition of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Turkey. **J. Essent. Oil Res.**, v. 9, n. 6, p. 693-696, 1997.
- BATISTA, L. C.de S. *et al.* In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627-638, 2016.
- BELLO, R. *et al.* Effects on Arterial Blood Pressure of the Methanol and Dichloromethanol Extracts from *Schinus molle* L. in Rats. **Phytother. Res.**, v. 10, n. 7, p. 634–635, 1996.
- BENDAOUD, H. *et al.* Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **J. Food Sci.**, v. 75, n. 6, p. 466-72, 2010.
- BENZI, V.; STEFANAZZI, N.; FERRERO, A. A. Bioactividad de aceites esenciales de hojas y frutos del aguaribay (*Schinus molle* L.) en el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.). **Chil. J. Agric. Res.**, v. 69, n. 2, p. 154-159, 2009.
- BERNHARD, R. A. *et al.* The volatile constituents of *Schinus molle* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, n. 2, p. 463-466, 1983.

BIGLIANI, María C. *et al.* Chemical compositions and properties of *Schinus areira* L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 7, p. 2282-2288, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Anacardiaceae* (Aroeira-da-praia)**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BVENURA, C.; KAMBIZI, L. Composition of Phenolic Compounds in South African *Schinus molle* L. Berries. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1376, 2022.

CALZADA, F. *et al.* Antilymphoma potential of the ethanol extract and rutin obtained of the leaves from *Schinus molle* linn. **Pharmacognosy Res.**, v. 10, n. 2, 2018.

CASTILLO-ESPAÑA, P. *et al.* Preliminary ethnopharmacological survey of plants used in Mexico for the treatment of hypertension. **Pharmacogn. Rev.**, v. 3, n. 5, p. 48, 2009.

CHOI, Y. *et al.* Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 59, p. 369–376, 1994.

CLIFFORD, M.N. *et al.* Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, 2900–2911, 2003.

DANISE, T. *et al.* White poplar (*Populus alba* L.) leaf waste recovery and intercropping outcome on its polyphenols. **Ind. Crops Prod.**, v. 171, p.113866, 2021.

DA SILVEIRA, R. *et al.* Chemical profile of *Schinus molle* L. essential oil and its antihemostatic properties. **Natural Volatiles and Essential Oils**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2020.

DAVICINO, R. *et al.* Different activities of *Schinus areira* L.: anti-inflammatory or pro-inflammatory effect. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 620-627, 2010.

DE CASTRO OLIVEIRA, J. A. *et al.* *Eugenia uniflora*, *Melaleuca armillaris*, and *Schinus molle* essential oils to manage larvae of the filarial vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Enviro. Sci. Pollut. Res.**, v. 29, n. 23, p. 34749-34758, 2022.

DE LIMA GLÓRIA, L. *et al.* Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* Raddi influence the lowering of blood pressure in rats. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1792, 2017.

DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI, D.S. *et al.* Infusion from *Miconia albicans* (Melastomataceae) leaves exhibits anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities without toxicity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 308, p. 116251, 2023.

DEVECI, O. *et al.* Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. **J. Med. Plant Res.**, v. 4, n. 21, p. 2211-2216, 2010.

DEVI, M.S.S. Acute toxicity and diuretic activity of *Mangifera indica* Linn bark extracts. **Int. J. Pharma. Bio. Sci.**, v. 2, n. 3. p. 141-6, 2011.

DÍAZ, C. *et al.* Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. **Nat. Prod. Res.**, v. 22, n. 17, p. 1521-1534, 2008.

DIKSHIT, A.; NAQVI, A. A.; HUSAIN, A. *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 51, n. 5, p. 1085-1088, 1986.

DO ROSÁRIO MARTINS, M. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

DO, T. K. T. *et al.* Proposal for a standardised method for the identification of essential oils by HPTLC. **Pharmeur. Bio Sci. Notes**, v. 2021, p. 157-166, 2021.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.** v. 2000, n. 88, p. 308-16.

DUARTE, J. A. *et al.* Immunotoxicological evaluation of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) essential oil in lymphocytes and macrophages. **Evid.-Based Complement. Altern. Med.**, v. 2018, 2018.

DUTTA, K. N. *et al.* Herbal plants used as diuretics: a comprehensive review. **J. Pharm. Chem. Biol. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2014.

ERYIGIT T. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Schinus molle* L. essential oil from Turkey. **Jeobp.**, v. 20, n. 2, p. 570-577, 2017.

FERIANI, A. *et al.* HPLC-ESI-QTOF-MS/MS profiling and therapeutic effects of *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: investigation of their antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 467-481, 2021.

FERRERO, A. A. *et al.* Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 381-383, 2006.

FERRERO, A. A. *et al.* Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 4, p. 311-314, 2007.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 211, n. 1, p. 56–64, 2000.

GARZOLI, S. *et al.* Chemical investigation of a biologically active *Schinus molle* L. leaf extract. **J. Anal. Methods Chem.**, 2019.

GASPAROTTO JUNIOR, A. *et al.* Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **J. Ethnopharmacol.**, v.134, n.2, p. 363–372, 2011.

GEHRKE, I. T. S. *et al.* Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GHAREEB, M. *et al.* HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of bioactive secondary metabolites from *Strelitzia nicolai* leaf extracts and their antioxidant and anticancer activities in vitro. **Pharmacogn. Res.**, v. 10, n. 4, p. 368–378, 2018.

GIRMAY, K. *et al.* Evaluation of water and ethanol extracts of *Schinus molle* Linn. against immature *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **J. Coast. Life Med.**, v. 2, n. 6, p. 471-477, 2014.

GOLDSTEIN, D. J.; COLEMAN, R. C. *Schinus Molle* L. (Anacardiaceae) Chicha Production in the Central Andes. **Economic Botany**, v. 58, n. 4, p. 523–529, 2004.

GOLENIOWSKI, M. E. *et al.* Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 3, p. 324-341, 2006.

GOMES, V. *et al.* Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 48, p. 222-227, 2013.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. *et al.* 2008. Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, v. 1209, n. 1–2, p. 238–245, 2008.

GUERRA-BOONE, L. *et al.* Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. **Nat. Prod. Commun.** v. 8, p. 135–138, 2013.

GUNDIDZA, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. **Cent. Afr. J. Med.**, v. 39, n. 11, p. 231-234, 1993.

HABTE, G.; NEDI, T.; ASSEFA, S. Antimalarial activity of aqueous and 80% methanol crude seed extracts and solvent fractions of *Schinus molle* linnaeus (anacardiaceae) in plasmodium berghei-infected mice. **J. Trop. Med.**, v. 2020, 2020.

HAMDAN, D. I.; AL-GENDY, A. A.; EL-SHAZLY, A. M. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Schinus molle* Growing in Egypt. **J. Pharm. Sci & Res.**, v. 8, n. 8, p. 779 -793, 2016.

HENRIQUES, M.G. *et al.* Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, n. 1, p. 164–168, 1990.

HERCULANO, E.A. *et al.* Hypotensive, vasorelaxant and antihypertensive activities of the hexane extract of *Anacardium occidentale* Linn. **Arch. Biol. Sci.**, v. 70, n. 3, p. 459-468, 2018.

HMED, M.B. *et al.* Phytochemical and antioxidant activities of *Schinus molle* L. extract. **Rev. Roum. Chim.**, v. 65, n. 2, p. 173-178, 2020.

HOU, D. Anacardiaceae. Flora Malesiana-Series 1, **Spermatophyta**, v. 8, n. 1, p. 395-548, 1974.

HULLATTI, K.; MANJUNATHA, J. R.; KUPPASTH, I. J. Comparative study on diuretic effect of *Buchanania angustifolia* Roxb., and *Buchanania lanzan* Spreng. fruit extracts and fractions. **J. Appl. Pharm. Sci.**, v. 4, n. 8, p. 059-063, 2014.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **J. Herbmed Pharmacol.**, v. 7, n. 1, 2018.

JIMENEZ-ESTRADA, M. *et al.* Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, n. 1-2, p. 34-38, 2006.

KAWASAKI, H. *et al.* Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 164-167, 1988.

KAWASAKI, H. *et al.* NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. **A. J. of Physiol. - Heart and Circ. Physiol.**, v. 261, n. 3, p. H683-H690, 1991.

KHALED, S.E. *et al.* A biochemometric approach for the assessment of *Phyllanthus emblica* female fertility effects as determined via UPLC-ESI-qTOF-MS and GC-MS. **Food Funct.**, v. 10, n. 8, p. 4620–4635, 2019.

LLORENS-MOLINA, J. A.; VACAS, S. Seasonal variations in essential oil of aerial parts and roots of an *Artemisia absinthium* L. population from a Spanish area with supramediterranean climate (Teruel, Spain). **J. Essent. Oil Res.**, v. 27, n. 5, p. 395-405, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum; 2008.

MACHADO, C. D. *et al.* *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 29, p. 1-10, 2019.

MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 421-428, 2007.

MAEMA, L. P.; POTGIETER, M.; MAHLO, S. M. Invasive alien plant species used for the treatment of various diseases in Limpopo Province, **South Africa. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.** v. 13, n. 4, p. 223–231, 2016.

MAFFEI, M.; CHIALVA, F. Essential oils from *Schinus molle* L. berries and leaves. **Flavour Fragr. J.**, v. 5, n. 1, p. 49-52, 1990.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **J. Nat. Prod.**, v. 25, p. 320-331, 1962.

MARANGONI, J.A. *et al.* Geographical variation in the chemical composition, anti-inflammatory activity of the essential oil, micromorphology and histochemistry of *Schinus terebinthifolia* Raddi. **J. Ethnopharmacol.**, v. 301, p. 115786, 2023.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.

MARKS, S.C.; MULLEN, W.; CROZIER, A. 2007. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, n. 4, p. 719–728, 2007.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoter. Res.**, v.15, p.127130, 2001.

MERESA, A. *et al.* An Ethno Botanical Review on Medicinal Plants Used for the Management of Hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 7, p. 1-16, 2017.

MOLINA-GARZA, Z. J. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Trop.** v. 136, p. 14–18, 2014.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new 586 electronic algometer. **J. Neurosci. Methods**, v. 84, 41–47, 1998.

MONTANARI, R. M. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. **Quím. Nova**, v. 34, p. 1550-1555, 2011.

MORAIS, S.M. *et al.* Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Quím. Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MURRAY, A. P.; RODRIGUEZ, S. A.; ALZA, N. P. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Schinus*. **Recent Progress in Medicinal Plants**, v. 32, p. 261-287, 2012.

NAGISETTY, S. *et al.* Evaluation of Diuretic Activity of Root Extract of *Mangifera Indica* in Albino Rats: an Original Research Study. **Int. J. Health Sci.**, v. 6, n. S8, p. 3286-3291, 2022.

NEVES, A. M. *et al.* Phenolic profile, antioxidant and antifungal activity of extracts from four medicinal plants of the Anacardiaceae family. **Res. Soc. Dev.**, v. 10, n. 8, p. e44510817421-e44510817421, 2021.

NTCHAPDA, F. *et al.* Diuretic and antihypertensive activity of the aqueous extract of *Haematostaphis barteri* stem bark in adrenaline-induced hypertensive Wistar rats. **J. Phytopharm.**, v. 11, n. 1, p. 24-31, 2022.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), Test No. 474: **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, France: 2016a.

OECD (Organization of Economic Co-operation and Development). Test No. 489: **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris: 2016b.

OECD (Organization of Economic Co-operation and Development). The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 425 **Acute Oral Toxicity** – Fixed Dose Procedure. OECD, Paris, France: 2001.

OLAFSSON, K. *et al.* Isolations of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*. **Planta medica**, v. 63, n. 04, p. 352-355, 1997.

OMOLASO, B.O.; EMOJEVWE, V.; AJAO, B.Z. Effects of Methanol Fraction of *Anacardium Occidentale* (Cashew) Bark Extract on Salt-Induced Hypertension in Rats. **Prog. Med. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2021.

PAÇO, A. *et al.* Anti-inflammatory and immunoregulatory action of sesquiterpene lactones. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1142, 2022.

POWO. "Plants of the World Online". Facilitated by the **Royal Botanic Gardens**, Kew. Published on the Internet. Disponível em: < <http://www.plantsoftheworldonline.org/>>. Acesso em: 20 jul. 22.

POWO. "Plants of the World Online". Facilitated by the **Royal Botanic Gardens**, Kew. Published on the Internet. Disponível em: < <http://www.plantsoftheworldonline.org/>>. Acesso em: 17 set. 24.

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.**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RADWAN, A. M. *et al.* Comparative studies on the effect of environmental pollution on secondary metabolite contents and genotoxicity of two plants in Asir area, Saudi Arabia. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 17, n. 8, p. 1599-1605, 2018.

RANILLA, L.G. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 12, p. 4676-4689, 2010.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

ROCHA, P. M. de M. *et al.* Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12023-12036, 2012.

ROSAS, E.C.; CORREA, L.B.; DAS GRAÇAS HENRIQUES, M. Anti-inflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and its use in arthritic conditions. In: **Bioactive food as dietary interventions for related inflammatory diseases**. Academic Press, 2019. p. 489-505.

ROSSINI, C. *et al.* Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan origin. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, n. 1, p. 71-73, 1996.

RUNNIE, I. *et al.* Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, n. 2-3, p. 311-316, 2004.

RUFFA, M. J. *et al.* Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 335-9, 2002.

SALEM, M. Z. M. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Schinus molle* wood branch growing in Egypt. **J. Wood Sci.**, v. 62, n. 6, p. 548-561, 2016.

SANTOS, A. S. *et al.* **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Comunicado técnico. Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belém, Pará. Nov., 2004.

SCHULTES, R. E. Ruiz as an ethnopharmacologist in Peru and Chile. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 28, n. 1, p. 87-122, 1980.

SCHWOB, I. *et al.* Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochem Syst Ecol.**, v. 32, p. 735-745, 2004.

SGHAIER, M. B. *et al.* Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 32, n. 3, p. 336-348, 2011.

SILVA-JÚNIOR, E.F. *et al.* Phytochemical compounds and pharmacological properties from *Schinus molle* Linnaeus and *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 7, n. 12, p. 389-393, 2015.

SILVA-LUZ, C. L. *et al.* **Anacardiaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1199>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

SIMIONATTO E. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Leaves Essential Oil From *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Jeobp.**, v. 14, n. 5, p. 590-599, 2011.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochem. Rev.**, v. 19, n. 5, p. 1199-1209, 2020.

TCHIKAYA, F.O. *et al.* *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) stem bark extract induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.**, v. 8, n. 4, 2011.

THAMBI, P.; CHACKO, S.M.; CHUNGATH, J. Acute toxicity and diuretic activity of *Mangifera indica* L. bark extracts. **Pharmacology Online**, v. 2, p. 103-111, 2008.

TLILI, N. *et al.* *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. **Ind. Crops Prod.**, v. 122, p. 559-565, 2018.

TURCHETTI, G. *et al.* Antimicrobial testing of *Schinus molle* (L.) leaf extracts and fractions followed by GC-MS investigation of biological active fractions. **Molecules**, v. 25, n. 8, p.1977, 2020.

VEKIARI, S. A. *et al.* Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a *Cretan lemon* variety. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 147–153, 2002.

YUEQIN, Z. *et al.* Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with antiinflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Med.** v. 69, p. 893–898, 2003.

ZAHED, N. *et al.* Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination. **Acta Physiol. Plant.**, v. 32, n. 6, p. 1221-1227, 2010.

ZAHOU, O.S. *et al.* Determination of the hypotensive effect of aqueous extracts from *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae). **Journal of Research in Biology**, v. 5, n. 8, p. 1909-1921, 2015.

ZENEBE, S.; FEYERA, T.; ASSEFA, S. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of aerial parts of *Cissus quadrangularis* L. and leaves of *Schinus molle* L. against *Haemonchus contortus*. **Biomed Res. Int.**, 2017.

ZUHARAH, W. F. *et al.* Larvicidal activities of family Anacardiaceae on Aedes mosquitoes (Diptera: Culicidae) and identification of phenolic compounds. **J. King Saud Univ. Sci.**, v. 33, n. 5, p. 101471, 2021.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 8 de setembro de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO EXTRATO AQUOSO DE *Schinus molle* L. EM RATOS”**, registrada sob o protocolo de nº 14/2022, sob a responsabilidade de **Arquimedes Gasparotto Junior** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 11/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto de pesquisa	01/10/2022 a 01/08/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> - Ratos Wistar e SHR
Nº de animais	70 animais (10 Wistar e 60 SHR)
Peso/idade	300g/3 meses
Sexo	machos
Procedência	Biotério Central UFGD

Daniela Torres Cantadori
 Coordenadora em exercício CEUA/UFGD

ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 17 de novembro de 2017.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de espécies vegetais**", protocolo nº 07/2017, sob responsabilidade de Anelise Samara Nazari Formagio – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 02 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	20/11/2017 – 20/11/2022
Espécie/linhagem	Mus musculus / Swiss Rattus norvegicus / Wistar
Nº de animais	256 Mus musculus / Swiss 50 Rattus norvegicus / Wistar
Peso/idade	Mus sp. 25-30g / 45 dias Rattus sp 200-300g / 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Camundongos Swiss e Ratos Wistar – Biotério da Faculdade Ciências da Saúde/FCS-UFGD

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE AO ASSUNTO DA PESQUISA

Journal of Ethnopharmacology 333 (2024) 118499



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharmAcute toxicity and genotoxicity of *Schinus molle* L. aqueous extract/ethanol-soluble fraction in rats

Camila Dias Machado^a, Paulo Vitor Farago^a, Caroline de Moura Costa^b, Katyuze Souza Farias^b, Denise Brentan Silva^b, Aline Aparecida Macedo Marques^c, Karyne Garcia Tafarelo Moreno^c, Luana Ale Bertoncello Pael^c, Maria Luiza Fidelis da Silva^c, Arquimedes Gasparotto Junior^{c,*}, Jane Manfron^a

^a Pharmaceutical Sciences Post Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil^b Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LaPNEM), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food, and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil^c Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFaC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute toxicity
Anacardiaceae
Aroeira
Comet assay
Micronucleus test

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Schinus molle* L. is a medicinal species belonging to the Anacardiaceae family. It is commonly referred to as "aroeira" and its leaves and roots are utilized for treating different pathological conditions. However, despite its widespread use in traditional medicine, there is a lack of in-depth toxicological studies.

Aim: To evaluate the acute toxicity and genotoxicity of *S. molle* aqueous extract/ethanol-soluble fraction in rats. **Material and methods:** First, a purified aqueous extract was obtained from the leaves of *S. mole* through infusion (referred to as EESM) and its compounds were identified using LC-DAD-MS data. Female rats were then subjected to acute oral toxicity tests using doses of 5, 50, 300, and 2000 mg/kg of EESM. Studies on genetic material, including the micronucleus test and comet assay, were conducted on male and female Wistar rats using the same doses as in the acute toxicity test. For both assays, EESM was administered orally.

Results: The main metabolites annotated from EESM were dimeric proanthocyanidins, phenylpropanoids acids, flavan-3-ols, simple organic acids (C6–C1), a flavonol di-O-glycosylated (rutin), and O-glycosylated megastigmane. The EESM did not exhibit any acute toxic effects, such as changes in biochemical, hematologic, or histopathological analysis. Furthermore, no changes were observed in comet assay or micronucleus tests when rats were given doses of 5, 50, 300, or 2000 mg/kg of EESM.

Conclusion: The results showed that the EESM does not induce acute toxicity or exhibit genotoxicity up to a dose of 2000 mg/kg.

1. Introduction

The *Schinus* L. genus, which belongs to the Anacardiaceae R.Br. family, includes 12 species that are found throughout the Brazilian territory in different biomes such as Pampa, Caatinga, Cerrado, and Atlantic Forest (Silva-Luz et al., 2022a). This genus is native to Latin America (Plants of the World, 2022) and includes shrubs, subshrubs, and trees (Silva-Luz et al., 2022a). *Schinus* species have traditionally been used in Brazil as antifungal, antimicrobial, insecticide, and cicatrizing agents (Silva-Luz et al., 2022a). Additionally, they possess analgesic,

antioxidant, and antitumoral properties (Murray et al., 2012).

S. molle L. is a medicinal species commonly known as "aguaraby", "bálsamo", "molle", "pimenteiro" (Murray et al., 2012), "aroeira-folha-de-salsa", and "aroeira-mansa" (Silva-Luz et al., 2022b). The distribution of *S. molle* extends to South America, specifically to countries like Paraguay, Uruguay, Brazil, Northern Argentina (Silva-Luz et al., 2022b), Chile, and Peru (Plants of the World, 2022). In Brazil, *S. molle* mainly inhabits the Southern Region, including areas like Pampas and the Atlantic Forest (Silva-Luz et al., 2022b). In traditional medicine, the species is used as an antifungal, antimicrobial, insecticide, analgesic, antitumoral, antiseptic, and antihypertensive (Goldstein and

* Corresponding author. Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LaFaC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970, Dourados, MS, Brazil.

E-mail address: arquimedesjunior@ufgd.edu.br (A. Gasparotto Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118499>

Received 18 April 2024; Received in revised form 7 June 2024; Accepted 25 June 2024

Available online 25 June 2024