

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRISCILLA SALLES DE BRITO

MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis* Sm.

PONTA GROSSA

2022

PRISCILLA SALLES DE BRITO

**MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis* Sm.**

Tese apresentada para obtenção do título de
doutora na Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Área de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Profa. Dra. Jane Manfron

**PONTA GROSSA
2022**

8862 Brito, Priscilla Sallas de
Morfogenetomia, composição química e atividades biológicas do óleo
essencial de *Eucalyptus tereticornis* Sm. / Priscilla Sallas de Brito. Ponta Grossa,
2022.
102 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Parago.
Coorientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.

1. *Eucalyptus tereticornis*. 2. Morfogenetomia. 3. Atividades biológicas. I.
Parago, Paulo Vítor. II. Manfron, Jane. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Fármacos. Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia. IV. T.

CDD- 613



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 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 02/2022 DA DOUTORANDA PRISCILLA SALLES DE BRITO, REALIZADA
NO DIA 26 DE AGOSTO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Às vinte e seis dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, às 09h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência da Professora Doutora JANE MANFRON, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda PRISCILLA SALLES DE BRITO, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora JANE MANFRON, demais Doutores (membros titulares): PATRÍCIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN (UEPG/PR); JULIANA BONAMETTI OLIVATO (UEPG/PR); JOSIANE DE FATIMA GASPARI DIAS (UFPR/PR) e SARA EMILIA LIMA TOLOUEI (CIEP/SC). 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: "MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis* Sm".

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 Dissertação 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: _____

JANE MANFRON (UEPG/PR)
Presidente

PATRÍCIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
(UEPG/PR)

Titular

JOSIANE DE FATIMA GASPARI DIAS
(UFPR/PR)

Titular

JULIANA BONAMETTI OLIVATO
(UEPG/PR)

Titular

SARA EMILIA LIMA TOLOUEI
(CIEP/SC)

Titular

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus orientadores Prof. Paulo Vitor Farago e Profa. Jane Manfron Budel pelos ensinamentos, incentivo, dedicação e competência para a realização deste trabalho.

A minha família, pela ajuda e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo investigar a morfoanatomia, composição química e atividades biológicas do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*. Para tanto foi avaliada a morfoanatomia das folhas adultas de *E. tereticornis*, e após a extração do óleo essencial das folhas de *E. tereticornis* foi determinado o seu teor e o perfil químico e verificadas algumas atividades biológicas como, atividades antimicrobiana, antioxidante, efeito anti-inflamatório por meio do modelo de edema de orelha, migração celular por meio de análises histológicas, atividade citotóxica e a ação repelente. No presente estudo, uma explicação abrangente da anatomia da folha e do caule e histoquímica de *Eucalyptus tereticornis* é apresentada. Observou-se a presença de crostas como ceras epicuticulares nas superfícies das folhas, os cristais foram encontrados em algumas células epidérmicas como um agregado de placas, presença de cristais prismáticos em vários tecidos e mesofilo homogêneo. As análises histoquímicas confirmaram a presença de compostos lipofílicos e compostos fenólicos, grãos de amido e elementos lignificados. A composição química do óleo essencial análise por CG-EM detectou 25 compostos, sendo que os principais componentes foram p-cimeno (46,57%), a criptona (25,24%) e o terpinen-4-ol (5,23%). Na análise da atividade antimicrobiana, houve inibição do crescimento de todos os microrganismos testados na metodologia de difusão em disco, com resultados mais satisfatórios frente a *C. albicans* e *S. epidermidis*; na metodologia de macrodiluição em caldo, com exceção de *P. aeruginosa*, também foi observada atividade bactericida do óleo essencial frente todas as demais cepas testadas. O óleo essencial de *E. tereticornis* demonstrou efeito antioxidante pelo método da redução do radical livre DPPH. O óleo essencial de *E. tereticornis* apresentou atividade anti-inflamatória quando utilizado por via tópica, pois reduziu de forma significativa o edema, o peso do tecido e a migração de células inflamatórias. Na avaliação da atividade citotóxica, por meio de redução do MTT utilizando as linhagens de fibroblasto murino (linha não tumoral - 3T3) e de melanoma murinho (linhagem tumoral - B16F10), observou-se que é necessário utilizar uma concentração maior do óleo para causar citotoxicidade para a linhagem tumoral em relação a não tumoral. Na avaliação da atividade repelente, também foi observado efeito com o óleo sem diluição. Esses resultados mostram detalhes da morfoanatomia e histologia da planta ainda não estudados. Novos estudos envolvendo análises anatômicas e filogenéticas de outras espécies de eucalipto são indispensáveis para entender melhor a evolução e taxonomia do gênero. O presente trabalho mostra também que a necessidade da continuidade nos estudos para confirmar e elucidar o mecanismo de ação dessas e muitas outras atividades biológicas que podem estar presentes no o óleo essencial de *E. tereticornis*.

Palavras-chave: *Eucalyptus tereticornis*; morfoanatomia; atividades biológicas

ABSTRACT

This study aims to investigate the morphoanatomy, chemical composition and biological activities of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis*. Therefore, the morphoanatomy of the adult leaves of *E. tereticornis* was evaluated, and after the extraction of the essential oil from the leaves of *E. tereticornis*, its content and chemical profile were determined and some biological activities were verified, such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activity. -inflammatory through the ear edema model, cell migration through histological analysis, cytotoxic activity and repellent action. In the present study, a comprehensive explanation of the leaf and stem anatomy and histochemistry of *Eucalyptus tereticornis* is presented. The presence of crusts such as epicuticular waxes on the leaf surfaces was observed, crystals were found in some epidermal cells as an aggregate of plaques, presence of prismatic crystals in various tissues and homogeneous mesophyll. Histochemical analyzes confirmed the presence of lipophilic and phenolic compounds, starch grains and lignified elements. The chemical composition of the essential oil by GC-MS analysis detected 25 compounds, the main components being p-cymene (46.57%), kryptone (25.24%) and terpinen-4-ol (5.23 %). In the analysis of antimicrobial activity, there was inhibition of the growth of all microorganisms tested in the disc diffusion methodology, with more satisfactory results against *C. albicans* and *S. epidermidis*; in the broth macrodilution methodology, with the exception of *P. aeruginosa*, bactericidal activity of the essential oil was also observed against all other strains tested. The essential oil of *E. tereticornis* showed an antioxidant effect by the DPPH free radical reduction method. *E. tereticornis* essential oil showed anti-inflammatory activity when used topically, as it significantly reduced edema, tissue weight and migration of inflammatory cells. In the evaluation of the cytotoxic activity, through the reduction of MTT using the murine fibroblast (non-tumor line - 3T3) and murine melanoma (tumor line - B16F10) strains, it was observed that it is necessary to use a higher concentration of the oil to cause cytotoxicity for the tumor lineage in relation to the non-tumor. In the evaluation of the repellent activity, an effect was also observed with the oil without dilution. These results show details of the morphoanatomy and histology of the plant not yet studied. New studies involving anatomical and phylogenetic analyzes of other eucalyptus species are essential to better understand the evolution and taxonomy of the genus. The present work also shows the need for continuity in studies to confirm and elucidate the mechanism of action of these and many other biological activities that may be present in the essential oil of *E. tereticornis*.

Keywords: *Eucalyptus tereticornis*; morphoanatomy; biological activities

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Imagens de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	22
Figura 2 -	Sistema de câmara fechada para avaliação da atividade fumigante.....	38
Figura 3 -	Morfoanatomia de folhas de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (b, c, g, h, j, k: microscopia de luz; d, e, f, i, l, m: SEM). a) face adaxial (ad) e abaxial (ab) de folhas. (b-f) Folha em vista frontal. (g-m). Secções transversais (cr, cristal; ct, cutícula; cv, cavidade; di, cristal prismático em forma de diamante; dr, drusa; ep, epiderme; le, lenticela; oc, células de cobertura; pa: cristal de agregado em placas; pp, parênquima paliçádico; st, estômatos; wx, cera epicuticular). Barra de escala: a = 20 cm; b, c, d, g = 50 µm; h, k = 25 µm; e, f, i, j, k, l = 10 µm; m = 2 µm.....	40
Figura 4 -	Imagem de MEV e espectro de EDS de um cristal prismático de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	42
Figura 5 -	Anatomia de <i>Eucalyptus tereticornis</i> em secção transversal (a-g: microscopia de luz; h, i: MEV). (a-c) Nervura central. (d-i) pecíolo. (co, colênquima; ct, cutícula; cv, cavidade; di, cristal prismático em forma de losango; dr, drusa; ep, epiderme; fi, fibras; ir, cristal irregular; ph, floema; pp, parênquima paliçádico; vb, feixe vascular ; xy, xilema). Barra de escala: a = 200 µm; b, c, e-g = 50 µm; d = 500 µm; h, i = 5 µm.....	44
Figura 6 -	Anatomia do caule de <i>Eucalyptus tereticornis</i> em secção transversal (a, g, h: microscopia de luz; b-f, i: MEV). (ct, cutícula; ep, epiderme; dr, drusa; ir, cristal irregular; pc, composto fenólico; ph, floema; ph, medula; re, prisma retangular; ve, elemento do vaso; xy, xilema). Barra de escala: a, b = 500 µm; c, d, i = 20 µm; e, f = 10 µm; g = 300 µm; h = 30 µm.....	45
Figura 7 -	Histoquímica de <i>Eucalyptus tereticornis</i> . (a, b) Nervura central em reação com Sudan III e (c) com cloreto férrico. (d) Pecíolo tratado com cloreto férrico. (e, f) Pecíolo em reação com dicromato de potássio. (g) Caule em reação com solução de iodo. (h, i) Caule tratado com florocloroglucinol/HCl. (co, colênquima; ct, cutícula; cv, cavidade; o, óleo essencial; ep, epiderme; fi, fibras; gp, parênquima fundamental; pc, compostos fenólicos; ph, floema; pi, medula; sc, esclerênquima; sg, grãos de amido; xy, xilema). Barra de escala: a = 100 µm; b, d, f-i = 50 µm; c, e = 200 µm.....	47
Figura 8 -	Comparação das placas de CCDAE sob UV 366 nm (A) e sob luz branca (B) após derivatização com reagente de anisaldeído. As faixas 1-4 do lado esquerdo da figura são padrões: 1,8-cineol, α -bisabolol, borneol e óxido de bisabolol, respectivamente, e a faixa 1 do lado direito é óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	51
Figura 9 -	Estrutura química dos compostos majoritários encontrados no óleo	

	essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	53
Figura 10 -	Percentual de crescimento de <i>Candida albicans</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton com 2% de glicose no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	58
Figura 11 -	Percentual de crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	58
Figura 12 -	Percentual de crescimento de <i>Escherichia coli</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	59
Figura 13 -	Percentual de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	59
Figura 14 -	Percentual de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao	

	grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	60
Figura 15 -	Percentual de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 horas de incubação com o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 µg/mL e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano (n=9) ± E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).....	60
Figura 16 -	Curva analítica para a quantificação da atividade antioxidante, pelo método de redução do radical livre DPPH, a partir de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	65
Figura 17 -	Média da atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> , em relação ao ácido ascórbico e ácido gálico pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio. **** para $p < 0,0001$ quando comparado com o ácido ascórbico, ** $p < 0,01$ quando comparado com o ácido ascórbico (ANOVA e pós teste de Tukey).....	67
Figura 18 -	Efeito do Óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> no edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados topicamente com o TPA (Controle), com exceção do grupo veículo que recebeu apenas a aplicação de acetona (Veículo). Na sequência os animais foram tratados com o óleo essencial (1,0 a 0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha). As barras representam a média ± E. P. M. (n=5-8) do aumento da espessura da orelha em micrometros. A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo Veículo.....	70
Figura 19 -	Efeito do Óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (1; 0,75; 0,5; 0,3 e 0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) no peso das orelhas após indução por TPA (2,5 µg/orelha - Controle). Os dados apresentados representam a média ± E. P. M. (n=5-8). A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey. ** $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle. ns foi indicativo de não significância quando comparado ao grupo controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo Veículo.....	71
Figura 20 -	Imagens representativas da histologia de cortes transversais das orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 100x, escala de 200 µm) coletadas 24 horas após a aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). Grupos: naïve (sem tratamento), veículo (acetona), controle, Óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (0,1;	

	0,3; 0,5; 1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha).....	73
Figura 21 -	Efeito do óleo essencial das folhas de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (concentrações) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a migração leucocitária após a indução com aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E. P. M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte) e os cortes corados com Hematoxilina-eosina. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (anova), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.	74
Figura 22 -	Ensaio de viabilidade celular frente ao óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> utilizando a técnica de MTT. A – linhagem não tumoral, fibroblasto murino, 3T3. B – linhagem tumoral, melanoma murino, B16F10. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão da média, de um experimento realizado em triplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.....	77
Figura 23 -	Imagem de <i>Ctenocephalides felis</i>	79
Figura 24 -	Percentual % da inabilidade dos insetos de <i>C. felis</i> em relação do tempo, quando expostos ao óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> e aos controles.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tempo de retenção (min), identidade química, porcentagem média da concentração dos constituintes químicos e o desvio padrão do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	52
Tabela 2 -	Média e desvio padrão dos diâmetros dos halos de inibição referentes a atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> pelo método de difusão em disco.....	56
Tabela 3 -	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> frente a cada microrganismo testado pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton.....	61
Tabela 4 -	Porcentagem da atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> em diferentes concentrações frente ao DPPH (1-difenil-2-picril-hidrazil)	64
Tabela 5 -	Resultados de IC ₅₀ para o óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> , frente aos padrões de ácido ascórbico e de ácido gálico, a partir do ensaio de redução do radical livre DPPH.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.	16
2.2	GÊNERO <i>Eucalyptus</i> L'Hér.	17
2.3	ESPÉCIE <i>Eucalyptus tereticornis</i>	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	GERAL.....	24
3.2	ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	25
4.2	ESTUDOS BOTÂNICOS.....	25
4.2.1	Procedimento de Microscopia.....	25
4.2.2	Análise Histoquímica.....	25
4.2.3	Micromedições.....	26
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
4.2.5	Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS).....	26
4.3	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus tereticornis</i>	27
4.3.1	Extração do Óleo Essencial de Folhas de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	27
4.3.2	Determinação do Perfil Químico do Óleo Essencial.....	27
4.3.2.1	Análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE).....	27
4.3.2.2	Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	28
4.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	29
4.4.1	Atividade Antimicrobiana.....	29
4.4.1.1	Difusão em disco	29
4.4.1.2	Macrodiluição em caldo	30
4.4.2	Atividade Antioxidante	31
4.4.2.1	Método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)	31
4.4.2.2	Método do fosfomolibdênio.....	32
4.4.2.3	Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico- Espécies Reativas (TBARS).....	33
4.3	Atividade Anti-inflamatória <i>in vivo</i>	34
4.4.3.1	Animais.....	34
4.4.3.2	Avaliação do edema de orelha.....	34
4.4.3.2.1	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA	35
4.4.3.4	Análise histológica	35
4.4.4	Atividade Citotóxica.....	35
4.4.4.1	Linhas celulares.....	35
4.4.4.2	Ensaio de citotoxicidade através da metabolização do reagente MTT.....	36
4.4.4.3	Cálculo da concentração inibitória mínima IC ₅₀	36
4.4.4.4	Cálculo do índice de seletividade.....	36
4.4.4.5	Análise estatística.....	37
4.4.5	Atividade Repelente.....	37
4.4.5.1	Atividade biológica de óleos essenciais usando <i>Ctenocephalides felis</i>	37
4.4.5.1.1	Avaliação da atividade fumigante.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1	ESTUDOS BOTÂNICOS.....	39
5.2	ANÁLISES HISTOQUÍMICAS.....	46
5.3	DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Eucalyptus tereticornis</i>	49
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	55
5.4.1	Teste de Difusão em Disco.....	56
5.4.2	Teste de Macrodiluição em Caldo.....	57
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	63
5.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>in vivo</i>	69
5.6.1	Efeito do Óleo Essencial das Folhas de <i>Eucalyptus tereticornis</i> no Aumento da Espessura das Orelhas Induzido Pela Aplicação de TPA.....	69
5.6.2	Efeito do Óleo Essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> no Peso das Orelhas Induzido pela Aplicação de TPA.....	70
5.6.3	Análise Histológica para Avaliação do Efeito do Óleo Essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> Sobre a Migração Leucocitária	71
5.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	76
5.8	ATIVIDADE REPELENTE.....	78
6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos pela humanidade, como terapia natural para a cura e/ou alívio de enfermidades, sendo essas informações passadas de uma geração para outra. Observa-se ainda ao longo dos anos uma crescente demanda por plantas medicinais, sendo muitas vezes a única fonte de recursos terapêuticos para a população, seja por ser de origem natural, pela riqueza da biodiversidade, pela tradição popular desta prática, como também pelo baixo poder aquisitivo da população (ARAÚJO, A.C *et al.*, 2009; TOMCHINSKY *et al.*, 2013; MARTINS; GARLET, 2016; CAVAGLIERI; PADILHA; PRADO, 2018).

Na medicina popular, as plantas adquiriram fundamental importância por suas propriedades terapêuticas. Fontes de substâncias naturais, incluindo os compostos derivados de plantas, têm sido utilizadas como estratégia para obtenção de novos compostos biologicamente ativos. A descoberta da atividade biológica destas substâncias não representou apenas o surgimento de grupos novos de medicamentos, mas possibilitou a identificação de novas intervenções terapêuticas. (BRUNETON, 1993; CALIXTO *et al.*, 2001; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

A busca por alternativas terapêuticas mais naturais está se intensificando nos últimos anos, a fim de se obter compostos com melhores potenciais de biodisponibilidade, segurança e mecanismos de ação mais eficazes para o tratamento das doenças. Com isso, muitas plantas medicinais estão sendo evidenciadas com variadas atividades biológicas, a exemplo de antimicrobiana (CAAMAL-HERRERA *et al.*, 2018; DANTAS *et al.*, 2018, QASIM *et al.*, 2018), anti-inflamatória (ABU-SERIE; HABASHY; ATTIA, 2018; XIAO *et al.*, 2018), antiproliferativa (MOLINA-ROMO *et al.*, 2018, PRETI *et al.*, 2018), antioxidante (KOCOT *et al.*, 2018; SHANG *et al.*, 2018), entre outras.

No entanto, ainda existem plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foram submetidas a estudos que comprovem sua eficácia e segurança, embora sejam naturais, não estão isentas de efeitos tóxicos e necessitam ter sua eficácia comprovada. Segundo a RDC26/2014 (BRASIL, 2014), foram criadas duas modalidades de produtos, os “medicamentos fitoterápicos”, que continuam tendo a necessidade de passar por testes clínicos padronizados para avaliação de segurança e eficácia; e os “produtos tradicionais fitoterápicos”, que serão autorizados por meio da demonstração do uso seguro no ser humano por um período longo, determinado pela Agência como de 30 anos, mediante a literatura científica referenciada. As plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro

xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (LAPA *et al.*, 2000). Dentre as inúmeras espécies utilizadas medicinalmente destaca-se o eucalipto.

O eucalipto é a espécie florestal mais cultivada no território nacional, ocupando uma área superior a 4,75 milhões de hectares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS, 2011). As árvores de eucalipto têm grande relevância na economia brasileira, sendo extensivamente empregadas como matéria-prima na construção civil e em indústrias de compensado e de papel (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). Além da exploração da madeira, o óleo essencial obtido a partir das folhas de espécies de *Eucalyptus* é amplamente utilizado na fabricação de produtos farmacêuticos e de limpeza e nas indústrias de perfumaria. Adicionalmente, o óleo essencial de *Eucalyptus* possui um amplo espectro de atividade biológica, incluindo antimicrobiana, fungicida, inseticida/repelente de insetos, herbicida, acaricida e nematocida (BATISH *et al.*, 2008). Por esse motivo, os óleos essenciais produzidos por espécies desse gênero passaram a ter um interesse econômico crescente, uma vez que as folhas do eucalipto podem ser consideradas um bioproduto do corte das árvores (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

No Brasil, muitas das espécies de eucalipto são morfologicamente semelhantes e são conhecidas pelo mesmo nome popular de eucalipto, criando confusão na identificação das espécies (FLORES *et al.* 2016). Nesse contexto, estudos morfoanômicos vêm sendo realizados por diversos grupos de pesquisa com o intuito de minimizar possíveis confusões causadas por tamanha similaridade entre as espécies (DÖLL-BOSCARDIN *et al.* 2010; KNIGHT *et al.* 2004; MALINOWSKI; NAKASSHIMA; ALQUINI, 2009;; MICGAZ *et al.* 2018; SANTOS *et al.* 2008; SAULLE *et al.* 2018).

Dentre as espécies de *Eucalyptus* destaca-se o *Eucalyptus tereticornis* Sm., também é popularmente conhecido como eucalipto, e na medicina tradicional, o infuso e o decocto das folhas de *E. tereticornis* são utilizadas no tratamento de doenças respiratórias (SILVA *et al.*, 2003; JUERGENS *et al.*, 2003). Morfologicamente, *E. tereticornis* se assemelha à *Eucalyptus camaldulensis* subsp. *simulata* Brooker & Kleinig (FLORES *et al.* 2016), *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden e *Eucalyptus saligna* Sm. (MICGAZ *et al.* 2018).

Embora essa espécie seja amplamente utilizada na medicina popular, os estudos que demonstram sua eficácia e segurança ainda são escassos. Além disso, visto que as espécies de eucalipto são morfologicamente semelhantes, estudos que demonstrem detalhadamente a morfoanatomia dessas espécies é necessária e urgente. Portanto, o presente estudo teve como

objetivo analisar a composição química, as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, citotóxica e repelente do óleo essencial, bem como estudar as características anatômicas foliares e caulinares de *E. tereticornis* a fim de fornecer dados para a caracterização do óleo essencial, para a identificação e diferenciação da espécie de outras espécies de *Eucalyptus* que apresentam morfologia semelhante, além de estabelecer um padrão para os parâmetros de qualidade deste material vegetal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

Myrtaceae é composta por aproximadamente 144 gêneros e de 3100 a 4600 espécies (SOBRAL, 2003). Os maiores gêneros dessa família são *Eugenia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Syzygium* e *Melaleuca* (CRONQUIST, 1981). No Brasil está representada por 29 gêneros e 1195 espécies, sendo 788 espécies endêmicas (PROENÇA *et al.*, 2022).

As espécies dessa família são arbustivas ou arbóreas (JOLY, 1998). As folhas são inteiras, de disposição alterna ou oposta e, às vezes, oposta cruzada, apresentando pontuações e revelando estípulas muito pequenas. É frequente a presença de cauliflora. Em relação às flores, a ocorrência maior é as de coloração branca ou, às vezes, avermelhadas, sendo qualificadas como efêmeras, hermafroditas e com simetria radial. As flores, geralmente, são pentâmeras, mono ou diclamídeas, evidenciando muitas vezes um receptáculo bem desenvolvido. A corola pode ser suprimida e apresentar cálice gamossépalo com deiscência transversal. É comum a presença de numerosos estames. O ovário varia de súpero a semi-ífero, até ífero, podendo ser pentacarpelar e pentalocular, com muitos óvulos. O fruto é do tipo baciforme ou capsular loculicida. As sementes podem apresentar poliembrionia e, também, podem ser do tipo aladas (WILSON *et al.*, 2001).

No Brasil, a família Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermae ou Magnoliopsida. Além disso, é reconhecido o valor dessa família, devido ao importante papel na fitossociologia das florestas do sul e sudeste do país, e por ser um dos grupos predominantes do componente arbóreo da Floresta Atlântica (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; CRUZ; KAPLAN, 2004). Na flora brasileira, encontram-se várias plantas frutíferas, sendo as mais comuns a goiabeira (*Psidium guajava* L.), o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), a jaboticabeira (*Plinia grandifolia* (Mattos) Sobral), a pintangueira (*Eugenia uniflora* L.), a uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), a grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.), o cambucazeiro (*Eugenia edulis* Benth et Hook.) e o cambuci (*Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh) (JOLY, 1966). E, dentre as cultivadas, merecem destaque especial as espécies originárias da Austrália, as quais geralmente apresentam folhas alternas e fruto seco do tipo capsular como, por exemplo, os representantes do gênero *Eucalyptus*.

Cruz e Kaplan (2004) realizaram um levantamento sobre o uso medicinal de espécies da família Myrtaceae no Brasil e verificaram que cerca de 70% dos representantes dessa

família podem ser empregados para fins medicinais. A utilização medicinal está relacionada principalmente a distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, as cascas e, também, os frutos, os quais são habitualmente consumidos. Além disso, diversos estudos contemporâneos têm respaldado o uso popular de espécimes dos diversos gêneros de Myrtaceae, por meio de diferentes investigações farmacognósticas, relacionadas aos aspectos botânicos, aos compostos químicos e às atividades biológicas (DEFAVERI *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011; AYEPOLA; ADENIYI, 2008; CRUZ; KAPLAN, 2004).

2.2 GÊNERO *Eucalyptus* L'Hér.

O gênero *Eucalyptus* inclui mais de 800 espécies, sendo a maioria das espécies nativas da Austrália (WALTER, 2022). Este gênero possui importante valor na indústria madeireira. As espécies *Eucalyptus grandis* W.Hill, *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake e *Eucalyptus globulus* Labill., são as mais comuns cultivadas nas zonas tropicais e temperadas para seu uso na indústria da madeira (QUANG *et al.* 2010; CAROCHA *et al.* 2015). Além disso, as espécies de *Eucalyptus* são utilizadas em produtos alimentícios, bebidas, perfumarias, fármacos e cosméticos, bem como na produção de papel, mel e óleos essenciais (HUSSAIN *et al.* 2008; TEIXEIRA *et al.* 2013; RAUT; KARUPPAYIL 2014; BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016; FLORES *et al.* 2016).

O eucalipto se tornou a principal cultura não nativa no Brasil, com plantações ocupando 5,63 milhões de hectares (IBÁ, 2017), tornando o país o maior produtor de eucalipto, seguido pela Índia (4,3 milhões ha) e China (2,6 milhões ha). Além disso, o cultivo dessas árvores permite retorno econômico dentro de um breve período de tempo (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). Uma grande variedade de tipos de madeira é produzida a partir dos eucaliptos. Essa diversidade de propriedades permite que os eucaliptos sejam utilizados para diferentes finalidades, como na produção de celulose e papel, mobiliário, postes, dormentes, mourões, energia e construção civil (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962).

Os óleos essenciais de eucalipto são muito importantes para a indústria farmacêutica (GOODGER *et al.* 2016). Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais grupos de compostos químicos comumente presentes nos óleos essenciais dessa espécie (GOODGER *et al.* 2016; BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016; SAULLE *et al.* 2018).

A palavra *Eucalyptus* é derivada do grego eu (=bem) e kalypto (=cobrir) em menção ao opérculo que cobre as sementes até que estejam completamente desenvolvidas (GUENTHER, 1977). O botânico francês Charles-Louis L'Heritier de Brutelle realizou a primeira descrição botânica do gênero *Eucalyptus* em 1788 (ANDRADE; VECCHI, 1918; SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). A espécie farmacopeica *Eucalyptus globulus* Labill. foi descoberta na Tasmania, por La Billardiére, em 1792. Somente em 1800 é que um pequeno número de espécies começou a ser descrito, sendo que grande parte dessas espécies foram nominados por Joseph Smith (BROOKER, 2002).

Entretanto, é importante ressaltar que os óleos essenciais, extraídos da maioria das espécies de *Eucalyptus*, são subutilizados no aspecto econômico e comercial. Por mais de 60 mil anos, aborígenes australianos desenvolveram uma sofisticada compreensão empírica de plantas, como as espécies de *Eucalyptus*. Não existem muitos dados relativos ao emprego do eucalipto pelos aborígenes australianos, porém é sabido que eles utilizavam não só as folhas, mas também a resina e a casca. Com a casca, preparavam decocções para disenteria e também, para lavar feridas. A casca também era empregada como antisséptico (ALONSO, 1998). Desde então, esse gênero tem contribuído de maneira efetiva na medicina tradicional.

Os principais usos populares dos eucaliptos estão relacionados ao sistema respiratório. A inalação de substâncias provenientes de *Eucalyptus* tem sido usada no tratamento de faringite, bronquite e sinusite (CERMELLI *et al.*, 2008). Essas propriedades medicinais dos eucaliptos estão normalmente associadas aos seus componentes voláteis. O óleo essencial de eucalipto tem demonstrado atividades expectorante, fluidificante e antisséptica da secreção dos brônquios tanto pela via oral quanto inalatória (SIMÕES; SPITZER, 2007). A atividade antisséptica também pode ser evidenciada nos sistemas urogenitais e digestivo, sendo o eucaliptol o componente mais ativo (ALONSO, 1998).

A folha é a parte da planta geralmente investigada, mas também é possível isolar compostos bioativos do caule (BROPHY; SOUTHWELL, 2002). A maior parte do óleo essencial desse gênero está presente nas folhas e compartimentalizado em estruturas secretoras denominadas de cavidades, localizadas no parênquima fotossintetizante foliar, sendo encontrados desde o início do desenvolvimento das folhas (VITTI; BRITO, 2003). O óleo essencial de eucalipto também pode ser encontrado nos ramos terminais, na casca, nos botões florais e nos frutos. O óleo essencial obtido a partir das folhas é composto por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, muitas vezes envolvendo de 50 a 100 compostos, ou mais. (FABROWSKI, 2002; VITTI; BRITO, 2003).

Diversas investigações têm sido conduzidas com o óleo essencial de determinadas espécies de *Eucalyptus*, com a finalidade de determinar possíveis aplicações terapêuticas e/ou confirmar o uso já estabelecido pela medicina popular. Em estudo realizado por Franco et al. (2005), foi verificado o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Cermelli et al. (2008) investigou a atividade antibacteriana e antiviral do óleo essencial de *E. globulus* frente a patógenos isolados de pacientes com infecção no trato respiratório. As bactérias *Haemophilus influenzae*, *Parainfluenzae* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram as mais sensíveis à ação do óleo essencial, seguidas de *Streptococcus pneumoniae*. O fungo *Candida albicans* também apresenta sensibilidade ao óleo essencial de *E. globulus* (ALONSO, 1998).

Considerando o fato de que óleos essenciais apresentam atividades inseticidas (ISMAN, 1999), alguns estudos têm sido conduzidos com espécies de *Eucalyptus*, a fim de avaliar a atividade biológica desses óleos contra *Pediculus humanus capitis*. Nesse sentido, o estudo conduzido por Toloza et al. (2008) com as espécies *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *E. tereticornis*, e os híbridos *E. grandis* x *E. camaldulensis* e *E. grandis* x *E. tereticornis*, foi evidenciado que o óleo essencial extraído desses eucaliptos apresenta potencial pediculicida e repelente, sendo que a hibridação interespecies melhora essa atividade. De acordo com Daley (2007), vários constituintes do óleo essencial de *E. globulus* têm efeitos letais contra espécimes de *Pediculus humanus capitis* e seus ovos. O 1,8-cineol é considerado duas vezes mais eficaz que a D-fenotrina e o piretro, enquanto o (-)- α -pineno, o 2- β -pineno e o (*E*)-pinocarveol são tão ativos quanto esses compostos sintéticos. Audino et al. (2007) constatou que a combinação a 10% do óleo essencial de *E. globulus* e do óleo essencial de *Mentha x piperita* L., em solução de etanol a 96%, foi tão efetivo contra os piolhos resistentes à permetrina, quanto a melhor preparação comercial disponível na Argentina.

Döll-Boscardin (2009) verificou que o óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage apresenta atividade fumegante e ação repelente contra o *Pediculus humanus capitis*. Em 2017, Pujiarti e Fentiyanti avaliaram a atividade repelente de óleos essenciais de *E. tereticornis* e *Eucalyptus deglupta* Blume contra o mosquito *Culex quinquefasciatus* e concluíram que essas espécies podem ser consideradas como potentes agentes repelentes naturais contra o mosquito *C. quinquefasciatus*.

Alguns estudos também têm investigado o potencial dos óleos essenciais de *Eucalyptus* como agentes analgésicos e anti-inflamatórios. Foi demonstrado que os óleos

essenciais de *E. tereticornis* e de *E. globulus* induziram efeitos analgésicos e promoveram efeitos anti-inflamatórios em modelos de edema de pata de rato (SILVA *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores têm relatado que monoterpenos presentes em óleos essenciais de *Eucalyptus* são potentes inibidores de mediadores inflamatórios. O eucaliptol, por exemplo, inibe a produção do fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β , leucotrieno B4 e tromboxano B2 (JUERGENS *et al.*, 1998a). Além disso, há dados indicando que o eucaliptol promove a inibição do metabolismo do ácido araquidônico em monócitos humanos (JUERGENS *et al.*, 1998b).

Em um estudo realizado com músculo liso traqueal de ratos, o óleo essencial de *E. tereticornis* potencializou a contração induzida por acetilcolina (ACh) ao passo que inibiu, de maneira dependente da concentração, a estimulação contrátil eletromecânica do cloreto de potássio (KCl) (LIMA *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais obtidos dos eucaliptos são destinados, principalmente, para fins medicinais, porém, existem outras utilizações habituais: na forma de vaporização em saunas ou banhos, na perfumaria, na indústria de alimentos e em produtos desinfetantes (FABROWSKI, 2002). Dentre as espécies de *Eucalyptus* conhecidas, cerca de 400 delas fornecem óleos essenciais com diferentes composições (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Foi avaliada a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das espécies *Eucalyptus crebra* F.Muell., *Eucalyptus kitsoniana* Maiden, *Eucalyptus melanophloia* F.Muell., *Eucalyptus microtheca* F.Muell., *Eucalyptus pruinosa* Schau, *Eucalyptus rudis* Endl. e *E. tereticornis*. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro* foi estudada pelo método de difusão em ágar, e os óleos essenciais de várias espécies de eucalipto inibiram significativamente o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus spizizenii*, *Staphylococcus aureus*), demonstraram moderado efeito inibitório contra bactérias Gram negativas (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) e exibiram efeitos bactericidas contra todos os patógenos transmitidos por alimentos testados, exceto *Pseudomonas aeruginosa*. O ensaio de cinética de morte microbiana (time-kill), baseado em estudos de quatro semanas, autenticou a potência dos óleos como conservantes de alimentos. Os óleos essenciais também apresentaram boa atividade antioxidante quando testados pelos métodos da atividade de eliminação de radicais livres e teste de redução do poder férrico. O potencial antioxidante e antibacteriano dos óleos essenciais de *Eucalyptus* validam seu potencial uso como conservantes de alimentos podendo ser sugeridas como novas fontes potenciais de agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais (SIDDIQUE *et al.*, 2018).

Ameer e colaboradores (2016) demonstraram o potencial antimicrobiano de extratos de folhas de *E. tereticornis* contra *E. Coli*. As investigações sugerem que este extrato pode ser efetivo contra cepas microbianas resistentes a múltiplas drogas (AMEER *et al.*, 2016).

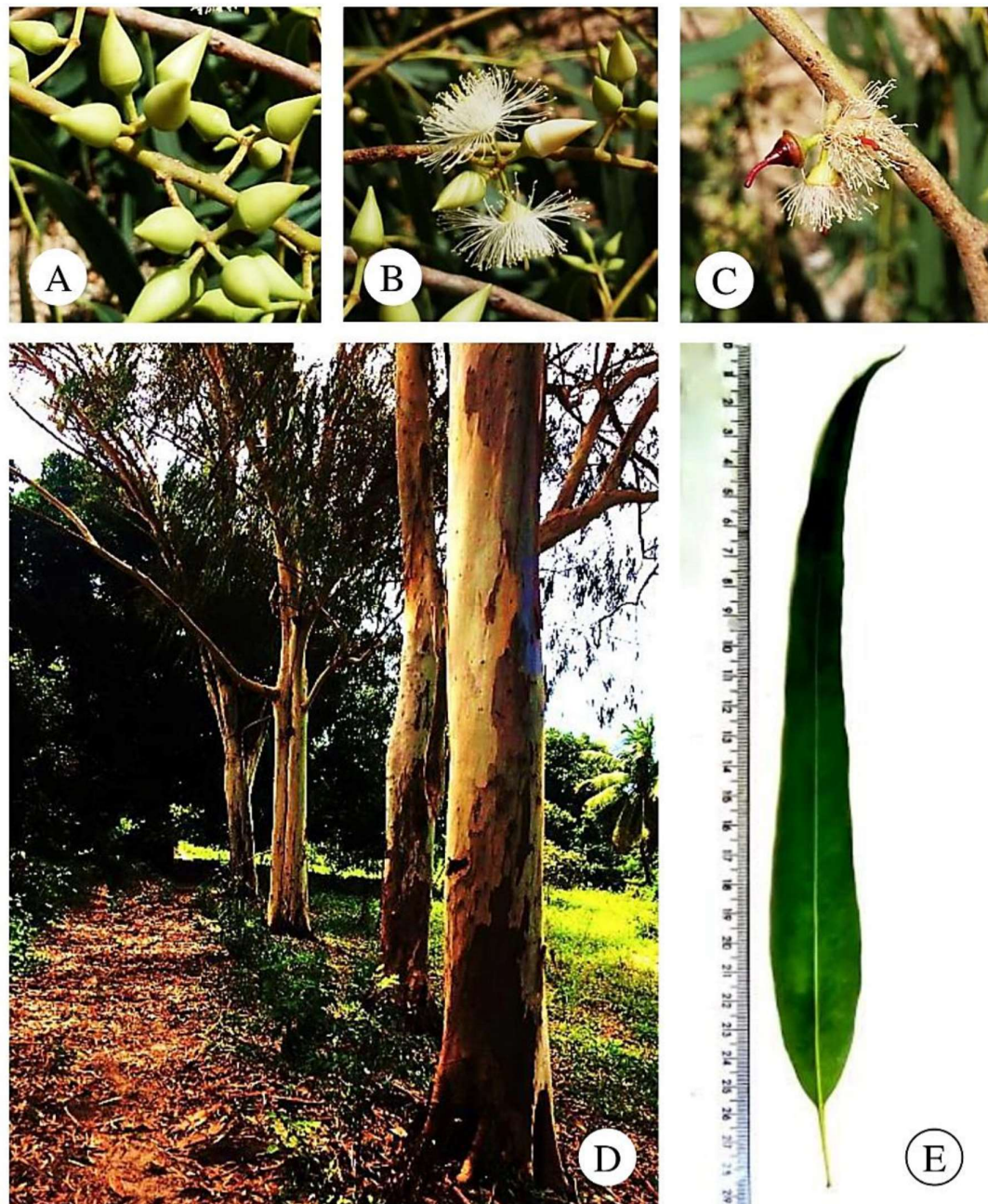
O uso de espécies de eucalipto para produção de madeira e de óleo essencial tem aumentado, apesar da maioria das áreas cultivadas em solo brasileiro ainda serem destinadas à produção de papel e de carvão. As folhas de *Eucalyptus* são uma boa fonte de óleo essencial (RAO; SHIVA; JAIN *et al.*, 1970), sendo que na medicina Ayurveda, esse óleo é usado como um antisséptico para infecções do trato respiratório. De acordo com Vitti e Brito (2003), as espécies *E. globulus* e *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F. M. Bailey são as principais espécies cultivadas no Brasil para produção de óleo essencial, sendo que dentro do número de espécies de eucalipto existentes, pouco mais de 200 foram estudadas visando a caracterização desse derivado vegetal. Nesse sentido, estudos têm sido realizados a fim de ampliar a utilização de algumas espécies de eucalipto para a produção de óleo essencial (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006).

2.3 ESPÉCIE *Eucalyptus tereticornis* Sm.

A espécie *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Figura 1) é nativa da Papua Nova Guiné e da Austrália e também é cultivada em todo o mundo. É uma árvore de grande porte com casca lisa e esbranquiçada. (CHIPPENDALE 1988; FLORES *et al.* 2016).

E. tereticornis é explorado comercialmente como fonte de óleo essencial devido à grande quantidade de óleo produzido. Além do óleo essencial, vários compostos fitoquímicos foram isolados de vários órgãos de *E. tereticornis*, tais como flavonoides (HONGCHENG; FUJIMOTOT, 1993), euglobal T1 (KOKUMAI *et al.*, 1991), triterpenoides como ácido betulônico, tereticornato A, tereticornato B (HONGCHENG; FUJIMOTOT, 1993), ácido betulínico, (THEAGARAJAN; PRABHU, 1983), ácido 2 α -hidroxi-ursólico, ácido ursólico, ácido ursólico lactona (DAYAL, 1987) e β -sitosterol (THEAGARAJAN; PRABHU, 1983).

Figura 1 -Imagens de *Eucalyptus tereticornis*



Fonte: Castro, M. A. (2020)

A: Botões florais; B: Flor em antese; C: Flores fecundadas com peças florais e sem peças florais; D: Árvore de *E. tereticornis* no hábito; E: Folha adulta.

Quimicamente essa espécie apresenta 1,8-cineol e o p-cimeno como compostos majoritários (TOLOZA et al., 2006). O 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, é comumente utilizado na indústria farmacêutica e na perfumaria (BABU; SINGH, 2009). Quando testado *in vitro* o óleo essencial de *E. tereticornis* demonstrou atividade contra várias

bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*, e contra fungos, como *Hansenula* spp., *Saccharomyces* spp., *Sporobolomyces* e *Torulopsis candida*. Os óleos essenciais também apresentaram atividades contra *Aedes aegypti*, *Anopheles gambia* e *Pediculus humanus capitis*, bem como atividade acaricida contra *Amblyoma variegatum* (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016).

As plantas aromáticas têm sido utilizadas desde a antiguidade, devido às suas propriedades conservantes, às suas atividades medicinais e para conferir aroma e sabor aos alimentos. Em geral, propriedades terapêuticas de plantas aromáticas são atribuídas aos óleos essenciais. Pelas características da planta em questão, e também de outras espécies do gênero, torna-se interessante avaliar as atividades biológicas do óleo essencial extraído do *E. tereticornis*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar microscopicamente as folhas e caules de *Eucalyptus tereticornis* Sm., e investigar a composição química e as atividades biológicas do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus tereticornis*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar microscopicamente folhas adultas e caules de *E. tereticornis* por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a composição química dos cristais por energia dispersiva de raios X (EDS);
- Realizar testes histoquímicos em folhas adultas e caules de *E. tereticornis*;
- Realizar a extração do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis*;
- Determinar o teor de óleo essencial de folhas de *E. tereticornis*;
- Investigar o perfil químico do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* por CG/EM;
- Determinar o perfil químico do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* por CCDAE;
- Verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* pelos métodos de difusão em disco e de macrodiluição em caldo Muller-Hinton;
- Estabelecer a atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* por DPPH, fosfomolibdênio e TBARS;
- Analisar o efeito anti-inflamatório do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* por meio do modelo de edema de orelha;
- Verificar a ação do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* sobre a migração celular por meio de análises histológicas;
- Investigar a atividade citotóxica do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* frente às linhagens: 3T3 (fibroblasto murino) e B16F10 (melanoma murino);
- Verificar a ação repelente do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* frente aos insetos adultos de *Ctenocephalides felis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Partes vegetativas aéreas de *Eucalyptus tereticornis* Sm. utilizadas no presente estudo foram coletadas no Horto Medicinal do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (25° 05'41,3 "S e 50° 06'04,8" W) em maio de 2016. Uma amostra (#ESA 112341) foi preparada e depositada no Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. O acesso ao material botânico foi aprovado e licenciado pelo (CGEN / SISGEN) e registrado sob o número A03C6CC.

4.2 ESTUDOS BOTÂNICOS

4.2.1 Procedimento de Microscopia

Folhas e caules frescos, saudáveis e intactos, obtidos a partir do sexto nó, foram fixados em solução de FAA 70 por 3 dias (JOHANSEN, 1940), lavados em água destilada e armazenados em solução de etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976). As folhas e caules foram seccionados com navalhas, à mão livre, nas direções transversal e longitudinal. As secções foram hidratadas e coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e uma combinação de azul Astra e fucsina básica (KRAUS et al., 1998). As secções foram preparadas em uma gota de glicerina (50%) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) em lâminas de vidro, cobertas com uma lamínula e seladas com esmalte transparente.

Para a análise das superfícies epidérmicas, pequenas secções das folhas foram lavadas e tratadas com solução de hipoclorito (50%) até ficarem translúcidas. Os materiais foram então lavados com água destilada e neutralizados em solução de ácido acético (5%). Posteriormente, as secções foram lavadas novamente com água destilada, coradas com safranina (FUCHS, 1963) e montadas como descrito acima.

4.2.2 Análise Histoquímica

Para identificar as composições químicas das paredes celulares e do conteúdo celular, os seguintes reagentes foram utilizados nos testes histoquímicos: Floroglucinol / HCl para evidenciar a presença de lignina (SASS, 1951), solução de cloreto férrico (JOHANSEN,

1940) e dicromato de potássio (GABE, 1968) para revelar compostos fenólicos, Sudan III para testar componentes lipofílicos e investigação de substâncias lipídicas, como estruturas de revestimento cutinizadas e suberizadas e gotículas de óleo (Foster, 1949) e solução de iodo para detectar amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976). As fotomicrografias foram capturadas usando um microscópio de luz Olympus CX 31 equipado com uma unidade de controle C-7070.

4.2.3 Micromedições

O índice estomático (SI) foi calculado de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), usando 15 campos de múltiplas amostras de folhas, a partir da fórmula $SI = S/(S + E) \times 100$, em que S = número de estômatos por área unitária e E = número de células epidérmicas na mesma área unitária. O comprimento e a largura dos estômatos foram medidos a partir de 20 estômatos em diferentes locais da lâmina foliar de cada amostra para determinar o tamanho médio dos estômatos.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras fixadas pelo FAA70 foram desidratadas em uma série etanólica (70, 80, 90 e 100%) e secas em um secador de ponto crítico Balzers CPD 030 (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein), utilizando CO₂ líquido. As amostras foram coladas em stubs com fita dupla face e depois foram metalizadas com ouro em aparelho Quorum (modelo SC7620). As fotomicrografias foram preparadas usando um microscópio eletrônico de varredura por Emissão de Campo Mira 3 (Tescan, Brno-Kohoutovice, República Tcheca).

4.2.5 Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS)

A composição química dos cristais foi analisada por espectroscopia de raios X por dispersão de energia. Essa análise foi realizada nos cristais, aleatoriamente, bem como em células desprovidas de cristais como controle, usando um detector de EDS nas mesmas condições da análise de MEV. Tanto o MEV como o EDS foram realizados no Complexo Laboratorial Multiusuários (C-Labmu) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis*

4.3.1 Extração do Óleo Essencial de Folhas de *Eucalyptus tereticornis*.

Para a extração do óleo essencial, folhas adultas, dessecadas à sombra, foram submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger (USP XXII, 1990), com duração de 6 h. Após esse tempo, o material obtido foi acondicionado em tubos de vidro âmbar, vedados e armazenados em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As diluições do óleo essencial empregadas para todos os experimentos foram obtidas a partir de cálculos baseados na densidade, obtida após a pesagem 4 vezes de um mL do óleo essencial em balança analítica calibrada.

4.3.2 Determinação do Perfil Químico do Óleo Essencial

4.3.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

A análise foi conduzida por um sistema de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) CAMAG, onde o óleo essencial de *E. tereticornis* foi analisado em placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), usando-se a fase móvel acetato de etila:tolueno 5:95. A solução padrão foi preparada com 10 µL de eucaliptol, α/β -tujona e α -bisabolol diluídos em 990 µL de tolueno. Uma solução estoque de borneol foi preparada a 1 mg/mL em tolueno e, então, diluída para 100 µg/mL.

Utilizou-se um aplicador automático (ATS4) para realizar as aplicações na placa, com bandas de 8 mm, distância entre as bandas de 11.4 mm, distância da primeira aplicação com a borda esquerda da placa de 20 mm, distância da aplicação com a borda inferior da placa de 8 mm e volume de aplicação de 2 µL.

O desenvolvimento da cromatografia ocorreu em uma cuba de desenvolvimento automático (ADC2), utilizando como fase móvel acetato de etila/tolueno 5:95 v/v, depois da saturação por 20 min e ativação a 33 % de umidade relativa por 10 min usando uma solução saturada de cloreto de magnésio. A distância de migração foi de 70 mm (da borda inferior da placa) e a secagem final ocorreu em 5 min.

A derivatização foi realizada com anisalaldeído e a preparação dos reagentes ocorreu da seguinte forma: 85 mL de metanol foram colocados em um frasco de vidro de 100 mL e

resfriados em freezer. Ao metanol resfriado, foi adicionado 10 mL de ácido acético e 5 mL de ácido sulfúrico. Quando essa mistura atingiu a temperatura ambiente, 0,5 mL de *p*-anisaldeído foi adicionado.

Para a visualização da placa foi utilizado um visualizador (TLC Visualizer 2) com as luzes UV 254 e 366 nm antes da derivatização, UV 366 nm depois da derivatização com NP e luz branca após derivatização com NP e anisalaldeído.

As análises foram executadas usando o software visionCATS versão 3.1. Os parâmetros CCDAE estavam de acordo com o Capítulo geral da USP <203> (The United States Pharmacopoeia (USP), 2017).

4.3.2.2 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A composição química do óleo essencial de *E. tereticornis* foi determinada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, GC-2010 Plus) acoplado a detector de massas do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040, utilizando injetor automático modelo AOC-5000 Plus.

A amostra foi diluída a 1% (m/v) em hexano e caracterizada utilizando as seguintes condições de análises: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo split 1:10, estando o injetor à 250°C e o sistema de ionização 70 eV. Foi injetado 1 µL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60°C (0') até 250°C, com taxa de aquecimento de 3°C/min. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados pelo índice de retenção e determinados por uma série de n-alcenos, contendo entre 8 a 24 átomos de carbono (VAN DENDOOIJ; KRATZ, 1963).

Os espectros de massas dos constituintes detectados nos óleos essenciais foram comparados com os espectros existentes na biblioteca de massas NIST 14, e baseados pela análise visual comparativa com os espectros de massas, utilizando-se ADAMS (2017).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo em fase gasosa (Agilent, modelo 7890A). As análises foram realizadas em coluna capilar RTx-5 (30 m por 0,25 mm e espessura de filme 0,25 µm), sendo utilizado hidrogênio (H₂) como gás de arraste, em vazão de 1,0 mL min⁻¹. A injeção em modo splitless foi realizada com injetor a 200° C. A temperatura do detector foi de 280° C e o forno foi programado para uma temperatura de 60° C, com posterior incremento de 3° C min⁻¹ até 240° C. Foram

preparados três *vials* e injetados no cromatógrafo para o cálculo da média da concentração e do desvio padrão.

4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.4.1 Atividade Antimicrobiana

A capacidade antibacteriana e/ou antifúngica do óleo essencial da espécie em estudo foi avaliada por meio dos métodos de difusão em disco (KONEMAN *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1966) e macrodiluição em caldo Muller-Hinton. Foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC), pois já possuem suas características fenotípicas conhecidas, ou seja, sua identificação e perfil de sensibilidade já foram determinados. Previamente à execução dos testes, as cepas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton (AMH) e incubadas por 24 h em estufa bacteriológica a 35°C, com exceção da cepa de *Candida albicans*, para a qual foi utilizado ágar Mueller-Hinton acrescido de 2% de glicose (AMHG). Após incubados, um esfregaço corado pelo Gram do crescimento nas placas foi feito com objetivo de confirmar a pureza das culturas. Para o experimento foram preparadas suspensões dos microrganismos no padrão 0,5 da escala de McFarland.

4.4.1.1 Difusão em disco

Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). Foi realizada a semeadura dos inóculos bacterianos, preparados em soro fisiológico, padronizados pelo tubo 0,5 da Escala McFarland, em espectrofotômetro a 580 nm, previamente padronizados nas placas contendo os meios AMH e AMHG, com o auxílio de um swab e de forma homogênea. O óleo essencial foi testado puro e nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL. As diluições foram realizadas em água purificada, com a utilização de até 10% (m/V) de polissorbato 80.

Com o auxílio de uma micropipeta, foi efetuada a impregnação de 20 µL e 10 µL do óleo essencial de *E. tereticornis*, e respectivas diluições, nos discos de papel de filtro previamente estéreis, sendo que um disco sem impregnação foi utilizado como controle de esterilidade. Os discos contendo cloranfenicol (30 µg), gentamicina (30 µg) e cetoconazol

(50 µg) foram usados como controle positivo. Após 30 min, as placas de Petri foram incubadas invertidas, em estufa a $36 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 a 48 h. Após o período de incubação foram realizadas as medidas do diâmetro dos halos formados. A mensuração do halo de inibição do crescimento bacteriano foi realizada com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, segundo a USP XXVIII (2005). Os halos com diâmetro igual ou superior a 8 mm foram considerados como resultados positivos (LIMA; GUERRA; SILVA, 2000). Todos os testes foram efetuados em triplicata, considerando a média das leituras como o resultado final.

4.4.1.2 Macrodiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas pela técnica de macrodiluição em caldo Muller-Hinton (MH) para bactérias e em caldo MH com glicose 2% para leveduras. O método foi adaptado do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Foi preparada uma solução inicial óleo essencial de *E. tereticornis* na concentração de 40,0 mg/200 µL com DMSO 1:2. A partir dessa solução foram feitas diluições para a obtenção das concentrações finais de 10000 – 312,5 µg/mL quando adicionadas ao caldo MH com volume final de 1,0 mL.

Os microrganismos foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 14053 (levedura), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 e *Enterococcus faecalis* ATCC 25212. Para o experimento foram preparadas suspensões dos microrganismos em solução fisiológica conforme padrão 0,5 da escala de McFarland e diluídos 1:10. Foram adicionados 50 µL de cada microrganismo aos testes e controles. Como controle positivo utilizou-se 1 mL do caldo com os microrganismos sem o óleo essencial. Para cada microrganismo, foi realizado o controle negativo com 10 µL de gluconato de clorexidina 0,12% (CLX).

Os testes foram realizados em triplicata e cada série de testes teve um branco equivalente. Após o preparo os tubos foram deixados meio abertos e incubados em estufa a 35°C por 24 horas. Sequencialmente à incubação, foram transferidos 200 µL para microplacas de 96 cavidades e realizadas três leituras, após agitação, em 630 nm no leitor SynergyH1 com software Gen5.2.

Para o cálculo foi efetuada a média das leituras descontando-se a média da leitura do branco correspondente. Para a determinação da atividade antimicrobiana (inibição do crescimento) calculou-se o percentual de crescimento comparando a média das leituras das

densidades ópticas de cada concentração do extrato em relação ao crescimento do microrganismo teste, que foi equivalente a 100%. A atividade inibitória foi a diferença entre a taxa do crescimento dos testes com as dos controles. A análise estatística (ANOVA e pós test de Tukey, $p < 0,005$) foi realizada em GraphPad Prism8.

Para a determinação da CBM as culturas dos tubos foram inoculadas em AMH para as cepas bacterianas e Ágar Sangue para o fungo e, em seguida incubadas por 24 h a 35° C. A menor concentração do óleo essencial capaz de inibir completamente o crescimento microbiano foi considerada a CBM.

4.4.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis*, foi determinada por três métodos: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), fosfomolibdênio e Ácido Tiobarbitúrico- Espécies Reativas (TBARS).

4.4.2.1 Método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)

O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, cuja solução possui uma coloração violeta, com absorção máxima no comprimento de onda de 517 nm (ARNAO, 2000; BLOIS, 1958). Na medida em que o radical livre DPPH vai sendo reduzido por uma substância antioxidante, ocorre o emparelhamento de seu elétron e a absortividade nesse comprimento de onda reduz (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Inicialmente, foi determinada a cinética da reação, a fim de verificar o tempo necessário para a máxima redução do DPPH. O tempo, a partir do qual duas medidas de absorvâncias consecutivas revelaram valores muito próximos, foi adotado como adequado aos ensaios de determinação da concentração inibitória ou IC₅₀ (inhibitory concentration). O valor de IC₅₀ corresponde à quantidade necessária de substância antioxidante para reduzir em 50% a concentração inicial da solução de DPPH.

a) Determinação do IC₅₀ do óleo essencial

Foram preparadas diferentes soluções etanólicas do óleo essencial, em concentrações variando de 0,015 a 0,5 mg/mL Foi adicionado 100 µL da solução de DPPH a 1 mmol/L para 3 mL de cada solução de óleo essencial. Para o controle negativo, foi utilizado 3 mL de etanol

e 100 µL da solução de DPPH. Após 30 min, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 517 nm. O aparelho foi zerado com álcool etílico absoluto. Para cada concentração em estudo, foi calculada a porcentagem de atividade antioxidante (% AA), conforme a Equação 01.

$$\%AA = 100 - \left(\frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle}} \right) \times 100 \quad (01)$$

Com os valores obtidos foi construído um gráfico da porcentagem de atividade antioxidante em função da concentração do óleo essencial, em µg/mL. Para o cálculo do IC₅₀, foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50%, para a obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH adotada.

b) Determinação do IC₅₀ do padrão de ácido ascórbico

Considerando a absorvidade molar, foram elaboradas soluções de ácido ascórbico (AA), em concentrações entre 0,078 e 5 µg/mL, em etanol. A partir de cada 3 mL de solução, foi aplicado o mesmo procedimento estabelecido para as soluções etanólicas do óleo essencial de *E. tereticornis*, possibilitando o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (Equação 01) para cada concentração, bem como o valor da concentração de AA com capacidade de reduzir 50% de 100 µL de DPPH a 1 mmol/L (IC₅₀).

c) Determinação do IC₅₀ do padrão de ácido gálico

Foram preparadas soluções etanólicas de rutina, nas concentrações de 0,015 a 0,5 mg/mL. O procedimento foi o mesmo relatado para a determinação do IC₅₀ para a amostra do óleo essencial de *E. tereticornis*.

4.4.2.2 Método do fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênico para a determinação da capacidade antioxidante total (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), é baseado na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, em triplicata, a 695 nm. Uma alíquota de 300 µL da amostra, em

solução etanólica a 200 µg/mL, foi acrescentada em um tubo de ensaio, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio a 4 mmol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L, ácido sulfúrico 0,6 mol/L). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95 °C por 90 min. O tubo foi resfriado e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 695 nm contra um branco (300 µL de etanol, acrescidos de 3 mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e o ácido gálico a 200 µg/mL. Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a Equação 02.

$$\%AA = 100 - \left(\frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do ácido ascórbico} - \text{Absorbância do branco}} \right) \times 100 \quad (02)$$

4.4.2.3 Ensaio Antioxidante pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico - Espécies Reativas (TBARS)

A atividade do óleo essencial de *E. tereticornis* sob a formação do malonaldeído (MDA) a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados foi analisado espectrofotometricamente segundo metodologia modificada por Morais et al. (2006). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (5% p/v), 0,1 mL de amostra pura ou padrão e completado o volume para 1 mL com água destilada. Após este processo, acrescentou-se a cada um dos tubos de ensaio, 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) 0,07 mol/L, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% p/v em solução de dodecil sulfato de sódio 1,1% p/v. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 60 min, sob agitação. Após resfriamento, foi acrescentado a cada tubo 5 mL de n-butanol e centrifugados por 10 min, a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos a leitura em espectrofotômetro, em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com 3 tubos de ensaio que não continham amostras, apenas os reagentes. Foram avaliados o óleo essencial de *E. tereticornis*, e os padrões BHT (butil hidroxi tolueno) e ácido ascórbico nas mesmas proporções. Todas as amostras testadas foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a Equação 03:

$$IA(\%) = 1 - \left(\frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle totalmente oxidado}} \right) \times 100 \quad (03)$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparações entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.4.3. Atividade Anti-inflamatória *in vivo*

4.4.3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) BALB/c, (25-35 g) de aproximadamente 60 a 90 dias. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água e ração. Os animais foram conduzidos ao laboratório de experimentação pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais, sendo que de acordo com o planejamento estatístico, foi definida a necessidade da utilização de cinco animais por grupo. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número de processo: 0069285.

4.4.3.2. Avaliação do edema de orelha

A avaliação do edema de orelha foi realizada mediante o método revisado por Hecker e Schimdt (1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com auxílio de um micrômetro digital (Great, MT-04513). A espessura foi registrada em micrômetros e os dados foram expressos como o aumento da espessura da orelha. O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador. O óleo essencial das folhas adultas e o agente flogístico foram dissolvidos em um volume de 20 µL de acetona e aplicados na orelha direita de cada camundongo. O óleo essencial das folhas adultas de *E. tereticornis* foi testado nas doses de 0,1 mg/orelha a 1 mg/orelha.

4.4.3.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA

O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 µg/orelha de TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) em 20 µL de acetona, e aplicado na orelha direita dos camundongos. As amostras e os controles foram aplicados topicamente, após o tratamento com TPA. Como controle positivo foi usado dexametasona (0,05 mg/orelha), e no teste do controle negativo foi aplicado apenas TPA. A espessura da orelha foi avaliada antes (basal) e após 6 h da aplicação do TPA (DE YOUNG *et al.*, 1989). Após 24 h da aplicação do TPA os animais foram eutanasiados e a espessura da orelha foi medida novamente. Círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram coletados e submetidos à avaliação do edema pela medida da massa das orelhas e à análise histológica.

4.4.3.4 Análise histológica

As amostras de orelhas coletadas de camundongos e submetidas à aplicação tópica de TPA foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool etílico 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por um período de 16 h, sendo, em seguida, conservadas em álcool 70% até o início do processo de desidratação. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente e emblocadas em parafina. Foram realizadas secções transversais de 3-4 µm de espessura, as quais foram coradas por hematoxilina e eosina (RECIO *et al.*, 2000). A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x

4.4.4 Atividade Citotóxica

4.4.4.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de fibroblasto murino (3T3, Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0017) e melanoma murino (B16F10, Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0342). As linhagens foram cultivadas em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 U/L de penicilina em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.4.4.2 Ensaio de citotoxicidade através da metabolização do reagente MTT

Em placas de 96 poços foram semeadas 3×10^3 células por poço. Após 24 h o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com concentrações crescentes do óleo essencial ressuspensos em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina. Após 72 h as células foram lavadas com meio de cultivo e aos poços foi acrescentada 100 µL de uma solução contendo 0,5 mg/mL do reagente MTT diluído em solução salina tamponada (PBS). Após 2 h, quando era possível visualizar os cristais de formazam formados intracelularmente, o MTT foi retirado e os cristais dissolvidos com DMSO. A coloração formada foi mensurada em espectrofotômetro de microplaca em 570 nm (MOSMANN, 1983). O controle negativo foi realizado com as células incubadas com RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina, com DMSO 0,08% (Veículo). O branco foi obtido procedendo-se a técnica de MTT em um poço sem células. Todas as amostras foram testadas em quadruplicata. Antes da adição do MTT, todos os poços foram analisados em microscópio invertido para visualização da morfologia celular e comparação com o resultado do MTT. As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular de acordo com a equação 04:

$$\% \text{ Viabilidade} = \left(\frac{\text{absorbância do poço tratado} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância da média dos poços controle negativo} - \text{absorbância do branco}} \right) \times 100 \quad (04)$$

4.4.4.3 Cálculo da concentração inibitória mínima IC₅₀

A concentração dos tratamentos que inibe em 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foi calculada a partir de uma curva de regressão não linear onde o eixo X era constituído pelas concentrações de tratamento em escala logarítmica e o eixo Y a % de viabilidade celular. Foi utilizado usando o programa GraphPad Prisma, versão 8.00 para Windows de 2019 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4.4.4.4 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi definido pela razão do IC₅₀ das frações entre as linhagens não-tumoral (3T3) e a tumoral (B16F10) conforme equação (05) a seguir:

$$IS = \frac{IC50 \text{ linhagem não tumoral}}{IC50 \text{ linhagem tumoral}} \quad (05)$$

4.4.4.5 *Análise estatística*

Os dados foram submetidos aos testes de distribuição normal Shapiro-Wilk e Bartlett, e posteriormente analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism (versão 8.00 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA).

4.4.5 Atividade Repelente

4.4.5.1 *Atividade biológica de óleos essenciais usando Ctenocephalides felis*

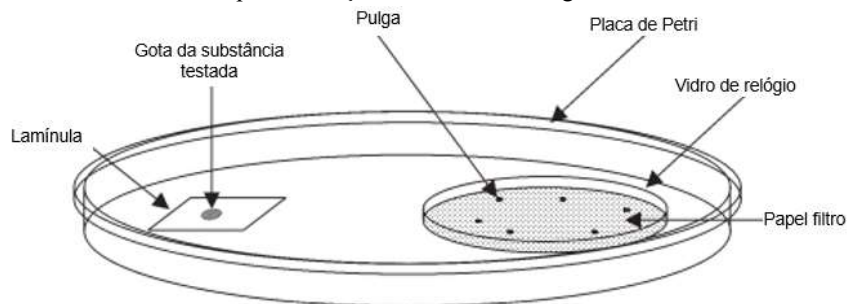
Insetos adultos foram coletados de cães infectados bem alimentados em Ponta Grossa, Paraná, penteando o pêlo do cão e transferindo os espécimes para os tubos plásticos Falcon rotulados com dados de coleta. Os insetos foram identificados por um especialista do laboratório de parasitologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Depois de confirmar mobilidade da amostra, os insetos foram transferidos para placas de Petri e submetidos aos ensaios. Eles foram mantidos em um ambiente controlado, a 28 ± 1 °C e 60% a 70% de umidade relativa.

4.4.5.1.1 Avaliação da atividade fumigante

Esta análise seguiu o método sugerido por Toloza et al. (2006) com algumas modificações. O teste foi realizado em triplicata e utilizou insetos adultos não sexados. Os insetos foram divididos em três grupos de cinco insetos cada, sendo o grupo teste, o grupo controle e o grupo branco. Foi utilizado um sistema de câmara fechada, mostrado na figura 2, constituído por uma placa de Petri e sua tampa que permitia a formação de vapores. Uma gota (50 µL) de óleo essencial foi colocada em uma tampa de vidro dentro da placa de Petri. Três grupos de cinco insetos adultos foram monitorados em intervalos de 10 minutos ao longo de 1 h. Os resultados foram expressos como tempo médio de abatimento (Tempo médio de Knockdown - KT50). O óleo essencial de Melaleuca (Via Farma) foi utilizado como controle

positivo, enquanto a água foi utilizada como controle negativo. A inabilidade da movimentação dos insetos foi analisada com a observação de que as pulgas permanecessem de costas, apresentando movimentos nas patas ou não. O resultado final foi expresso em Tempo médio de Knockdown (KT₅₀). A análise estatística (ANOVA e pós teste de Tukey) foi realizada em GraphPad Prism8.

Figura 2 - Sistema de câmara fechada para avaliação da atividade fumigante



Fonte: Toloza *et al.*, 2006.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

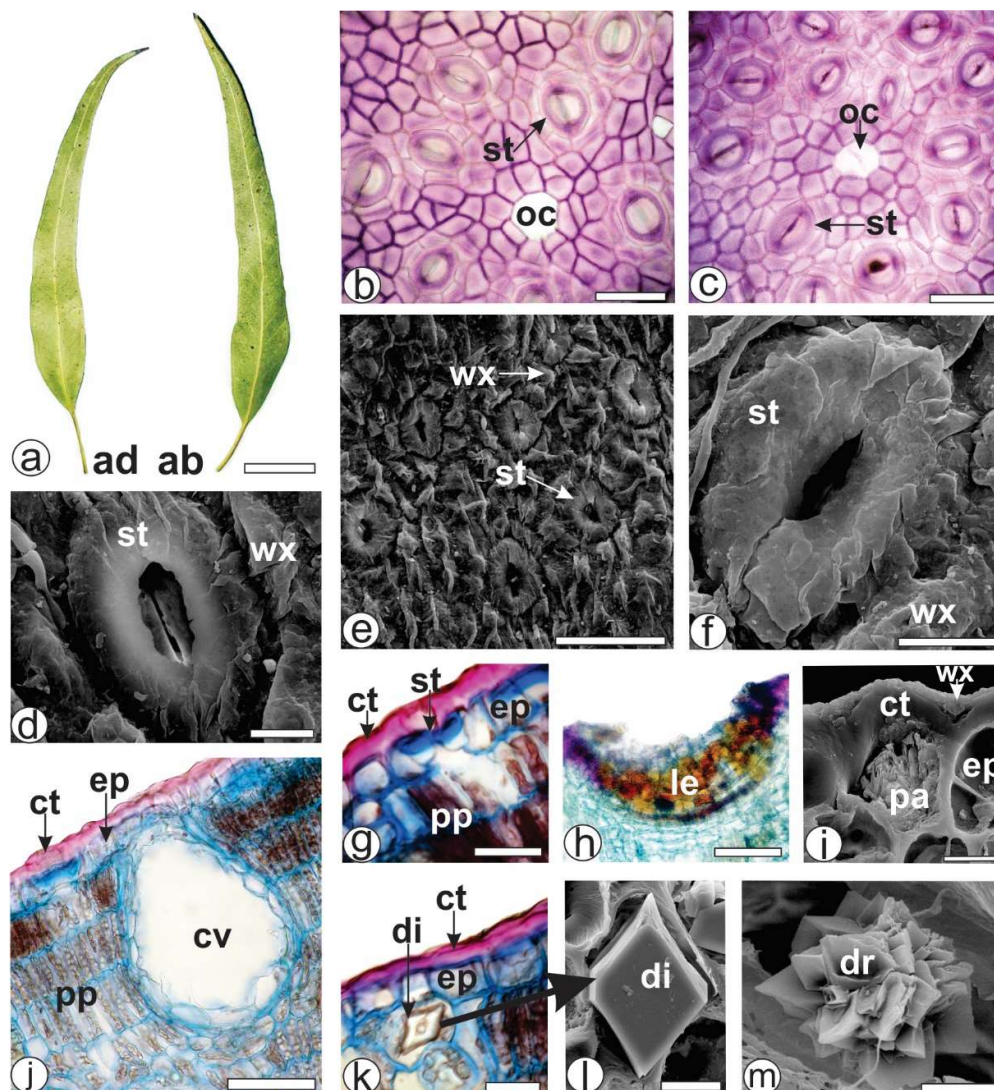
5.1 ESTUDOS BOTÂNICOS

As folhas de *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Fig. 2a) possuem epiderme de paredes anticlinais retas (Fig. 1b, c) e estômatos anomocíticos (Fig. 2b-f) presentes em ambas as faces. Essas características são comumente encontradas em espécies do gênero (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; MALINOWSKI; NAKASSHIMA; ALQUINI, 2009; MICGAZ *et al.*, 2018). O tamanho médio dos estômatos em ambas as superfícies é de $30\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$. Saulle *et al.* (2018) encontraram um tamanho semelhante de estômatos em *Eucalyptus saligna* Sm. ($31\ \mu\text{m} \times 27\ \mu\text{m}$). As micro-medidas dos estômatos foram estudadas por MICGAZ e colaboradores (2018) e os menores estômatos estavam presentes em *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, sendo $28,57 \times 21,43\ \mu\text{m}$ na face abaxial e $28,70 \times 22,88\ \mu\text{m}$ na face adaxial entre seis espécies de *Eucalyptus* estudadas; os maiores estômatos foram observados em *E. grandis* na face adaxial ($65,61 \times 51,06\ \mu\text{m}$) e em *E. globulus* na face abaxial ($56,48 \times 46,16\ \mu\text{m}$).

No presente estudo, o índice estomático médio calculado para a face adaxial foi de 6,4%, enquanto que na face abaxial foi de 5,2%. Micgaz *et al.* (2018) analisaram seis espécies de *Eucalyptus*, entre as quais *E. benthamii* apresentou o maior índice estomático (8%) para ambas as epidermes, enquanto *Eucalyptus dunnii* Maiden apresentou os menores índices, 4,84% na face abaxial e 1,86% na face adaxial. Santos *et al.* (2008) também calcularam valores de índice estomático para espécies de eucalipto e encontraram 1,03% para a superfície adaxial e 16,05% para a superfície abaxial em *E. grandis*, enquanto *E. saligna* apresentou 0,35% para a face adaxial e 15,55% para a face abaxial. No entanto, esses autores usaram folhas de plantas jovens com 120 dias de idade para seus estudos, ao passo que neste estudo foram utilizadas folhas adultas.

Comparando os índices estomáticos entre as faces adaxial e abaxial, *E. benthamii* e *E. badjensis* Beuzev. & Welch apresentaram valores próximos, como também observado no presente estudo para *E. tereticornis*. Santos *et al.* (2006) observaram que, embora os estômatos sejam observados em ambas as faces, eles são raros na superfície adaxial, apresentando baixo índice estomático. O tamanho dos estômatos e os valores do índice estomático têm importância taxonômica na diferenciação das espécies de eucalipto.

Figura 3. Morfoanatomia de folhas de *Eucalyptus tereticornis* (b, c, g, h, j, k: microscopia de luz; d, e, f, i, l, m: SEM). a) face adaxial (ad) e abaxial (ab) de folhas. (b-f) Folha em vista frontal. (g-m). Seções transversais (cr, cristal; ct, cutícula; cv, cavidade; di, cristal prismático em forma de losango; dr, drusa; ep, epiderme; le, lenticela; oc, células de cobertura; pa: cristal em placas; pp, parênquima paliçádico; st, estômatos; wx, cera epicuticular). Barra de escala: a = 20 cm; b, c, d, g = 50 μ m; h, k = 25 μ m; e, f, i, j, k, l = 10 μ m; m = 2 μ m.



Fonte: A autora.

As células epidérmicas aparecem dispersas casualmente em *E. tereticornis* (Fig. 3b, c). No entanto, quando estão localizadas exatamente sobre as cavidades secretoras podem ter forma, tamanho e coloração diferentes, sendo então denominadas células de cobertura. Gomes *et al.* (2009) afirmaram que as características das células de cobertura têm valor taxonômico. List, Brown e Walsh (1995) afirmaram que as células de cobertura podem estar relacionadas à eliminação de secreções constituídas principalmente por compostos voláteis armazenados nas

cavidades secretoras subjacentes. A presença de células de cobertura é frequentemente observada em espécies de eucalipto, a exemplo de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. pellita* F. Muell., *E. pilularis* Sm., *E. resinifera* Smith e *E. saligna*. Essas espécies mostraram um par de células de cobertura sobre cada uma das cavidades secretoras (SANTOS *et al.*, 2008; MICGAZ *et al.*, 2018), enquanto *Eucalyptus pyrocarpa* L.A.S. Johnson e Blaxell exibiram até quatro células em *E. resinifera* (SANTOS *et al.*, 2008). No presente estudo, *E. tereticornis* apresentou um par de células de cobertura sobre cada cavidade secretora, em ambas as faces epidérmicas foliares.

A morfologia da cera epicuticular é particularmente importante para a classificação de gêneros taxonomicamente complexos, como é o caso de *Eucalyptus* (WILKINSON, 1979). As ceras epicuticulares foliares nas espécies de eucalipto ocorrem em diferentes formas. Por exemplo, foram encontradas ceras em forma de túbulos na face abaxial de *E. globulus*, de placas com bordas inteiras em *Eucalyptus viridis* F. Muell. ex RT Baker, placas com bordas em forma de dedos em *Eucalyptus platypus* Hook.f., grânulos em *E. badjensis* e *E. dunnii*, placas paralelas em *E. yalatensis* Boomsma, placas densamente agregadas nas cavidades epistomatais de *E. benthamii* e cristaloides (rosetas) e semelhantes a crostas na superfície abaxial das folhas de *E. saligna* (DÖLL-BOSCARDIN *et al.*, 2010; KNIGHT *et al.*, 2004; MALINOWSKI; NAKASSHIMA; ALQUINI, 2009; MICGAZ *et al.*, 2018; SAULLE *et al.*, 2018). No presente estudo, *E. tereticornis* evidenciou ceras epicuticulares semelhantes a crostas em ambas as superfícies foliares (Fig. 3d-f, i).

Na secção transversal da folha, a epiderme é coberta externamente por uma cutícula espessa e lisa, especialmente na superfície adaxial da folha (Fig. 3g, i, j, k). A epiderme é unisseriada em ambas as faces, apresentando células que variam de forma poliédrica à arredondada (Fig. 3g, i, j, k). Os estômatos estão localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas em ambas as superfícies (Fig. 3g). Várias espécies de eucalipto têm epiderme unisseriada coberta por cutícula lisa a levemente estriada (DÖLL-BOSCARDIN *et al.*, 2010; MICGAZ *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; IFTIKHAR *et al.*, 2009; SAULLE *et al.*, 2018).

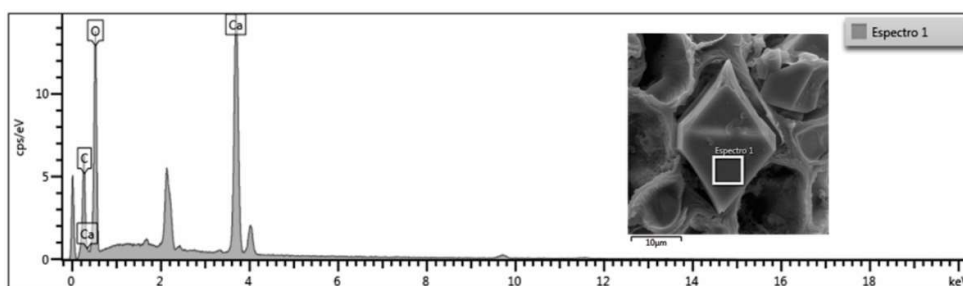
A presença de cristais nas plantas é comum e pode ser formada em qualquer órgão ou tecido de plantas. Cristais foram observados em caules (SANTOS *et al.*, 2018), folhas (PARVEEN *et al.*, 2020) e pecíolos. Eles podem estar presentes em diferentes tecidos e locais, como dentro das células epidérmicas (TRAESSEL *et al.*, 2017), externamente à epiderme (ALMEIDA *et al.*, 2020), no parênquima paliçádico (BERTOCCO *et al.*, 2017), no pecíolo (TIRLONI *et al.*, 2018) e no córtex e medula do caule (HOMEM *et al.*, 2020). A

tipologia dos cristais é muito variável, podendo ocorrer prismas de diferentes formas, drusas, estiloides e areia cristalina, auxiliando na identificação das espécies (UPTON *et al.*, 2011).

Em *Eucalyptus* foram encontrados diferentes tipos de cristais, como piramidais e areia cristalina na superfície epidérmica de *E. globulus*, prismáticos e drusas no mesofilo de *E. badjensis*, *E. benthamii* e *E. dunnii* (MICGAZ *et al.*, 2018), prismáticos no mesofilo e pecíolo de *E. saligna* (SAULLE *et al.*, 2018). No presente estudo, os cristais foram encontrados em algumas células epidérmicas como um agregado de placas (Fig. 3i), característica essa, não relatada anteriormente para espécies do gênero. Além disso, prismas em forma de losangos (Fig. 3k, l) e drusas (Fig. 3m) estão presentes principalmente nas células da bainha parenquimática que envolve o feixe vascular. O morfotipo e a localização dos cristais de oxalato de cálcio são caracteres diagnósticos que auxiliam na identificação de espécies de eucalipto.

Oxalato de cálcio é a composição química mais comum de cristais de famílias de plantas superiores. Entretanto, quando existe excesso de cálcio, este pode ser precipitado em sais de carbonato, fosfato, silicato, oxalato e citrato (WEINER; DOVE, 2003). Os espectros das microanálises qualitativas de raios-X de cristais de *E. tereticornis* evidenciaram picos de cálcio, carbono e oxigênio (Figura 4), sugerindo que esses cristais são compostos de oxalato de cálcio.

Figura 4 - Imagem de MEV e espectro de EDS de um cristal prismático de *Eucalyptus tereticornis*.



Fonte: A autora.

A maioria das espécies de *Eucalyptus* possui mesofilo isobilateral (TANTAWY, 2004; SANTOS *et al.*, 2008; MICGAZ *et al.*, 2018), embora a organização dorsiventral também tenha sido relatada no gênero (SANTOS *et al.*, 2008; MALINOWSKI; NAKASSHIMA; ALQUINI, 2009; XU *et al.*, 2012). Como afirmado por Malinowski, Nakasshima e Alquini (2009), o mesofilo dorsiventral é frequentemente encontrado em folhas jovens e o mesofilo

isobilateral presente nas folhas maduras de *E. globulus*. No presente estudo, *E. tereticornis* possui mesofilo homogêneo (Fig. 3j) formado por oito camadas de parênquima paliçádico. Essa característica auxilia na diferenciação de *E. tereticornis* de outras espécies de *Eucalyptus*.

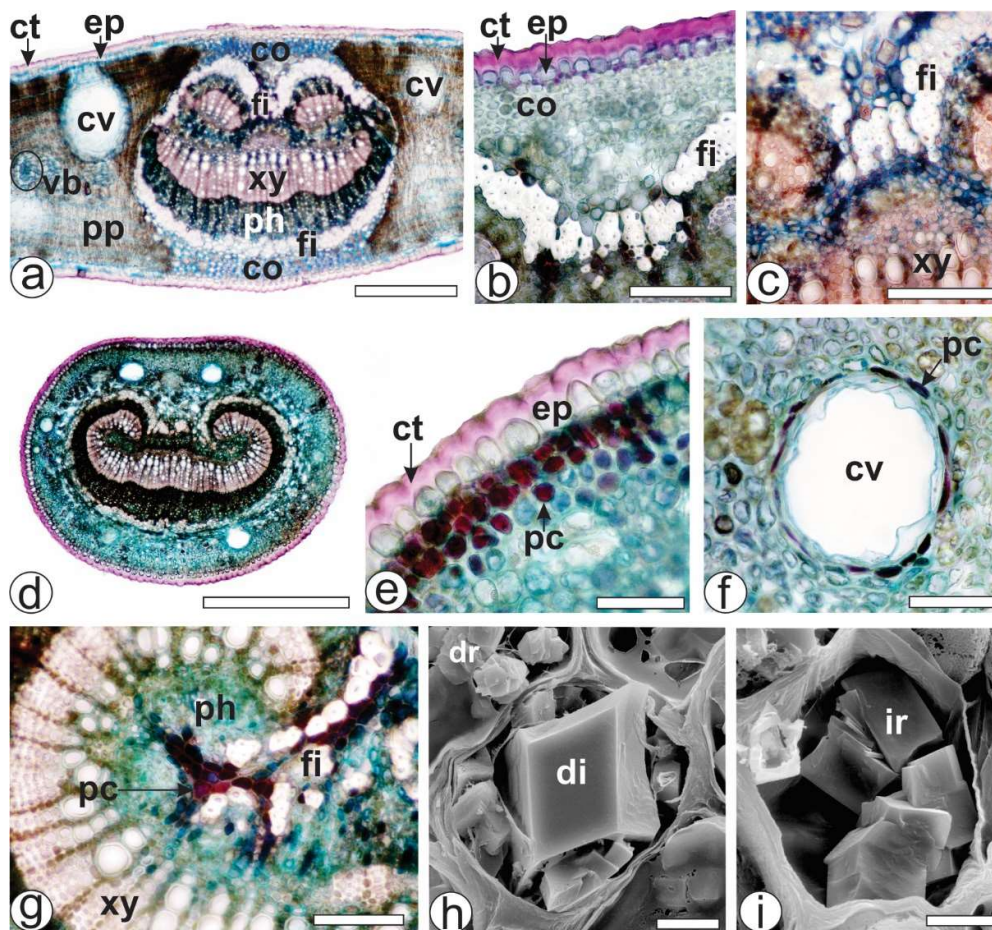
Cavidades secretoras podem ser encontradas em todos os órgãos de espécies de Myrtaceae. Nesta família, as cavidades se apresentam como espaços intercelulares em forma arredondada que armazenam conteúdo lipofílico. As cavidades secretoras presentes nas espécies de *Eucalyptus* contém não apenas monoterpenoides e sesquiterpenoides, mas também grandes quantidades de flavanonas (GOODGER *et al.*, 2016). Em *Eucalyptus*, essas estruturas secretoras são comumente encontradas na epiderme, mesofilo e nervura central (GOODGER *et al.*, 2016; MICGAZ *et al.*, 2018; CRANG; LYONS-SOBASKI; WISE, 2019) da folha e no córtex do caule (BRISOLA; DEMARCO, 2011; SAULLE *et al.*, 2018). Em *E. tereticornis*, as cavidades secretoras são encontradas no parênquima paliçádico, especialmente na região subepidérmica, em ambas as faces foliares. Essas estruturas secretoras têm forma piriforme e medem de 80–140 µm de diâmetro (Fig. 3j). Em *Eucalyptus saligna*, Saulle *et al.* (2018) observaram cavidades secretoras circulares ou ovais medindo 40-140 µm de diâmetro.

O súber cicatricial é um processo fisiológico não patogênico que ocorre em folhas de várias espécies vegetais e, atualmente é denominado de lenticela. Pinkard, Gill e Mohammed (2006) afirmam que as lenticelas presentes em folhas podem ser formadas em resposta a fatores ambientais. Essas estruturas têm sido amplamente relatadas em folhas de *Eucalyptus*, a exemplo de *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake, *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, *Eucalyptus pellita* F.Muell., *Eucalyptus resinifera* Sm., *Eucalyptus saligna* (SANTOS *et al.*, 2006), *Eucalyptus nitens* (H. Dean & Maiden) Maiden e *Eucalyptus globulus* (PINKARD; GILL; MOHAMMED, 2006). Döll-Boscardin *et al.* (2010) afirmaram que a ocorrência dessa estrutura auxilia na identificação de *E. benthamii*. No presente trabalho, lenticelas foram encontradas em folhas de *E. tereticornis* (Fig. 3h).

A forma da nervura central é importante na distinção das espécies, como observado em muitos gêneros (BUDEL *et al.*, 2018; PARVEEN *et al.*, 2020), incluindo *Eucalyptus* (MICGAZ *et al.*, 2018). Diferentes formas de nervura central foram encontradas no gênero, a exemplo de plano-convexa em *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. resinifera*, ligeiramente biconvexa em ambas as faces de *E. pyrocarpa* (SANTOS *et al.*, 2008), *E. badjensis* e *E. benthamii* e levemente convexa em *E. dunnii* e *E. globulus* (MICGAZ *et al.*, 2018). *E. tereticornis* possui nervura central de formato levemente biconvexa (Figura 5).

Figura - 5

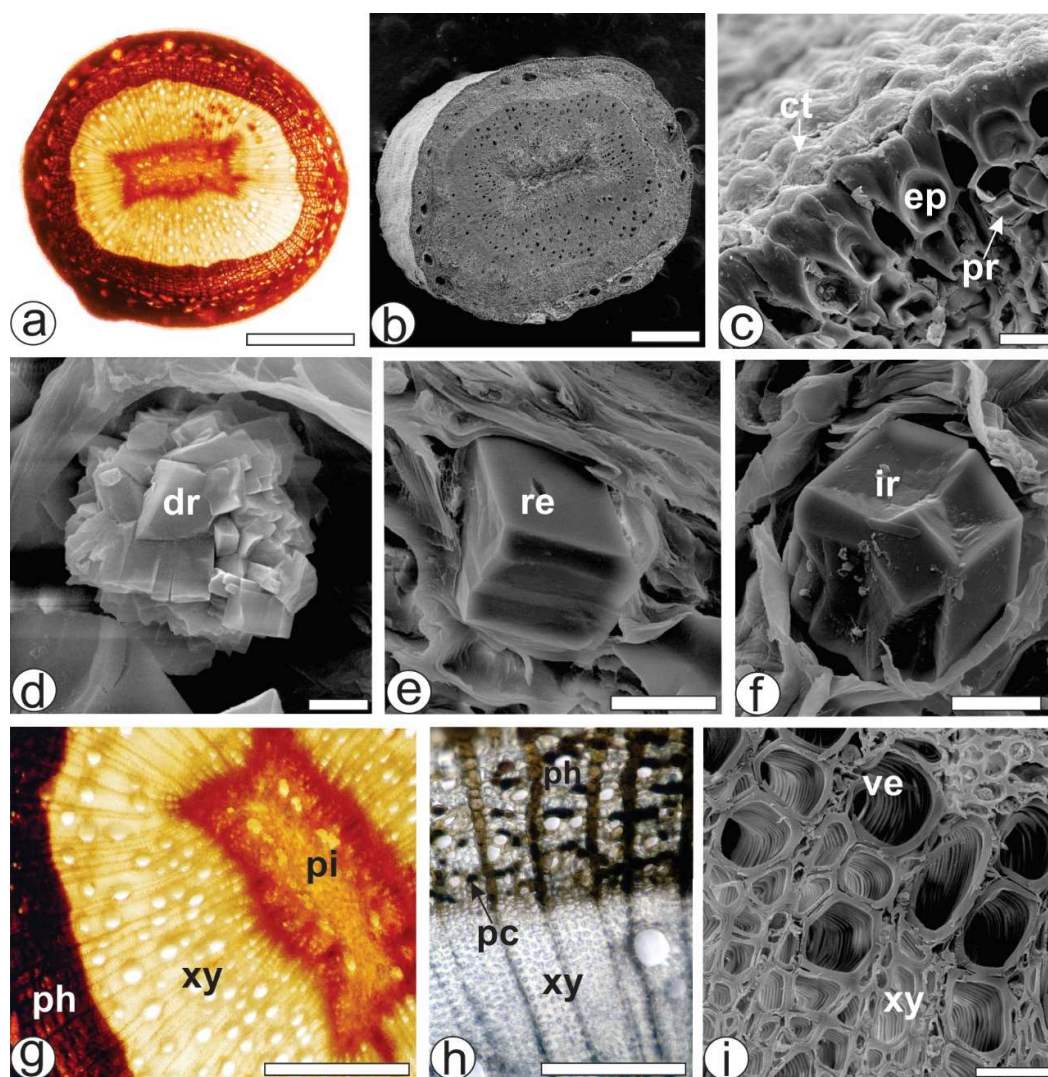
Anatomia de *Eucalyptus tereticornis* em secção transversal (a-g: microscopia de luz; h, i: MEV). (a-c) Nervura central. (d-i) pecíolo. (co, colênquima; ct, cutícula; cv, cavidade; di, cristal prismático em forma de losango; dr, drusa; ep, epiderme; fi, fibras; ir, cristal irregular; ph, floema; pp, parênquima paliçádico; vb, feixe vascular ; xy, xilema). Barra de escala: a = 200 μ m; b, c, e-g = 50 μ m; d = 500 μ m; h, i = 5 μ m.



Fonte: A autora.

A nervura central, em secção transversal, possui epiderme unisseriada e, subjacentemente, o colênquima é interrompido e substituído por algumas camadas de colênquima angular em ambas as faces (Fig. 5a, b). Fibras esclerenquimáticas são encontradas apostas ao floema em ambas as faces (Fig. 5a, b, c), como também observado em outras espécies de *Eucalyptus*, a exemplo de *E. badjensis*, *E. benthamii* e *E. dunnii*. Contudo, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* não apresentaram essa característica (MICGAZ *et al.*, 2018).

Figura - 6 Anatomia do caule de *Eucalyptus tereticornis* em secção transversal (a, g, h: microscopia de luz; b-f, i: MEV). (ct, cutícula; ep, epiderme; dr, drusa; ir, cristal irregular; pc, composto fenólico; ph, floema; pi, medula; re, prisma retangular; ve, elemento de vaso; xy, xilema). Barra de escala: a, b = 500 μ m; c, d, i = 20 μ m; e, f = 10 μ m; g = 300 μ m; h = 30 μ m.



Fonte: A autora.

O pecíolo de *E. tereticornis*, seccionado transversalmente na porção medial, possui formato plano-convexo (Fig. 5d). As células epidérmicas são arredondadas e cobertas externamente por cutícula espessa (Fig. 5e). Várias cavidades secretoras, semelhantes às encontradas na lâmina foliar, são comumente observadas no parênquima fundamental (Fig. 5d, f). O sistema vascular é bicolateral e é representado por um arco aberto com extremidades invaginadas, envoltas por um anel esclerenquimático contínuo (Fig. 5d, g). Cristais prismáticos em forma de losango (Fig. 5h), drusas (Fig. 5h) e cristais irregulares (Fig. 5i) são observados distribuídos no parênquima fundamental e no sistema vascular. Embora o

contorno do pecíolo seja uma característica diagnóstica, existem poucos estudos envolvendo a anatomia do pecíolo das espécies de *Eucalyptus*. Além disso, considerando vários tipos de cristais de oxalato de cálcio presentes em espécies de *Eucalyptus*, são necessários mais estudos para se determinar os morfotipos e padrões cristalinos do gênero.

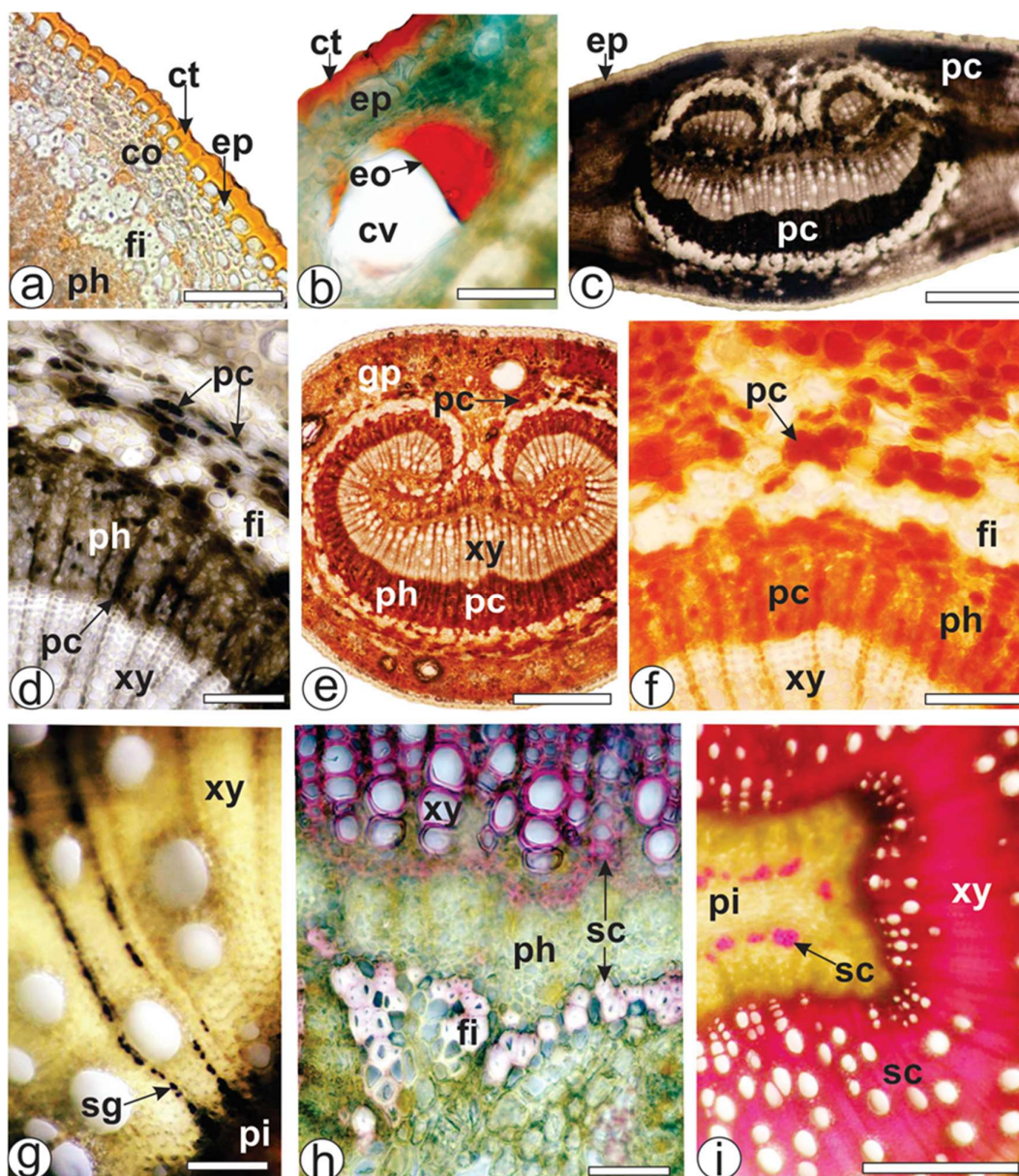
Em secção transversal, o caule é circular (Figs. 6a, b) e a epiderme é unisseriada e coberta por uma cutícula espessa (Fig. 6c). Formato semelhante foi encontrado em *E. saligna* (SAULLE *et al.*, 2018) e *E. urophylla* (BRISOLA; DEMARCO, 2011). Contudo, contorno retangular foi observado em *E. grandis* (BRISOLA; DEMARCO, 2011), enquanto forma estrelada foi observada em *E. grandis* quando seccionado próximo ao ápice caulinar (BRYANT; TRUEMAN, 2015).

O córtex contém idioblastos repletos de substâncias fenólicas, cavidades secretoras, drusas (Fig. 6d) e prismas retangulares (Fig. 6e) e de formato irregular (Fig. 6f). Os cristais também são encontrados em outros tecidos do caule. Essas características são comumente observadas nas espécies de *Eucalyptus* (BRISOLA; DEMARCO, 2011; SAULLE *et al.*, 2018). O sistema vascular tem organização bicolateral (Fig. 6g). Tanto o floema externo quanto o interno são formados por elementos de tubo crivado e células do parênquima e incluem vários idioblastos fenólicos (Fig. 6g, h). As fibras são encontradas ao lado do floema externo e interno. O xilema é composto por elementos de vaso com espessamento helicoidal e estão dispostos em fileiras radiais (Fig. 6g, h, i) separadas por células do parênquima lignificadas. A medula é composta por células parenquimáticas de paredes finas, cristais prismáticos e drusas.

5.2 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS

As análises histoquímicas em plantas são realizadas a fim de se caracterizar, bem como mostrar a localização e o acúmulo de compostos químicos ou grupos de metabólitos secundários (compostos lipofílicos, mucilagem, elementos lignificados e compostos fenólicos) em tecidos e células biológicas, utilizando reativos específicos, técnicas de microscopia de luz e registros fotográficos (BADRIA; ABOELMAATY, 2019).

Figura - 7. Histoquímica de *Eucalyptus tereticornis*. (a, b) Nervura central em reação com Sudan III e (c) com cloreto férrico. (d) Pecíolo tratado com cloreto férrico. (e, f) Pecíolo em reação com dicromato de potássio. (g) Caule em reação com solução de iodo. (h, i) Caule tratado com florocloroglucinol/HCl. (co, colênquima; ct, cutícula; cv, cavidade secretora; o, óleo essencial; ep, epiderme; fi, fibras; gp, parênquima fundamental; pc, compostos fenólicos; ph, floema; pi, medula; sc, esclerênquima; sg, grãos de amido; xy, xilema). Barra de escala: a = 100 μ m; b, d, f-i = 50 μ m; c, e = 200 μ m.



Fonte: A autora.

Os compostos lipofílicos em plantas são representados por gotas lipídicas, cera epicuticular (depositada nas superfícies externas da lâmina), cutina (presente na parte superior

das paredes celulares epidérmicas externas), suberina (interior depositado nas paredes primárias das células de certos tecidos) e endoderme, além de óleo essencial (secretado dentro de células, ductos, cavidades e tricomas glandulares). O Sudan III reage positivamente com os lipídios, evidenciando a cor vermelho ou vermelho-laranja. No presente estudo, *E. tereticornis* evidenciou material lipofílico nas ceras epicuticulares e cutículas sobre a epiderme foliar (lâmina e pecíolo), em caules (Fig. 7a) e também nas cavidades secretoras (Fig. 7b). A presença desses componentes também foram detectadas em várias espécies de *Eucalyptus* (SANTOS *et al.*, 2008; MICGAZ *et al.*, 2018; SAULLE *et al.*, 2018).

Goodger *et al.* (2016) analisaram as composições químicas dos óleos essenciais de várias espécies de *Eucalyptus* e observaram que *Eucalyptus oreades* F.Muell ex R.T.Baker, *Eucalyptus stellulata* Sieber ex DC., *Eucalyptus muelleriana* Howitt, *Eucalyptus gregsoniana* L.A.S.Johnson & Blaxell, *E. falciformis* (Newnham, Ladiges & Whiffin) Rule, *Eucalyptus nitida* Hook.f., *E. approximans* Maiden, *Eucalyptus apiculata* R.T.Baker & H.G.Sm., e *Eucalyptus dendromorpha* (Blakely) L.A.S.Johnson & Blaxell. continham, além de compostos fenólicos, monoterpenoides e sesquiterpenoides. Somente *Eucalyptus suberea* Brooker & Hopper e *Eucalyptus brevistylis* Brooker não continham compostos fenólicos nos óleos essenciais. No presente estudo, o conteúdo dentro das cavidades secretoras de *E. tereticornis* foi positivo apenas para o material lipofílico, sendo que compostos fenólicos não foram detectados pelos testes histoquímicos realizados.

Existem vários reativos para evidenciar compostos fenólicos. Contudo, os mais comuns são a solução de cloreto férrico que, por precipitação de ferro, produz coloração marrom escuro ou preto e a solução de dicromato de potássio que forma uma coloração marrom ou marrom-avermelhado (BADRIA; ABOELMAATY, 2019). Em *E. tereticornis*, os componentes fenólicos foram destacados usando ambas as soluções de cloreto férrico (Fig. 7c, d) e dicromato de potássio (Fig. 7e, f). Fenólicos foram encontrados no mesofilo da lâmina foliar, no parênquima fundamental e no floema da nervura central (Fig. 7c), no parênquima fundamental e no floema do pecíolo (Fig. 7e), bem como no córtex e no floema do caule. (Fig. 7d). Compostos fenólicos no tecido floemático foliar foram relatados em várias espécies de *Eucalyptus* (Micgaz *et al.*, 2018; Saulle *et al.*, 2018). No entanto, fenólicos na epiderme foram detectados apenas em *E. saligna* (SAULLE *et al.*, 2018), uma característica não observada no presente estudo.

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias formadas por pelo menos uma unidade de fenol e compreendem subgrupos como ácidos fenólicos, taninos, quinonas, lignanas e flavonoides. Os fenólicos têm efeitos tóxicos em herbívoros e patógenos

fúngicos e são responsáveis pela resistência da planta a fatores ambientais agressivos (LAMBERS; CHAPIN III; PONS, 2008).

A solução de iodo é usada para destacar o amido presente que passa à coloração de azul-escuro a preto. Praticamente todas as outras estruturas ficam manchadas de amarelo, mas essa cor não tem significado específico (BADRIA; ABOELMAATY, 2019). Grãos de amido são encontrados no parênquima do xilema do caule (Fig. 7g). Eles são pequenos e arredondados e encontrados isolados ou em pares. Essa característica foi observada em várias espécies do gênero (MICGAZ *et al.*, 2018). O amido é uma das principais substâncias ergásticas do protoplasto e consiste em uma longa cadeia de polissacarídeos agrupados ao redor de um hilo e formando grânulos característicos. Não apenas a presença, mas também a estrutura, forma e tamanho dos grãos de amido ajudam na identificação das espécies (UPTON *et al.*, 2011).

O floroglucinol, em meio ácido, reage com a lignina presente nas paredes das células, formando uma coloração de rosa a vermelho. No presente estudo, elementos lignificados reagiram positivamente com floroglucinol/HCl na bainha esclerenquimática descontínua aposta ao floema, bem como nas células do xilema em folhas e caules (Fig. 7h, i). As mesmas características foram encontradas em *E. saligna* (SAULLE *et al.*, 2018). No entanto, Santos *et al.* (2018) encontraram resultados negativos em várias espécies de *Eucalyptus* ao analisar plantas jovens (120 dias de idade). A lignina é uma substância encontrada em várias ou todas as camadas celulares que participam do processo de lignificação, resultando em uma modificação importante das propriedades da parede celular. Esse processo leva à perda de plasticidade celular, mas aumenta significativamente a rigidez e elasticidade dos tecidos, além de diminuir a permeabilidade da água (CRANG; LYONS-SOBASKI; WISE, 2019).

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus tereticornis*

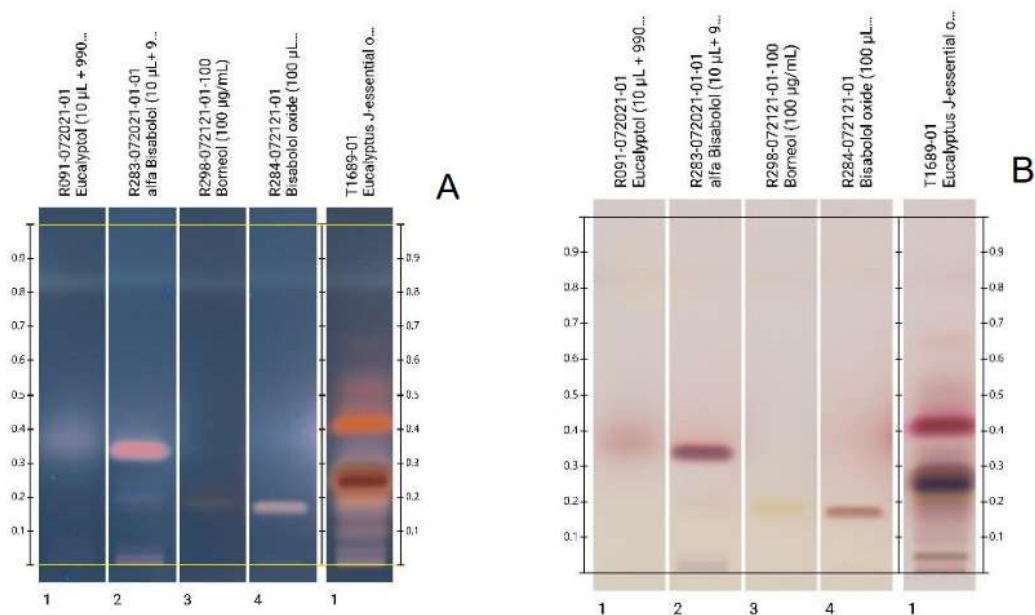
O óleo essencial extraído por hidrodestilação de folhas de *E. tereticornis* é amarelo-claro, translúcido e com aroma intenso e característico, e com densidade menor que a densidade da água. Características semelhantes foram observadas em *E. benthamii* (DÖLL-BOSCARDIN *et al.*, 2010) e *E. saligna* (SAULLE *et al.*, 2018). Os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* são aromáticos, condimentados, amarelo-claros ou incolores. Todavia, coloração acastanhada ou esverdeada também foi relatada para óleos essenciais extraídos de espécies do gênero (ARAÚJO, F. *et al.*, 2009).

O rendimento médio do óleo essencial de três extrações de folhas de *E. tereticornis* coletadas no outono foi de $1,60\% \pm 0,08165$ e a densidade calculada foi de $0,9234 \text{ g/mL}$. Arango, Ruíz e Jaramillo (2011) obtiveram um rendimento de $0,89\%$ de óleo essencial amarelado e translúcido para folhas frescas da mesma espécie coletadas em Medellín (Colômbia) e com uma densidade de $0,855 \text{ g/mL}$; Kaur *et al.* (2011) relatou um rendimento de $1,21\%$ de óleo essencial amarelado e translúcido de folhas adultas frescas de *E. tereticornis* coletadas na Índia; enquanto que Boom *et al.* (2018) descreveu um rendimento de $0,77\%$ de óleo essencial extraído de folhas frescas de *E. tereticornis* coletadas em diferentes locais na Colômbia, com densidade de $0,884 \text{ g/mL}$. Gobbo-Neto e Lopes (2007) avaliaram como as condições de coleta, sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, temperatura ambiente, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de macro e micronutrientes, altitude, latitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos pode influenciar no conteúdo de metabólitos secundários. Migacz *et al.* (2018), avaliou interferência da sazonalidade da coleta em ambos os parâmetros rendimento e densidade intraespécie e interesespécie avaliando seis espécies do gênero *Eucalyptus*, demonstrando variação de rendimento e densidade do óleo essencial da mesma planta, corroborando com Gobbo-Neto e Lopes (2007), e justificando os resultados obtidos no presente estudo em comparação com os dados da literatura.

O perfil químico do óleo essencial de *E. tereticornis* em CCDAE, sob luz branca e após derivatização com anisaldeído mostram quatro bandas intensas: uma banda marrom-rosada em $R_f \sim 0,42$ e três bandas com R_f próximos. Em $R_f \sim 0,29$ uma banda acastanhada, $R_f \sim 0,25$ uma banda de cor cinza e $R_f \sim 0,23$ uma banda amarelada. As mesmas bandas foram observadas sob UV 366 nm com cores laranja ou acastanhadas (Figura 8). Essas bandas foram diferentes das observadas com os padrões 1,8-cineol, α -bisabolol, borneol e óxido de bisabolol.

O método CCDAE é específico, preciso e reprodutível e pode ser usado para a separação e estimativa simultânea de componentes ativos, sendo muito utilizado no controle da qualidade de drogas vegetais, especialmente por ser um método rápido e preciso (GUPTA, *et al.*, 2018). Na Farmacopeia brasileira 6a. edição (2019) consta a monografia de *E. globulus*, onde a CCD indica três zonas de coloração, sendo que o 1,8-cineol corresponde à zona de coloração castanho-violácea intensa.

Figura - 8 Comparação das placas de CCDAE sob UV 366 nm (A) e sob luz branca (B) após derivatização com reagente de anisaldeído. As faixas 1-4 do lado esquerdo da figura são padrões: 1,8-cineol, α -bisabolol, borneol e óxido de bisabolol, respectivamente, e a faixa 1 do lado direito é óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*.



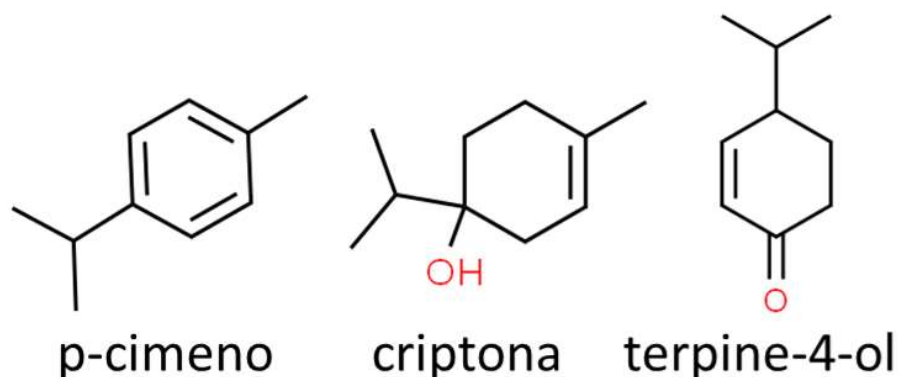
A análise por CG-EM do óleo essencial detectou 25 compostos, sendo que dois não foram identificados. A Tabela 1 mostra o tempo de retenção (min), índice de retenção, identidade química, a porcentagem média da concentração dos constituintes químicos e o desvio padrão do óleo essencial de *E. tereticornis*. A comparação dos grupos químicos no óleo essencial de *E. tereticornis* mostra uma alta concentração de monoterpênicos. Os compostos majoritários do óleo essencial foram o *p*-cimeno (46,57%), a criptona (25,24%) e o terpinen-4-ol (5,23%) (Figura 9).

Tabela 1 - Tempo de retenção (min), identidade química, porcentagem média da concentração dos constituintes químicos e o desvio padrão do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*

Nº	Tempo de retenção	Compostos identificados	Média %	Desvio Padrão
1	7,882	α -Tujeno	0,303	$\pm 0,017$
2	8,176	α -Pineno	1,162	$\pm 0,005$
3	10,978	δ -2-Careno	0,383	$\pm 0,000$
4	11,428	α -Terpineno	0,201	$\pm 0,001$
5	11,749	<i>p</i>-Cimeno	46,572	$\pm 0,098$
6	11,965	Limoneno	2,339	$\pm 0,025$
7	12,057	β -Felandreno	2,640	$\pm 0,031$
8	13,789	Óxido de cis-linalol	0,305	$\pm 0,001$
9	14,686	<i>p</i> -Cimeneno	0,430	$\pm 0,002$
10	15,078	Linalol	0,658	$\pm 0,000$
11	15,966	<i>trans</i> -Tujona	0,378	$\pm 0,000$
12	16,274	Sem identificação	1,192	$\pm 0,000$
13	16,977	Sem identificação	0,978	$\pm 0,001$
14	17,112	<i>neo</i> -3-Tujanol	0,645	$\pm 0,005$
15	18,885	Terpinen-4-ol	5,230	$\pm 0,013$
16	19,181	Criptona	25,245	$\pm 0,047$
17	19,559	α -Terpineol	0,440	$\pm 0,001$
18	20,202	Formato de Linalol	0,178	$\pm 0,001$
19	21,725	Cumin aldeído	0,294	$\pm 0,001$
20	22,257	Piperitona	0,774	$\pm 0,003$
21	23,963	<i>p</i> -Cimen-7-ol	0,747	$\pm 0,003$
22	24,286	Carvacrol	1,129	$\pm 0,010$
23	25,995	3- <i>oxo-p</i> -menth-1-en-7-al	0,391	$\pm 0,002$
24	35,970	Espatulenol	4,634	$\pm 0,040$
25	36,184	Óxido de Cariofileno	0,354	$\pm 0,003$
		Total Identificado	97,57 %	$\pm 0,006$
		Monoterpenos Hidrocarbonados	53,60 %	
		Monoterpenos Oxigenados	36,67 %	
		Sesquiterpenos Oxigenados	4,99 %	

Fonte: A autora.

Figura 9- Estrutura química dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*



Fonte: Adaptado de ChemSpider, 2022

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de terpenoides ou de fenilpropanoides, sendo que os primeiros normalmente são dominantes. Os terpenoides são derivados de unidades do isopreno (C_5H_8), podendo ser formados pelas rotas do ácido mevalônico e/ou da desoxixilulose 5-fostato (DXP). Os fenilpropanoides, formam-se a partir do ácido chiquímico, que constitui as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. (CASTRO *et al.*, 2010).

Os monoterpenoides e os sesquiterpenoides, com estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam volatilidade acentuada. Essa característica, por sua vez, apresenta grande importância para as plantas aromáticas, pois os óleos essenciais atuam como sinais químicos no reino vegetal e como defesa química contra o reino animal, apresentando uma função biológica vital para a sobrevivência e adaptação das plantas para o meio ambiente (MENDES-PINTO, 2009; MANFRON *et al.*, 2021). Segundo a literatura os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenoides (90% dos óleos essenciais) que é o caso da maioria das espécies de *Eucalyptus* estudadas, seguido dos sesquiterpenoides. Estes são majoritários em outros gêneros botânicos, a exemplo de *Baccharis* (MANFRON *et al.*, 2021).

Em *Eucalyptus*, os óleos essenciais são biossintetizados e compartimentalizados em cavidades secretoras (Fig. 3j, 5a, d, f, 7b), sendo encontradas em folhas e caules. Booker e Kleinig (2006) relatam que os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* são uma mistura complexa de uma variedade de monoterpenoides e sesquiterpenoides, fenóis, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas. A atividade biológica dos óleos essenciais de *Eucalyptus* depende da natureza e da concentração dos constituintes químicos. Vale destacar que o perfil químico dos óleos essenciais depende da espécie, época, localização, clima, tipo e fertilidade do solo,

idade da planta, método utilizado para a secagem do material vegetal, bem como, com o método de extração do óleo (BROOKER; KLEINIG, 2006; MORAIS, 2009).

No presente estudo, dos compostos identificados, 90,27% são monoterpenoides, sendo 53,6% de monoterpenos hidrocarbonados e 36,67% de monoterpenos oxigenados, e 4,99% são sesquiterpenos oxigenados. O principal composto encontrado no óleo essencial de *E. tereticornis* foi o *p*-cimeno (46,57%). Este componente foi encontrado em outras espécies de *Eucalyptus*, como em *E. saligna* (28,90%) (SAULLE, 2008) e em *E. camaldulenses* (17,9%) (LUCIA *et al.*, 2008).

Várias atividades biológicas são atribuídas ao *p*-cimeno, a exemplo de fungicida (CAMELE *et al.*, 2012; ELSHAFIE; MANCINI; CAMELE, 2015; LOPEZ-REYES *et al.*, 2010), antioxidante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015), anti-inflamatória (QUINTANS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; ZHONG; GEFU; LANXIANG, 2013 e KUMMER *et al.*, 2015), antinociceptiva (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2013) e antimicrobiana (XIE *et al.*, 2012 e ZHONG *et al.*, 2012). Santana *et al.* (2011) observaram, em um estudo *in vivo*, que o *p*-cimeno reduz a resposta nociceptiva orofacial, mostrando-se uma biomolécula importante no tratamento da dor na região orofacial. O *p*-cimeno é também empregado na produção de substâncias químicas e como agente aromatizante (LOTFI; YAGHMAEL; EBRAHIM-HABIBI, e SELVARAJ *et al.*, 2012).

Dois estudos conduzidos no Benin (BOSSOU *et al.*, 2013; ALITONOU *et al.*, 2004). e na República Democrática do Congo também revelaram *p*-cimeno como o componente majoritário do óleo essencial de *E. tereticornis* (CIMANGA *et al.*, 2002). Lucia *et al.* (2008; 2009) relataram que os óleos essenciais de *E. tereticornis* são ricos em β -felandreno, 1,8-cineol e *p*-cimeno. Um trabalho de Filomeno e colaboradores (2008) relatou que *E. tereticornis*, cultivado no estado de Minas Gerais, Brasil, produz grandes quantidades de óleo essencial (2,3%) que é rico em β -pineno, 1,8-cineol e α -pineno. Toloza e colaboradores (2006) examinaram o óleo essencial de *E. tereticornis* e encontraram 1,8-cineol, *p*-cimeno e γ -terpineno como os componentes principais.

A criptona (25,24%) foi o segundo composto em maior quantidade no óleo essencial de *E. tereticornis*. Esse composto também foi encontrado por Saulle e colaboradores (2018) na composição do óleo essencial de folhas de *E. saligna* (17,92%). Outras espécies de *Eucalyptus* também apresentaram a criptona em sua composição, como em *Eucalyptus odorata* Behr, com 20.9% (ELAISSI; SALAH; MABROUK, 2011), *E. deglupta* Blume e *E. urophylla* com 25 and 4%, respectivamente (CIMANGA *et al.*, 2002). Coffi e colaboradores (2012) detectaram criptona no óleo essencial de folhas de *E. camaldulensis* coletadas na

Argentina (5.71%,) e na Austrália (9.81%). A presença deste composto demonstrou estar relacionada a atividades antibacterianas e antifúngicas, e óleos essenciais que o contém, dependendo da sua concentração, podem ser promissores para o tratamento de algumas doenças respiratórias causadas por infecções bacterianas (ELAISSI; SALAH; MABROUK, 2011, ELAISSI *et al.*, 2012).

O terpinen-4-ol (5,23%) foi identificado na composição do óleo essencial de *E. tereticornis*, sendo o terceiro componente majoritário. Esse composto é um terpeno que se destaca por suas excelentes propriedades medicinais, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica e efeito antitumoral (FRANCISCONI *et al.*, 2015, NOGUEIRA *et al.*, 2014, SUN; ZHANG; LI, 2012; WU *et al.*, 2012). Possui amplo espectro de ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, microrganismos multirresistentes (THOMSEN *et al.*, 2013). Mais especificamente é um biocida membrana-ativo que atua na indução da perda da membrana, interfere na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Outros estudos também detectaram o terpinen-4-ol no óleo essencial de *E. tereticornis*. Pereira (2010) detectou 1% de desse composto em plantas cultivadas no Brasil. Cimanga e colaboradores (2002) detectaram 1,7% de terpinene-4-ol no óleo essencial da planta cultivada no Congo, enquanto que Toloza e colaboradores (2006) detectaram 5,8% em plantas cultivadas na Argentina, sendo a concentração desse composto no óleo essencial de *E. tereticornis* cultivada na Argentina bem próxima à encontrada no presente estudo.

A composição química do óleo essencial de *E. tereticornis* se apresentou diferente de outros estudos. Pereira *et al.* (2011) identificou no óleo essencial extraído de folhas de *E. tereticornis* *p*-cimeno (8,1%), γ -terpineno (8,4%), α -felandreno (10,3%), α -pineno (13,6%), 1,8- cineol (19,3%) e β -pineno (22,4%). Toloza e colaboradores (2006) encontraram *p*-cimeno no óleo essencial de *E. tereticornis*, contudo na concentração de 22%.

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O efeito antimicrobiano do óleo essencial de *E. tereticornis* foi avaliado pelos métodos de difusão em disco (KONEMAN *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1966) e macrodiluição em caldo Muller-Hinton.

5.4.1 Teste de Difusão em Disco

Para o teste de difusão em disco, as placas foram satisfatoriamente semeadas apresentando um tapete confluyente de crescimento microbiano e os halos de inibição resultantes apresentavam-se uniformemente circulares. Após 24 h de incubação das placas a 35° C, foram observados halos de inibição para o óleo essencial na concentração de 250 mg/mL para todas as cepas testadas, sendo que a maior inibição de crescimento microbiano foi frente a *C. albicans* e *S. epidermidis*. O maior diâmetro do halo de inibição foi frente a *C. albicans*, sendo muito semelhante ao controle utilizado (clorexidina 28 ± 0 mm). A tabela 2 apresenta a média e desvio padrão dos resultados das leituras dos halos de inibição em mm.

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos diâmetros dos halos de inibição referentes a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* pelo método de difusão em disco

Microrganismo	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
*OP 20 µL	60 ± 0	12 ± 0,8164	21 ± 0	44 ± 0	16 ± 1,4142	
*OP 10 µL	50 ± 0	11,3 ± 1,2472	19 ± 0	40 ± 0	13 ± 0	
500 mg	40 ± 14,1421	10,3 ± 1,6996	14 ± 1,4142	24 ± 6,5319	13,3 ± 1,2472	
250 mg	27,3 ± 5,2493	8,67 ± 1,2472	10,3 ± 1,2472	17 ± 2,9439	8 ± 2,8284	
5 mg	-	-	-	-	-	
Halo de Inibição (mm)	500 µg	-	-	-	-	
	100 µg	-	-	-	-	
	50 µg	-	-	-	-	
	Gentamicina (30 µg)	nt	24 ± 0,8165	20,67 ± 1,5275	24 ± 0	23 ± 0
	Cloranfenicol (30 µg)	nt	35 ± 0	30,67 ± 0,9428	32,5 ± 2,5	25 ± 2,4494
	Clorexidina (50 µg)	28 ± 0	nt	nt	nt	nt
	DMSO	-	-	-	-	-

(*) : Óleo sem diluição

(-) : Não houve inibição do crescimento

(nt) : Não testado

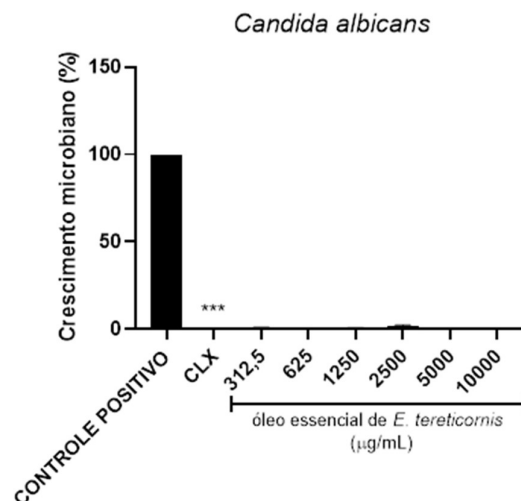
Fonte: A autora.

No estudo de Bachheti, Joshi e Singh (2011) foi testado 20 µL do óleo essencial puro de *E. tereticornis* coletado na Índia, onde a maior inibição foi contra *S. aureus*, seguido por *E. coli*, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp. O halo obtido nesse estudo para *E. coli* foi de 12 mm, muito semelhante ao presente trabalho, porém, Bachheti *et al.* reportaram melhor inibição frente a *S. aureus*. Fawad *et al.* (2012) testou 100 µL do óleo essencial puro e obteve melhores resultados, sendo reportado também melhor atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (halo de inibição de 30,27 mm), seguido por *E. faecalis* (halo de inibição de 26,65 mm), *E. coli* (halo de inibição de 21,49 mm), e em seguida *Salmonella taphimurium* (halo de inibição de 16,69 mm). No presente estudo, 250 mg/mL do óleo essencial de *E. tereticornis* frente a *C. albicans* apresentou um halo de $27,3 \pm 5,2493$ mm, evidenciando uma potencial atividade antimicrobiana.

5.4.2 Teste de Macrodiluição em Caldo

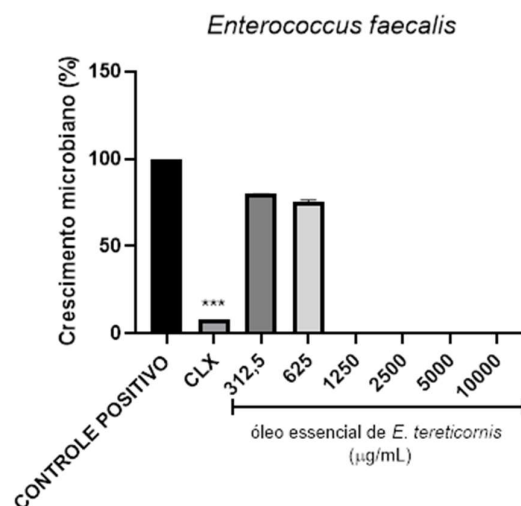
Os percentuais de crescimento do teste de macrodiluição em caldo para os microrganismos *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* podem ser observado nas Figuras 10 a 15, respectivamente. O percentual de crescimento foi obtido comparando-se a média das leituras das densidades ópticas de cada concentração do extrato em relação ao crescimento do microrganismo teste sem tratamento (controle positivo), que foi equivalente a 100%.

Figura 10 - Percentual de crescimento de *Candida albicans* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton com 2% de glicose no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g/mL}$ e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

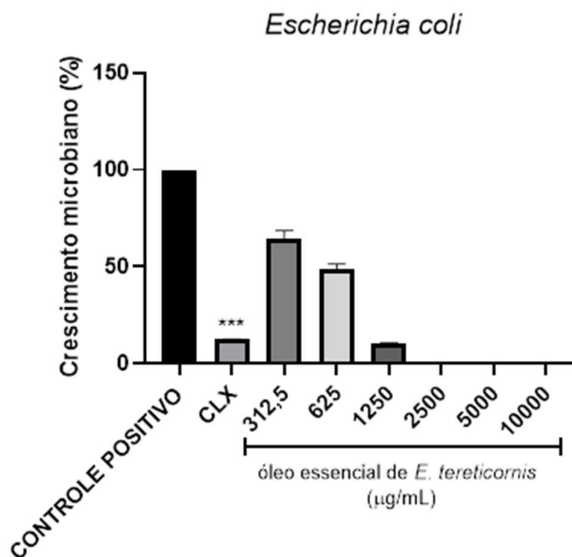
Figura 11 - Percentual de crescimento de *Enterococcus faecalis* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g/mL}$ e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

Figura 12 -

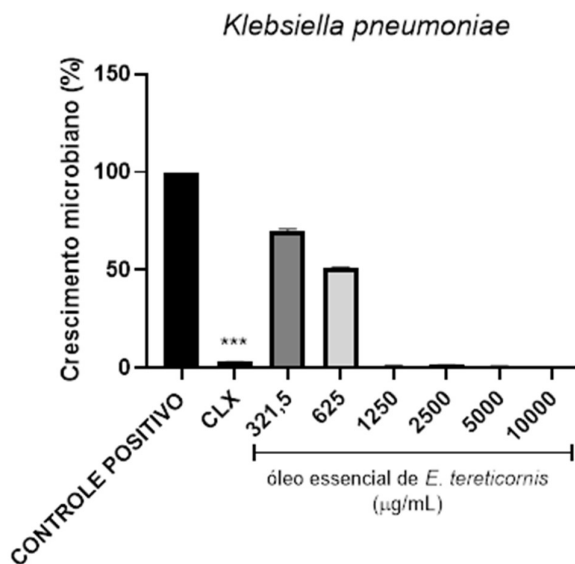
Percentual de crescimento de *Escherichia coli* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g/mL}$ e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

Figura 13 -

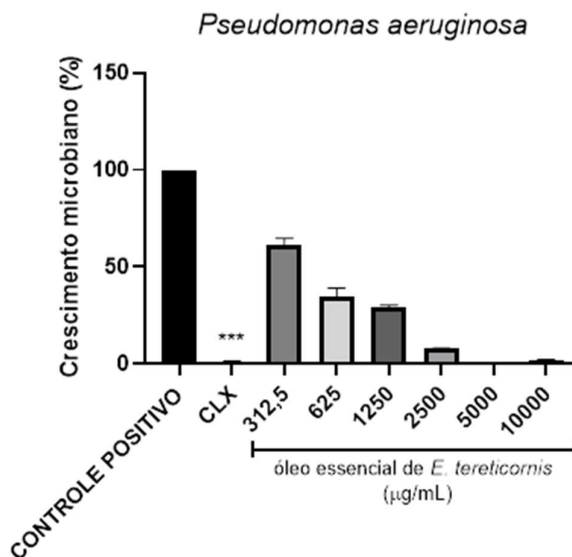
Percentual de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g/mL}$ e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

Figura 14 -

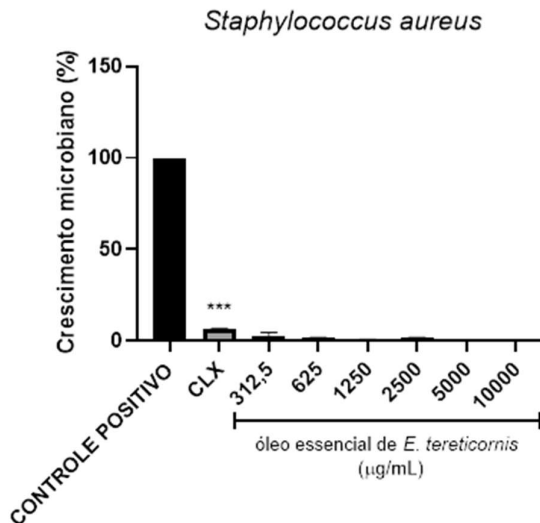
Percentual de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

Figura 15 -

Percentual de crescimento de *Staphylococcus aureus* pelo método de macrodiluição em caldo Muller-Hinton no período de 24 h de incubação com o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* nas concentrações de 10000; 5000; 2500; 1250; 625 e 312,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX). Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média do percentual de crescimento microbiano ($n=9$) $\pm$ E.P.M. *** quando $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento)



Fonte: A autora.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), as culturas dos tubos da macrodiluição foram inoculadas em AMH para as cepas bacterianas e AS para o fungo, e após a incubação foi avaliada a presença ou não de crescimento microbiano. A menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano foi considerada a CBM. Nesse estudo, a concentração mínima que foi capaz de inibir o crescimento de cada microrganismo em análise, é também a menor concentração bactericida, exceto para *P. aeruginosa*, para a qual não foram observados efeito bactericida e inibição de crescimento do óleo essencial frente a essa cepa (Tabela 3). A CIM e a CBM do óleo essencial de *E. tereticornis* frente a *C. albicans* foi de 312,5 µg/mL, frente a *E. faecalis* foi de 1.250 µg/mL e frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* foi de 2.500 µg/mL.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* frente a cada microrganismo testado pelo método de macrodiluição em caldo.

	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	312,5	312,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.250	1.250
<i>Escherichia coli</i>	2.500	2.500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.500	2.500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.500	2.500

(-): não houve a inibição do crescimento/efeito bactericida

Fonte: A autora.

O óleo essencial de *E. tereticornis* teve uma melhor atividade microbiana frente a *C. albicans*, assim como observado na avaliação pela difusão em disco. No entanto, pela metodologia de difusão em disco, o óleo essencial aparentava ser mais efetivo contra *S. aureus* do que para *E. coli*. Entretanto, pela metodologia de macrodiluição em caldo, foi possível observar que a concentração de 2.500 µg/mL do óleo essencial foi efetiva tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, além de também ser bactericida para *K. pneumoniae*. *P. aeruginosa* foi o microrganismo que apresentou maior resistência ao óleo essencial de *E. tereticornis*, o que foi relatado também em outros estudos. Elaissi *et al.* (2011), estudaram a atividade antimicrobiana de 20 espécies diferentes de *Eucalyptus*, e verificaram que todas

possuíam atividade, em maior ou menor grau. A bactéria mais sensível aos óleos essenciais foi *S. aureus* e a mais resistente foi *P. aeruginosa*. Ainda nesse estudo, verificou-se correlação entre a quantidade de 1,8- cineol, *p*-cimeno, α -pineno ou de criptona nos óleos essenciais com a atividade antibacteriana.

A cepa utilizada de *E. coli* (ATCC-35218) é produtora de β -lactamase (TEM-1) considerada ESBL positiva (produtora de beta-lactamase de espectro estendido). A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos, que representa um grande problema de resistência bacteriana aos antimicrobianos (ALTERTHUM, 2015; OPLUSTIL *et al.*, 2000). Cepas produtoras de ESBL são comumente isoladas de infecções adquiridas em Unidades de Terapia Intensiva (BRASIL, 2007), e considerada um patógeno de prioridade crítica para desenvolvimento de novos antimicrobianos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017).

Vários estudos têm destacado os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais mesmo contra bactérias multirresistentes (BURT, 2004; EL ASBAHANI *et al.*, 2015; MAYAUD *et al.*, 2008). A estrutura química, os grupos funcionais e a estereoquímica estão ligados à capacidade antimicrobiana e antifúngica dos óleos essenciais. Os compostos fenólicos, por exemplo, apresentam uma ação mais efetiva, sendo tanto bactericidas como bacteriostáticos. Grupamentos hidroxila ligados a estruturas fenólicas tendem a aumentar a potência da atividade inibitória, e de acordo com a estereoquímica das moléculas, elas podem ter ou não atividade antimicrobiana. A propriedade lipofílica dos óleos essenciais também está relacionada a atividade antimicrobiana, uma vez que permite interações com a membrana bacteriana (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita através de pesquisas envolvendo diversas espécies de vegetais e microrganismos testados. Em uma revisão sobre o assunto, Greay e Hammer (2011) citam alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre células bacterianas. Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas (QIU *et al.*, 2011), e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella enterica* (DI PASQUA *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, sugere-se que as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Eucalyptus* estão associados com grandes quantidades de compostos oxigenados

como, por exemplo, 1,8-cineol (MARZOUG *et al.*, 2011). De fato, foi reportado que os aldeídos, principais componentes do óleo essencial de *E. tereticornis* segundo Kaur et al. (2011), provocam ruptura irreversível da membrana microbiana, alterando sua permeabilidade, o que acarreta em vazamento de eletrólitos e inibição do crescimento microbiano (AVISSAR *et al.*, 1990). Marzoug *et al.* afirma também que a presença do conteúdo de monoterpenoides oxigenados são os compostos que mais contribuem para a atividade contra microrganismos Gram-negativos (*K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) e também contra o fungo *C. albicans*. Corroborando com esses dados, Arango, Ruíz e Jaramillo (2011) apresentaram os efeitos do óleo essencial de *E. tereticornis* na morfologia do fungo *F. oxysporum*, relatando alterações a nível de estruturas celulares, principalmente nas hifas, mas também observadas nos conídios e macroconídios; também foi reportado redução no número de clamidósporos, que são estruturas de resistência fúngica.

O óleo essencial de *E. tereticornis* apresentou, no presente estudo, como principais constituintes o *p*-cimeno e o terpine-4-ol. No estudo de Pessoa (2018), o *p*-cimeno apresentou atividade antibacteriana, onde na concentração de 32 g/mL (CIM) e 64 g/mL (CBM), produziu inibição sobre o crescimento das cepas *S. aureus* ATCC-13150, *P. aeruginosa* ATCC-25853, *E. coli* ATCC-18739 e *S. enteritis* ATCC-6017.

O terpinen-4-ol apresentou ação antimicrobiana em *S. aureus* resistentes a metilicina (LOUGHLIN *et al.*, 2008), *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. (GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008), antifúngica em *C. albicans* (JANDOUREK; VAISHAMPAYAN; VAZQUEZ, 1998). A atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol acontece por diversos mecanismos e é atribuída a um conjunto de multicomponentes que afetam principalmente a parede celular bacteriana, a desnaturação proteica e alteração da estrutura e função da membrana celular (CARSON; RILEY, 2001; CUARON *et al.*, 2013 e FALCI *et al.*, 2015).

É importante salientar, como relatado por vários autores, que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. tereticornis* está relacionada com o sinergismo entre a mistura complexa de componentes presentes no óleo essencial, e não a um único componente (NAKATSU *et al.*, 2000; ARANGO; RUÍZ; JARAMILLO, 2011; KAUR *et al.*, 2011).

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do óleo essencial de *E. tereticornis* foi avaliada por meio do método da redução do radical livre DPPH, pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico e pelo Método do Ácido Tiobarbitúrico - Espécies Reativas (TBARS). A

atividade antioxidante de compostos vegetais pode ser atribuída a vários mecanismos como a prevenção da peroxidação lipídica e a capacidade sequestrante de radicais livres (KAUR; GEETHA, 2006), por esse motivo neste trabalho optou-se por técnicas que apresentassem mecanismos de ação diferentes.

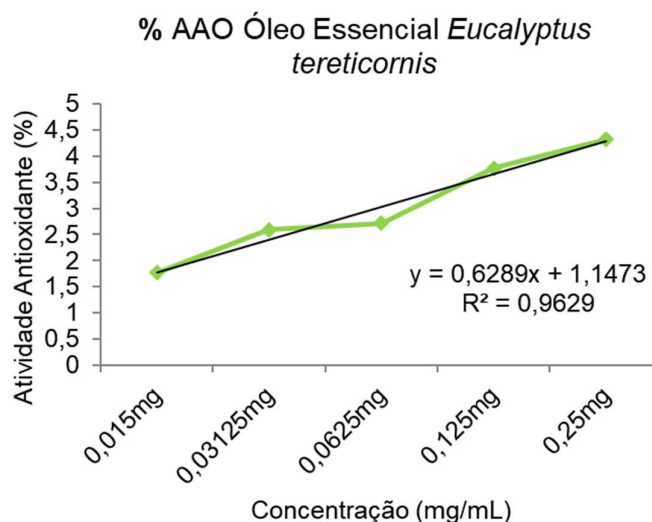
Um dos métodos mais citados para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante é o método de DPPH que se baseia na redução do radical oxidante utilizando a própria molécula que dá nome ao teste, o DPPH. Trata-se de uma reação mudança de cor, na qual a solução reagente, cor violeta é convertida em amarelo, na presença de um antioxidante (PIRES *et al.*, 2017). Neste método, o reagente de DPPH fornece um radical oxidante, que na presença de um composto com potencial antioxidante ocorre a transferências de elétrons para o átomo de hidrogênio neutralizando o radical livre (SOARES *et al.*, 1997). Os valores da porcentagem da atividade antioxidante de diferentes concentrações do óleo essencial de *E. tereticornis* estão apresentados na Tabela 4 e os dados foram colocados na figura 16, onde foi construída a curva analítica.

Tabela 4 - Porcentagem da atividade antioxidante do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* em diferentes concentrações frente ao DPPH (1-difenil-2-picril-hidrazil)

Concentração óleo essencial <i>Eucalyptus tereticornis</i> (mg/mL)	%Atividade antioxidante
0,0015	1,768
0,03125	2,594
0,0625	2,712
0,125	3,773
0,25	4,323

Fonte: A autora.

Figura 16 - Curva analítica para a quantificação da atividade antioxidante, pelo método de redução do radical livre DPPH, a partir de diferentes concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*



Fonte: A autora.

Considerando os resultados obtidos a partir da curva analítica, a capacidade antioxidante do óleo essencial de *E. tereticornis* pode ser explicada pela equação de reta $y = 0,6289x + 1,1473$. Substituindo o valor de y por 50, foi determinado um valor de IC_{50} de 77,6795 mg/mL, de forma que, para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, são necessários 77,68 mg/mL do óleo essencial de *E. tereticornis*. Para os padrões de ácido ascórbico e de ácido gálico, foram estabelecidos valores de IC_{50} de 1,4486 mg/mL e 28,5718 mg/mL respectivamente, conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de IC_{50} para o óleo essencial de *E. tereticornis*, frente aos padrões de ácido ascórbico e de ácido gálico, a partir do ensaio de redução do radical livre DPPH

Amostra	IC_{50} (mg/mL)
Óleo essencial de <i>E. tereticornis</i>	77,6795
Ácido Ascórbico	1,4486
Ácido Gálico	28,5718

Fonte: A autora.

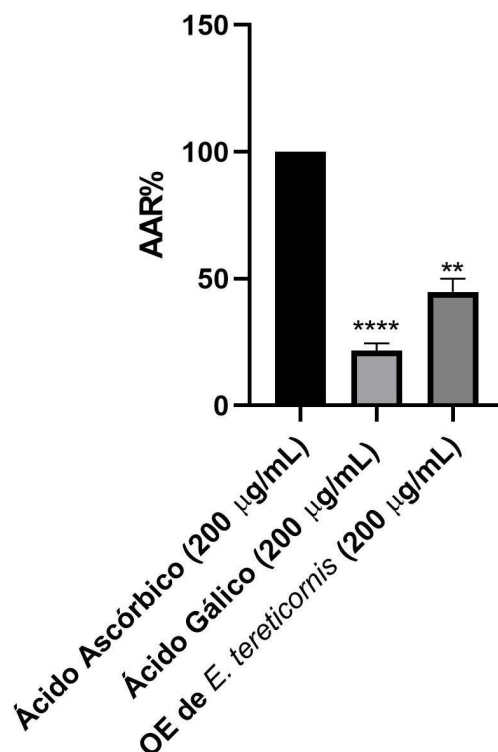
Ololade e Olawore (2018) estudaram o óleo essencial extraído de sementes de *E. tereticornis*, de plantas cultivadas na Nigéria. Nesse estudo, o óleo essencial foi capaz de inibir a formação de Radicais DPPH de uma maneira dependente da concentração. Os percentuais de inibição do óleo essencial em diferentes concentrações (1000, 100 e 10 μ g/mL) foram $67,60 \pm 0,09$, $64,89 \pm 0,03$ e $62,71 \pm 0,06\%$ respectivamente; enquanto o valor de IC_{50} encontrado foi de 2,0 μ g/mL, em comparação ao ácido ascórbico que apresentou percentuais

de inibição de $96 \pm 0,00$ $69 \pm 0,00$ e $54 \pm 0,00$, e valor de IC_{50} de $9,0 \mu\text{g/ml}$. Com resultados semelhantes, Ghaffar e colaboradores (2015) relataram um percentual de inibição de radicais livres do óleo essencial de folhas de *E. tereticornis* do Paquistão de 81,8%. Esses estudos apresentam resultados diferentes do presente estudo. No primeiro estudo o óleo essencial foi extraído das sementes, mas a diferença entre a atividade antioxidante do óleo essencial extraído de folhas da mesma espécie também pode ser explicada pelos fatores ambientais aos quais a planta é exposta, uma vez que influenciam na composição química do óleo essencial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Importante destacar que, considerando uma mesma espécie, a composição química do óleo essencial pode ser diferente quando extraído de órgão diferentes, como folhas, caules e sementes, por exemplo (SAULLE *et al.*, 2018; MANFRON *et al.*, 2021).

O método de fosfomolibdênio mede capacidade antioxidante total e é baseada na redução de molibdênio na presença de substâncias com capacidade antioxidante (BALESTRIN *et al.*, 2008). Foi avaliada a atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo essencial de *E. tereticornis* em relação aos padrões ácido ascórbico e ácido gálico.

A figura 17 apresenta a media da atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo essencial de *E. tereticornis* e do ácido gálico em relação ao padrao ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi usado como substância de referência, sua atividade antioxidante foi considerada de 100% no ensaio experimental, de acordo com a literatura (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Para este teste foi verificado uma atividade antioxidante relativa de $45,07 \pm 7,4387\%$ para o óleo essencial de *E. tereticornis* frente ao complexo fosfomolibdênio. O resultado foi maior que o ácido gálico, que apresentou atividade antioxidante relativa de $21,7396 \pm 2,7764\%$.

Figura 17 - Média da atividade antioxidante relativa (AAR%) do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*, em relação ao ácido ascórbico e ácido gálico pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio. **** para $p < 0,0001$ quando comparado com o ácido ascórbico, ** $p < 0,01$ quando comparado com o ácido ascórbico (ANOVA e pós teste de Tukey).



Fonte: A autora.

Döll-Boscardin e colaboradores (2015) em seus estudos com *E. benthamii* obtiveram um resultado de 43,15% de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico. Porém, Malinowski, Nakasshima e Alquini (2009) ao estudarem a espécie *E. globulus* ssp. *bicostata*, por meio do mesmo procedimento, obtiveram um valor de 25,72% de atividade para o óleo essencial. *E. saligna* demonstrou uma capacidade antioxidante frente ao complexo fosfomolibdênio de 28,53 %. Portanto, pode-se dizer que o óleo essencial de *E. tereticornis* obteve melhores resultados na capacidade de reduzir o complexo do fosfomolibdênio quando comparado ao óleo essencial de *E. globulus* ssp. *bicostata*, e ao óleo essencial de *E. saligna*, e obteve um resultado semelhante ao do óleo essencial de *E. benthamii*.

A atividade antioxidante também pode ser avaliada quanto à capacidade do composto de teste para inibir a peroxidação lipídica pela quantificação do malondialdeído formado que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e que pode ser medida espectrofotometricamente.

Neste presente estudo constatou-se que o óleo essencial apresentou um índice de atividade antioxidante de 25,9%, muito próximo do padrão (BHT) que foi de 26,42%.

As três metodologias demonstram que a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. tereticornis* é inferior quando comparada aos padrões. Esses resultados diferem do que foi descrito por Kaur *et al.* (2011), que obteve como atividade antioxidante para o óleo de *E. tereticornis* um IC₅₀ igual a 146,3 µg/mL na metodologia do DPPH, valor esse menor que o IC₅₀ do padrão BHT, que foi de 163 µg/mL; no entanto, quando analisada pelo método do peróxido de hidrogênio, o IC₅₀ (µg/mL) do óleo essencial foi maior que o do padrão, 270,1 e 181, respectivamente. Boom *et al.* (2018) demonstrou que o óleo essencial de *E. tereticornis* teve, de maneira geral, menor atividade antioxidante quando comparado aos óleos essenciais de *E. camaldulensis* coletados em dois locais diferentes e avaliados por três metodologias.

A diferença entre a atividade antioxidante do óleo essencial extraído de folhas da mesma espécie também pode ser explicada pelos fatores ambientais a qual a planta é exposta, uma vez que influenciam na composição química do óleo essencial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), como observado na composição química de óleo essencial de *E. tereticornis*, coletados em locais diferentes (ARANGO; RUÍZ; JARAMILLO, 2011; KAUR *et al.*, 2011; BOOM *et al.*, 2018; CASTRO, 2020)

Outro fator a ser considerado é a porcentagem de monoterpenoides presentes na composição química do óleo essencial. No presente estudo o óleo essencial apresentou 89,79% de monoterpenoides em sua composição. Óleos essenciais com grandes porcentagens de compostos monoterpênicos não apresentam boa atividade antioxidante (LÓPEZ *et al.*, 2007; DŽAMICŽ *et al.*, 2013). Concordando com esse dado, está o estudo de Boom *et al.* (2018) que demonstrou que mais de 65% do óleo essencial de *E. tereticornis* é composto por compostos monoterpênicos, sendo a espécie que apresentou menor atividade antioxidante no estudo. Entretanto, o óleo essencial de *E. tereticornis* analisado por Kaur *et al.* (2011) apresentou aproximadamente 80% de compostos monoterpênicos em sua composição, e, como já foi mencionado, obteve-se atividade antioxidante melhor que o padrão frente ao radical DPPH.

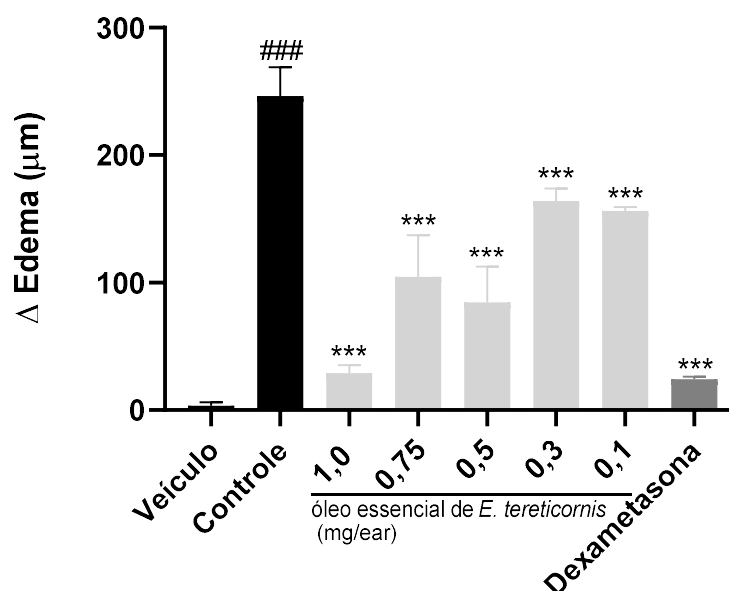
5.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *in vivo*

5.6.1 Efeito do Óleo Essencial de Folhas de *Eucalyptus tereticornis* no Aumento da Espessura das Orelhas Induzido pela Aplicação de Acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA)

A atividade anti-inflamatória do óleo essencial obtido de folhas de *E. tereticornis* foi avaliada por meio do modelo de edema de orelha e migração celular em camundongos. O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica do agente flogístico TPA (2,5 µg/orelha). Seis horas após a aplicação do TPA, os animais exibiram edema, representado pelo aumento significativo na espessura da orelha. No final do experimento foi medida a espessura das orelhas. O edema foi inibido pelo tratamento tópico com diferentes concentrações do óleo essencial de *E. tereticornis*. Os resultados apresentados na figura 18 mostram, pelos valores da média $\pm$ E. P. M do aumento da espessura da orelha. O óleo essencial foi capaz de inibir a formação de edema induzido por TPA com uma inibição máxima de $43,41 \pm 2,43\%$ para a dose de 1 mg/orelha. A dexametasona (0,05 mg/orelha), usada como controle positivo, causou uma redução significativa do edema, muito semelhante à do óleo essencial, sendo de $43,85 \pm 1,71\%$. As concentrações de 0,75 e 0,5 mg/orelha apresentaram reduções de $25,89 \pm 2,70\%$ e $29,63 \pm 2,34\%$, respectivamente. O grupo que recebeu apenas o Veículo (acetona) não apresentou nenhuma alteração na espessura da orelha.

Figura 18 -

Efeito do Óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* no edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados topicamente com o TPA (Controle), com exceção do grupo Veículo que recebeu apenas a aplicação de acetona (Veículo). Na sequência os animais foram tratados com o óleo essencial (1,0 a 0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha). As barras representam a média $\pm$ E. P. M. (n=5-8) do aumento da espessura da orelha em micrometros. A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo Veículo.

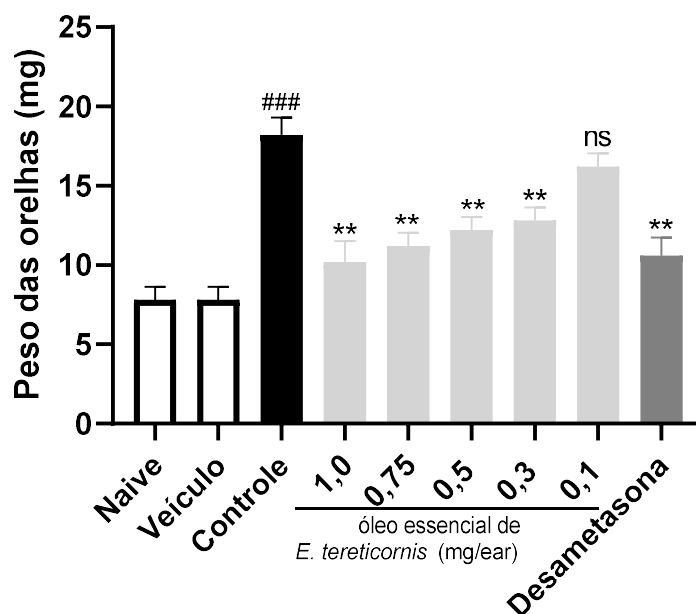


Fonte: A autora.

5.6.2 Efeito do Óleo Essencial de *Eucalyptus tereticornis* no Peso das Orelhas Induzido pela Aplicação de TPA

Ao final do experimento, após a indução com o agente flogístico (Figura 19), foi observado um aumento significativo no peso das orelhas dos camundongos do grupo Controle ($18,2 \pm 0,50$ mg) se comparado ao grupo Naive ($7,8 \pm 0,37$ mg) (animais não tratados) e grupo Veículo ($7,8 \pm 0,37$ mg) (tratados com acetona). O grupo de animais tratados com o óleo essencial de *E. tereticornis* na concentração de 1 mg/orelha teve uma redução significativa de $43,96 \pm 3,20\%$ no peso das orelhas quando comparados com o grupo controle. O grupo tratado com a dexametasona apresentou uma semelhante e também significativa redução, sendo de $41,76 \pm 2,80\%$, quando comparado ao grupo controle. As concentrações de 0,75, 0,5, 0,3 e 0,1 mg/orelha do óleo essencial apresentaram, respectivamente redução de 38,46%, 32,97%, 29,67% e 10,99%.

Figura 19 - Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* (1; 0,75; 0,5; 0,3 e 0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) no peso das orelhas após indução por TPA (2,5 µg/orelha - Controle). Os dados apresentados representam a média ± E. P. M. (n=5-8). A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey. ** $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle. ns foi indicativo de não significância quando comparado ao grupo controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo Veículo.



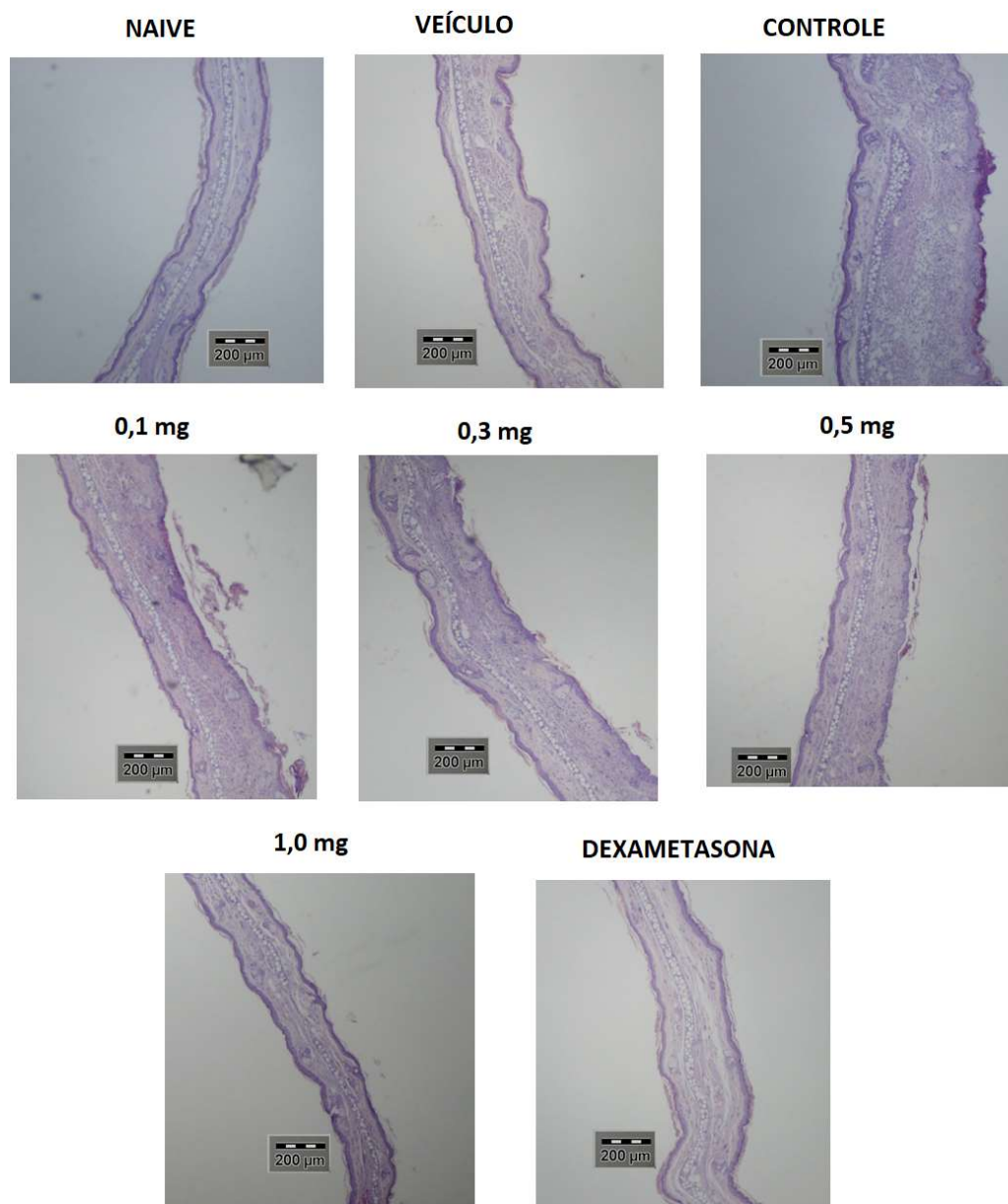
Fonte: A autora.

5.6.3 Análise histológica para avaliação do efeito do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* sobre a migração leucocitária

As amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm), submetidas a indução por aplicação de TPA, foram utilizadas para avaliar o processo de migração leucocitária. Foi realizada a contagem de células (leucócitos) localizadas na derme, após coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-eosina. A contagem permitiu avaliar as mudanças no padrão celular da derme da orelha direita dos camundongos após a aplicação de TPA e os respectivos tratamentos em via tópica.

Além da diferença na migração leucocitária, o edema também pode ser observado por meio da análise histológica das orelhas dos camundongos. A análise por microscopia óptica, 24 h após a indução da inflamação com TPA, revelou aumento na espessura da orelha dos animais, com clara formação de edema. (Figura 20). O edema foi reduzido com a administração tópica de 0,1 a 1,0 mg/orelha do óleo essencial de *E. terenticornis*, bem como por 0,05 mg/orelha de glicocorticoide dexametasona (FIGURA 19). O grupo que recebeu apenas Veículo não mostrou nenhuma mudança, mantendo-se intacto, assim como o Naive.

Figura 20 - Imagens representativas da histologia de cortes transversais das orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 100x, escala de 200 μm) coletadas 24 horas após a aplicação de TPA (2,5 μg /orelha). Grupos: Naive (sem tratamento), Veículo (acetona), controle, Óleo essencial de *E. terenticornis* (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha).

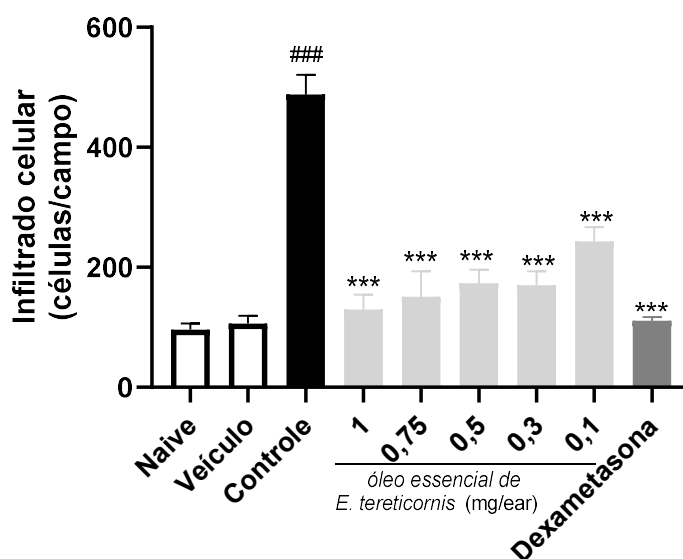


Fonte: A autora.

A indução realizada promoveu aumento significativo no número de células da derme da pele da orelha do grupo controle, que apresentou $487,6 \pm 11,10$ células/campo enquanto o grupo Veículo apresentou $106,2 \pm 4,41$ células/campo. Os animais tratados com

dexametasona apresentaram uma redução significativa de $77,29 \pm 0,43\%$, no número de células, quando comparados com o grupo controle. Os grupos dos animais tratados com o óleo essencial de *E. tereticornis* nas concentrações de 1,0 e 0,75 mg/orelha apresentaram, respectivamente, reduções no número de células de $73,36 \pm 1,69$ e $69,13 \pm 2,93\%$, quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com 0,1 mg/orelha do óleo, que foi a menor concentração, apresentou uma redução no número de células de $50,15 \pm 1,61\%$ (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus tereticornis* (concentrações) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e Veículo (acetona) sobre a migração leucocitária após a indução com aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E. P. M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte) e os cortes corados com Hematoxilina-eosina. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (anova), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo Veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.



Fonte: A autora.

O modelo de Edema de orelha induzido por TPA é um modelo usado para avaliar a resposta inflamatória, uma vez que este agente flogístico induz a inflamação na pele, semelhante a várias doenças de pele (GABOR, 2003). A aplicação tópica do agente flogístico TPA induz uma reação inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema nas primeiras 2 h, que é seguido pelo aumento da espessura da orelha em consequência do extravasamento plasmático. A aderência dos leucócitos polimorfonucleares

(PMN) na parede dos vasos e a degranulação dos mastócitos é verificada entre a quarta e sexta hora. Porém, a infiltração máxima de leucócitos PMN no tecido é atingida somente após 24h da aplicação tópica do TPA (YOUNG; WAGNER; SPIRES, 1983).

As reações desencadeadas pelo TPA são dependentes de ativação de PKC, com ativação adicional de PLA2 que leva ao aumento dos níveis de AA e outros metabólitos, como prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, a fosforilação de NF- κ B e AP-1 por MAPK estão presentes neste modelo, o que resulta no aumento da liberação de citocinas (por exemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-8 e MIP-1 β) e expressão de moléculas de adesão (ICA M, VCAM e E-selectina) (CALIXTO *et al.*, 2004; GÁBOR, 2003; KOLCH, 2005), ocorrendo com isso, a formação de edema e migração de leucócitos na derme (GÁBOR, 2003; CALIXTO *et al.*, 2004; MURAKAWA *et al.*, 2006).

Neste modelo, o tratamento tópico com o óleo essencial de *E. tereticornis* foi capaz de reverter a formação de edema, sugerindo atividade anti-edematogênica do óleo essencial estudado. DÖLL-BOSCARDIN (*et al.* 2012), utilizando a mesma metodologia, de edema de orelha, mostraram que o óleo essencial de *E. benthamii* foi capaz de inibir a formação do edema induzido por TPA com uma inibição máxima de $51 \pm 6\%$ na dose de 0,1 mg/orelha.

Segundo Pongprayoon e colaboradores (1997), os monoterpenoides terpinen-4-ol e α -terpineno inibem significativamente a formação de edema em pata de rato induzido pelo agente flogístico carragenina. Algumas pesquisas têm relacionado a atividade anti-inflamatória aos monoterpenoides, que são os componentes químicos majoritários encontrados nos óleos essenciais de várias espécies vegetais (YAMADA *et al.*, 2013; ESTEVÃO-SILVA *et al.*, 2014; RITTER *et al.*, 2013).

No presente estudo, *p*-cimeno é o componente majoritário do óleo essencial de *E. tereticornis*. Estudos sobre inflamação aguda têm demonstrado ainda a eficácia de diversos monoterpenoides com atividade anti-inflamatória e baixa citotoxicidade. Especificamente, o *p*-cimeno reduziu a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, inibiu a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares, além de estimular a atividade fagocítica de macrófagos e reduzir os níveis da citocina TNF- α sem alterar significativamente os níveis de IL-10 (KUMMER, 2015; DEGENHARDT *et al.*, 2016). De acordo com Chen e colaboradores (2014) e Guerreiro (2015), o *p*-cimeno, timol e o carvacrol são compostos com grande potencial terapêutico para lesão pulmonar aguda e outras doenças pulmonares inflamatórias.

O influxo de células inflamatórias também foi avaliado e os resultados encontrados mostraram que o tratamento com o óleo essencial de *E. tereticornis* foi capaz de reduzir a migração polimorfonuclear para o tecido inflamado.

A inibição da migração de leucócitos é um parâmetro importante a ser avaliado em uma resposta inflamatória, pois os neutrófilos são conhecidos por terem uma alta concentração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e podem estar associados a danos ao hospedeiro (NÉMETH E MÓCSAI, 2012).

Existem vários estudos na literatura mostrando que os neutrófilos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro, principalmente pela habilidade para realizar a fagocitose e gerar ERO para eliminar um possível agente agressor (BRADLEY *et al.*, 1982; SCHAKEL; DOBEL; BOSSELMANN, 2014; WITTMANN; MCGONAGLE; WERFEL, 2014). Além disso, em modelos de inflamação aguda, os neutrófilos são as principais células responsáveis pela produção de ERO.

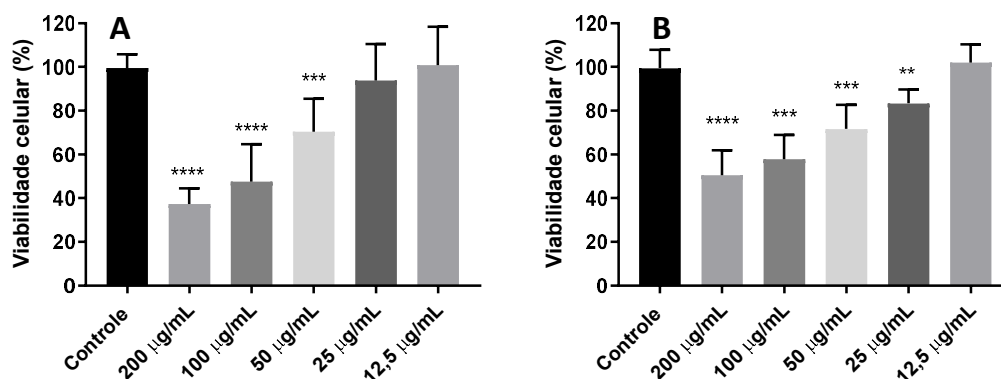
5.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA

O óleo essencial apresentou CI_{50} de $72,32 \pm 11,72 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem não tumoral e $88,60 \pm 30,34 \mu\text{g/mL}$ para a tumoral. Levando-se em consideração o critério do NCI (*National Cancer Institute*) dos EUA, que considera interessante CI_{50} inferior a $30 \mu\text{g/mL}$ para extratos e óleos, os resultados ficaram abaixo das expectativas, pelo menos para essa linhagem tumoral em especial (melanoma). O IS foi de 0,82 e valores abaixo de 1 não são desejáveis, pois significa que foi necessária uma concentração maior do óleo essencial para causar citotoxicidade para a linhagem tumoral em relação a não tumoral.

O efeito do óleo essencial de *E. tereticornis* sobre a viabilidade celular da linhagem não tumoral, fibroblasto murino, 3T3 e linhagem tumoral, melanoma murino, B16F10, nas concentrações de 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ está demonstrado na Figura 22. Utilizando os resultados de viabilidade celular, obtidos por meio do ensaio de redução do MTT, foi calculado o valor de IC_{50} para o óleo essencial de *E. tereticornis* para ambas as linhagens celulares.

Figura - 22

Ensaios de viabilidade celular frente ao óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* utilizando a técnica de MTT. A – linhagem não tumoral, fibroblasto murino, 3T3. B – linhagem tumoral, melanoma murino, B16F10. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão da média, de um experimento realizado em triplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.



Fonte: A autora.

Os produtos naturais com promissoras atividades biológicas requerem ser avaliados não apenas quanto a sua eficácia, mas também em relação a sua toxicidade e segurança para o organismo. Portanto, se torna de suma importância a avaliação da toxicidade celular, pois é essencial que o composto atue de forma seletiva, e com mínimas alterações nas células normais. (BEDNARZUK; VERDAM; MIGUEL, 2010; BLANK, 2013; RAFIQ *et al.*, 2015).

Nos testes de citotoxicidade, são avaliados os efeitos que as moléculas promovem a nível celular, e para tal, são amplamente utilizados os cultivos celulares, que são estabelecidos a partir de células obtidas de tecidos ou órgãos de animais ou seres humanos. (BEDNARZUK; VERDAM; MIGUEL, 2010; BONES; MOLENTO, 2012).

Modelos celulares são ferramentas úteis e de extrema necessidade, para que se possa avaliar o potencial citotóxico de determinadas substâncias, através da sua capacidade de induzir a morte celular (DELGADO *et al.*, 2005). Para o experimento, foi utilizada a linhagem celular B16F10 de melanoma murino, que tem sido frequentemente utilizada em testes laboratoriais, e foi estabelecida por Fidler em 1973. É oriunda do melanoma murino B16, de natureza maligna e metastática. Para o seu desenvolvimento, células foram coletadas de tumor primário subcutâneo de camundongos C57BL/6, e cultivadas em laboratório até a obtenção da linhagem B16F10, que possui comportamento agressivo e capacidade invasiva e metastática. Estas células também são bastante utilizadas para testes *in vivo*, através da inoculação experimental em camundongos para o desenvolvimento de tumores (DA SILVA *et*

al., 2013; VIANA *et al.*, 2017). As células de melanoma são de fácil manutenção em cultivo laboratorial, por sua alta capacidade proliferativa. Desta forma, constituem-se em excelente modelo para avaliar a atividade de agentes antiproliferativos, como os fitoterápicos (LEAL *et al.*, 2003).

Diversas metodologias são utilizadas para avaliação da toxicidade celular, o ensaio do MTT é amplamente utilizado para esta finalidade. Constitui-se em um ensaio colorimétrico, onde, através da redução do sal MTT, avalia-se a atividade enzimática mitocondrial celular, ou a ausência desta, indicando lesão preliminar que culmina com a morte celular. Esse teste é baseado na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem, no meio intracelular, o sal solúvel de tetrazólio a cristais insolúveis de formazan de coloração violeta (MOSMANN, 1983).

O óleo essencial de outras espécies de *Eucalyptus* apresentaram atividades citotóxicas e antitumorais, despertando interesse dos pesquisadores. O óleo essencial extraído de *E. benthamii* demonstrou potencial para gerar apoptose em células de algumas linhagens cancerígenas (DÖLL-BOSCARDIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, os óleos essenciais de *E. sideroxylon* e *E. torquata* apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma hepatocelular e de câncer de mama, e os óleos essenciais de *E. cladocalyx* F.Muell. e *E. camaldulensis*, contra células de leucemia promielocítica e células ECV-304, respectivamente (SOUSA, 2015; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014). Entretanto, *E. saligna* mostrou-se citotóxico tanto para as células Calu-3, como para as células 3T3, não apresentando assim, seletividade contra as células tumorais do estudo (SAULLE, 2018).

5.8 ATIVIDADE REPELENTE

A análise da atividade repelente foi realizada com insetos que foram identificados por um parasitologista da Universidade Estadual de Ponta Grossa como *Ctenocephalides felis*, mostrado na figura 23. As pulgas do gênero *Ctenocephalides* são insetos parasitos mais prevalentes em todo o mundo. Sua classificação taxonômica pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Siphonaptera e família Pulicidae. Duas principais espécies estão incluídas nesse gênero: *C. canis* e *C. felis*. Sua diferenciação pode ser feita por com base em detalhes sutis em sua morfologia e distribuição geográfica (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; MÉNIER; BEAUCOURNU, 1998; RUST, 2017). Essas pulgas são ectoparasitos pequenos, medindo entre um a três milímetros de comprimento, possuem corpo achatado lateralmente,

aparelho bucal picador e pernas adaptadas para o salto (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; SOULSBY, 1986).

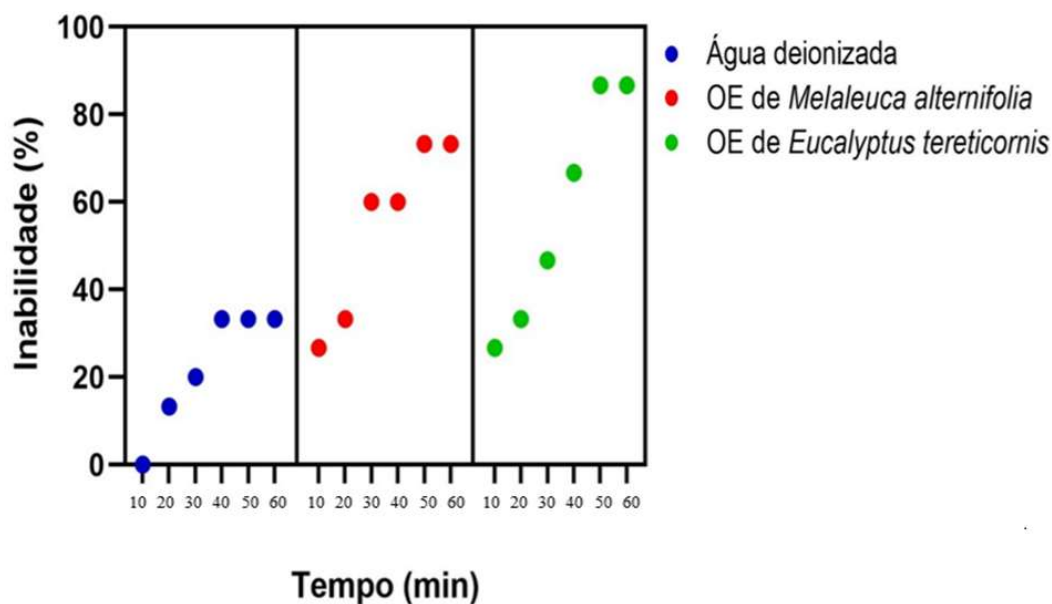
Figura 23 - Imagem de *Ctenocephalides felis*



Fonte: A autora.

O resultado da análise da atividade repelente do óleo essencial de *E. tereticornis* contra *C. felis* está apresentado na figura 24. Foi avaliado o percentual de inabilidade do grupo de insetos expostos ao óleo essencial de *E. tereticornis*, grupo testado e do grupo de insetos expostos ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel, controle positivo. Após uma hora de exposição, o grupo testado apresentou 86,67% de inabilidade dos insetos, e o grupo do controle positivo apresentou 73,33% de inabilidade dos insetos. O grupo do controle negativo foi exposto a água deionizada e apresentou 33,33% de inabilidade ao final do experimento.

Figura 24 - Percentual da inibibilidade dos insetos de *C. felis* em relação ao tempo, quando expostos ao óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* e aos controles



Observação: após análise estatística, os valores não foram significativamente diferentes (ANOVA e pós teste de Tukey).

Fonte: A autora.

Como observado no gráfico acima, e confirmado pela análise estatística, não houve diferença significativa entre a capacidade de causar a inabilidade dos insetos pelo óleo essencial de *E. tereticornis* e pelo óleo essencial de *M. alternifolia*, controle positivo no teste, apesar de visualmente o óleo essencial em teste ter levado mais tempo para alcançar o KT_{50} . A inabilidade dos insetos que foram expostos a água deionizada e contados como KD se deve ao dano físico destes durante o processo de mantê-los dentro da câmara fechada.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, uma explicação pormenorizada da anatomia foliar e caulinar e histoquímica de *Eucalyptus tereticornis* é apresentada. Todas as características anatômicas de *E. tereticornis* devem ser avaliadas para caracterizar a espécie, destacando-se a presença de ceras epicuticulares em forma de crostas em ambas as superfícies foliares, células epidérmicas foliares contendo cristais como agregados de placas, presença de cristais prismáticos em forma de losango e retangulares em vários tecidos, além do mesofilo homogêneo. As análises histoquímicas confirmaram a presença de compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido e elementos lignificados. Novos estudos envolvendo análises anatômicas e filogenéticas de outras espécies de eucalipto são indispensáveis para entender melhor a evolução e taxonomia do gênero.

O perfil químico do óleo essencial de *E. tereticornis* por CG/EM evidenciou 25 compostos, sendo que os principais componentes o *p*-cimeno (46,57%), a criptona (25,24%) e o terpinen-4-ol (5,23%), enquanto que na CCDAE foram encontradas sob luz branca e após derivatização com anisaldeído, quatro bandas intensas, sendo uma banda marrom-rosada com $R_f \sim 0,42$ e três bandas com R_f próximos. Em $R_f \sim 0,29$ foi encontrada uma banda acastanhada, com $R_f \sim 0,25$ uma banda de cor cinza e com $R_f \sim 0,23$ uma banda amarelada. As mesmas bandas foram observadas sob UV 366 nm com cores laranja ou acastanhadas.

Na análise da atividade antimicrobiana, houve inibição do crescimento de todos os microrganismos testados na metodologia de difusão em disco, com resultados mais satisfatórios frente a *C. albicans* e *S. epidermidis*; na metodologia de macrodiluição em caldo, com exceção de *P. aeruginosa*, também foi observada atividade bactericida do óleo essencial frente todas as demais cepas testadas, especialmente contra ESBL *E. coli* e *C. albicans*. Foram obtidas as CIM e CBM na concentração de 312,5 µg/mL frente a *C. albicans* e sugere-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial seja justificada pelo sinergismo entre os compostos presentes no óleo, especialmente os monoterpenos oxigenados.

O óleo essencial de *E. tereticornis* demonstrou atividade biológica, com efeito antioxidante, pelos métodos de redução do radical livre DPPH, redução do complexo fosfomolibdênico e do Ácido Tiobarbitúrico- Espécies Reativas (TBARS).

O óleo essencial de *E. tereticornis* possui atividade anti-inflamatória quando utilizado por via tópica, uma vez que reduziu de forma significativa o edema, o peso do tecido e a migração de células inflamatórias.

Na avaliação da atividade citotóxica, os ensaios de viabilidade celular obtidos por meio de redução do MTT utilizando as linhagens de fibroblasto murino (linha não tumoral - 3T3) e de melanoma murinho (linhagem tumoral - B16F10), mostraram que é o óleo essencial de *E. tereticornis* não tem boas seletividades para a linhagem tumoral testada. Na avaliação da atividade repelente, também foi observado efeito com o óleo sem diluição.

É importante ressaltar que esse estudo evidencia características microscópicas e cromatográficas inéditas, fornecendo dados botânicos e químicos para o controle da qualidade da droga vegetal. Além disso, as características botânicas são úteis na taxonomia do gênero *Eucalyptus* e da família Myrtaceae.

Considerando as atividades biológicas encontradas, é importante realizar ainda estudos toxicológicos *in vivo*, como toxicidade aguda, subcrônica de 28 dias e até ensaios de toxicologia reprodutiva, caso a substância teste em questão seja de interesse de gestantes também. De acordo com os resultados obtidos, há necessidade da continuidade dos estudos a fim de elucidar os mecanismos de ação, além de testar outras atividades para o promissor óleo essencial de *E. tereticornis*.

REFERÊNCIAS

- ABU-SERIE, M. M.; HABASHY, N.H.; ATTIA, W.E. In vitro evaluation of the synergistic antioxidant and anti-inflammatory activities of the combined extracts from Malaysian *Ganoderma lucidum* and Egyptian *Chlorella vulgaris*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 18, p. 1-13, 2018.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**. 4. ed, Carol Stream, Illinois, USA. 2017.
- ALITONOU, G.; AVLESSI, F.; WOTTO, V.D.; AHOUSSE, E.; DANGOU, J.; SOHOUNHLOUÉ, D.C.K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. **Comptes Rendus Chimie**. v. 7, p. 1051–1055, 2004.
- ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; RAESKI, P. A.; URBAN, A. M.; SWIECH, J. N.; MIGUEL, M. D.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Anatomy, micromorphology and histochemistry of leaves and stems of *Cantinoa althaeifolia* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**. v. 83, p. 551-557, 2020
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. In: ALTERTHUM, F. (Ed.), **Trabulsi-Alterthum Microbiologia**. 6. ed. Editora Atheneu. São Paulo, p. 67-78, 2015.
- AMEER, M. R; ZAMAN, S.; KHALID, M.; BILAL, M.; ERUM, S.; HUANG, D.; CHE, S. Optimization of antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* leaf extracts against *Escherichia coli* through response surface methodology. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 376-385, 2016.
- ANDRADE, E. N.; VECCHI, O. **Os Eucaliptos: sua cultura e exploração**. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild; Comp., 225 p., 1918.
- ARANGO, W. M.; RUÍZ, J. M. A.; JARAMILLO, C. A. P. Fungicidal activity of *Eucalyptus tereticornis* essential oil on the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 45, p. 264-274, 2011.
- ARAÚJO, A.C. *et al.* Caracterização socio-econômico-cultural de raizeiros e procedimentos pós-colheita de plantas medicinais comercializadas em Maceió, AL. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 11, n. 1, p. 84-91, 2009.
- ARAÚJO, F.; RIETZLER, A.; DUARTE, L.; SILVA, G.; CARAZZA, F.; VIEIRA FILHO, S. A. Chemical constituents and ecotoxicological effect of the volatile oil from leaves of *Eucalyptus urograndis* (MIRTACEAE). **Química Nova**. v. 33, p. 1510-1513, 2009.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS.
Anuário estatístico da ABRAF 2011: ano base 2010. Brasília, 130 p., 2011.

AUDINO, P. G.; VASSENA, C.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. Effectiveness of lotions based on essential oils from aromatic plants against permethrin resistant *Pediculus humanus capitis*. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, p. 389-392, 2007.

AVISSAR, I.; DROBY, S.; PESIS, E. Characterization of acetaldehyde effects *Rhizopus stolonifera* and *Botrytis cinerea*. **Annals of Applied Biology**, v. 116, p. 213-220, 1990.

AYEPOLA, O. O.; ADENIYI, B. A. The Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, n. 11, p. 1410-1413, 2008.

BABU, G.D.K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* Oil Distillation: A Study on Optimization of 1,8-Cineole Production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 226-231, 2009.

BACHHETI, R. K.; JOSHI, A.; SINGH, A. Oil Content variation and Antimicrobial activity of *Eucalyptus* leaves oils of three different Species of Dehradun, Uttarakhand, India. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 2, p. 625-628, 2011.

BADRIA, F. A.; ABOELMAATY, W. S. Plant Histochemistry: A Versatile and Indispensable Tool in Localization of Gene Expression, Enzymes, Cytokines, Secondary Metabolites and Detection of Plant Infection and Pollution. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**. v. 3, p. 88-100, 2019.

BALESTRIN, L. *et al.* Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 230-235, Jun., 2008.

BARBOSA, L. C. A.; Filomeno C. A.; Teixeira, R. R. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. **Molecules**. v. 21, p. 1671-1686, 2016.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. *et al.* *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. v. 256, p. 2166-2174, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, S. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M D. *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**. v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P.; SASS, J. E. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University, 1976.

BERTOCCO, A. R. P.; MIGACZ, I. P.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; BUDEL, J. M. Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C.D.C. **Microscopy Research and Technique**. v. 80, p. 831-837, 2017.

BLANK, D. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae**. Orientadora: Marlete Brum Cleff. Pelotas, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

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

BONES, V. C.; MOLENTO, C. F. M. Alternatives to the use of laboratory animals in Brazil. **Veterinaria em foco**. v. 10, n. 1, p. 103-112, 2012.

BOOM, E. A.; OROZCO, J. A.; ALEAN, J. D.; ROJANO, B. Evaluación de la Actividad Antioxidante de Aceites Esenciales de Eucaliptos Cultivados en Colombia. **Información Tecnológica**. La Serena, v. 29, n. 6, p. 57-66, 2018.

BOSSOU, A.D.; MANGELINCKX, S.; YEDOMONHAN, H.; BOKO, P.M.; AKOGBETO, M.C.; KIMPE, N.; AVLESSI, F.; SOHOUNHLOUE, D.C.K. Chemical composition and insecticidal activity of plant EOs from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). **Parasites & Vectors**, v. 6, 337 p., 2013.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v. 28, p. 2530, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília. v. 1 métodos gerais. 6. ed. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Investigação e Controle de Bactéria Multirresistentes**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº26**, de 13 de maio de 2014.

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

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

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. 3.ed. Melbourne: Bloomings, 2006.

BROPHY, J. J.; SOUTHWELL, I. A. Eucalyptus chemistry. In: COOPER, J. J. W. **Eucalyptus: The Genus Eucalyptus**. London: Taylor, Francis, p. 102-160, 2002.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants**. Paris: Lavosier, 1993.

BRYANT, P.; TRUEMAN, S. Stem Anatomy and Adventitious Root Formation in Cuttings of Angophora, Corymbia and Eucalyptus. **Forests**. v. 6., p. 1227-1238. 2015.

BUDEL, J. M.; RAMAN, V.; MONTEIRO, L. M.; ALMEIDA, V. P.; BOBEK, V. B.; HEIDEN, G.; TAKEDA, I. J. M.; KHAN, I. A. Foliar anatomy and microscopy of six Brazilian species of Baccharis (Asteraceae). **Microscopy Research and Technique**. v. 81, p. 1–11, 2018.

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

CAAMAL-HERRERA, I. O.; CARRILLO-COCOM, L. M.; ESCALANTE-RÉNDIZ, D. Y.; ARÁIZ-HERNÁNDEZ, D.; AZAMAR-BARRIOS, J. A. Antimicrobial and antiproliferative activity of essential oil, aqueous and ethanolic extracts of Ocimum micranthum Willd leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, p. 1-9, 2018.

CALIXTO, J. *et al.* Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II: modulation of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**. v. 70, p. 93–103, 2004.

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

CAROCHA, V., SOLER, M., HEFER, C., CASSAN-WANG, H., FEVEREIRO, P., MYBURG, A. A., PAIVA, J. A. e GRIMA-PETTENATI, J. Genomewide analysis of the lignin toolbox of Eucalyptus grandis. **New Phytologist**, v.206, p.1297-1313, 2015.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Contact Dermatitis**. v. 45, n. 2, p. 65-7. 2001.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários** 2 ed. UFV: Viçosa, 113 p., 2004.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica** v. 41, n. 2, p.308-314, 2010.

CASTRO, M. A. **Avaliação do potencial fitoquímico das folhas de *eucalyptus tereticornis* smith (myrtaceae) do semiárido nordestino ocorrente no ceará.** Orientadora: Mary Anne Medeiros Bandeira. Fortaleza, 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CAVAGLIERI, M.; PADILHA, T. S.; PRADO, J. M. K. R. Implantação de uma aromateca de óleos essenciais em uma biblioteca especializada. **Revista Ci. Inf. e Doc.** v. 8, n. 2, p. 192-204, 2018.

CERMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of Eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology.** v. 56, p. 89-92, 2008.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry.** Disponível em: <http://www.chemspider.com/Default.aspx>. Acesso em: 15 set 2022.

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

CHIPPENDALE, G. M. Flora of Australia. **Canberra: Australian Government Publishing Service**, v. 19, p. 542, 1988.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of EOs of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of the Congo. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 79, p. 213–220, 2002.

CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** Twenty-third informational supplement, document M100-S24. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

COFFI, K.; SOLEYMANE, K.; HARISOLO, R.; BALO, T.B., CLAUDE, C.J., PIERRE, C., GILLES, F., ANTOINE, A.C., Monoterpene hydrocarbons, major components of the dried leaves volatile oils of five species of the genus Eucalyptus from Côte d'Ivoire. **Natural Sciences.** v. 4, p. 106–111, 2012.

COMMONWEALTH OF AUSTRALIA. **Forest trees of Australia.** 2^a ed. Canberra: Commonwealth Government Printer, 230 p., 1962.

CRANG, R.; LYONS-SOBASKI, S.; WISE, R. **Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants.** Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, New York, 1981.

CRUZ, A. V. M; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CUARON, J. A.; DULAL, S.; SONG, Y.; SINGH, A. K.; MONTELONGO, C. E.; YU, W.; *et al.* Tea tree oil-induced transcriptional alterations in *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 3, p. 390-6, 2013.

DA SILVA, C. F. N.; MELO, G. P.; BERNARDES, S. S.; CECCHINI, A. A. Experimental models of in vivo murine melanoma. **Biosaúde**, v. 15, n. 2, p. 73-80, 2013.

DALEY, J. Head Lice. **The Journal of Complementary Medicine**, p. 22-29, jan/fev, 2007.

DANTAS, F. G. S.; ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; ARAUJO, R. P.; FAVARIN, L. R. V.; CASTILHO, P. F.; GALVÃO, F. O.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CASAGRANDE, G. A.; OLIVEIRA, K. M. P. A Promising Copper (II) Complex as antifungal and antibiofilm drug against yeast infection. **Molecules**, v. 23, p. 1856, 2018.

DAYAL, R.; **Current Science** v. 56, 670 p., 1987.

DE OLIVEIRA, T. M.; DE CARVALHO, R. B. F.; DA COSTA, I. H. F.; DE OLIVEIRA, G. A. L.; DE SOUZA, A. A.; DE LIMA, S. G.; *et al.* Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. **Pharmaceutical Biology England**; v. 53, n.3, p. 423–8, 2015.

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

DELGADO, H. P. *et al.* Evolução da citotoxicidade e genotoxicidade de Argentatins A e B de *Parthenium argentatum*. **Revista life Sciences**, v.77, n.1, 2005.

DEGENHARDT, R. T.; FARIAS, I. V.; GRASSI, L. T.; FRANCHI JR, G. C.; NOWILL, A. E.; BITTENCOURT, C. M. D. S.; WAGNER, T. M.; DE SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; MALHEIROS, A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 56-61, 2016.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**. v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DI PASQUA, R. *et al.* Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, n.5, p. 1040-9, 2010.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage – Myrtaceae**. Orientadora: Tomoe Nakashima. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2009.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; NAKASHIMA, T.; SANTOS, P. E. T.; PAULA, J. F. P. Estudo anatômico e prospecção fitoquímica de folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 29, p. 4-101, 2010.

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

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

DŽAMIĆŽ, A. M.; SOKOVIĆ, M. D.; NOVAKOVIĆ, M.; JADRANIN, M.; RISTIĆ, M. S.; TEŠEVIĆ, V.; MARIN, P. D. Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 51, p. 401-407, 2013.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

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

ELAISSI, A.; ROUIS, Z.; SALEM, N. A. B.; MABROUK, S. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their 87 antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 81, 2012.

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

ESTEVÃO-SILVA, C. F.; KUMMER, R.; FACHINI-QUEIROZ, F. C.; GRESPAN, R.; NOGUEIRA DE MELO, G. A.; BARONI, S., *et al.* Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan. **Journal of Natural Medicines**. v. 68, n. 3, p. 567-75, 2014.

FABROWSKI, F. J. *Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil. Curitiba, 2002, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2002.

FALCI, S. P.; TEIXEIRA, M. A.; CHAGAS, P. F.; MARTINEZ, B. B.; LOYOLA, A. B.; FERREIRA, L. M.; *et al.* Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 30, n. 6, p. 401-6, 2015.

FAWAD, S. A.; KHALID, N.; ASGHAR, W.; SULERIA, H. A. R. In vitro comparative study of *Bougainvillea spectabilis* “stand” leaves and *Bougainvillea variegata* leaves in terms of phytochemicals and antimicrobial activity. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v.10, p. 441–7, 2012.

FILOMENO, C. A.; BARBOSA, L. C. A.; PEREIRA, J. L.; PINHEIRO, A. L.; FIDENCIO, P. H.; MONTANARI, R. M. The chemical diversity of *Eucalyptus* spp. essential oils from plants grown in Brazil. **Chemistry & Biodiversity**. v. 13, p. 1656 - 1665, 2008.

FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 07 nov. 2020.

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

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

FRANCISCONI, R.S.; BORDINI, E.A.F.; NOGUEIRA, M.N.M.; FONTANA, A.; BEDRAN, T.B.L.; CORREIA, M.F.; *et al.* Effect of *Melaleuca Alternifolia* and Its Components on *Candida Albicans* and *Candida Tropicalis*. **Journal of US-China Medical Science**. v. 12, p. 91-8, 2015.

FRANCO, J. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3, p. 191-194, 2005.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, p, 141-144, 1963.

GABE, M. Détection des cations minéraux. **Techniques Histologiques**. Masson et Cie, Paris, France, p. 324, 1968.

GÀBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. and WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**. New Jersey: Humana Press, p.129-131, 2003.

GARCÍA-GODOY, F.; HICKS, M. J. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **Journal of the American Dental Association**. v. 139 Suppl: 25S-34S, 2008.

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

GHAFFAR, A.; YAMEEN, M.; KIRAN, S.; KAMAL, S.; JALAL, F.; MUNIR, B.; SALEEM, S.; RAFIQ, N.; AHMAD, A.; SABA, I.; JABBAR, A. Chemical Composition and in-Vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Seven *Eucalyptus* Species, **Molecules**, v. 20, p. 20487–20498, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, 2007.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MIRANDA, S. C.; DE-CARVALHO, O. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 223-238, 2009.

GONÇALVES, L.A.; BARBOSA, L.C.A.; AZEVEDO, A.A.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 1, p.8-14, 2003.

GOODGER, J. Q. D.; SENERATNE, S. L.; NICOLLE, D.; WOODROW, I. E. Foliar Essential Oil Glands of *Eucalyptus* Subgenus *Eucalyptus* (Myrtaceae) Are a Rich Source of Flavonoids and Related Non-Volatile Constituents. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, e0151432, 2016.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011, disponível em: Acesso em 17 de out. 2021.

GRESSLER, E; PIZO M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUENTHER, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. **The essential oils**. 4.ed., v. 4. New York: Van Nostrand, 1977.

GUERREIRO, M. P. **Avaliação dos efeitos dos constituintes de óleos essenciais (timol, carvacrol e p-cimeno) na inflamação pulmonar aguda induzida por instilação de lps em camundongos**. Orientadora: Carla Maximo Prado. Diadema, 2015. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, 2015.

GUPTA, A.; MAHETA, P.; CHAUHAN, R. *et al.* Simultaneous Quantification of Bioactive Triterpene acids (Ursolic acid and Oleanolic acid) in Different Extracts of *Eucalyptus globulus* (L) by HPTLC Method. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, ed.1, p.179-185, 2018.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irritants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais, importância e perspectivas terapêuticas, In: Yunes RA, e Cechinel Filho V, editors. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmagnosia**. Itajaí: Ed Univale; 303 p., 2007.

HOMEM, I. C. M.; BOBEK, V. B.; SZABO, E. M.; BUDEL, J. M.; RAMAN, V.; OLIVEIRA, V. B.; MIGUEL, O. G. Anatomy and histochemistry of leaf and stem of Brazilian endemic species *Mollinedia clavigera* Tul. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 63 ahead of print, 2020.

HONGCHENG, W.; FUJIMOTOT, Y.; **Phytochemistry** v. 33, 151 p., 1993.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; HUSSAIN SHERAZI, S.T.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**. v. 108, p. 986–995, 2008.

IBÁ - Indústria Brasileira de produtores de Árvores. **Relatório IBÁ 2017 ano base 2016**. Brasília, p.100, 2017. Disponível em:< <http://iba.org/pt/biblioteca-iba/publicacoes>>. Acesso em: 20 de nov. de 2020

IFTIKHAR, A.; QAISER, A.; SYED, H.; MANSOOR, N.; NARGIS, Z.; SARA, K. Leaf anatomical adaptations in some exotic species of *Eucalyptus* L. (Myrtaceae). **Pakistan Journal of Botany**. v. 41, p. 2717-2727, 2009.

ISMAN, M. Pesticides based on plant essential oils. **Pestic Outlook**, v. 10, p. 68-72, 1999.

JANDOUREK, A.; VAISHAMPAYAN, J. K.; VAZQUEZ, J. A. Efficacy of Melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. **AIDS**. v. 12, n. 9, p. 1033-7, 1998.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1966.

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

JUERGENS, U. R.; STOBBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **European Journal of Medical Research**, v. 3, p. 508–510, 1998a.

JUERGENS, U. R.; STOBBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **European Journal of Medical Research**, v. 3, p. 407–412, 1998b.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**. v. 97, n. 3, p. 250-6, 2003.

KAUR, S.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, p. 297–302, 2011.

KAUR, I.P.; GEETHA, T. Screening methods for antioxidants-A Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v.6, p.305-312, 2006.

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

KOCOT, J.; KIEŁCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 7074209, 2018.

KOKUMAI, M.; KONOSHIMA, T.; KAZUKA, M.; HARUNA, M.; ITO, K. J. Euglobal T1, a new Euglobal from *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Natural Products**. v. 54, n. 4, 1082-1086p., 1991

KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 6, p.827-837. 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. N.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Antimicrobial susceptibility testing. **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. v. 5, p. 398-408, Philadelphia – New York: Lippincott, 1997.

KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; CASTRO, N. M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, p. 235-243, 1998.

KUMMER, R. **Efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a resposta inflamatória aguda**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 2015.

KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C.F.; BASTOS, R.L.; SILVA-COMAR, F.M.D.S.; SPIRONELLO, R.A.; ROCHA, B.A., *et al.* Effect of p -cymene on chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors. **International journal of applied research in natural products**. v. 8, n. 2, p. 20–7, 2015.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. 2 ed. NewYork, NY: SpringerScience, p. 225-236, 2008.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 181-196, Florianópolis: UFSC, 2000.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LIMA, E. O.; GUERRA, M. F. L.; SILVA, M. G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 81, n.3-4, p. 95-97, 2000.

LIMA, F.J.; BRITO, T.S.; FREIRE, W.B.; COSTA., R.C.; LINHARES, M.I.; SOUSA, F.C.; *et al.* The essential oil of *Eucalyptus tereticornis*, and its constituents α - and β -pinene, potentiate acetylcholine-induced contractions in isolated rat trachea. **Fitoterapia**. v. 81, n. 6, p.649–655, 2010.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. 291 p., São Paulo: Editora Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000.

LIST, S., BROWN, P. H., WALSH, K. B. Functional anatomy of the oil glands of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 43, p. 329-641, 1995.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDAS, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F.I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia* **Phytochemistry**, v.38, n.2, p.381-389, 1995.

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

LÓPEZ, V.; AKERRETA, S.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J. M.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. In Vitro Antioxidant and Anti-rhizopus Activities of Lamiaceae Herbal Extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 151-155, 2007.

LOTFI, P.; YAGHMAEI, P.; EBRAHIM-HABIBI, A. Cymene and Metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.14, n. 1, 2015.

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

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; GONZALEZ, A.P.; MASUH, H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* EOs. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6083–6087, 2009.

MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASSHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização morfo-anatômica de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**., v. 28, p. 756-761, 2009.

MANFRON, J.; RAMAN, V.; KHAN, I.A.; FARAGO, P.V. Essential Oils of Baccharis: Chemical Composition and Biological Activities. In: FERNANDES, G.W.; OKI, Y.; BARBOSA, M. (ed) **Baccharis**. Springer, Cham, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-83511-8_10. Acesso em: 7 nov. 2020.

MARTINS, M. C.; GARLET, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 438-448, 2016.

MARZOUG, H. N. B.; ROMDHANE, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; COUDERC, F.; ABDERRABA, M.; KHOUJA, M. L.; BOUAJILA, J. *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). **Molecules**, v. 16, p. 1695-1709, 2011.

MAYAUD, L.; CARRICAJÓ, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, p. 167–173, 2008.

MENDES-PINTO, M. M. Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 483, n. 2, p. 236–245, 2009.

MÉNIER, K.; BEAUCOURNU, J. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 883-890, 1998.

MERCHANT, D.; KAHN, R.; MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Broken Arrow: Burgess Publishing, 1964.

MIGACZ, I. P.; RAESKI, P. A.; ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; NISGOSKI, S.; MUNIZ, G. I. B.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Comparative leaf morpho-anatomy of six species of *Eucalyptus* cultivated in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 273-281, 2018.

MOLINA-ROMO, E. D.; GARIBAY-ESCOBAR A.; VALENZUELA-ANTELO O.; RUIZBUSTOS, E.; MARTÍNEZ, J. H., VÉLAZQUEZ, C.; RASCÓN-VALENZUELA, L.A.; ROBLES-ZEPEDA, R. E. Antiproliferative and Apoptotic Activities of the Medicinal Plant *Ziziphus obtusifolia*. **Pharmacognosy Research**, v. 10, p. 55–59, 2018.

MORAIS, S. M. et al. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.27, Ed. esp., p.4050-4063, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**. v.71, p. 331–336, 2006.

NAKATSU, T.; LUPO, A.; CHINN, J.; KANG, R. Biological activity of essential oils and their constituents. *In: Studies in natural products chemistry (Bioactive natural products)*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**. v.143, p. 9–19, 2012.

NOGUEIRA, M. N.; AQUINO, S. G.; ROSSA JUNIOR, C., SPOLIDORIO, D. M. Terpinen-4-ol and α -terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v.63, n. 9, p. 769-78, 2014.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, A. C. M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T. C.; NOGUEIRA, M. N. M.; BEDRAN, T. B. L.; ANDRADE, C. R.; *et al.* Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in

dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p. 492-9, 2011.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo, SP: Atheneu, 2005.

OLOLADE, Z.; OLAWORE, N. O. Phytochemical Characterization, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Nociceptive and Antimicrobial Properties of the Seed Essential Oil of *Eucalyptus tereticornis*. **Greener Journal of Biological Sciences**. v. 8, p. 001-009, 2018.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TABOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

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

PARVEEN, A.; ADAMS, J. S.; RAMAN, V.; BUDEL, J. M.; ZHAO, J.; BABU, G. N. M.; ALI, Z.; KHAN, I. A. Comparative Morpho-Anatomical and HPTLC of *Tinospora* Species and Dietary Supplements. **Planta Medica**., v. 86, n. 7, p. 470-481, 2020.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de Eucalyptus L'Herit (Myrtaceae)**. Orientador: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Viçosa, 2010. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

PEREIRA, J. L.; SILVA, A. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. A.; PINHEIRO, A. L. **Análise quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais de onze espécies de eucalyptus L' Herit (Mirtaceae)**, Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. Disponível em: <http://www.sbq.org.br/34ra/cdrom34ra/resumos/T0583-1.pdf>. Acesso em 7 nov. 2020.

PESSOA, M. M. B. **Avaliação da atividade antidiarreica e antimicrobiana do p-cimeno em modelos experimentais**. Orientadora: Leônia Maria Batista. João Pessoa, 2018. Monografia (Graduação) – Universidade Federal da Paraíba/ Centro de Ciências da Saúde. João Pessoa – PB, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17657>. Acesso em: 10 out. 2021.

PINKARD, E.; GILL, W.; MOHAMMED, C. Physiology and anatomy of lenticel-like structures on leaves of *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus* seedlings. **Tree Physiol.**, v.26, p. 989-999, 2006.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências** (Universidade de São Paulo), p. 1-6, 2017.

PONGPRAYOON, U.; SOONTORNSARATUNE, P.; JARIKASEM, S.; SEMATONG, T.; WASUWAT, S.; CLAESON, P. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: **The essential oil**. **Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 319-322, 1997.

PRETI, D.; ROMAGNOLI, R.; RONDANIN, R.; CACCIARI, B.; HAMEL, E.; BALZARINI, J.; LIEKENS, S.; SCHOLS, D.; ESTEVEZ-SARMIENTO, F.; QUINTANA, J.; ESTEVEZ, F. Design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1- (30,40,50-trimethoxyphenyl)-3-(20-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 1225–1238, 2018.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PROENÇA, C.E.B. *et al.* **Myrtaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB171>. Acesso em: 16 jul. 2022

PUJARTI, R.; FENTIYANTI, P. K. Chemical compositions and repellent activity of *Eucalyptus tereticornis* and *Eucalyptus deglupta* essential oils against *Culex quinquefasciatus* mosquito. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p.19-25, 2017.

QASIM, M.; UDOMLUCK, N.; CHANG, J.; PARK, H.; KIM, K. Antimicrobial activity of silver nanoparticles encapsulated in poly-N-isopropylacrylamide-based polymeric nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 235–249, 2018.

QIU, J *et al.* Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v.6, n.1, jan. 2011, disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016160>. Acesso em 23 out. 2021.

QUANG, T. H.; KIEN, N. D.; VON ARNOLD, S.; JANSSEN, G.; THINH, H. H.; CLAPHAM, D. Relationship of wood composition to growth traits of selected open-pollinated families of *Eucalyptus urophylla* from a progeny trial in Vietnam. **New forests**, v. 39, p. 301- 312, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11056-009-9172-5>. Acesso em: 10 out. 2020.

QUINTANS, J.D.S.S.; MENEZES, P.P.; SANTOS, M.R.V.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.G.S.; GELAIN, D.P.; *et al.* Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, p. 436-440, 2013.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; MOREIRA, J. C. F.; PASQUALI, M. A. B.; RABIE, S. M. S.; PIRES, A. S.; SCHRÖDER, R. *et al.* Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. **ISRN Toxicol**, v. 2013, 2013.

RAFIQ, R. A.; QUADRI, A.; NAZIR, L. A.; PEERZADA, K.; GANAI, B. A.; TASDUQ, S. A. A potent inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen activated protein (MAP) kinase signalling, quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) promotes cell death in ultraviolet (UV)-B-irradiated B16F10 melanoma cells. **PLoS One**, v. 10, n. 7, e0131253, 2015.

RAO, H. S.; SHIVA, M. P.; JAIN, P. P.; **Indian Forester**, v. 96, 135 p., 1970.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250 - 264, 2014.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

RITTER, A. M.; DOMICIANO, T. P.; VERRI, W. A, Jr.; ZARPELON, A. C.; DA SILVA, L. G.; BARBOSA, C. P.; *et al.* Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 187-97, 2013.

RUST, M. K. **The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management**: A Review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

SANTANA, M. F.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; OLIVEIRA, M. G. B.; GUIMARÃES, A. G.; CUNHA, E. S.; MELO, M. S.; SANTOS, M. R. V.; ARAÚJO, A. A. S.; BONJARDIM, L. R. p-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 1138–1143, 2011.

SANTOS, L. D. T.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. **Revista Arvore**, v.32, p. 769-779, 2008.

SANTOS, T. L. D.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; DUARTE, W. M.; TIBURCIO, R. A. S.; MACHADO, A. F. L. Intoxicação de eucalipto submetido à deriva simulada de diferentes herbicidas. **Planta Daninha**, v. 24, p. 521-526, 2006.

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

SAULLE, C.C. **Análise morfoanatômica de folhas e caules e análise química e biológica do óleo essencial de *Eucalyptus saligna* Sm.(MYRTACEAE)**. Orientadora: Jane Manfron Budel. Ponta Grossa, 2018, Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

SAULLE, C. C.; RAMAN, V.; OLIVEIRA, A. V. G.; MAIA, B. H. L. N. S.; MENEGHETTI, E. K.; FLORES, T. B.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Anatomy and volatile oil chemistry of *Eucalyptus saligna* cultivated in South Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 125-134, 2018.

SCHAKEL, K.; DOBEL, T.; BOSSELMANN, I. Future treatment options for atopic dermatitis - small molecules and beyond. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 2, p. 91-100, 2014.

SCHUMACHER, M. V.; CALIL, F. N.; VOGEL, H. L. M. **Silvicultura aplicada**. Santa Maria: UFSM, 120 p., 2005.

SELVARAJ, M.; PANDURANGAN, A.; SESHADRI, K. S.; SINHA, P. K.; KRISHNASAMY, V.; LAL, K. B. Comparison of mesoporous Al-MCM-41 molecular sieves in the production of p-cymene for isopropylation of toluene. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 186, n. 1-2, p. 173–86, 2002.

SHANG, H. M.; ZHOU, H. Z.; YANG, J. Y.; RAN LI, R.; SONG, H.; WU, H. X. In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. **Plos One**, v. 2, p. 1-12, 2018.

SIDDIQUE, S.; PARVEEN, Z.; FIRDAUS-E-BAREEN; MAZHAR, S.; CHAUDHARY, M. N. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of seven eucalyptus species grown in pakistan. **Journal of Animal & Plant Sciences**. v.28, n. 2, p. 222-230, 2018.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277–283, 2003.

SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; SILVA JÚNIOR, F. G. Potential of eleven Eucalyptus species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, p. 467-495, 2007.

SOARES, J. R.; DINS, T. C. P.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M., Antioxidant activity of some extracts of Thymus zygis, **Free Radical Res**. v. 26, p. 469-478, 1997.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Unisinos, 2003.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. México: Interamericana, 823 p., 1986.

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

SUN, L. M.; ZHANG, C. L.; LI, P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6150-6, 2012.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of Eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.1, p.60-64, 2004.

TANTAWY, M. E. Morpho-anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 274-285, 2004.

TEIXEIRA, B., *et al*. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

THEAGARAJAN, K. S.; PRABHU, V. V.; **Indian Journal of Forestry**. v. 6, p. 238, 1983.

THOMSEN, N. A.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V.; BELKUM, A. V.; CARSON, C. F. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of

Staphylococcus spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 343-51, 2013.

TIRLONI, C. A. S.; PALOZI, R. A. C.; TOMAZETTO, T. A.; VASCONCELOS, P. C. P.; SOUZA, R. I. C.; SANTOS, A. C.; ALMEIDA, V. P.; BUDEL, J. M.; SOYZA, L. M.; GASPAROTTO, A. J. Ethnopharmacological approaches to kidney disease-prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 47-57, 2018.

TOLOZA, A. C.; LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H.; PICOLLO, M. I. Interspecific hybridization of Eucalyptus as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7341-7347, 2008.

TOLOZA, A. C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G. M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.

TOMCHINSKY, B. *et al.* Impactos da legislação na pesquisa etnobotânica no Brasil, com ênfase na região amazônica. Amazônica - **Revista de Antropologia**, Botucatu, v. 5, n. 3, p.734-761, 2013.

TRAESEL, G. K.; DIAS MACHADO, C. D.; TIRLONI, C. A. S.; MENETRIER, J. V.; LÍVERO, F. A. R.; LOURENÇO, E. L. B.; OESTERREICH, S. A.; BUDEL, J. M.; GASPAROTTO, A. J. Safety Assessment and Botanical Standardization of an Edible Species from South America **Journal of Medicinal Food**, v. 20, p. 519-525, 2017.

UPTON, R *et al.* **American Herbal Pharmacopeia. Botanical Pharmacognosy—** Microscopy Characterization of Botanical Medicines. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011.

USP XXII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 1990.

USP XXVIII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2005.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization Of The Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, Brasil, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIANA, A. R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; KRAUSE, L. M. F. Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma [Bioactive products in the prevention and treatment of cancer, especially melanoma]. **Disciplinarum Scientia**| Saúde, v. 18, n. 3, p. 511- 528, 2017.

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

XIAO, S.; ZHANG, W.; CHEN, H.; FANG, B.; QIU, Y.; CHEN, X.; CHEN, L.; SHU, S.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; LIANG, G. Design, synthesis, and structure–activity relationships of 2-benzylidene-1-indanone derivatives as anti-inflammatory agents for treatment of acute lung injury. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 887–899, 2018.

WALTER, B.M.T. *Eucalyptus* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB614473>. Acesso em: 16 jul. 2022.

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

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, **Discovery, and Development of New Antibiotics**. Genebra: WHO, 2017.

WILKINSON, H. P. The plant surface Mainly Leaf Part VII: epicuticular wax and its morphology. In: *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Woods in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses* Metcalfe. **C.R. & L. Chalk**. Oxford, Oxon: Clarendon Press, 1979.

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

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

WITTMANN, M.; MCGONAGLE, D.; WERFEL, T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 25, n. 4, p. 443-51, 2014.

WU, C. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, J. J.; SHIEH, J. J.; HUANG, C. H.; LIN, P. S. *et al.* Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

XIE, G.; CHEN, N.; SOROMOU, L. W.; LIU, F.; XIONG, Y.; WU, Q.; *et al.* p-Cymene protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory cell activation. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8159-8173, 2012.

XU, C. Y.; SALIH, A.; GHANNOUM, O.; TISSUE, D. T. Leaf structural characteristics are less important than leaf chemical properties in determining the response of leaf mass per area and photosynthesis of *Eucalyptus saligna* to industrial-age changes in [CO₂] and temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5829-5841, 2012.

YAMADA, A. N.; GRESPAN, R.; YAMADA, Á. T.; SILVA, E. L.; SILVA-FILHO, S. E.; DAMIÃO, M. J. *et al.* Anti-inflammatory Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in

Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 04, p. 913–26, 2013.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.

ZHONG, W.; CHI, G.; JIANG, L.; SOROMOU, L. W.; CHEN, N.; HUO, M. *et al.* p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 529–37, 2012.

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