

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

IZABEL PIETCZAK MIGACZ

MORFOANATOMIA DE PECÍOLOS, PERFIL QUÍMICO SAZONAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE SEIS ESPÉCIES DE *Eucalyptus* L'
HÉR (MYRTACEAE)

PONTA GROSSA

2024

IZABEL PIETCZAK MIGACZ

MORFOANATOMIA DE PECÍOLOS, PERFIL QUÍMICO SAZONAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE SEIS ESPÉCIES DE *Eucalyptus* L'
HÉR (MYRTACEAE)

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Jane Manfron.

PONTA GROSSA

2024

M634 Migacz, Izabel Pietczak
Morfoanatomia de pecíolos, perfil químico sazonal e atividade biológica dos óleos essenciais de seis espécies de *Eucalyptus* L' HÉR (Myrtaceae) / Izabel Pietczak Migacz. Ponta Grossa, 2024.
121 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.

1. Eucalipto. 2. Morfoanatomia. 3. Composição química. 4. Anti-inflamatório. 5. Inseticida. I. Manfron, Jane. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

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

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **09/2024** DA DOUTORANDA **IZABEL PIETCZAK MIGACZ**, REALIZADA NO DIA 09 DE AGOSTO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos nove dias do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, às 9h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência da Profa. Dra. Jane Manfron, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **IZABEL PIETCZAK MIGACZ**, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pela Professora Doutora JANE MANFRON e demais Doutores (membros titulares): ANELISE FORMAGIO (UFGD/MS); FABIANE FORTES (UNESPAR/PR); PATRÍCIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN (UEPG/PR); e ADRIANA YURIKO KOGA (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: **“MORFOANATOMIA DE PECÍOLOS, PERFIL QUÍMICO SAZONAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE SEIS ESPÉCIES DE *Eucalyptus* L’ HÉR (MYRTACEAE)”**. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☐

Novo título: _____


JANE MANFRON
 (UEPG)
 Presidente

 Documento assinado digitalmente
ANELISE SAMARA NAZARI
 Data: 09/08/2024 15:51:22-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

ANELISE FORMAGIO
 (UFGD/MS)
 Titular


PATRÍCIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
 (UEPG/PR)
 Titular

 Documento assinado digitalmente
FABIANE FORTES
 Data: 10/08/2024 23:11:46-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

FABIANE FORTES
 (UNESPAR/PR)
 Titular


ADRIANA YURIKO KOGA
 (UEPG/PR)
 Titular

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais Jose Migacz e Urçulina Pietczak Migacz (*in memoriam*) e aos meus irmãos: Inês Migacz Wasosnik, Hilario Pietczak Migacz e Ivete Pietczak Migacz pela base familiar, educação e amor.

Ao meu esposo Paulo Ricardo Solda, por toda paciência, por acreditar no meu sucesso profissional e me motivar na minha trajetória.

Ao meu amado filho Paulo Ricardo Migacz Solda, por me dar um sentido e amor indescritível a vida e a tudo que eu exerço.

À professora Doutora Jane Manfron, pela dedicação e entusiasmo em tudo que faz. Obrigada por me motivar e acreditar no nosso projeto, por me inspirar como docente, pesquisadora, mãe e ser humano do bem.

A lasmin Lourenço Niza, mais que uma amiga, uma verdadeira entusiasta da pesquisa, que sempre me incentivou para finalização deste trabalho.

Ao viveiro Paraíso Verde pela concessão do Material botânico.

As alunas da Iniciação Científica Vitoria Caroline Gonçalves e Carolina Sabedotti pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacognosia da UEPG e a técnica Luciane Mendes Monteiro por todo suporte prestado a esta pesquisa e aos demais colegas do Laboratório 54.

Ao Laboratório Multiusuários da UEPG, especialmente à técnica Vanessa Parise Chagury que sempre nos auxiliou nas análises de microscopia eletrônica com muito profissionalismo.

À Professora Doutora Anelise Samara Nazari Formagio e seus doutorandos Janaine Alberto Marangoni Faoro e Sidney Mariano dos Santos pela oportunidade e parceria na realização dos experimentos de atividades biológicas (antioxidante e atividade anti-inflamatória) na Universidade Federal da Grande Dourados.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade do Mississippi, Universidade, MS, EUA e CAMAG Scientific, Inc, Wilmington, NC, EUA pelas análises do perfil químico dos óleos essenciais.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa pela graduação em Agronomia, Mestrado e Doutorado. Foram anos de muito aprendizado, gratidão e histórias com muitas memórias afetiva.

Por fim, agradeço a toda e qualquer pessoa ou instituição que contribuiu direta ou indiretamente para a produção deste trabalho. Muito obrigada.

“Quando você é bom para com os outros, é
melhor para com você mesmo”.
(Benjamin Franklin)

RESUMO

Eucalyptus se destaca como o mais cultivado globalmente dentro da família Myrtaceae, com notável semelhança morfológica. Apresenta crescente importância econômica pelos óleos essenciais (OEs) produzidos, aos quais são atribuídas atividades biológicas diversas. Este estudo teve como objetivo investigar a morfoanatomia peciolar, a fitoquímica e as atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de seis espécies de *Eucalyptus*, a saber: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*, coletadas sazonalmente (primavera, verão, outono e inverno). As condições de cultivo e estágio de desenvolvimento das plantas foram padronizadas para todas as espécies. A morfoanatomia foi analisada por métodos usuais de microscopia. Os OEs de folhas foram extraídos por hidrodestilação. O perfil químico foi determinado por CG-EM e CCDAE e as atividades biológicas foram testadas quanto ao efeito antioxidante, ação inseticida (tópico e fumigação) e anti-inflamatória (edema de pata induzido por carragenina, hiperalgesia mecânica, sensibilidade ao frio e pleurisia). O estudo morfoanatômico dos pecíolos evidenciou as seguintes diferenças: tamanho, formato em seção transversal, tamanho de cavidades, disposição e o número de feixes vasculares, além dos morfotipos cristalinos. Os OEs das seis espécies apresentaram variações significativas no teor, na constituição química e na concentração dos compostos voláteis em função da sazonalidade. Os rendimentos variaram entre 0,7-2,43% sendo o maior para *E. badjensis* no verão e o menor para *E. grandis* no inverno. Os constituintes majoritários foram em *E. badjensis* (1,8-cineol), *E. benthamii* (α -pineno e globulol), *E. dunnii* (α -pineno e 1,8-cineol), *E. globulus* (1,8-cineol), *E. grandis* (α -pineno e *o*-cimeno) e *E. saligna* (*o*-cimeno e criptona). A cromatografia em camada delgada de alta eficiência se apresentou como uma técnica rápida para monitorar a composição química. As análises por CG-MS e CCDAE mostraram que diferentes *Eucalyptus* apresentaram composições químicas únicas. Esse achado foi demonstrado na análise de cluster de componentes principais. A análise de inseticida revelou que o OE de *E. benthamii* é o mais potente contra *Cimex lectularius*. Os seis OEs demonstraram atividade antioxidante no modelo ABTS. Os OEs de *E. benthamii*, *E. dunnii* e *E. grandis* mostraram atividades anti-inflamatórias significativas em modelos experimentais testados. Esses achados destacam a importância do estudo dos OEs de *Eucalyptus*, não apenas por sua diversidade química e potencial terapêutico, mas também por sua variabilidade sazonal e especificidade entre as espécies como é ilustrado no estudo anatômico.

Palavras-chave: Eucalipto, morfoanatomia, composição química, anti-inflamatório, antioxidante e inseticida.

ABSTRACT

Eucalyptus stands out as the most cultivated globally within the Myrtaceae family, with notable morphological similarity. It presents growing economic importance due to the essential oils (EOs) produced, which are attributed to diverse biological activities. This study aimed to investigate the petiolar morphoanatomy, phytochemistry and biological activities of essential oils from leaves of six *Eucalyptus* species, namely: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* and *E. saligna*, collected seasonally (spring, summer, autumn and winter). Cultivation conditions and plant development stage were standardized for all species. The morphoanatomy was analyzed using standard microscopy methods. The EOs from the leaves were extracted by hydrodistillation. The chemical profile was determined by GC-EM and CCDAE and the biological activities were tested for insecticidal (topical and fumigation) and anti-inflammatory action (carrageenan-induced paw edema, mechanical hyperalgesia, sensitivity to cold and pleurisy). The morphoanatomical study of the petioles highlighted the following differences: size, cross-sectional shape, size of cavities, arrangement, and number of vascular bundles, in addition to crystalline morphotypes. The essential oils of the six species showed significant variations in the content, chemical constitution and concentration of volatile compounds depending on seasonality. Yields varied between 0.7-2.43%, being the highest for *E. badjensis* in summer and the lowest for *E. grandis* in winter. The major constituents were in *E. badjensis* (1,8-cineole), *E. benthamii* (α -pinene and globulol), *E. dunnii* (α -pinene and 1,8-cineole), *E. globulus* (1,8-cineole), *E. grandis* (α -pinene and *o*-cymene) and *E. saligna* (*o*-cymene and cryptone). High-performance thin-layer chromatography has emerged as a rapid technique for monitoring chemical composition. GC-MS and CCDAE analyzes showed that different *Eucalyptus* had unique chemical compositions. This finding was demonstrated in principal components cluster analysis. Insecticide analysis revealed that *E. benthamii* EO is the most potent against *Cimex lectularius*. The six EOs demonstrated antioxidant activity in the ABTS model. EOs from *E. benthamii*, *E. dunnii* and *E. grandis* showed significant anti-inflammatory activities in tested experimental models. These findings highlight the importance of studying *Eucalyptus* essential oils, not only for their chemical diversity and therapeutic potential but also for their seasonal variability and specificity between species as illustrated in the anatomical study.

Keywords: *Eucalyptus*, morphoanatomy, chemical composition and activity: anti-inflammatory, antioxidant, and insecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvores adultas de <i>Eucalyptus badjensis</i>	23
Figura 2 - Árvore adulta de <i>Eucalyptus benthamii</i>	24
Figura 3 - Árvore adulta de <i>Eucalyptus dunnii</i>	26
Figura 4 - Árvore adulta de <i>Eucalyptus globulus</i>	27
Figura 5 - Árvore adulta de <i>Eucalyptus grandis</i>	29
Figura 6 - Árvore adulta de <i>Eucalyptus saligna</i>	31
Figura 7 - Morfologia de <i>Cimex lectularius</i> em vista dorsal com aumento de 20X	36
Figura 8 - Fluxograma dos estudos.....	39
Figura 9 - Representação das secções do pecíolo de espécies de <i>Eucalyptus</i>	41
Figura 10 - Câmera onde os insetos (<i>Cimex lectularius</i>) foram mantidos em condições controladas de crescimento	47
Figura 11 - Os insetos (<i>Cimex lectularius</i>) em placa de petri após aplicação dos tratamentos	48
Figura 12 - Esquema representativo do delineamento experimental utilizado para avaliação da atividade inseticida tópica sobre <i>Cimex lectularius</i>	49
Figura 13 - Os insetos (<i>Cimex lectularius</i>) em frascos de vidro após aplicação dos tratamentos	49
Figura 14 - Esquema representativo do delineamento experimental utilizado para avaliação da atividade inseticida com fumigação sobre <i>Cimex lectularius</i>	50
Figura 15 - Esquema representativo do modelo experimental anti-inflamatório do edema induzido por carragenina.....	51
Figura 16 - Esquema representativo do modelo experimental de pleurisia	52
Figura 17 - Morfologia de folhas de <i>Eucalyptus</i>	55
Figura 18 - Anatomia de <i>Eucalyptus</i> (pecíolos em secção transversal, porção proximal)	56
Figura 19 - Anatomia de <i>Eucalyptus</i> (pecíolos em secção transversal, porção medial)	57
Figura 20 - Anatomia de <i>Eucalyptus</i> (pecíolos em secção transversal, porção distal)	58
Figura 21 - Reações histoquímicas nos tecidos peciolares das espécies de <i>Eucalyptus</i>	62

Figura 22 - Cristais presentes nos pecíolos de <i>E. badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. grandis</i> e <i>E. saligna</i>	64
Figura 23 - Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) dos cristais nas espécies de <i>E. badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. grandis</i> e <i>E. saligna</i>	67
Figura 24 - Espectroscopia de raios X por mapeamento dos cristais nas espécies de <i>E. globulus</i>	68
Figura 25 - Representação gráfica dos rendimentos médios (% m/v) em função da sazonalidade	69
Figura 26 - Compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sp	81
Figura 27 - Gráfico de análise de agrupamento hierárquico baseado no perfil químico de 24 amostras de óleos essenciais obtidas por análise cromatográfica (GC-MS) de seis espécies de <i>Eucalyptus</i>	84
Figura 28 - Gráfico da análise de componentes principais.....	85
Figura 29 - Comparação de impressões digitais HPTLC sob UV 366 nm (A) e luz branca RT (B) após derivatização com reagente anisaldeído	87
Figura 30 - Efeito da administração oral de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	92
Figura 31 - Efeito de óleos essenciais de <i>E. badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. grandis</i> , <i>E. globulus</i> e <i>E. saligna</i> (10 mg/kg, vo)	93
Figura 32 - Efeitos de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> (10 mg/kg, po), veículo (solução salina) e dexametasona (1 mg/kg por via subcutânea, controle positivo) em modelo de carragenina induzido por acetona	94
Figura 33 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> (10 mg/kg vo), controle (solução salina) e dexametasona (1 mg/kg, por via subcutânea), na migração leucocitária (cel /mL)	95
Figura 34 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> (10 mg/kg, vo), controle (soro fisiológico) e dexametasona (1 mg/kg, via subcutânea) no número de proteínas totais expressas por mg/mL (cada coluna representa a média de 6 animais)....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Posição Sistemática das espécies de <i>Eucalyptus</i>	22
Quadro 2 - Características peciolares das espécies de <i>E. badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. grandis</i> , <i>E. globulus</i> e <i>E. saligna</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Densidade do “Pool” do óleo essencial de <i>E. badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. grandis</i> e <i>E. saligna</i>	71
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos óleos essenciais com as amostras de cada estação de coleta (primavera, verão, outono e inverno).....	72
Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus badjensis</i> , <i>E. benthamii</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. grandis</i> e <i>E. saligna</i> analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020.....	74
Tabela 4 - Atividade antioxidante de OEs de eucalipto pelos ensaios DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoléico.....	88
Tabela 5 - Toxicidade tópica e por vapor induzida por óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> contra <i>Cimex lectularius</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAF	Associação Brasileira dos Produtores de Florestas Plantadas
ANBG	<i>Australian National Botanic Gardens</i>
ANVISA	Agência Brasileira de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CGen	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMAPP	Disfotato de dimetillalil
EBA	<i>Eucalyptus badjensis</i>
EBE	<i>Eucalyptus benthamii</i>
EDU	<i>Eucalyptus dunnii</i>
EGL	<i>Eucalyptus globulus</i>
EGR	<i>Eucalyptus grandis</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EDS	Energia Dispersiva
ESG	<i>Eucalyptus saligna</i>
FAA	Fixador de tecidos vegetais constituído de formal, ácido acético e álcool etílico
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por efeito de campo
H	Hora
IBÁ	Indústria Brasileira de Árvores
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração necessária para reduzir 50% de algo
ICFR	<i>Institute for Commercial Forestry Research</i>
IR	Índice de Refração
ISO	<i>International Standard Organization</i>
L	Litro
m	Metro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mmol	Milimol
nm	Nanômetro
NCNPR	<i>National Center for Natural Products Research</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OEs	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANCs	Plantas Alimentícias Não-Convencionais
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RENASEM	Registro Nacional de Sementes e Plantas
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
V	Volume
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.....	20
3.2 GÊNERO <i>Eucalyptus</i> L'HER.....	21
3.3 ESPÉCIES DE <i>Eucalyptus</i>	22
3.3.1 <i>Eucalyptus Badjensis</i> Beuzev. & Welch	22
3.3.2 <i>Eucalyptus Bentharii</i> Maiden & Cambage	24
3.3.3 <i>Eucalyptus Dunni</i> Maiden.....	26
3.3.4 <i>Eucalyptus Globulus</i> Labill.	27
3.3.5 <i>Eucalyptus Grandis</i> W.Hill.....	29
3.3.6 <i>Eucalyptus Saligna</i> Sm.....	30
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	32
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i> L'HER.....	34
3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i>	35
3.6.1 Atividade Inseticida	35
3.6.2 Processo Inflamatório.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	39
4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	40
4.3 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS.....	41
4.3.1 Microscopia de Luz	41
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG) e Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)	42
4.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL	42
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	43
4.5.1 Determinação da Densidade Relativa	43
4.5.2 Determinação do Índice de Refração (IR)	43
4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	43
4.6.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM).....	43

4.6.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) .	44
4.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	45
4.7.1 Testes antioxidantes.....	45
4.7.1.1 Eliminação de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	45
4.7.1.2 Atividade de eliminação ABTS•+	46
4.7.1.3 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	46
4.7.2 Atividade Inseticida: Criação dos Insetos	47
4.7.3 Atividade Inseticida: Bioensaio Tópico	48
4.7.4 Atividade Inseticida: Bioensaio de Fumigação	49
4.7.5 Atividade Anti-Inflamatória: Animais.....	50
4.7.6 Atividade Anti-Inflamatória: Edema de Pata Induzido Por Carragenina	51
4.7.7 Atividade Anti-Inflamatória: Modelo de Pleurisia	51
4.7.8 Atividade Anti-Inflamatória: Hiperalgesia Mecânica	52
4.7.9 Atividade Anti-Inflamatória: Estimulação Térmica a Frio	53
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DOS PECÍOLOS.....	55
5.2 VARIAÇÕES SAZONAIS NO TEOR DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i>	
68	
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	71
5.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	72
5.4.1 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa.....	72
5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	83
5.6 CROMATOGRAPHIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA	86
5.6.1 Atividade Antioxidante	88
5.6.2 Atividade Inseticida Contra <i>Cimex Lectularius</i> L.	89
5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	91
5.7.1 Edema, Hiperalgesia Mecânica e ao Frio Induzidos por Carragenina em Pata de Camundongos	91
5.7.2 Migração de Células Pleurais e Exsudação de Proteínas	95
6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS.....	100
APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	117
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	120

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e seus derivados é uma das formas terapêuticas mais antigas, sendo utilizada para o tratamento, cura e prevenção de doenças. O conhecimento do uso tradicional de plantas para este fim, contribui para o desenvolvimento de fitofármacos. Este interesse por produtos oriundos de plantas também está relacionado ao uso de medicamentos sintéticos, ao alto custo e à falta de acesso de grande parte população ao tratamento farmacológico convencional (Gilroy *et al.*, 2004; Calixto, 2005). Estudos mostram que 64% dos medicamentos disponíveis são oriundos de produtos naturais (Valli *et al.*, 2013).

Devido ao crescente uso de produtos naturais, o Brasil tem desenvolvido ações para ampliar a prática do uso e cuidados da saúde utilizando plantas medicinais. Como exemplo, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) que estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações com os objetivos de garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2006).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), criada pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2009, é uma ferramenta essencial para promover a integração das plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS). A lista inclui 71 plantas que possuem potencial farmacológico e terapêutico, com o objetivo de assegurar a utilização segura e eficaz dessas plantas em práticas de saúde pública. Dentre as espécies incluídas na lista destaca-se *Eucalyptus globulus* Labill.

As espécies de *Eucalyptus* L'Hér., conhecidas popularmente como eucalipto, compreende cerca de 800 espécies (Flores *et al.*, 2016), tendo atenção de pesquisadores e ambientalistas em todo o mundo por serem uma fonte de madeira em rápido crescimento e uma fonte de óleo essencial usado para múltiplos propósitos. É o gênero mais importante de Myrtaceae, e atualmente lidera como mais cultivado do mundo, principalmente no seu centro de origem na Austrália (Flores *et al.*, 2016).

No Brasil, as plantações de *Eucalyptus* ocupam 6,97 milhões de hectares e estão localizadas principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul, e atualmente representa o gênero de plantas mais cultivado do mundo (IBÁ, 2020).

Extensas áreas de cultivo aliadas à exploração madeireira resultaram no grande acúmulo de folhas e caules descartadas no solo, causando problemas

ambientais significativos associados à alelopatia. Diversos estudos indicam que os óleos essenciais (OEs) de *Eucalyptus* podem impedir significativamente o crescimento e o desenvolvimento de sementes de diversas plantas, representando uma ameaça à progressão das culturas agrônômicas e ao surgimento de outras espécies no bioma (Jasrotia *et al.*, 2023).

A exploração de OEs de *Eucalyptus* é uma alternativa altamente sustentável, pois utiliza um bioproduto que geralmente é descartado durante o processo de corte das árvores para extração da madeira (Birtchnell; Gibson, 2006; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016). Nesse contexto, os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) são um chamado global pela Organização das Nações Unidas (ONU). A descoberta de novas aplicações para os OEs de diferentes espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil pode contribuir para o segundo objetivo, que trata da agricultura sustentável (Jasrotia *et al.*, 2023).

O potencial medicinal de espécies do gênero *Eucalyptus* está principalmente ligado à presença majoritária de um componente do OE, o 1,8-cineol (eucaliptol). Todas as espécies de *Eucalyptus* estudadas até o momento possuem OEs em suas folhas, caules e flores (Vitti; Brito, 2003).

Contudo, no que diz respeito aos OEs de *Eucalyptus*, há muito ainda a ser explorado, uma vez que dentre as mais de 800 espécies deste gênero, cerca de apenas 300 espécies foram avaliadas quanto à produção, teor e composição química sendo que destas somente cerca de 20 delas são exploradas comercialmente para a produção de OEs (Limam *et al.*, 2020; Santos, 2021). Esse fato, representa uma lacuna no âmbito da pesquisa para outras espécies do gênero com potencial químico e biológico (Brooker; Kleinig 2006; Almas *et al.*, 2021; Flores *et al.*, 2016; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016; Limam *et al.*, 2020; Panikar *et al.*, 2021).

Espécies de *Eucalyptus* apresentam similaridade morfológica e anatômica e apresentam heterofilia em folhas o que dificulta a identificação botânica. Neste contexto, as análises morfoanatômicas têm se mostrado importantes para a diferenciação das espécies do gênero (Malinowski; Nakashima; Alquini, 2009; Döll-Boscardin *et al.*, 2010; Migacz *et al.*, 2018; Saulle *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021; Brito *et al.*, 2021; Migacz *et al.*, 2022).

Os OEs presentes em espécies de *Eucalyptus* têm sido avaliados biologicamente e muitos efeitos têm sido demonstrados, a exemplo de anti-inflamatório (Boscardin, 2012; Belkhodja *et al.*, 2022), antibacteriano (Sebei *et al.*,

2015) e inseticida (Döll-Boscardin *et al.*, 2009; Döll- Boscardin *et al.*, 2010, Goodger *et al.*, 2016; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016) e anti-viral (Panikar *et al.*, 2021).

O 1,8-cineol (eucaliptol), composto majoritário do OE de *Eucalyptus globulus* é amplamente utilizado para combater microrganismos patogênicos e possui ações antialérgicas e anti-inflamatórias comprovadas (Liapi *et al.*, 2007; Batish *et al.*, 2008; Goldbeck *et al.*, 2014; Juergens *et al.*, 2014).

Medicamentos comerciais, como Soledum® (100 mg de 1,8-cineol), são usados no tratamento de bronquite, sinusite e outras doenças respiratórias (Chandorkar *et al.*, 2021), e produtos como Vicks VapoRub™ são amplamente utilizados para aliviar a congestão nasal, tendo 1,8-cineol como componente ativo (Asif *et al.*, 2020).

As atividades biológicas dos OEs são altamente dependentes da sua composição química (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016) e vários estudos têm mostrado diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos químicos dos OEs em *Eucalyptus*, especialmente relacionados a fatores edafo-climáticos e ambientais incluindo a sazonalidade (Gilroy *et al.*, 2004; Calixto, 2005; Toloza *et al.*, 2006; Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Mossi *et al.*, 2011; Bett *et al.*, 2016; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

Os OEs de eucalipto podem conter outros compostos com atividades farmacológicas, como o α -terpineol com efeitos analgésicos, antimicrobianos e antinociceptivos (Park *et al.*, 2012) e o D-limoneno com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Zahi *et al.*, 2015).

Face ao exposto, considerando a variação da composição química e o potencial biológico dos OEs de espécies de *Eucalyptus*, objetivou-se analisar o perfil químico e atividades anti-inflamatórias e inseticidas dos OEs de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*, a fim de caracterizá-los quimicamente nas quatro estações do ano e verificar as referidas atividades biológicas. Além de analisar morfoanatomicamente os pecíolos, contribuindo para diferenciação e diagnose das espécies do gênero.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise química sazonal comparativa e verificar as atividades biológicas dos OEs de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus grandis* W.Hill, *Eucalyptus globulus* Labill. e *Eucalyptus saligna* Sm., além de caracterizar morfoanatomicamente os pecíolos dessas espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os caracteres morfoanatômicos peciolares por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura;
- b) Caracterizar histoquimicamente os pecíolos;
- c) Determinar os morfotipos cristalinos e a composição química elementar dos cristais presentes nos pecíolos;
- d) Determinar o teor e identificar perfil químico dos OEs presentes nas folhas na primavera, verão, outono e inverno, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE);
- e) Quantificar as propriedades físico-químicas dos OEs presentes nas folhas;
- f) Avaliar a atividade antioxidante frente os métodos DPPH; ABTS e ácido linoleico;
- g) Verificar atividade inseticida dos OEs extraídos de folhas contra *Cimex lectularius*;
- h) Avaliar a atividade anti-inflamatória dos OEs extraídos de folhas, pelo modelo edema de pata induzido por carragenina;
- i) Realizar a contagem de leucócitos e quantificar as proteínas totais pelo ensaio de pleurisia, utilizando de OEs extraídos de folhas;
- j) Apurar a atividade antinociceptiva dos OEs extraídos de folhas, pelo modelo de hiperalgesia mecânica;
- k) Analisar a sensibilidade ao frio pelo teste da acetona, utilizando OEs extraídos de folhas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS

Myrtaceae Juss pertence à ordem Myrtales e compreende 140 gêneros e 6000 espécies (Wilson *et al.*, 2011 *apud* Flora do Brasil, 2024) e distribui-se nas regiões tropicais e subtropicais do globo, com picos de diversidade na América do Sul, Austrália e sudeste da Ásia, além de certa representatividade na África (Flora do Brasil, 2024).

As espécies são cultivadas com finalidade ornamental, pelos frutos comestíveis, para madeira e lenha ou como fonte de essências de valor comercial. Espécies de Myrtaceae quase sempre apresentam proantocianinas e usualmente, possuem ácidos gálico e elágico. Às vezes, produzem saponinas e raramente compostos cianogênicos (Cronquist, 1981).

Os OEs encontrados podem ser formados por monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e polifenóis. Esses metabólitos estão presentes em abundância, dispersos e em cavidades secretoras, que ocorrem na maioria ou em todos tecidos sem lignina. Também estão presentes células contendo compostos fenólicos, de modo disperso, e cristais de oxalato de cálcio encontrados na forma solitária ou agrupados nas células dos tecidos parenquimatosos (Cronquist, 1981).

Myrtaceae apresenta várias espécies com frutos carnosos comestíveis e por esta razão são encontradas em cultivo para fins alimentares e medicinais. Cada região brasileira apresenta potencial para exploração para espécies distintas. Na região amazônica é o araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh), no sudeste brasileiro são comuns as jabuticabas (*Plinia* spp.) e na região sul bem comum são o guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) e a goiaba-serrana (*Feijoa sellowiana* O. Berg). Por fim, a goiaba (*Psidium guajava* L.) é cultivada com fins alimentares ao longo de todo o território brasileiro, sendo uma espécie amplamente adaptada no país. Na região do cerrado, a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) é conhecida na cultura popular, pelos frutos com potencial laxativo (Flora Do Brasil, 2024).

Atualmente surgem interesse crescente para cultivo de outros gêneros com potencial para as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs). Como exemplo: *Eugenia* spp., *Campomanesia* spp., *Myrciaria* spp. e *Psidium* spp. (Lima; Silva;

Lavoranti, 2011). Um dos maiores gêneros com expressiva importância comercial de Myrtaceae é *Eucalyptus* (Flores *et al.*, 2016).

3.2 GÊNERO *Eucalyptus* L'HER

As plantas denominadas popularmente de eucalipto são um grande grupo de espécies que juntas formam um dos maiores gêneros de plantas do planeta, formalmente denominados de *Eucalyptus*, descrito por L' Hérítier em 1789 (Flores *et al.*, 2016). O nome "*Eucalyptus*" deriva do grego "*eu*", que significa bem, e "*kalypto*", que significa cobrir, em referência ao opérculo que cobre as sementes até que estejam completamente desenvolvidas (Guenther, 1977; Brooker; Kleinig, 2006; Flores *et al.*, 2016).

O gênero *Eucalyptus* é composto por mais de 800 espécies, onde somente quatro não ocorrem naturalmente na Austrália, sendo nativas da Indonésia, Filipinas, Nova Guiné e Timor Leste, respectivamente: *Eucalyptus deglupta* Blume, *E. orophila* L.D. Pryor, *E. urophylla* S.T. Blake e *E. wetarensis* L.D. Pryor (Flora do Brasil, 2024).

Eucalyptus apresenta diversas finalidades comerciais: produção da madeira, produção de celulose e papel, e suas folhas são utilizadas para extração de OE. Logo, *Eucalyptus* é o gênero mais cultivado do mundo (IBÁ, 2020) devido a sua importância socioeconômica e facilidade de adaptação nos diversos ambientes (Brooker; Kleinig, 2006; Burrows *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2016).

No Brasil, as plantações de eucalipto ocupam 6,97 milhões de hectares e estão localizadas principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul posicionando o Brasil como o maior produtor mundial de eucalipto, seguido pela Índia e China (IBÁ, 2020). Várias espécies de eucalipto são morfologicamente semelhantes e chamadas pelo mesmo nome comum de "eucalipto", causando confusões na identificação. Por exemplo, *E. saligna* é frequentemente confundido com *E. deanei* Maiden, *E. dunnii* Maiden, *E. grandis* W.Hill ou *E. botryoides* Sm (Flores *et al.*, 2016).

O gênero apresenta uma característica peculiar e muito incomum que é ampla adaptação a vários ambientes, pois encontram-se espécies desde regiões tropicais (latitude de 43°S), até temperadas (latitude 43°S), de regiões extremamente úmidas, com chuvas de médias anual superior a 3.000 mm, a regiões extremamente secas, onde a chuva média anual é inferior a 30 mm, e desde o nível do mar em regiões litorâneas até regiões montanhosas de picos e nevascas (Flores *et al.*, 2016). Consequentemente toda essa diversidade e adaptação resultou em um gênero de

plantas com grande similaridade morfológica principalmente em folhas (Migacz *et al.*, 2018) e muito complexa, sendo possível encontrar espécies arbóreas com até 90 m de altura e pequenos arbustos com 40 cm, já em estado reprodutivo (Flores *et al.*, 2016).

Todas as características de diferenciação de espécies são muito importantes (Santos *et al.*, 2008; Migacz *et al.*, 2018), uma vez que a morfologia de troncos, folhas, inflorescências, flores, frutos e sementes merecem destaque sob o ponto de vista de identificação das espécies, sendo um grande desafio até para taxonomistas especialistas no gênero (Flores *et al.*, 2016).

Espécies de *Eucalyptus* são aromáticas e armazenam OEs em cavidades secretoras presentes em folhas e caules (Vitti; Brito, 2003; Migacz *et al.*, 2018; Saulle *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021; Brito *et al.*, 2021).

Os OEs têm sido foco de pesquisas que avaliam a aplicabilidade comercial destes, uma vez que provém do aproveitamento da serapilheira que é descartada na mata quando ocorre o corte da madeira de *Eucalyptus*. Sendo, dessa forma considerada uma atividade sustentável pela utilização de um bioproduto, principalmente da indústria madeireira.

3.3 ESPÉCIES DE *Eucalyptus*

A posição sistemática das espécies de *Eucalyptus*, analisadas neste trabalho está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Posição Sistemática das espécies de *Eucalyptus*

Sistema de Cronquist	
Divisão	II Magnoliophyta
Classe	1° Magnoliopsida
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae Juss.
Gênero	<i>Eucalyptus</i> L'Hér.
Espécie	<i>Eucalyptus bajjensis</i> Beuzeville & Welch <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden & Cambage <i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden <i>Eucalyptus grandis</i> W.Hill <i>Eucalyptus globulus</i> Labill <i>Eucalyptus saligna</i> Sm.

Fonte: A autora

3.3.1 *Eucalyptus Badjensis* Beuzev. & Welch

Eucalyptus badjensis apresenta o nome originário de “Badja” que significa depois de uma montanha proeminente. É uma árvore de tamanho médio a alto (Figura

1), com imperfeições nas cascas do tronco, sendo estas mais suaves na parte superior do vegetal.

Figura 1 - Árvores adultas de *Eucalyptus badjensis*



Fonte: ANBG (2022)

Muito utilizada para sombra e abrigo, possui uma madeira de boa qualidade, de cor pálida e moderadamente durável; possui frutos e flores geralmente de pequeno tamanho, sendo a floração entre fevereiro e março. Essa espécie é um híbrido de *E. nitens* Maiden com *E. viminalis* Labill., sendo nativa da região leste da Austrália. Devido a sua similaridade morfológica com *E. viminalis*, a espécie só foi reconhecida próximo ao ano 2000, apresentando uma madeira de qualidade superior à *E. viminalis* (Higa; Higa; Alves, 2002).

Ocorre principalmente na região sudoeste de Nova Gales do Sul, Austrália, entre 36° e 36°45'S, em altitudes que variam de 800 a 1200 m. É considerada uma região de clima temperado subúmido que apresenta temperatura média máxima, no mês mais quente, entre 22° e 25°C, e média mínima, na época mais fria, de -4° a 0°C. Estudos realizados no Sul do Brasil, mais precisamente em Santa Catarina e Paraná, têm mostrado que *E. badjensis* possui grande resistência a geadas, alta taxa de crescimento e grande potencial para produção de OEs (Higa; Higa; Alves, 2002).

No Brasil teve rendimento de 2,8% de OE, sendo que o componente majoritário foi 1,8-cineol (67%). Em cultivo no Uruguai forneceu um rendimento em OE de 1,25%, tendo concentração de 86% de 1,8-cineol. Na Austrália há relatos que a mesma planta

chega a render 2,8% de óleo essencial, com 70% de 1,8-cineol em sua composição (Ghazghazi *et al.*, 2019). Adicionalmente, *E badjensis* apresentou propriedade inseticida contra *Aedes Aegypti* e *Haematobia irritans* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

3.3.2 *Eucalyptus Benthamii* Maiden & Cabbage

Eucalyptus benthamii é uma árvore considerada moderadamente alta, atingindo aproximadamente 35 m de altura (Figura 2). É originária da Austrália, mais especificamente da região de Camden. Tem uma distribuição limitada na costa leste de Nova Gales do Sul, sendo que a maior ocorrência é verificada no sudoeste de Sydney, nas planícies do Rio Nepean e de seus afluentes (Nisgoski; Muñiz; Klock, 1998).

Figura 2 - Árvore adulta de *Eucalyptus benthamii*



Fonte: ANBG (2022)

No continente australiano, *E. benthamii* floresce, principalmente, de abril a maio. Contudo, botões florais podem ser encontrados durante o ano inteiro, com exceção do mês de fevereiro. Frutos maduros podem ser colhidos durante os meses de abril a junho e de outubro a dezembro. No entanto, o florescimento e a frutificação podem variar consideravelmente entre os indivíduos da espécie.

Eucalyptus benthamii é conhecido popularmente na Austrália como “camden white gum” e apresenta bom desenvolvimento em planícies de rios ou ladeiras brandas (Nisgoski; Muniz; Klock, 1998). Na África do Sul, essa árvore é considerada promissora para o plantio em regiões com geadas frequentes e foi incluída no programa de melhoramento do *Institute for Commercial Forestry Research* (ICFR) a partir de 1994 (Higa; Pereira, 2003).

No Brasil, esse táxon tem ganhado notoriedade, em função da alta capacidade de rebrota e da resistência elevada ao frio, suportando temperaturas de até -6 °C na fase inicial de desenvolvimento (Lima; Goldenberg; Sobral, 2011; Higa, 1999). Em ensaios realizados com diferentes representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de desenvolvimento mais acelerado do gênero (Higa, 1999).

Morfologicamente, *E. benthamii* apresenta casca persistente e fina, compacta e tende a formar pequenas tiras longitudinais, as quais são aderentes apenas em parte. As folhas são opostas e sésseis quando jovens, as cavidades são frequentes, espalhadas em tecidos da folha e do pecíolo. Folhas adultas são alternas, lanceoladas; verdes, algumas com textura fina. Inflorescência axilar, 4-7 flores, pedúnculos com 0,5 cm de comprimento, pedicelos com 0,25 cm. Botão floral oval a clavado, no Sul forma opérculos hemisféricos e subglaucos, no Norte apresenta forma cônica e dificilmente glauco (Nisgoski; Muñiz; Klock, 1998; Flores *et al.*, 2016).

Um estudo desenvolvido para verificar o potencial de extração de OEs, a partir de onze espécies de eucalipto, foram observados valores de rendimento de 0,40 e 0,35% nas folhas frescas de *E. benthamii*, colhidas nos meses de outono e de verão, respectivamente (Silva; Brito; Silva Júnior, 2006). Döll-Boscardin *et al.* (2010) obtiveram valores de rendimento de 1,13 a 1,38% para o OE de folhas jovens e adultas de *E. benthamii*.

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o α -pineno foi caracterizado como o constituinte majoritário do OE de *E. benthamii*. A partir de folhas coletadas nos meses de outono, inverno, primavera e verão, respectivamente, foram encontradas concentrações de 47,6; 26,4; 24,2 e 34,7% desse componente (Silva; Brito; Silva Júnior, 2006). Considerando o rendimento de OE e a produção de α -pineno, o OE de *E. benthamii* tem alto valor econômico (Higa; Pereira, 2003; Lima; Silva; Lavoranti, 2011; Silva *et al.*, 2015).

Considerando os estudos de atividade biológica, destacam-se as propriedades inseticidas frente à *Sitophilus zeamais* (Mossi *et al.*, 2011), *Pediculus humanus capitis* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016) e atividade antimicrobiana frente às cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de *Candida albicans* (Döll- Boscardin *et al.*, 2012; Elaissi *et al.*, 2012).

3.3.3 *Eucalyptus Dunnii* Maiden

Eucalyptus dunnii é popularmente denominado de goma branca de Dunn, goma branca ou eucalipto (Figura 3) e o nome do epíteto foi dado em homenagem à William Dunn, engenheiro florestal que descobriu a espécie (ANBG, 2022).

Figura 3 - Árvore adulta de *Eucalyptus dunnii*



Fonte: ANBG (2022)

É uma espécie de ocorrência restrita na região nordeste de Nova Gales do Sul e sudeste de Queensland, Austrália, habitando regiões entre as latitudes de 28 a 30° e altitudes de 150 a 800 m, com precipitação pluviométrica média anual variando de 800 a 1.500 mm e com chuvas concentradas no verão. Ainda, a temperatura média das máximas do mês mais quente compreendida entre 27 a 29 °C, e a média das mínimas do mês mais frio em torno de 8 °C, o período de seca não ultrapassa a 3

meses e ocorre geralmente no inverno *E. dunnii* é considerada uma das espécies com maior crescimento na Austrália, entre os eucaliptos (Flores *et al.*, 2016).

Eucalyptus dunnii apresenta árvores com altura entre 30 e 45 m com tronco ereto e cilíndrico. No Brasil é cultivada extensivamente na região do planalto catarinense e paranaense, apresentando tolerância ao frio dessas regiões (Lorenzi *et al.*, 2003). Apresenta propriedade inseticida para *Aedes aegypti*, *Blattella germanica*, *Pediculus humanus capitis* e *Sitophilus zeamais* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

3.3.4 *Eucalyptus Globulus* Labill.

Eucalyptus globulus é uma espécie nativa da Austrália e Tasmânia e amplamente cultivada no sul e sudoeste da China, especialmente nas províncias de Yunnan e Jiangxi, onde foi introduzida em 1890. A espécie se adaptou muito bem a praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 4), sendo amplamente distribuída na África do Sul, Índia, Sul da Europa e Brasil (IBÁ, 2017).

Figura 4 - Árvore adulta de *Eucalyptus globulus*



Fonte: ANBG (2022)

No Brasil, a espécie *E. globulus* é conhecida principalmente como eucalipto, eucalipto-comum e eucalipto-limão sendo sua monografia descrita na 6a edição da

Farmacopéia Brasileira de 2019, volume II. O nome do epíteto científico deriva do latim *globulus*, remetendo a um globo ou bola que corresponde à forma do fruto.

É uma árvore de médio a grande porte, com cerca de 40 m. As folhas jovens são opostas, sésseis, ovaladas a lanceoladas, glaucas, apresentam cor pálida na superfície abaxial e o ramo quadrangular. As folhas adultas são de coloração verde-escura, alternas, pecioladas, geralmente curvas e lanceoladas. A casca apresenta coloração azul-acinzentada a cinza-esbranquiçada (Silva *et al.*, 2020).

Utilizando folhas frescas, Daroui-Mokaddem *et al.* (2010) obtiveram rendimento de 2,5% de OE, por hidrodestilação, enquanto Cimanga *et al.* (2002) encontraram 1,87% de rendimento do OE. O principal constituinte do OE derivado de folhas frescas desta espécie é 1,8-cineol, superior a 80% (Vitti; Brito, 2003).

Eucalyptus globulus é cultivado em vários locais e é a principal fonte comercial de 1,8-cineol. Concentração superior a 80% é encontrada em estudos realizados no Brasil no estado de Minas Gerais e no estado do Ceará (Copping; Duke, 2007). Alto teor de 1,8-cineol também foi encontrado na Austrália (81,1%–90,0%), Indonésia (86,5%), Montenegro (85,8%); Itália (84,9) e Índia (81,9%) (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

O material vegetal de interesse farmacológico engloba as partes aéreas (folhas, flores e frutos) e as cascas do caule da planta, sendo utilizada na medicina popular no combate a gripes e resfriados. A principal forma de utilização da planta se dá por inalação do infuso ou decocto de folhas e cascas, respectivamente (Kareru *et al.*, 2007; Brasil, 2019).

Atualmente vários estudos vêm sendo realizados, testando propriedades inseticidas de *E. globulus*, a exemplo propriedade larvicida dos OEs para controlar o agente etiológico causador da dengue, da chikungunya e dos vetores de Zika (Ríos; Stashenko; Duque, 2017). Apresenta propriedade acaricida para *Boophilus microplus* (Chagas *et al.*, 2002).

Barbosa, Filomeno e Teixeira (2016) descrevem inúmeras atividades antibacterianas frente à *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter diversus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri* e

Streptococcus pyogenes. Derwich, Benziane e Boukir (2010) demonstraram a eficiência antimicrobiana de *E. globulus* contra cepas Gram-negativas de *E. coli* e Gram-positivas de *S. aureus* e *S. intermedius*.

3.3.5 *Eucalyptus Grandis* W.Hill

Ocorre naturalmente na Austrália, ao norte do estado de Nova Gales do Sul, e ao sul de Queensland (próximo à região costeira e na parte central), e ao norte de Queensland em áreas de altitude (300 a 900 m). Adapta-se desde o nível do mar até 1.100 m de altitude. Tem a origem do seu nome pela derivação do Latim *grandis* que significa grande ou alto, (Figura 5) referindo-se ao hábito da espécie (Flores *et al.*, 2016).

Figura 5 - Árvore adulta de *Eucalyptus grandis*



Fonte: ANBG (2022)

A madeira de *E. grandis* é leve e fácil de ser trabalhada, sendo extensivamente usada como madeira de construção na Austrália e na república Sul Africana. Plantações, convenientemente manejadas, podem produzir madeira de excelência para serraria e laminação. É a principal fonte de matéria prima para celulose e papel do Estado de São Paulo (IBÁ, 2017).

Eucalyptus grandis é a espécie mais cultivada no Brasil, entre os motivos está sua adaptação edafoclimática, com diversos destinos comerciais como indústria madeireira para construção em geral, compensados, painéis e é fonte botânica de *Apis mellifera* para a produção de mel, além da produção de celulose e carvão vegetal (Müller; Couto; Neves, 2008).

Com relação ao rendimento do OE, em estudos realizados com plantas cultivadas em Botucatu (São Paulo, Brasil), obtiveram baixo rendimento (0,31%), enquanto rendimentos maiores (2,0%) foram encontrados em Goiás, no Brasil (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

A composição química varia em função dos locais de coleta do material botânico para a extração do OE, assim, plantas cultivadas no estado de Goiás (Brasil) apresentam-se com γ -terpineno, *o*-cimeno e β -pineno como os componentes majoritários. Em outro estudo realizado em Botucatu (São Paulo, Brasil) o quimiotipo foi caracterizado por grandes proporções de α -pineno, γ -terpineno e *p*-cimeno (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

Dentre as atividades biológicas, os OEs apresentam propriedades inseticidas frente à *Aedes aegypti*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Blattella germanica*, *Pediculus humanus capitis* e *Thyrintaina arnobia* e atividade anticrobiana frente às cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

3.3.6 *Eucalyptus Saligna* Sm.

Ocorre geralmente na região litorânea e nos vales das cadeias montanhosas próximas ao litoral de New South Wales, e ao sul de Queensland. A distribuição natural da espécie situa-se entre as latitudes de 28 a 35° S, em altitudes desde o nível do mar até 1000 m. *Eucalyptus saligna* apresenta casca lisa, tronco ereto e atinge entre 20 e 30 m de altura (Figura 6) O nome do epíteto científico *saligna*, refere-se a salgueiro (Lorenzi *et al.*, 2003).

Figura 6 - Árvore adulta de *Eucalyptus saligna*



Fonte: ANBG (2022)

As folhas juvenis de *Eucalyptus saligna* são opostas e/ou alternas, têm forma oval a lanceolada e geralmente atingem 12 cm de comprimento e 5 cm de largura. As folhas adultas são verdes brilhantes, de forma lanceolada a falcada, dispostas alternadamente, e medem 16 cm de comprimento e 3 cm de largura. Tanto as folhas juvenis como as adultas apresentam cores distintas em ambas as faces, onde as superfícies superior e inferior da folha têm cores diferentes.

As flores são brancas e formam inflorescências axilares que contêm cachos de 7 a 11 flores, que florescem entre os meses de janeiro a abril. Os frutos são obcônicos e lenhosos, com a semente madura disponível nos meses seguintes à floração. As sementes são facilmente germinadas e cultivadas (Flores *et al.*, 2016).

Frequentemente a espécie é confundida com *E. grandis* em função da morfologia similar. No Paraná, *E. saligna* oriundo da Austrália, Mairinque ou Itatinga, produz madeira de maior densidade quando comparada ao *E. grandis* (IBÁ, 2017).

Vários estudos realizados no Brasil, em diferentes estados, revelaram diferentes perfis químicos para o OE. No Rio Grande do Sul o componente majoritário foi o 1,8 cineol, com 61,3%. Já em Minas Gerais apresentou 92,3% deste composto, e no estado de São Paulo apresentou o α -pineno (45,7%). Sendo que nos estudos

mencionados acima os rendimentos de extração do OE foram de aproximadamente 1,42% (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

Propriedades antibacterianas foram relatadas para a espécie frente à *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016). Atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, também foi relatada em diversos estudos (Sartorelli *et al.*, 2007).

Eucalyptus saligna também apresenta propriedades inseticidas contra *Acanthoscelides obtectus*, *Aedes aegypti*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Pediculus humanus capitis*, *Sitophilus zeamais*, *Sitotroga cerealella*, *Tribolium castaneum* e *Thyrinteina arnobia* (Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são misturas complexas de componentes principalmente de baixo peso molecular biossintetizados e armazenados em estruturas secretoras especializadas de plantas e são extraídos por diferentes métodos, utilizando plantas inteiras ou rasuradas. Podem atuar como sinalizadores químicos no reino vegetal e como defesa química contra herbívoros, apresentando uma função biológica essencial para a sobrevivência e adaptação das plantas ao meio ambiente. Apresentam grande variedade química entre diferentes táxons (Manfron *et al.*, 2021b).

Quimicamente, os OEs, são constituídos por misturas muito variáveis de compostos, fenilpropanoides, hidrocarbonetos terpênicos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), terpenos oxigenados (álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas), até compostos com enxofre e nitrogênio (Robbers; Speedie; Tyler, 1997).

OEs são produtos do metabolismo secundário de algumas plantas denominadas aromáticas, e que possuem função natural de defesa. Muitos fungos e insetos que atacam produtos agrícolas podem ser mitigados ou eliminados completamente pela aplicação adequada de OEs, pois são de baixo custo, mais seguros, ecologicamente corretos, não causando efeitos adversos e indesejáveis em organismos não-alvo, quando comparados aos pesticidas sintéticos. A mesma lógica prossegue para problemas com insetos, agentes etiológicos de diversas doenças,

tendo, portanto, numerosas aplicações em áreas farmacêuticas e medicinais como larvícida e inseticida.

Existem vários fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem na composição química dos OEs, por exemplo o órgão da planta de onde o OE é extraído pode variar dentro de uma mesma espécie. Destacam-se os fatores ambientais que muito podem alterar a composição química e a concentração dos constituintes voláteis dos OEs, como as propriedades físicas e químicas do solo, a temperatura, altitude, pluviosidade, luminosidade, além da herbivoria e do ataque de patógenos (Gobbo-Neto; Lopes, 2007). A época do ano em que se coleta o OE também é um fator que altera o teor e a composição química, uma vez que a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

A principal característica dos OEs é a volatilidade. Na planta, os OEs possuem funções biológicas como proteção contra predadores, atração de insetos para polinização, controle da temperatura, proteção contra perda de água entre outras (Taiz; Zeiger, 2004).

Os OEs ocorrem em estruturas secretoras especializadas como cavidades secretoras, dutos secretores, tricomas glandulares, e idioblastos oleíferos. Podendo ser armazenados em certos órgãos vegetais da planta tais como folhas, flores, cascas, madeiras, rizomas, frutos ou sementes, sendo que o local de obtenção dos diferentes órgãos da planta fornece composição, odor e características distintas (Vitti; Brito, 2003; Flores *et al.*, 2016).

A extração do OE pode ocorrer por meio de vários processos, que vão depender da localização do OE na planta, da quantidade e do objetivo de uso (Marques; Vigo, 2009). A extração por hidrodestilação é o método mais comum para extração de OE e utiliza o material vegetal em contato com água em um balão volumétrico, que é aquecido e o vapor d'água arrasta componentes voláteis para as paredes resfriadas do aparelho que condensam e se separam da água pela densidade. O aparato mais utilizado para esse método é o Clevenger. Comumente, os OEs obtidos são secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), armazenados em frasco âmbar e mantidos em temperatura baixa (Marques; Vigo, 2009).

A análise da composição química dos OEs pode ser empregada tanto para pesquisa de produtos naturais como para o controle de qualidade. O método mais utilizado para analisar a composição química dos OEs é cromatografia gasosa (CG)

e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Tem-se dado preferência pela CG-EM, pois permite separar os componentes dos OEs simultaneamente, evitando erros provenientes da determinação indireta (Mintegiaga *et al.*, 2018).

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* L'HER

Embora o óleo de eucalipto seja uma mistura complexa de variedade de monoterpenos, sesquiterpenos, fenóis aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, a sua composição e as proporções exatas variam entre os taxa (Brooker; Kleinig, 2006; Jerbi *et al.*, 2017). Dentre os componentes presentes nos OEs de espécies de *Eucalyptus*, encontram-se o 1,8-cineol e o citronelal como os de concentrações majoritárias (Almas *et al.*, 2021).

O 1,8-cineol está presente como constituinte majoritário em *E. staigeriana* F.Muell. (Gilles *et al.*, 2010), *E. globulus* Labill. (Tyagi; Malik, 2011) e *E. urophylla* S. T.Blake (Diloksumpun *et al.*, 2022). *E. citriodora* Hook., Já *Corymbia citriodora*, apresenta o citronelal, como constituinte majoritário. Ambos, 1,8-cineol e citronelal apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras (Chalchat *et al.*, 1997; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

Farmacologicamente, inúmeras espécies de *Eucalyptus* mostraram atividades biológicas, tais como anti-inflamatório (Salvatori *et al.*, 2023), antifúngico, antibacteriano (Sebei *et al.*, 2015), adstringente, cicatrizante e inseticida (Gundidza *et al.*, 1993; Cimanga *et al.*, 2002, Malinowski *et al.*, 2009, Döll-Boscardin *et al.*, 2009; Döll-Boscardin *et al.*, 2010, Goodger *et al.*, 2016). Adicionalmente, as atividades biológicas variam de acordo com a composição química específica do OE de cada espécie de *Eucalyptus* (Silva *et al.*, 2003; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016).

Para a comercialização, os OEs derivados de espécies de *Eucalyptus* são classificados de acordo com o seu destino, como OEs medicinais, OEs para setor de perfumaria e OEs para o campo industrial. O rendimento de OEs nesse gênero varia entre 0,8% e 3%, onde espécies que apresentarem rendimento de cerca de 1% de 1,8-cineol e eudesmol são consideradas de bom retorno financeiro (Tyler; Brady; Robbers, 1988; Vitti; Brito, 2003).

Os OEs que exibem o 1,8-cineol como seu componente majoritário, com concentração acima de 70% são chamados de OEs medicinais. Para esse uso, eles não podem demonstrar grandes quantidades de felandreno e aldeídos, máximo de

5%, devido aos seus efeitos tóxicos sobre o organismo. Os OEs classificados como medicinais são destinados à produção de expectorantes, inalantes, estimulantes da secreção do sistema respiratório, antissépticos, produtos de higiene bucal e como flavorizantes de medicamentos em geral, principalmente associados ao mentol (Malinowski; Nakashima; Alquini, 2009). A Farmacopeia brasileira, 6a. ed., preconiza para o OE obtido por hidrodestilação a partir de folhas ou ramos terminais frescos de *E. globulus*, um mínimo de 70% de 1,8-cineol (Brasil, 2019).

3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus*

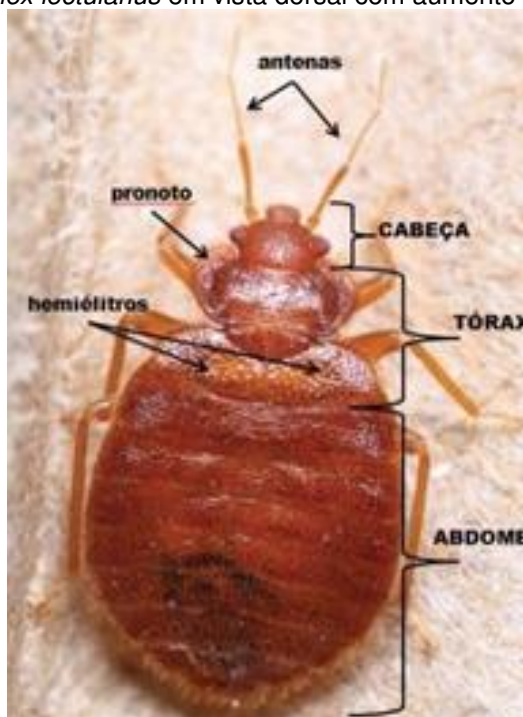
De uma maneira geral, as principais atividades biológicas atribuídas aos OEs de espécies de *Eucalyptus* são antimicrobianas, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anti-helmíntica, antiparasitária, antitumoral, analgésica, sedativa entre outras. Devido à grande complexidade química dessas substâncias, muitas vezes é difícil atribuir uma atividade biológica a apenas um componente, uma vez que pode ocorrer sinergismo químico para que ocorra determinada atividade. No entanto, diversos trabalhos visam caracterizar e identificar os componentes bioativos responsáveis pelas atividades farmacológicas de OEs (Limam *et al.*, 2020).

Os OES de espécies de *Eucalyptus* são conhecidos por possuírem propriedades antibacterianas, antifúngicas, analgésicas e anti-inflamatórias, sendo que essas propriedades têm sido amplamente utilizadas em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios. Em geral, esses OEs possuem um amplo espectro de atividade contra fungos, bactérias, insetos, ácaros e ervas daninhas, sendo, dessa forma, considerados uma alternativa ambientalmente segura para o controle de pragas (Mulyaningsih *et al.*, 2011).

3.6.1 Atividade Inseticida

Existem inúmeras atividades inseticidas dos OEs de várias espécies vegetais relatadas na literatura. Destaca-se as pragas cosmopolitas de difícil nível de controle a exemplo de *Cimex lectularius* L., 1758, popularmente conhecido como percevejo da cama (Figura 7). Esse inseto é uma praga hematófaga que se alimenta de sangue humano e vem causando muitas infestações, principalmente por apresentar difícil controle com a resistência de inseticidas comerciais (Machado *et al.*, 2019).

Figura 7 - Morfologia de *Cimex lectularius* em vista dorsal com aumento de 20X.



Fonte: Adaptado de Williams (2013)

O controle se torna ainda mais complexo, pois devidos aos seus hábitos noturnos, a especificidade de aplicação no alvo tanto de forma tópica ou sistêmica é um obstáculo. Durante o dia, o inseto se esconde nas dobras de móveis, dentro de rachaduras e fendas (Ghauri, 1973). Nas últimas décadas, ressurgiu e se tornou uma grande preocupação mundial, principalmente nos EUA devido ao clima local (Koganemaru; Miller, 2013).

Em estudo de Mossi *et al.* (2011), foi verificada atividade repelente e inseticida contra *Sitophilus zeamais* nos OEs de *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. benthamii*, *E. globulus* e *E. viminalis*. A capacidade larvicida e inseticida em insetos adultos dos OEs de algumas espécies de *Eucalyptus* contra *Aedes aegypti*, também tem sido comprovada (Lucia *et al.*, 2007).

3.6.2 Processo Inflamatório

A resposta inflamatória representa um dos mecanismos de defesa mais importante do nosso organismo. Pode iniciar-se por irritações de origem física, química ou biológica, como infecções ou lesão tecidual e se caracteriza pela presença dos 5 sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda da função da área lesionada (Serhan, 2010). O calor e rubor ocorrem devido ao aumento do fluxo sanguíneo capilar e da permeabilidade vascular. Já o edema ocorre pela infiltração de células em tecido

e a dor é ocasionada pela liberação de substâncias álgicas no local da inflamação (Todd *et al.*, 2015).

A resposta inflamatória consiste em uma longa cadeia de reações e atividades celulares com o intuito de reparar o tecido em que ocorre uma lesão. Ocorrendo atividades celulares, vasodilatação de arteríolas e vênulas, assim como aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o acúmulo de líquidos. Esta inflamação, é a resposta inicial ao agressor e pode trazendo incomodo e desconforto ao paciente devido ao edema formado, seguido de dor (Serhan, 2008).

A inflamação pode ocorrer em três fases distintas e cada uma mediada por diferentes mecanismos: uma aguda que tem como característica principal a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular; uma fase subaguda que consiste na infiltração de leucócitos e fagócitos; e por fim, a fase crônica caracterizada pela degeneração dos tecidos e presença de fibroses (Rotelli *et al.*, 2003).

A inflamação aguda é a primeira resposta a uma lesão celular ou tecidual, na qual contempla uma série de alterações sequenciais. Ela é mediada através de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos (Lieberman, 2009).

A inflamação crônica, por sua vez, se estende por período maior (semanas a meses), na qual a resposta inflamatória persistente causa danos aos tecidos, devido à secreção contínua de mediadores químicos e espécies reativas de oxigênio, levando a uma remodelação tecidual (Serhan, 2010).

A percepção da dor envolve dois componentes: o estímulo doloroso (nocicepção) e a reação emocional. Em condições normais, a informação sensorial é captada por estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e transmitida ao Sistema Nervoso Central (SNC). Nestas estruturas, neurotransmissores diferentes realizam a função bioquímica de transmitir a dor (Daudt *et al.*, 1998).

Existe uma diferença entre os termos nocicepção e dor. Muitos modelos experimentais com estímulos para a classificação da dor são realizados em animais, os quais apresentam reações comportamentais compatíveis com a sensação de dor, porém, uma vez que não é possível determinar objetivamente se a sensação apresentada é realmente “dor” é preferível classificá-la como sendo resultado da ativação das vias nociceptivas. Portanto, são denominadas tais reações em animais experimentais como nocicepção (Almeida; Roizenblatt; Tufik, 2004).

Os interesses em pesquisa da inflamação surgem em função da demanda de fármacos com potencial anti-inflamatórios e analgésicos. São realizados vários modelos experimentais envolvendo a hiperalgesia a estímulos nocivos e dor, com o objetivo de aliviar a dor persistente, de forma que as abordagens farmacológicas contribuam no desenvolvimento de medicamentos (Dale; Stacey, 2016).

Fármacos com ação anti-inflamatória estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém são limitados, com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos. Eles podem acarretar efeitos adversos, resultantes da inibição da atividade da prostaglandina E2 sintetase, incluindo perfuração e hemorragia do trato gastrointestinal, alterações renais e nos mecanismos de hemóstase corpórea. Sendo que os problemas de efeitos adversos estão principalmente relacionados ao uso crônico desses fármacos (Scholich; Geisslinger, 2006).

Devido a estas limitações, torna-se necessário a busca por substâncias oriundas de produtos naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos, preferencialmente com baixo custo e com efeitos adversos reduzidos.

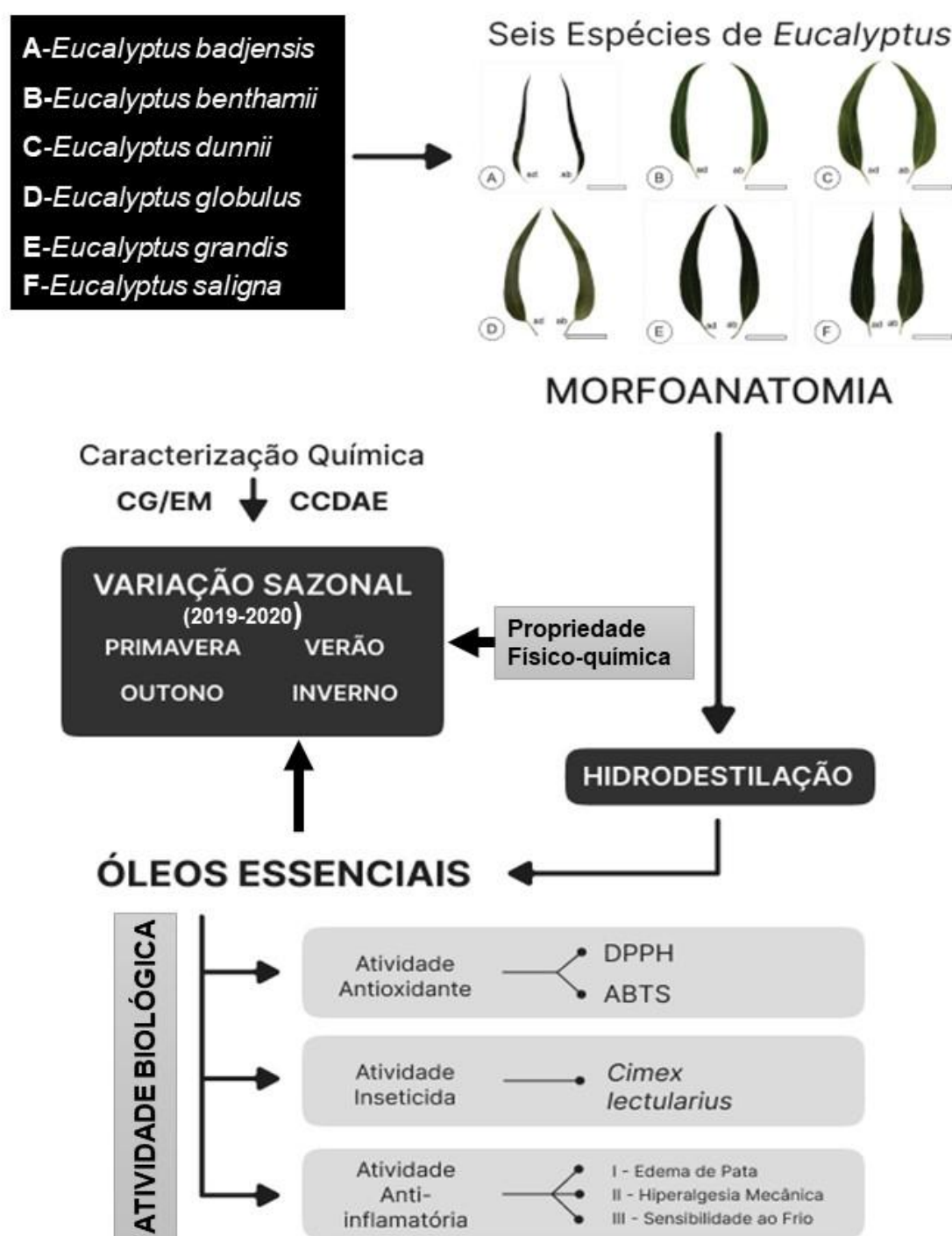
Muitos compostos voláteis presentes nos OEs de *Eucalyptus* têm demonstrado atividade anti-inflamatória (Döll-Boscardin *et al.*, 2012; Raut; Karuppayil, 2014; Vuong *et al.*, 2015; Barbosa; Filomeno; Teixeira, 2016; Belkhodja *et al.*, 2022). Nesse sentido, espécies de *Eucalyptus* podem ser uma alternativa promissora, uma vez que as folhas e são descartadas no processo de corte das árvores e nesse órgão vegetal (lâmina e pecíolo) são encontradas as cavidades secretoras que armazenam os OEs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

A Figura 8 demonstra um fluxograma de como os estudos foram realizados, evidenciando os diversos pontos de amostragem do presente trabalho.

Figura 8 - Fluxograma dos estudos



Fonte: A autora

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Este estudo se iniciou em 2015 com o plantio das mudas de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* provenientes do Registro Nacional de Sementes e Plantas (RENASEM), em 942015 (números de coleção 00605/1-6) do Viveiro Paraíso Verde (sediado em São João do Triunfo, Paraná, Brasil).

Estas plantas foram cultivadas a partir de sementes certificadas autenticadas pela Ministério da Agricultura do Brasil. As mudas das seis espécies, com quatro repetições, foram aclimatadas no mesmo ambiente, em São Mateus do Sul, Paraná (lat 25°41'00 "S; long 50°17'50" W; altitude: 840 m) em outubro de 2015, em delineamento inteiramente casualizado. O solo é classificado como latossolo, eutroférico. O clima na região com base classificação climática de Koppen-Geiger é o temperado subtropical (Cfb) e com temperatura média anual de 13-21°C (Alvares *et al.*, 2013).

Todas as espécies foram submetidas às mesmas condições de ambiente, com solo na saturação de bases de 60%, adubação orgânica com serapilheira, conforme recomendação para a cultura do eucalipto (Santarosa; Penteado Júnior; Goulart, 2014). Os tratamentos culturais empregados foram: capina manual nos primeiros estágios do desenvolvimento com posterior roçada mecanizada em área total, submetido à irrigação no início do transplante de 2 mm (2 L em um metro quadrado de área). Face ao exposto, todo o cuidado no cultivo destas plantas teve o propósito de assegurar que as diferenças possivelmente encontradas entre as espécies fossem atribuídas à genética do vegetal e não a fatores edafoclimáticos, padronizando-se as mesmas condições para todas as espécies.

O acesso ao patrimônio genético está licenciado sob o código ADA612E pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) / Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). A coleta das folhas adultas iniciou em março de 2019 e finalizou em março de 2020, ocorrendo nas diferentes estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), em São Mateus do Sul, Paraná, Brasil (latitude: 25° 41' 00" S e a longitude: 50° 17' 50" W Altitude: 840m). Parte do material fresco, coletado à 15 cm do ápice da planta foi submetido à fixação, e, posterior armazenamento em solução apropriada para a realização da análise morfoanatômica. O restante do material coletado foi seco à temperatura

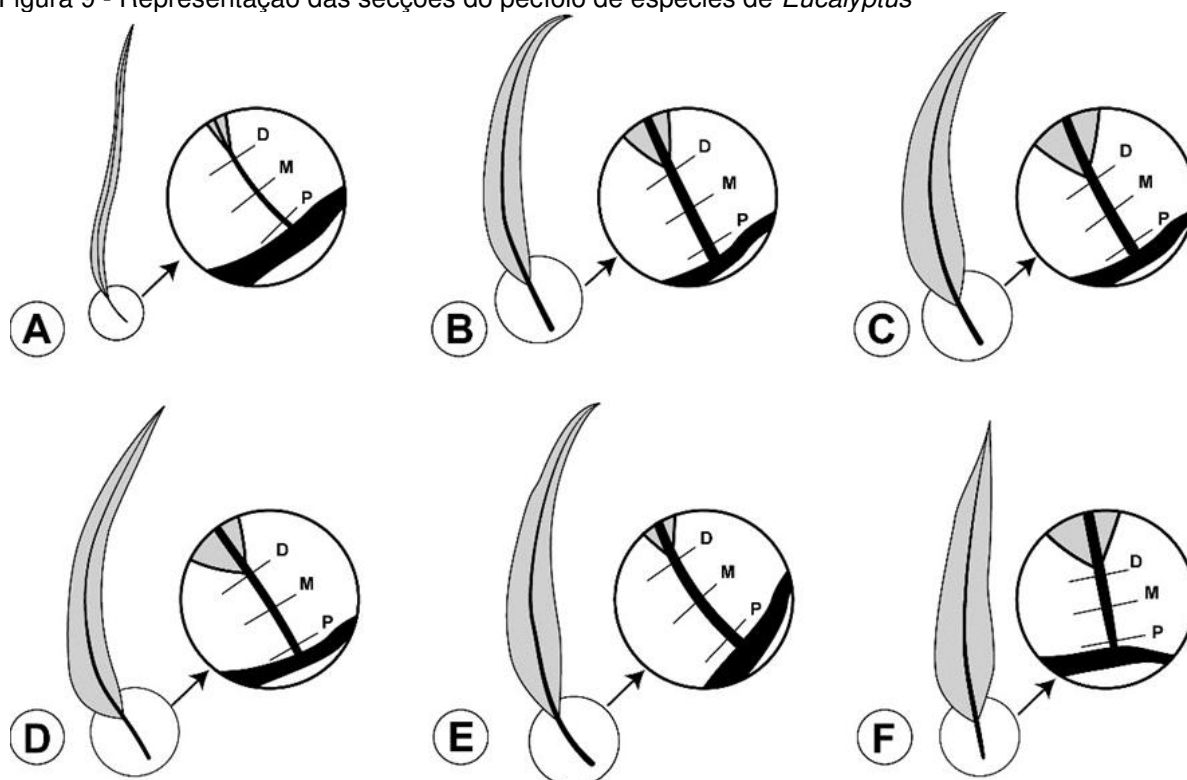
ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e fragmentado em pequenos pedaços (1cm^2) para posterior extração do OE.

4.3 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

4.3.1 Microscopia de Luz

Folhas adultas frescas foram fixadas em solução de FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70%) (Johansen, 1940) por cinco dias e lavadas em água destilada para retirada da solução de fixação. Posteriormente, os espécimes foram armazenados em etanol 70% (Berlyn; Miksche, 1976). O material vegetal foi seccionado com lâminas de barbear, à mão livre, nos sentidos transversal nas porções proximal, medial e distal do pecíolo, conforme ilustrado na Figura 9. Sendo posteriormente submetido à coloração de azul de Astra e fucsina básica (Luque; Sousa; Kraus, 1996)

Figura 9 - Representação das secções do pecíolo de espécies de *Eucalyptus*



Fonte: A autora

Nota: Representação da Porção Proximal (P), Medial (M) e Distal (D) do corte transversal dos pecíolos de *Eucalyptus*. *E. badjensis* (a), *E. benthamii* (b), *E. dunnii* (c), *E. globulus* (d), *E. grandis* (e) e *E. saligna* (f).

As secções foram, então, montadas em lâminas de vidro com uma gota de glicerina diluída a 50% (Berlyn; Miksche, 1976) e para lutagem foi utilizado esmalte

incolor (Beçak; Paulete, 1976). Os resultados dessa análise foram obtidos por meio de fotomicrografias, usando uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio ótico (modelo Olympus CX 31 com unidade de controle C 7070) do laboratório 54 de Farmacognosia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para as análises histoquímicas foram utilizados os seguintes reativos: floroglucina clorídrica para identificar tecidos e elementos lignificados (Sass, 1958), Sudam III para verificar a presença de substâncias lipofílicas (Foster, 1949), solução de cloreto férrico a 2% (Johansen, 1940) e dicromato de potássio a 10% para detectar compostos fenólicos e lugol a 1% para identificar o amido (Berlyn; Miksche, 1976) e azul brilhante de Coomassie para identificação de corpos proteicos em material vegetal (Bouzon, 2006).

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG) e Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)

Para as análises de FEG, as amostras previamente fixadas em FAA foram desidratadas em série crescente de soluções de etanol (80%, 90% e 100%). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico em aparelho Bal-Tec CPD030, utilizando CO₂ líquido. As amostras totalmente secas foram fixadas em “stubs” de alumínio com fitas adesivas de dupla face e depois revestidas com ouro, usando um aparelho de revestimento por pulverização Quorum (modelo SC7620 Sputter Coater) e/ou aparelho Balzers Union FL 9496 SCD 030 para todas as amostras. As análises FEG e EDS foram realizadas no C-LABMU, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

O OE foi extraído a partir de 100 g de folhas secas para as seis espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna*, separadamente, por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (U.S. Pharmacopeia, 2005). A extração foi conduzida por 4 h para as amostras de todas as espécies.

Foi verificada a quantidade de OE extraído pela medida do volume no tubo graduado, possibilitando o cálculo do rendimento percentual dado pela razão entre o volume em mL de OE obtido, pela massa da amostra utilizada, multiplicada por cem

(sendo assim, volume de OE (mL) / massa de material vegetal (g) X 100). As análises foram realizadas em triplicata, seguindo a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019).

Os OEs obtidos foram secos por sulfato de sódio anidro, estocados em tubo Eppendorf, e armazenados em temperatura de 4 °C, em geladeira comum.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

4.5.1 Determinação da Densidade Relativa

Para a determinação da densidade ($\rho = m \div v$) nas unidades de (g/mL), primeiramente foi retirado todo o resquício de água presente no tubo Eppendorf pela aplicação de sulfato de sódio anidro. Após, o OE foi transferido para outro tubo Eppendorf e, simultaneamente, teve sua massa determinada através de uma balança analítica, em temperatura ambiente a 25°C.

4.5.2 Determinação do Índice de Refração (IR)

A determinação desta análise ocorreu no laboratório de Bioquímica, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). O índice de refração foi aferido através de um refratômetro de Abbé, modelo RL1- Nr5630. Primeiramente, foi realizada a calibração do equipamento, utilizando água destilada para verificar sua exatidão e, em seguida, foi realizada a aferição do índice de refração em triplicata, determinado sob luz de sódio no comprimento de 589,3 nm e temperatura de 20 °C, segundo descrição da Farmacopeia Brasileira (2016).

4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

4.6.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM)

Para realização da identificação e quantificação dos compostos voláteis presentes no OE das espécies de *Eucalyptus*: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* foi realizada a cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (CG-EM). Essa análise foi realizada em parceria com a Universidade do Mississippi, Oxford, Mississippi, EUA.

Os OEs de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* foram analisados por CG-EM usando um sistema GC Agilent 7890A equipado com um espectrômetro de massas quadrupolo 5975C e um amostrador automático 7693 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

Dez microlitros dos OEs foram dissolvidos em 1 mL de n-hexano para cada amostra de OE e na sequência foi injetado 1 µL da solução da amostra no aparelho. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A temperatura de entrada ficou em torno de 250° C com um modo de injeção dividida para uma taxa de divisão de 50:1. A separação foi realizada em coluna capilar apolar DB-5MS (Agilent J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) com as mesmas dimensões de 30 m × espessura de 0,25 mm id x 0,25 µm. Injeções em triplicata foram feitas para cada amostra analisada. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV a um modo de m/z 35 a 500. A aquisição de dados foi realizada com o Agilent MSD Chemstation (F.01.03.2357).

A identificação dos compostos se deu pela comparação dos espectros de massa com os bancos de dados da Wiley e do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), usando um algoritmo de correspondência baseado em probabilidade. A identificação adicional foi baseada nos índices de retenção relativos comparados com a literatura (Adams, 2007). A percentagem bruta da área do pico de cada composto foi obtida em análises de CG-EM com leitura completa (coluna DB-5MS).

4.6.2 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 as 24 amostras dos OEs de: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* foram analisadas em placa de sílica gel 60 F254 (Merck), usando-se a fase móvel acetato de etila: tolueno 5:95. Estas amostras correspondem as seis espécies avaliadas na primavera, verão, outono e inverno.

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 aborda 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 anisaldeído 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 reprivatização, UV 366 nm depois da derivatização com NP e luz branca após derivatização com NP e anisaldeído. As análises foram executadas usando o software visionCATS versão 3.1. Os parâmetros CCDAE estavam de acordo com o Capítulo geral da USP (203) (USP, 2017).

4.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para as análises de atividade biológica dos OEs das seis espécies de *Eucalyptus*: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*, foi realizada uma mistura (“pool”), consistindo em uma alíquota equivalente 1:1:1:1: do OE proveniente de cada estação do ano (primavera, verão outono e inverno).

4.7.1 Testes antioxidantes

4.7.1.1 Eliminação de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A solução estoque das amostras (2,0 mg/mL) foram diluídas para concentrações finais de 300, 400, 500 e 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/mL em metanol, separadamente. As amostras foram adicionadas a 2 mL de DPPH metanólico (0,1 mM), e o branco apresentava todos os reagentes. A mistura foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente no escuro. Após 30 min, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro à 515 nm. O BHT foi usado como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição de DPPH (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = (A_0 - A/A_0) \times 100$. A_0 é a absorbância da solução em branco e A é a absorbância do óleo essencial em metanol. O IC₅₀ foi calculado para 50% de inibição de DPPH (BRAND-WILIAMS *et al.*, 1995, Rufino *et al.*, 2007a).

4.7.1.2 Atividade de eliminação ABTS•+

A atividade antioxidante total foi medida usando um método aprimorado de eliminação de radicais azinobis (ácido etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) com pequenas modificações. A solução estoque das amostras (2,0 mg/mL) foram diluídas para concentrações finais de 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 e 1600 µg/mL em etanol, separadamente. Resumidamente, ABTS 7,0 mM e persulfato de potássio 140 mM foram misturados e mantidos no escuro por 16 h à temperatura ambiente. Antes do uso, a solução ABTS•+ foi diluída em etanol (P.A) para obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ a 734 nm. Em seguida, 1,980 mL de solução ABTS•+ foram adicionados 20 µL das diferentes concentrações da amostra. Após 30 min, a absorbância foi lida em 734 nm usando espectrofotômetro. A atividade de eliminação de ABTS•+ foi calculada usando a seguinte equação: Atividade de eliminação de radicais ABTS (%) = $(A_0 - A/A_0) \times 100$ A_0 é a absorbância da solução em branco e A é a absorbância dos óleos essenciais. O IC₅₀ foi calculado para 50% de inibição de ABTS (HALLIWELL, 1996, Rufino *et al.*, 2007b).

4.7.1.3 Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante no sistema ácido linoleico/β-caroteno foi realizada conforme metodologia descrita por Lopes-Lutz *et al.* (2008), com algumas modificações. A uma solução contendo β-caroteno (2 mg) e clorofórmio (10 mL), foram adicionados 20 mg de ácido linoleico e 200 mg Tween 20. O clorofórmio foi totalmente evaporado em evaporador rotatório. Posteriormente, adicionaram-se 50 mL de água destilada, previamente saturada com oxigênio por 30 minutos (emulsão A). Alíquotas (200 µL) de cada amostra, foram adicionados em 5 mL da emulsão de ácido linoleico/β-caroteno. As amostras foram submetidas à oxidação, incubando-as a 50 °C por 145 minutos. Como controle foi utilizado 5 mL da emulsão de ácido linoleico/β-caroteno com 200 µL de metanol. A absorbância foi lida a 470 nm em intervalos de 15 min, as amostras ficaram em repouso em banho maria há 50°C, foram realizadas as leituras até que a solução controle ficasse incolor e a atividade percentagem de inibição da oxidação (Rufino *et al.*, 2007c).

4.7.2 Atividade Inseticida: Criação dos Insetos

As cepas dos insetos popularmente denominados de percevejo da cama *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758, apresentam-se em duas linhagens, sendo uma suscetível e outra resistente aos inseticidas piretroides (Bayonne 'Resistente a inseticidas' e Ft. Dix 'Susceptível') foram fornecidas pelo Dr. Changlu Wang do Departamento de Entomologia, Universidade Rutgers, New Brunswick, NJ, USA e foram criadas em massa no National Center for Natural Products Research (NCNPR), na Universidade do Mississippi, Oxford, USA.

Os insetos foram mantidos em frascos de vidro transparente de 473 mL, contendo papel-toalha. Os frascos foram cobertos com pano de malha fina para ventilação, preso por um elástico (Campbell; Miller, 2015) e acondicionados em uma câmara de crescimento a 26°C e 60% de umidade relativa, com um fotoperíodo de 13:11 h claro/escuro. Os insetos foram, semanalmente, alimentados com sangue de coelho desfibrinado (Hemostat, CA) (Figura 10).

Figura 10 - Câmara onde os insetos (*Cimex lectularius*) foram mantidos em condições controladas de crescimento



Fonte: Imagem cedida por Dr. Junaid Rehman (2018)

Os insetos foram alimentados de acordo com o método descrito por Montes Cuadrillero e Vilella (2002). Alimentadores de sangue (CG-1836-75 ChemGlass, NJ) foram ligados a um banho de água utilizando tubos de látex e um pedaço de membrana de parafilme "M" foi esticado ao longo do fundo do alimentador. Colocou-se 5 mL de sangue de coelho desfibrinado (Hemostat) no centro oco do material de vidro e reuniu-se no parafilme. O parafilme forneceu uma barreira para o inseto se alimentar. O banho de água foi ajustado para circular e aquecer o sangue a 37°C. Os insetos se deitaram após a alimentação e os frascos foram removidos. Para condução dos experimentos de inseticida foram usados dois métodos, tópico e fumigante.

4.7.3 Atividade Inseticida: Bioensaio Tópico

Os OEs das seis espécies deste estudo foram expostos ao teste de toxicidade frente a duas cepas de percevejo, sendo uma resistente aos inseticidas piretroides denominada de 'Bayonne' e outra suscetível, 'Ft. Dix'. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento descrito por Romero, Potter e Haynes (2009). Os insetos adultos foram separados na placa de Petri (Figura 11), usando uma pinça e, então, foram anestesiados com CO₂ e 1 µL de acetona foi colocado na superfície dorsal do abdômen com um dispensador de repetição de mão (Hamilton Co., Reno, NV), equipado com uma seringa de vidro de 50 mL (Hamilton Co). Insetos controle receberam apenas 1 µL de acetona. Após o tratamento, os insetos foram transferidos para os frascos de vidro transparente de 20 mL, contendo uma tira de papel (padrão 92 - papel multiuso) e mantidos na câmara de crescimento.

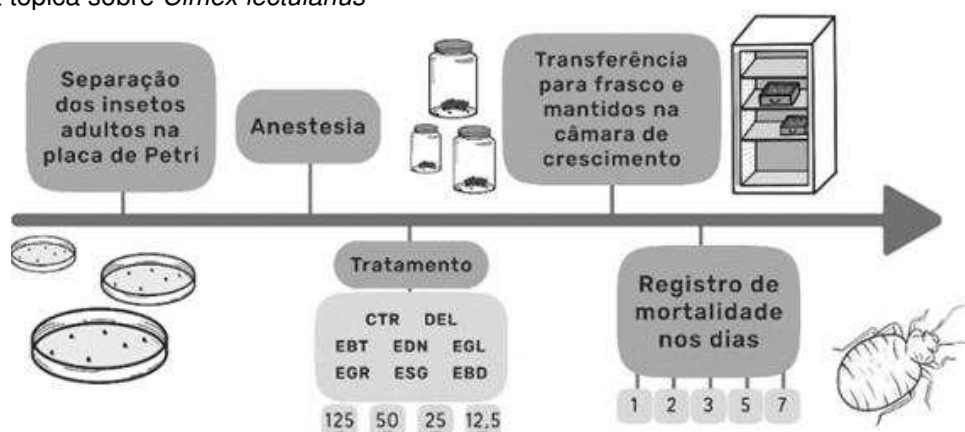
Figura 11 - Os insetos (*Cimex lectularius*) em placa de petri após aplicação dos tratamentos



Fonte: Imagem cedida por Dr. Junaid Rehman (2018)

Os dados para a mortalidade dos insetos foram registados aos 1, 2, 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Os insetos foram considerados mortos quando nenhuma parte do corpo se moveu, após serem tocados com uma agulha. Ocorreram 3 repetições com 10 insetos (ambos os sexos) / réplica. Quatro doses foram utilizadas, 125, 50, 25 e 12,5 μg de OE/inseto e a deltametrina foi usada como inseticida controle padrão (Figura 12).

Figura 12 - Esquema representativo do delineamento experimental utilizado para avaliação da atividade inseticida tópica sobre *Cimex lectularius*



Fonte: A autora

Nota: Os tratamentos do experimento tópico: *E. badjensis* (EBD), *E. benthamii* (EBT), *E. dunnii* (EDN), *E. globulus* (EGL), *E. grandis* (EGR) e *E. saligna* (ESG) nas doses de doses, 125, 50, 25 e 12,5 μg óleo essencial/inseto. CTR (Controle) e DEL (Inseticida padrão Deltametrina).

4.7.4 Atividade Inseticida: Bioensaio de Fumigação

Os insetos foram submetidos à toxicidade por vapor em frascos de vidro transparente de 125 mL. Um pequeno pedaço de papel foi colocado no fundo da jarra para fornecer um substrato para os insetos durante os testes com os OEs das seis espécies: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* (Figura 13).

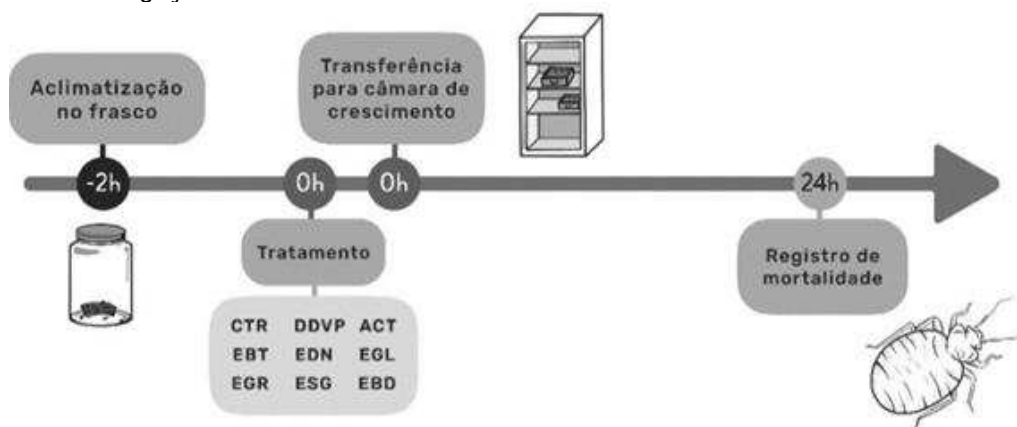
Figura 13 - Os insetos (*Cimex lectularius*) em frascos de vidro após aplicação dos tratamentos



Fonte: Imagem cedida por Dr. Junaid Rehman (2018)

Os insetos foram introduzidos nos frascos 2-4 h antes do tratamento para se aclimatarem. Uma solução de tratamento ou alíquota de acetona de 2 μL foi depositada diretamente na superfície interna da parede lateral da garrafa a 4 cm do fundo da garrafa usando uma seringa a 50 μL (Hamilton Company, Reno, NV) acoplada a um PB600, Reno, NV). Cinco concentrações: 15,6, 31,25, 62,5, 125 e 250 μg de OE/125 cm^2 foram testadas contra os insetos. Os frascos foram colocados na câmara de crescimento e os dados para mortalidade foram registrados 24 h após o tratamento. O 2,2-diclorovinil- dimetilfosfato (DDVP) foi usado como padrão (deltametrina- inseticida piretroide) (Figura 14).

Figura 14 - Esquema representativo do delineamento experimental utilizado para avaliação da atividade inseticida com fumigação sobre *Cimex lectularius*.



Fonte: A autora

Nota: Os tratamentos do experimento residual: *E. badjensis* (EBD), *E. benthamii* (EBT), *E. dunnii* (EDN), *E. globulus* (EGL), *E. grandis* (EGR) e *E. saligna* (ESG) nas doses de doses, 125, 50, 25 e 12,5 μg óleo essencial/inseto. CTR (Controle) e DEL (Inseticida padrão Deltametrina).

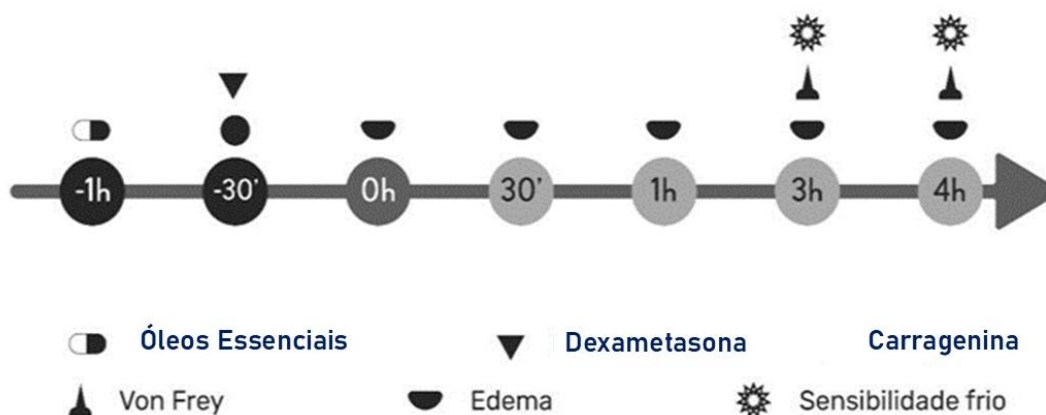
4.7.5 Atividade Anti-Inflamatória: Animais

Os experimentos foram conduzidos usando camundongos machos e fêmeas obtidos no Biotério Central da UFGD (Universidades Federal da Grande Dourados), mantidos a 22-27 $^{\circ}\text{C}$ com livre acesso a água e dieta, em ciclo claro/escuro 12:12 h exceto durante os ensaios. As fêmeas e machos Swiss apresentaram entre 20-25 g ($n=6$), Os ensaios foram realizados segundo os aspectos éticos da experimentação animal, sendo respeitadas as normas preconizadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). O Comitê de Ética da UFGD (nº07/2017), se encontra no Anexo A.

4.7.6 Atividade Anti-Inflamatória: Edema de Pata Induzido Por Carragenina

Camundongos Swiss machos foram divididos em grupos experimentais (6 animais/grupo) e tratados por via oral (1 h antes da carragenina) com os OEs das seis espécies de *Eucalyptus*, *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*, nas doses de 100 mg/kg de animal em estudo. No grupo controle positivo, foi administrado o anti-inflamatório esteroide dexametasona (0,5 mg/kg, via subcutânea), 30 min antes da carragenina. Após os respectivos tratamentos, os animais receberam na pata direita 50 µL de solução de carragenina (Cg – 300 µg). A pata esquerda recebeu o mesmo volume de salina, sendo utilizada como controle. A medida do edema foi realizada em ambas as patas por meio de um pletismômetro, 0,5; 1; 2 e 4 h após a administração da carragenina, conforme desenho experimental da Figura 15 (Kassuya *et al.*, 2006).

Figura 15 - Esquema representativo do modelo experimental anti-inflamatório do edema induzido por carragenina



Fonte: A autora

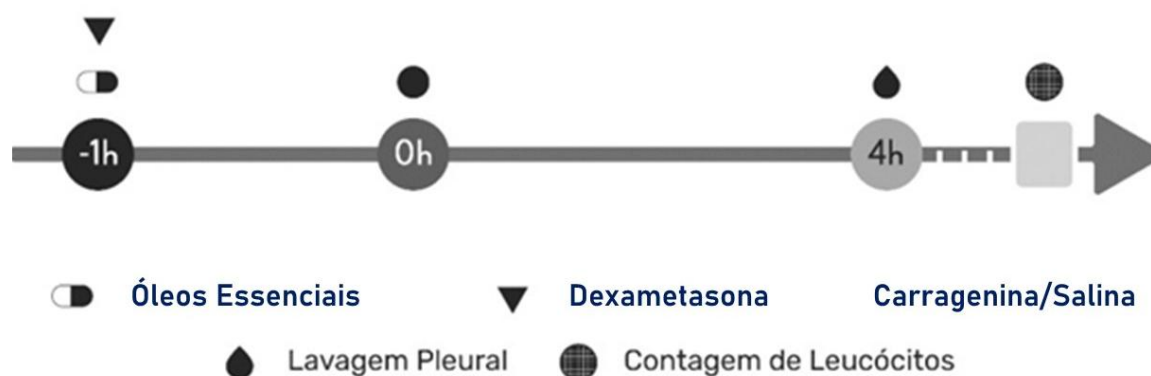
4.7.7 Atividade Anti-Inflamatória: Modelo de Pleurisia

Camundongos Swiss fêmeas foram divididos em diferentes grupos experimentais (6 animais/grupo): grupo controle (tratado com solução salina, via oral); grupo naive (tratado com solução salina, via oral sem exposição a doença); grupo experimental que consistiu na administração do óleo essencial por via oral na concentração de 10mg/kg das seis espécies em estudo, *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* e o grupo controle positivo (0,5 mg/kg de dexametasona, via subcutânea). Após uma hora de tratamento, os grupos tiveram administração de 100 µL de carragenina (1%) por injeção intrapleurial, para indução

da inflamação aguda no local. O grupo controle e o grupo naive recebeu por injeção intrapleural, 100 μ L de solução salina estéril (Vinegar *et al.*,1973)

Após quatro horas, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine®) (inalante) e por abertura da cavidade abdominal, receberam 2 mL de PBS para a lavagem da pleura (Velo *et al.*,1973). A contagem total de leucócitos será realizada a partir de 20 μ L da amostra homogeneizada em 400 μ L de líquido de Turck. Deste preparado, 10 μ L foi colocado na câmara de Neubauer para contagem de leucócitos em microscópio óptico. O número de leucócitos foi calculado a partir de: Contagem x 20×10^{-6} , conforme representado na Figura 16 (Kassuya *et al.*, 2006).

Figura 16 - Esquema representativo do modelo experimental de pleurisia



Fonte: A autora

Os níveis de óxido nítrico foram determinados pela reação de Griess (Green *et al.*,1982) e a concentração de proteína foi determinada a partir da lavagem pela reação de Bradford, utilizando o kit de Bradford comercial seguindo as orientações do fabricante (Bioagency, São Paulo, Brasil).

4.7.8 Atividade Anti-Inflamatória: Hiperalgesia Mecânica

A sensibilidade mecânica da pata traseira foi medida pela determinação dos limiares de retirada. Os limiares nociceptivos (g) foram estimados usando uma versão eletrônica do teste de Von Frey (Insight ®, EFF 301, analgesímetro digital). Grupos separados de camundongos *Swiss* machos ($n = 6$) foram tratados por via oral na concentração de 100mg/kg das seis espécies em estudo, *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* e o grupo controle positivo (0,5 mg/kg de dexametasona, via subcutânea).

Após 1 h, a partir tratamento, foi uma injeção intraplantar da carragenina (300 µg/pata), na pata direita, enquanto na pata esquerda uma injeção de soro fisiológico. Pressão constante foi aplicada à superfície plantar da pata traseira direita com o analgesiômetro até que os camundongos vocalizassem ou removessem a pata, indicando o nível de sensibilidade mecânica induzida pela sensibilização, 3 e 4 horas após a administração de carragenina (Formagio *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2001).

4.7.9 Atividade Anti-Inflamatória: Estimulação Térmica a Frio

A sensibilidade ao frio foi avaliada pelo teste da acetona. Os animais foram alojados em plataforma suspensa e a acetona (20 µL) foi distribuída na pele da face plantar da pata traseira direita. A reação, como indicado pela lambida da pata, agitação ou esfregar a pata, foi observada e registrada (Decosterd; Woolf, 2000; Formagio *et al.*, 2019).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de rendimento do óleo essencial (% p/v) em função da sazonalidade (primavera, verão, outono e inverno), foi realizada a média (n=3) seguida de ANOVA, adotando o teste de Tukey com $*p < 0.05$.

Para as análises do perfil químico, realizaram-se análises univariadas e multivariadas de variância (ANOVA), seguidas pelos testes de escala múltipla de Tukey. As diferenças entre os valores médios individuais foram consideradas significativas se o valor de $p < 0.05$. Com o resultado dos gráficos multivariados da Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*), desenvolveu-se um dendrograma na análise de *cluster* hierárquico baseadas no perfil químico de 24 amostras de óleo essencial obtidas da análise cromatográfica (GC-MS) de seis espécies de eucalipto nas quatro estações (primavera, verão, outono e inverno). O método de agrupamento aplicado foi o de vizinho mais próximo e a medida de dissimilaridade foi a distância euclidiana, possibilitando a divisão das amostras em grupos de acordo com as características semelhantes.

Para o teste de atividade inseticida, as médias de tratamento da toxicidade foram comparadas usando análise de variância de dois fatores (ANOVA) e separadas pela diferença significativa de Tukey. As análises foram realizadas no SAS® 9.3 e no JMP® 10.0.

Para as análises de antioxidante a análise diferiu para cada método utilizado. Os dados foram apresentados como médias seguidas de seus respectivos EPMS. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguidos dos testes de Student Newman-Keuls e Tukey. Em todos os testes o índice de significância estatística considerada será menor ou igual a 5% ($p > 0,05$) quando comparado com os controles. No ensaio de DPPH, a porcentagem de inibição do DPPH (I%) foi calculada pela equação: $\% I = (A \text{ (branco)} - A \text{ (amostra)}) / A \text{ (branco)} \times 100$. A atividade antioxidante foi expressa como IC₅₀ (mg/mL), definida como concentração do material de teste necessário para causar uma diminuição de 50% na concentração inicial de DPPH (BENDAOUD *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017). Já na atividade de eliminação de ABTS foi calculado usando equação: Atividade de eliminação de radicais ABTS (%) = $(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}} / A_{\text{branco}}) \times 100$. Todos os testes foram feitos em triplicata (SILVA *et al.*, 2017).

Para os testes de atividade anti-inflamatória, os dados foram apresentados como médias seguidas de seus respectivos desvios padrão. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida dos testes de Tukey. Em todos os testes, o índice de significância estatística considerado foi menor ou igual a 5% ($p < 0.05$) quando comparado com os controles.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

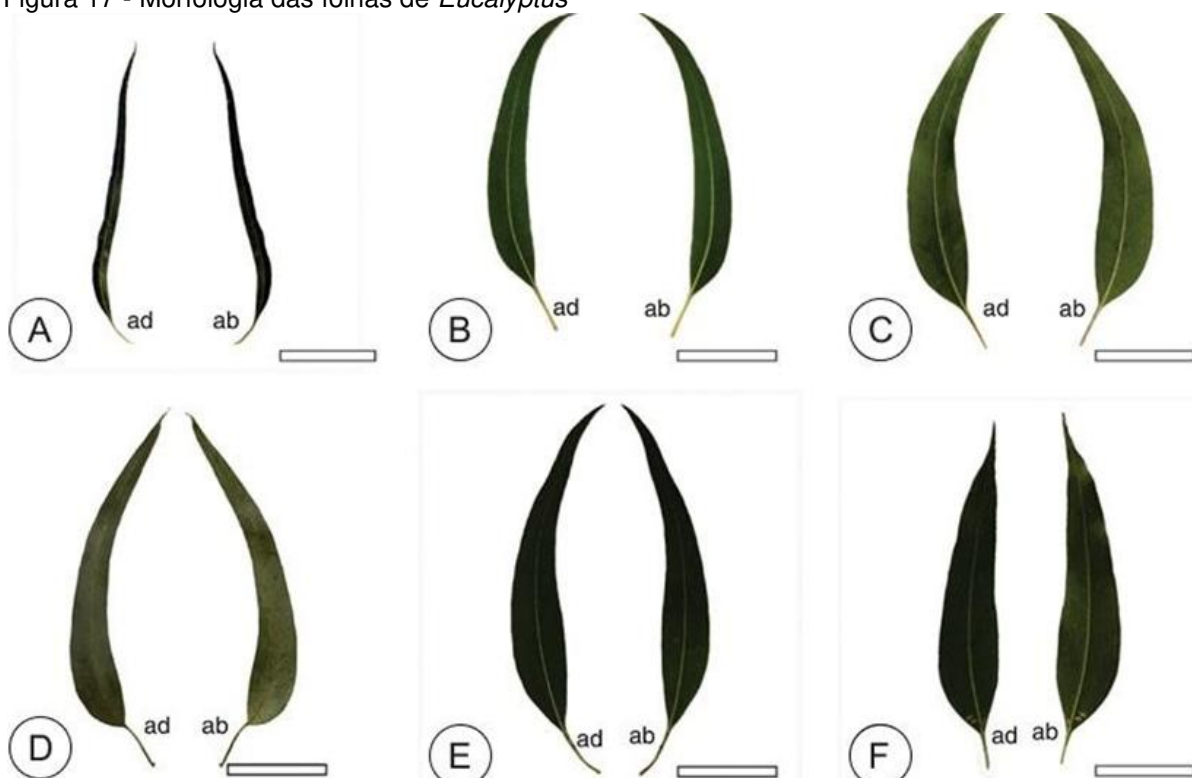
5.1 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DOS PECÍOLOS

No presente estudo, a morfoanatomia do pecíolo de seis espécies de *Eucalyptus*, a saber: *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* foi investigada e comparada (Figura 17a-f), sendo que as principais características diferenciais estão sumarizadas no Quadro 2 e discutidas a seguir.

Quanto ao comprimento do pecíolo, *E. benthamii* apresentou-se como o maior (23-29 mm $\pm$ 2,13), enquanto *E. badjensis* foi o menor (12,3-18 mm $\pm$ 3,18). Considerando que todos os pecíolos se mostraram relativamente longos foram realizadas secções transversais nas regiões proximal, medial e distal, sendo observadas diferenças intraespecíficas e interespecíficas.

De uma maneira geral, as características presentes em todos os pecíolos, independentemente à região analisada, são: epiderme unisseriada coberta por cutícula lisa e espessa (Figuras 18 - 20), sistema vascular bicolateral (Figuras 18 - 20), bainha de fibras descontínua (Figuras 18 - 20), idioblastos cristalíferos (Figuras 18 - 21) e fenólicos (Figuras 18,20, 21).

Figura 17 - Morfologia das folhas de *Eucalyptus*

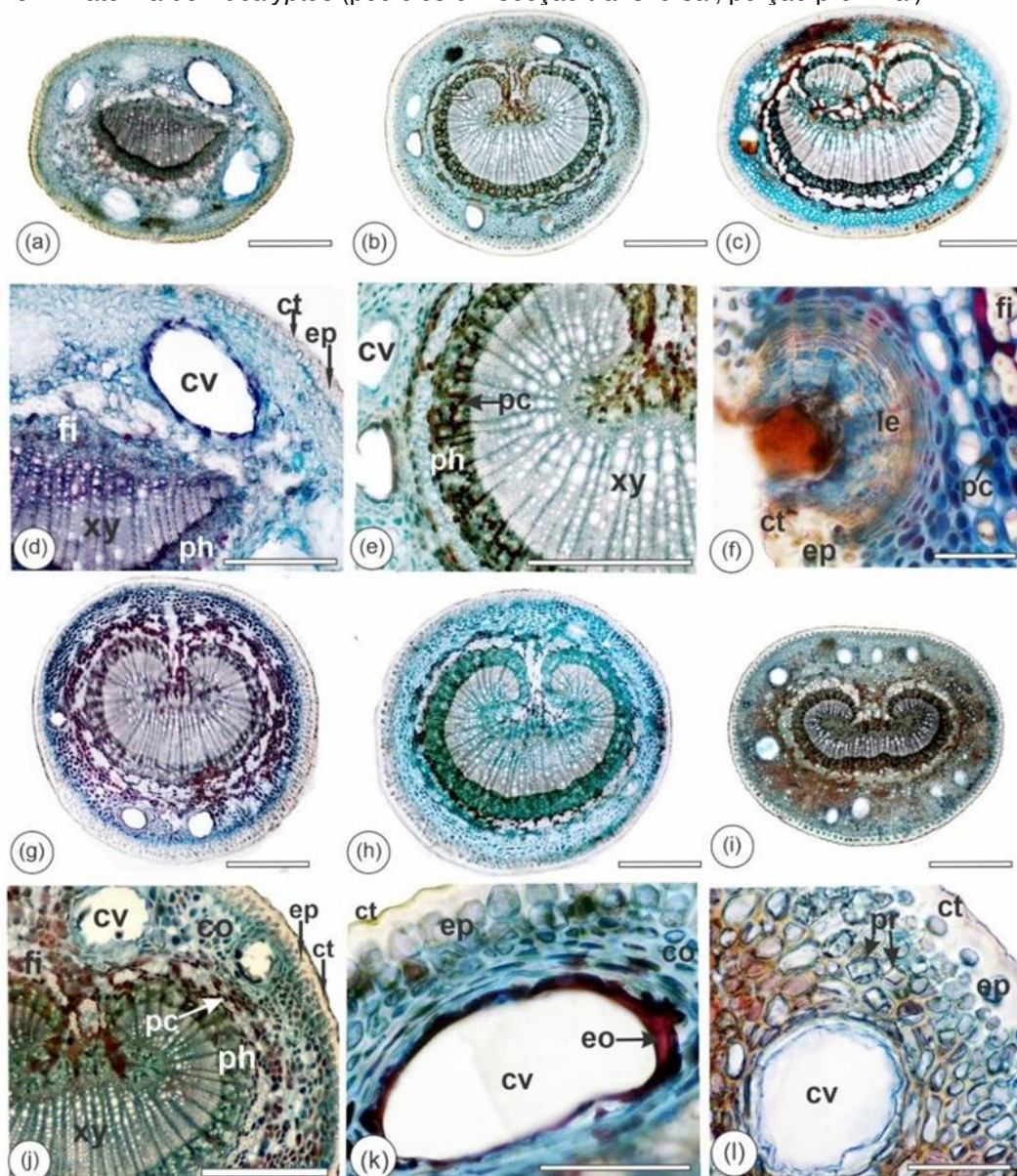


Fonte: Migacz *et al.* (2018)

Nota: *E. badjensis* (a), *E. benthamii* (b), *E. dunnii* (c), *E. globulus* (d), *E. grandis* (e) e *E. saligna* (f). Face abaxial (ab) e Face adaxial (ad). Barra = 2 cm.

Em se tratando da forma do pecíolo em secção transversal, as formas mais encontradas foram circulares (Figuras 18b, g, h, 18b, g, h,) e elipsoide (Figuras 18a, c, i; 18a, c i; 19a, c, i), enquanto a forma plano-convexa foi encontrada somente na região distal de *E. badjensis* (Figura 20a) e *E. saligna* (Figura 20e). *Eucalyptus badjensis* (Figura 18a) e *E. saligna* (Figura 19i) evidenciaram diferença na região medial e distal, respectivamente. As demais espécies apresentaram pouca variação intraespecífica. Para melhor elucidar os resultados foi realizada a diagramação dos pecíolos nas três regiões proximal, medial e distal (Quadro 2).

Figura 18 - Anatomia de *Eucalyptus* (pecíolos em secção transversal, porção proximal)

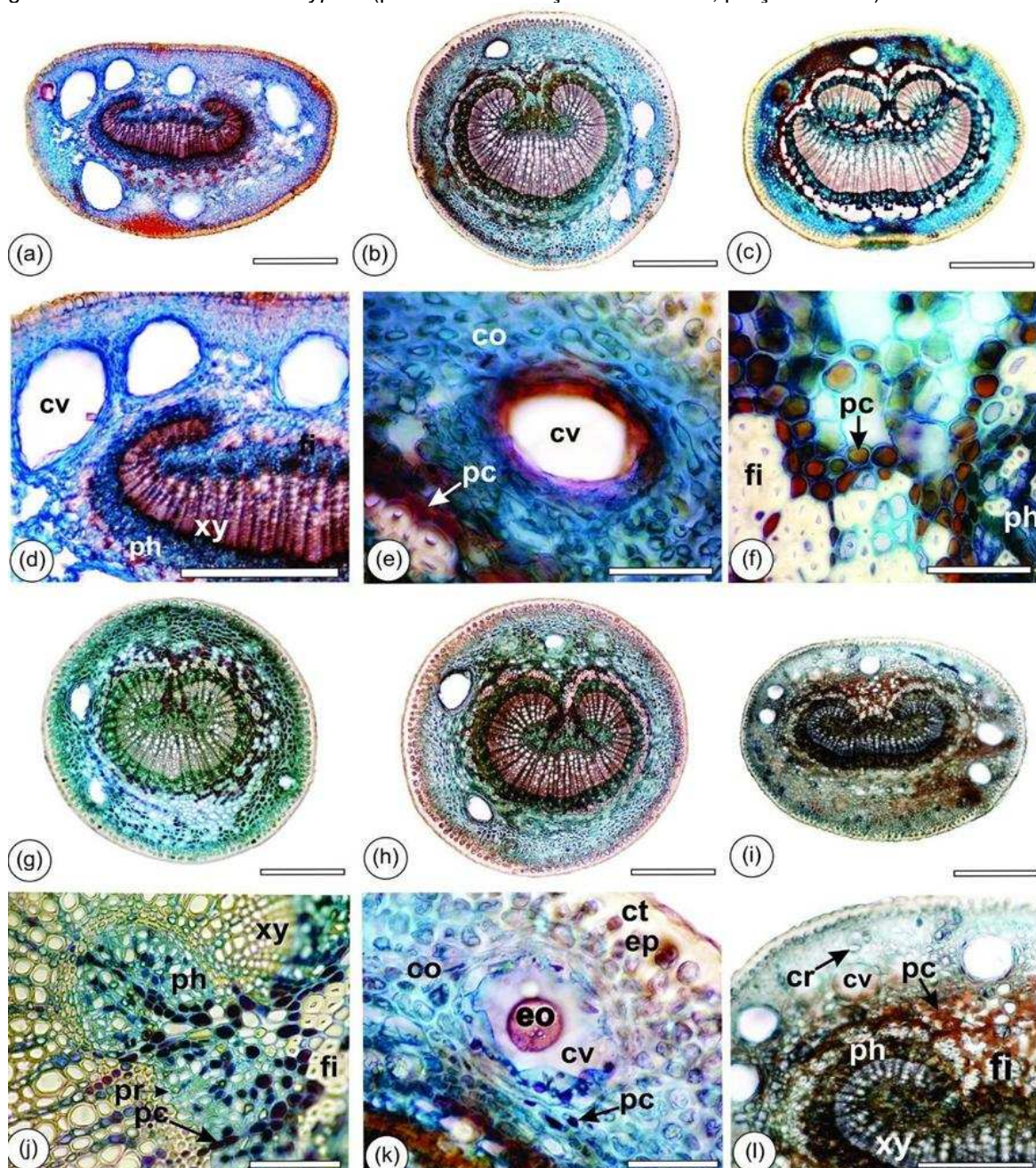


Fonte: A autora

Nota: Pecíolos em secção transversal. porção proximal - microscopia de luz. *E. badjensis* (a-d), *E. benthamii* (b-e), *E. dunnii* (c-f), *E. globulus* (g-j), *E. grandis* (h-k) e *E. saligna* (i-l). [cr: cristal, cv: cavidade oleífera, eo: óleo essencial, ep: epiderme, fi: fibras, le: lenticela, pc: compostos fenólicos, ph: floema, xy: xilema]. Barra: a-c, g-i = 200 µm, d-f, j-l = 50 µm.

Todavia, diferenças entre as espécies foram verificadas como observadas no Quadro 2. Sistema vascular bicolateral foi encontrado em todas as espécies, contudo o arranjo desse sistema se mostrou importante na comparação intraespecífica como em *E. badjensis* que apresentou feixe em arco aberto na região proximal (Figura 18a) e em arco aberto com as extremidades invaginadas nas regiões medial (Figura 19a) e distal (Figura 20a).

Figura 19 - Anatomia de *Eucalyptus* (pecíolos em secção transversal, porção medial).

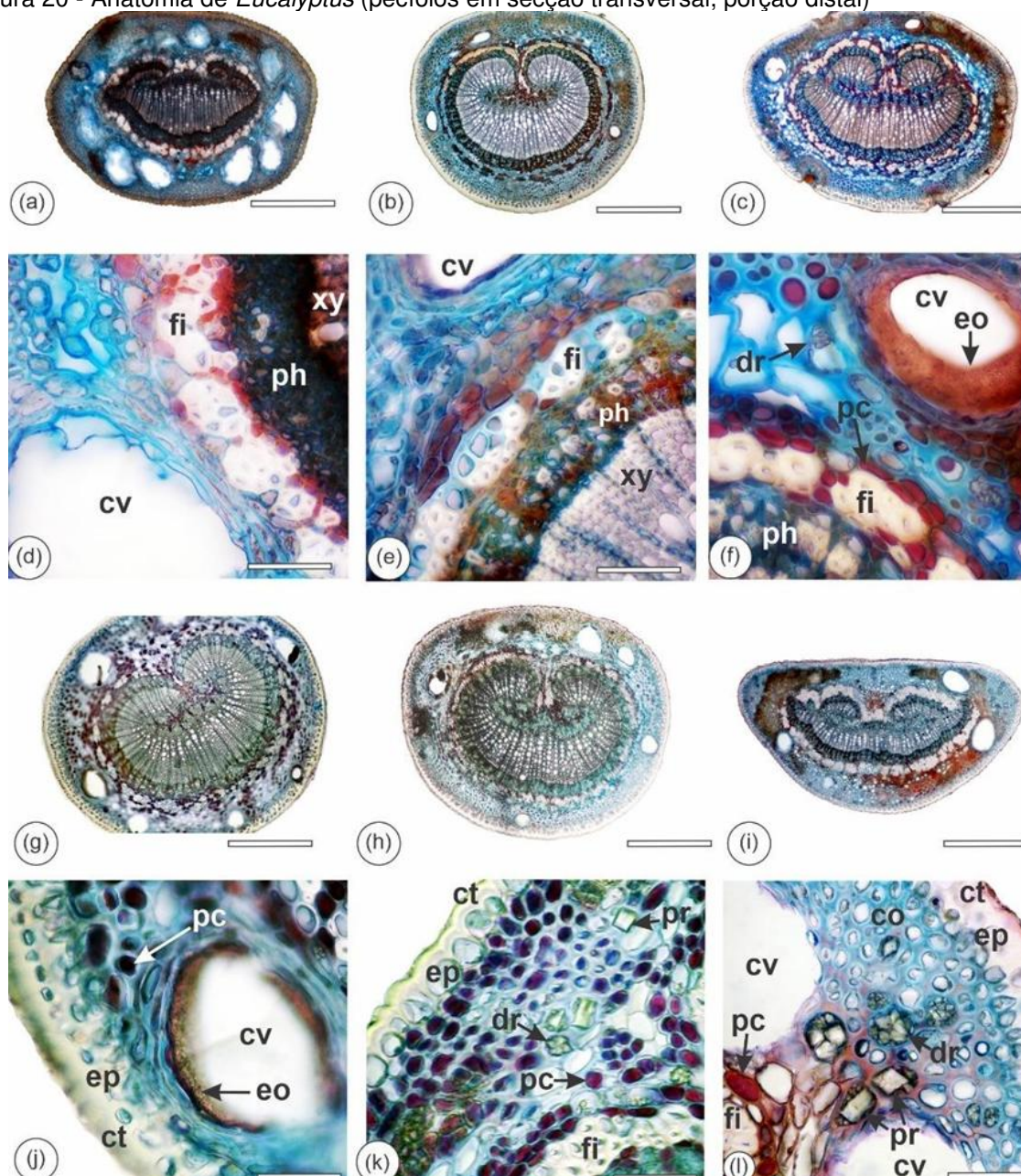


Fonte: A autora

Nota: Pecíolos em secção transversal. porção medial - microscopia de luz. *E. badjensis* (a-d), *E. benthamii* (b-e), *E. dunnii* (c-f), *E. globulus* (g-j), *E. grandis* (h-k) e *E. saligna* (i-l). [cr: cristal, cr: cristal, ct: cutícula, cv: cavidade oleífera, eo: óleo essencial, ep: epiderme, fi: fibras, le: lenticela, pc: compostos fenólicos, ph: floema e xy: xilema]. Barra: a- c, g-i = 200 µm, d-f, j-l = 50 µm.

Da mesma forma, o padrão do sistema vascular se mostrou importante na diferenciação das espécies, sendo que 4 tipos foram observados, a saber: único em arco aberto (Figura 18a), único em arco aberto com as extremidades invaginadas (Figura 18i) único em formato de C com a abertura para a face adaxial (Figura 18b, 18g, 18h, 19b, 19g, 19h, 20b, 20g, 20h) e um feixe em arco aberto e dois dorsais (Figura 18c, 19c, 20c).

Figura 20 - Anatomia de *Eucalyptus* (pecíolos em secção transversal, porção distal)



Fonte: A autora

Nota: Pecíolos em secção transversal. porção medial - microscopia de luz. *E. badjensis* (a-d), *E. benthamii* (b-e), *E. dunnii* (c-f), *E. globulus* (g-j), *E. grandis* (h-k) e *E. saligna* (i-l). [cr: cristal, cr: cristal, ct: cutícula, cv: cavidade oleífera, eo: óleo essencial, ep: epiderme, fi: fibras, le: lenticela, pc: compostos fenólicos, ph: floema e xy: xilema]. Barra: a- c, g-i = 200 µm, d-f, j-l = 50 µm.

As características da forma do pecíolo e do sistema vascular, em secção transversal, fornecem subsídios para a identificação de uma espécie em particular, mostrando-se também relevante para a diferenciação entre outras do grupo.

Ou seja, as combinações do contorno do pecíolo com o tipo de arranjo do feixe vascular em todas as espécies examinadas no presente estudo têm valor importante para uso na identificação e diferenciação de espécies de *Eucalyptus*.

De acordo com recentes estudos publicados, a forma do pecíolo em secção transversal, o padrão do sistema vascular e a presença de idioblastos são características microscópicas que auxiliam na diferenciação e identificação de espécies vegetais, como evidenciados para os gêneros *Passiflora* L. (Wosch *et al.*, 2015), *Hopea* Roxb. (Talip *et al.*, 2017), *Mikania* Willd. (Almeida *et al.*, 2017) e *Piper* L. (Bertocco *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021).

Todas as espécies possuem cavidades secretoras distribuídas no parênquima fundamental do pecíolo (Figuras 18I, 19I, 20I). *Eucalyptus badjensis* apresentou cavidades de maiores dimensões (152,5 µm) em relação as demais espécies (Quadro 2). Esse dado vai ao encontro do maior rendimento de OE obtido nesse estudo.

Cavidades secretoras podem ser encontradas em todos os órgãos de espécies de Myrtaceae (Metcalf; Chalk, 1950). Nesta família, eles são espaços intercelulares isolados, grandes e em forma de esfera que correspondem aos locais de secreção interna e armazenamento. *Eucalyptus saligna* apresentou as menores cavidades conforme observado no Quadro 2 e na Figura 21i).

As cavidades secretoras presentes nas espécies de *Eucalyptus*, contêm não apenas monoterpenos e sesquiterpenos, mas também flavanonas segundo estudo de Goodger *et al.* (2016). Em eucalipto, essas estruturas secretoras são comumente encontradas próximas à epiderme, no mesofilo e na nervura central (Döll-Boscardin *et al.*, 2010; Goodger *et al.*, 2016; Migacz *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021) da folha e no córtex do caule (Saulle *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021) e no pecíolo (Brito *et al.*, 2021).

Também foram observadas lenticelas/súber cicatricial nos pecíolos de *E. dunnii* e *E. grandis* em (Microscopia Eletrônica de Varredura) - MEV, e microscopia ótica – MO, da mesma forma que ocorrem para a lâmina foliar nas espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* (Migacz *et al.*, 2018).

Histoquimicamente, houve reação positiva em todas as espécies com Sudam III e Sudam Black para compostos lipofílicos na cutícula (Figura 21b e 21f) e dentro

das cavidades secretoras (Figura 21b e 20g). Essas características são comuns a várias espécies de eucalipto (Santos *et al.*, 2008; Migacz *et al.*, 2018; Saulle *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021).

Compostos lipofílicos em plantas podem estar presentes na cera epicuticular (depositada nas superfícies externas da lâmina), cutina (presente dentro e sobre as paredes celulares epidérmicas externas), suberina (depositado no interior das paredes primárias das células de certos tecidos como endoderme), e secreções ou depósitos de óleo essencial (no interior de células, dutos, cavidades e tricomas glandulares), entre outros.

O Sudam III cora os lipídios de vermelho ou laranja-avermelhado, enquanto o Sudam black cora de marrom a preto, nos testes histoquímicos (Brito *et al.*, 2021). Neste estudo, dentro das cavidades secretoras foi encontrado somente material lipofílico. Estes dados vão de encontro do observado em *E. tereticornis* o qual apresentou somente material lipofílico dentro das cavidades secretoras, não sendo encontrados compostos fenólicos (Brito *et al.*, 2021), como os observados por Goodger *et al.* (2016).

Comparando o tamanho das cavidades secretoras (Quadro 2), *E. badjensis* apresenta o maior tamanho nas cavidades o que é demonstrado na Figura 21a. Enquanto a espécie que apresentou maior número de cavidades com menor tamanho foi *E. saligna*, conforme observado na Figura 21i.

Nas reações histoquímicas ainda, em todas as espécies foram encontrados compostos fenólicos que reagiram positivamente na presença de cloreto férrico (FeCl_3) a 10%, que através da precipitação de ferro, produz coloração marrom escuro ou preta, e solução de dicromato de potássio 20% que produz uma cor marrom ou marrom-avermelhada (Badria; Aboelmaaty, 2019), sendo localizados, portanto no floema do pecíolo e no parênquima fundamental (Figura 21c, 21d, 21e). Esta informação vai ao encontro da literatura para *E. tereticornis* (Brito *et al.*, 2021) e para *E. saligna* (Saulle *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias formadas por pelo menos uma unidade fenólica e compreendem subgrupos como ácidos fenólicos, taninos, quinonas, lignanas e flavonoides e são encontrados em quase todos os órgãos das plantas. Os fenólicos são responsáveis pela defesa e adaptação do vegetal ao ambiente (herbivoria, doenças fúngicas, evapotranspiração excessiva entre outros) (Tanase; Coşarcă; Muntean, 2019).

Em todas as espécies foi encontrada a presença de lignina, onde a floroglucina clorídrica reagiu positivamente (o floroglucinol, em meio ácido, cora a lignina nas paredes celulares de rosa a vermelho) nas fibras esclerenquimáticas e no xilema (Figura 21g). As mesmas características foram encontradas em *E. saligna* (Saulle *et al.*, 2018). No entanto, Santos *et al.* (2008) encontraram resultados negativos em várias espécies de eucalipto ao analisar plantas jovens com 120 dias de idade.

A lignina é uma substância encontrada em várias ou em todas as camadas da parede secundária que participam do processo de lignificação, resultando em uma importante modificação das propriedades da parede celular. Esse processo leva à perda da elasticidade celular, aumento significativo da rigidez e compressão a tração e diminuição da permeabilidade à água (Monteiro; Pereira; Abreu, 2004).

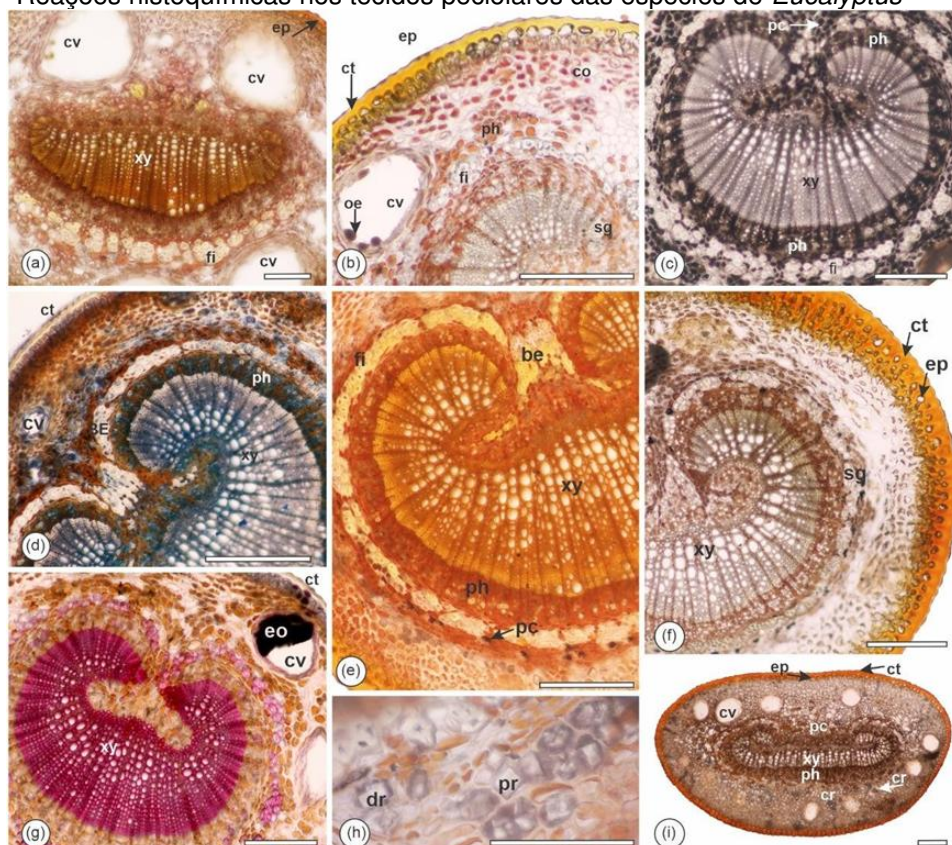
Pequenos aglomerados de grãos de amido foram encontrados nas células especializadas do colênquima, próximas as fibras esclerenquimáticas, sendo que essas reagiram positivamente com lugol (Figura 21f).

Essas características foram observadas em várias espécies de eucalipto (Migacz *et al.*, 2018; Pauzer *et al.*, 2021). O amido é uma das principais substâncias ergásticas do protoplasto e consiste em uma longa cadeia de polissacarídeos agrupados como cristais ao redor de um hilo e formando grânulos característicos (Brito *et al.*, 2021).

As análises histoquímicas em plantas são dedicadas ao estudo da caracterização, distribuição e densidade do acúmulo de substâncias químicas. Compostos ou grupos de metabólitos secundários (componentes lipofílicos, mucilagem, elementos lignificados e compostos fenólicos) dentro de tecidos e células, usando colorações específicas, indicadores em microscopia de luz e posterior registro fotográfico (Vitti; Brito, 2003; Badria; Aboelmaaty, 2019) e a presença desses compostos auxiliam na diagnose de drogas vegetais (Manfron *et al.*, 2022).

Como exemplo, *Monteverdia ilicifolia* Mart. ex Reissek, contém taninos condensados, o teste de vanilina clorídrica confirma a presença ou ausência desse grupo de metabólitos fornecendo subsídios ao controle da qualidade de produtos à base de espinheira-santa (Antunes *et al.*, 2023).

Figura 21 - Reações histoquímicas nos tecidos peciolares das espécies de *Eucalyptus*



Fonte: A autora

Nota: *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*. Testes histoquímicos. *E. badjensis* com reação de sudão III (a) e floruglucina clorídrica (g), *E. benthamii* com reação ao cloreto férrico (c) e reação com iodo (f), *E. dunnii* com solução de sudam III (b), *E. grandis* com reação do dicromato de potássio (e) e solução de sudam III (h), *E. globulus* com solução de azul brilhante de Comassie (d) e *E. saligna* com solução de sudam III (i). [be: bainha esclerenquimática, co: colênquima; ct: cutícula; cv: cavidade, dr: drusa; eo: óleo essencial, ep: epiderme, fi: fibra; pc: compostos fenólicos; ph: floema; pr: prisma; sg: grãos de amido e xy: xilema. Barra de escala: 100 µm (a, b, c, d, e, f, g, h); 50 µm (h); (i) 200 µm].

Neste estudo como os fatores ambientais das plantas foram controlados (mesmo local de cultivo), com mesma idade fenológica, as diferenças encontradas são somente intrínsecas à genética do vegetal.

Em estudo na Coreia que resultou em uma chave dicotômica (Song; Hong, 2018), os autores analisaram anatomia das regiões proximal, medial e distal dos pecíolos de um total de 32 espécies (subfamília Sorbarieae (Rosaceae)) e do gênero relacionado *Lyonothamnus* e encontraram várias diferenças, principalmente nos feixes vasculares entre a região medial e distal do pecíolo das espécies analisadas. Vale destacar que tais diferenças podem ter sido causadas pelas variações inerente ao hábito das espécies e do processamento do material vegetal, uma vez que este foi obtido de material herborizado proveniente de 18 países diferentes.

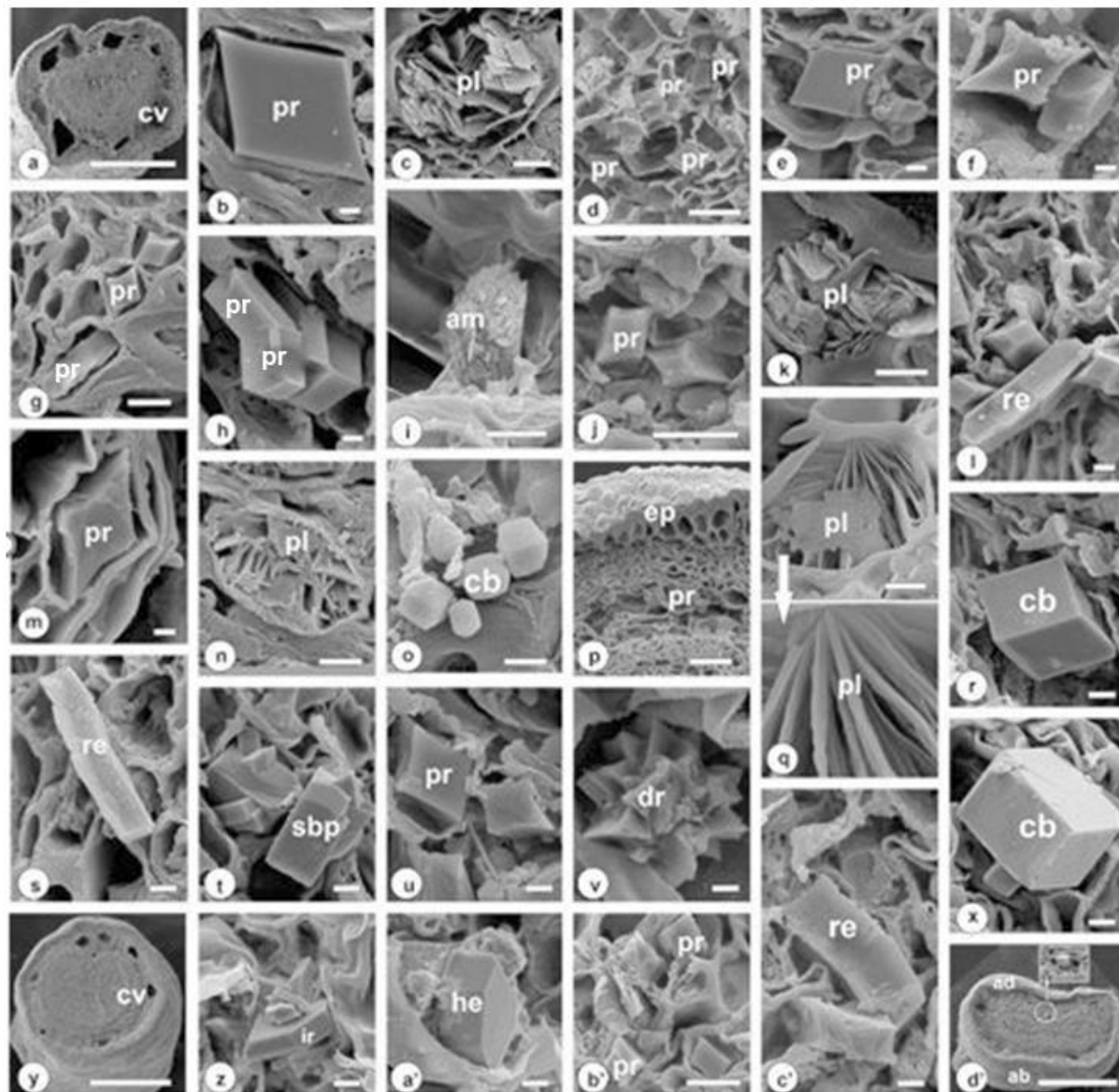
Quadro 2 - Características peciolas das espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*

Características		<i>E. badjensis</i> (Eba)	<i>E. benthamii</i> (Ebe)	<i>E. dunnii</i> (Edu)	<i>E. globulus</i> (Egl)	<i>E. grandis</i> (Egr)	<i>E. saligna</i> (Esa)
Tamanho do pecíolo (cm)		12,3-18 mm $\pm$ 3,18	23-29 mm $\pm$ 3,18	11,6-26 mm $\pm$ 5,8	18-28 mm $\pm$ 4,33	14-23 mm $\pm$ 6,14	14-18 mm $\pm$ 2,15
Formato em secção transversal	P	Elipsoide	Circular	Elipsoide	Circular	Circular	Elipsoide
	M	Plano-convexo	Circular	Elipsoide	Circular	Circular	Elipsoide
	D	Elipsoide	Circular	Elipsoide	Circular	Circular	Plano-convexo
Sistema vascular	P	Único em arco aberto	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Um feixe em arco aberto e dois feixes dorsais	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em arco aberto e com extremidades invaginadas
	M	Único em arco aberto	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Um feixe em arco aberto e dois feixes dorsais	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em arco aberto e com extremidades invaginadas
	D	Único em arco aberto e com extremidades invaginadas	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Um feixe em arco aberto e dois feixes dorsais	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em formato de C com a abertura para a face adaxial	Único em arco aberto e com extremidades invaginadas
Número de cavidades		6-7	5-7	2-3	4-7	3-6	9-10
Diâmetro das cavidades secretoras		152,5 μ m	105,2 μ m	110,4 μ m	103,7 μ m	112,0 μ m	106,2 μ m
Diagrama Pecíolo Próxima							
Diagrama Pecíolo Medial							
Diagrama Pecíolo Distal							
Morfotipos cristalinos	Prismático retangular	Prismático retangular	Irregular	Romboide	Romboide	Romboide	Romboide
			Em forma de placas				
		Em forma de placas	Amorfo	Drusa	Drusa	Drusa	Drusa
			Cúbico			Em forma de placas	Prismático retangular
		Drusa	Romboide				
			Prismático hexagonal			Prismático retangular	Cubo

Fonte: A autora

Os morfotipos de cristais presentes nos pecíolos das espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22 - Cristais presentes nos pecíolos das espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna*



Fonte: A autora

Nota: Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) – seção transversal. *E. badjensis* (a, g, m, s), *E. benthamii* (y, b, h, n, t), *E. dunnii* (z, c, i, o, u, a'), *E. globulus* (d, j, p, v, b'), *E. grandis* (e, k, q, c') e *E. saligna* (l, r, x, d'). [am: amorfo; cb: cristal cúbico; dr: drusa; he: cristal hexagonal; ir: cristal irregular; re: retangular; ro: cristal romboide; se: seta; st: estiloides. Barra de escala: j= 500 µm; a, d' = 200 µm; p=50 µm; g, s, b, h, c, k, l, r, x=10 µm; m, t, z, i, a', e =20 µm; q=5 µm].

Os cristais de oxalato de cálcio são comumente relatados em famílias botânicas de maior porte e ocorrem na maioria dos órgãos e tecidos. São classificados, simplificada e, em cinco categorias: areia cristalina, drusas, ráfides, estiloides e

cristais prismáticos. Sendo que todas essas formas se originam de um único cristal, podendo ocorrer agregação (Franceschi; Horner, 1980).

Normalmente, os morfotipos dos cristais, bem como sua distribuição nos tecidos vegetais, são constantes dentro de um táxon específico (Franceschi; Horner 1980; Nakata, 2003). No entanto, o tamanho e quantidade de cristais presentes dependem das mudanças na concentração de cálcio no solo (Franceschi; Nakata, 2005).

Dechen e Nachtigall (2007) descrevem minuciosamente o metabolismo de cálcio nas plantas. Resumidamente, o cálcio é absorvido pelas plantas a partir do solo na forma de Ca^{2+} (este é dependente do nitrogênio disponível para sua completa absorção), sendo transportado no xilema e em partes no floema. Depois de ser transportado para o interior da planta, mais especificamente no floema, o cálcio se torna imóvel. Portanto a maior parte do Ca no tecido vegetal proveniente do ácido oxálico sintetizado de forma endógena, encontra-se sob formas não solúveis em água, estes sais cálcicos de baixa solubilidade como o carbonato e o oxalato de cálcio darão origem aos cristais, estes por sua vez se cristalizam em formas características dando origem aos morfotipos cristalinos.

Portanto os cristais ocorrem, geralmente nos caules (Brustulim *et al.*, 2020), em folhas (Migacz *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2019), pecíolos (Brito *et al.*, 2021) e pode ser depositado também em diferentes tecidos e locais, como nas células epidérmicas, externamente à epiderme (Almeida *et al.*, 2020), no mesofilo (Tirloni *et al.*, 2018), e no córtex e medula do caule ou ainda sob a epiderme no limbo foliar como o cristal prismático encontrado em *E. globulus* (Migacz *et al.*, 2018). Porém podem ser encontrados também em raízes (Gonzalez *et al.*, 2009).

As funções propostas dos cristais incluem a regulação do cálcio, proteção da planta contra herbívoros e desintoxicação de alumínio e metais pesados (Franceschi; Nakata 2005). Em *Eucalyptus*, o morfotipo e a localização dos cristais são caracteres diagnósticos que auxiliam na identificação da espécie (Brito *et al.*, 2021).

Foram encontrados cristais prismáticos e drusas no mesofilo de *E. badjensis*, *E. benthamii* e *E. dunnii* (Migacz *et al.*, 2018), cristais prismáticos na nervura central e pecíolo de *E. saligna* (Saulle *et al.*, 2018), prismas, agregados de placas, drusas e tabulares no mesofilo, nervura central e medula de *E. cinerea* (Pauzer *et al.*, 2021).

Considerando os vários tipos de cristais de oxalato de cálcio em espécies de *Eucalyptus*, uma investigação minuciosa é necessária para determinar os morfotipos

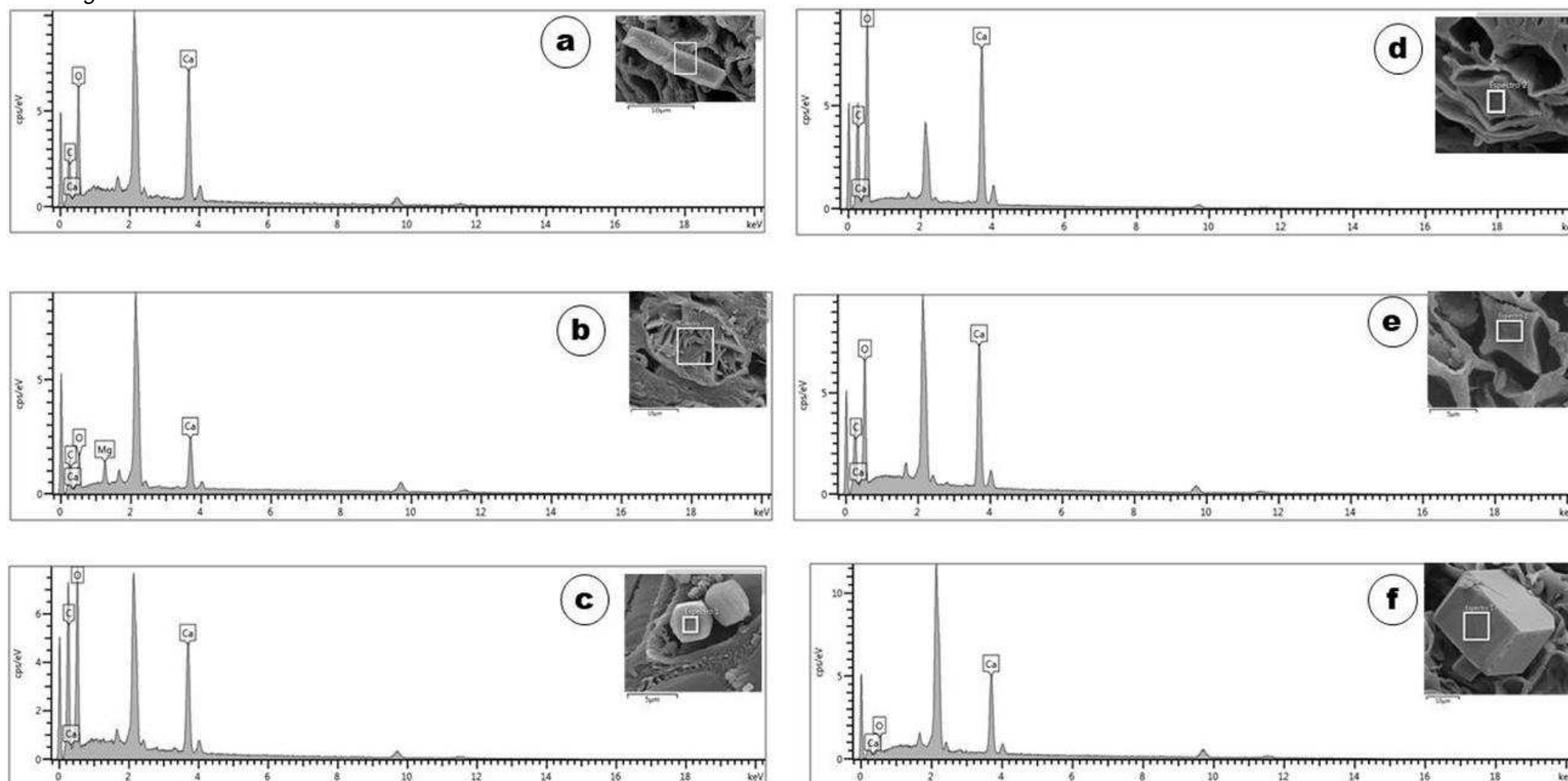
e padrões dos cristais no pecíolo. De forma geral, *E. dunnii* foi a espécie que apresentou maior quantidade de diferentes morfotipos cristalinos (Quadro 2).

Como em todos os estudos anatômicos, deve-se considerar cuidadosamente a influência potencial de fatores como idade da planta e condições ambientais (Santos *et al.*, 2018; Talip *et al.*, 2017). Para efeito de diferenciação de espécies de *Eucalyptus*, este trabalho avaliou plantas em mesma idade e de mesmo ambiente, fato que nunca foi relatado anteriormente na literatura para as espécies de *Eucalyptus*. Dessa forma, as características obtidas do presente estudo fornecem subsídios de alto valor diagnóstico e taxonômico para a identificação das espécies avaliadas.

No presente estudo, os espectros das microanálises qualitativas de raios-X (EDS) dos cristais mostram picos de cálcio, carbono e oxigênio (Figuras, 23a, 23f, 24a, 24b), sugerindo que esses cristais são de oxalato de cálcio. Na figura 24c foi utilizada a técnica de mapeamento dos cristais, em microscopia eletrônica de varredura evidenciando na coloração a presença de cálcio, em azul o oxigênio e carbono em vermelho.

A presença, o tipo e a composição química dos cristais têm auxiliado na diagnose de drogas vegetais, como observado em espécies de Asteraceae (Almeida *et al.*, 2020; Raeski *et al.*, 2023), Euphorbiaceae, Lauraceae (Brustulim *et al.*, 2020), Myrtaceae, Piperaceae (Bertocco *et al.*, 2017, Santos *et al.*, 2021) e Rubiaceae (Formagio *et al.*, 2022).

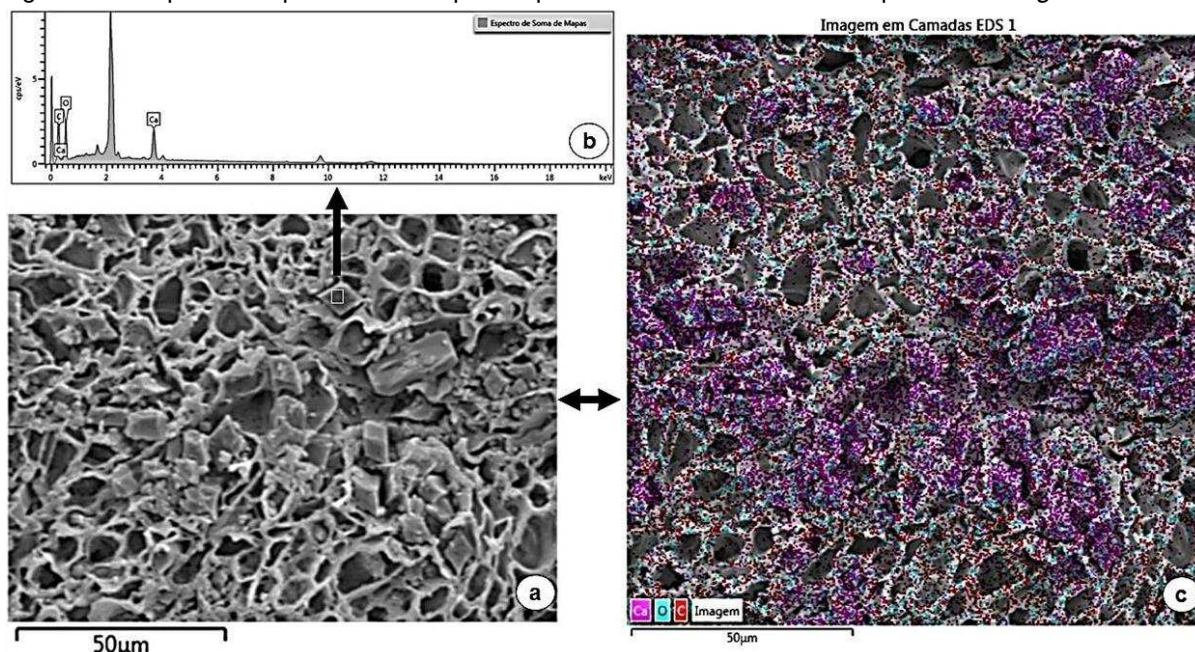
Figura 23 - Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) dos cristais nas espécies de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna*



Fonte: A autora

Nota: Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS). *E. badjensis* (a) EDS do cristal estiloide; (b) *E. benthamii*, EDS do cristal em placas; *E. dunnii*, (c) EDS do cristal em Cubo. *E. globulus* d) EDS do cristal prismático; *E. grandis* (e) EDS do cristal prismático *E. saligna* (f) EDS do cristal Cubo. Os picos não identificados correspondem ao metal "Au" utilizado no processo de metalização do material para análise em microscopia eletrônica de varredura.

Figura 24 - Espectroscopia de raios X por mapeamento dos cristais nas espécies de *E. globulus*



Fonte: A autora

Nota: Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS. *E. globulus* (a, b). EDS do cristal prismático (b); EDS dos cristais da imagem a mapeamento (c). Os picos não identificados correspondem ao metal “Au” utilizado no processo de metalização do material para análise em microscopia eletrônica de varredura.

Apesar da morfoanatomia da lâmina foliar das seis espécies de *Eucalyptus* de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* ter sido anteriormente descrita por (Migacz *et al.*, 2018), não havia informações a respeito da morfoanatomia dos pecíolos, justificando, portanto, a realização do estudo dos pecíolos.

Considerando que as espécies desse estudo foram cultivadas em mesmo ambiente, seguindo recomendações agrônomicas para o gênero, além da padronização da idade fenológica das espécies, pode-se afirmar que as características morfoanatômicas diferenciais encontradas são atribuídas especificamente à genética do vegetal.

5.2 VARIAÇÕES SAZONAIS NO TEOR DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus*

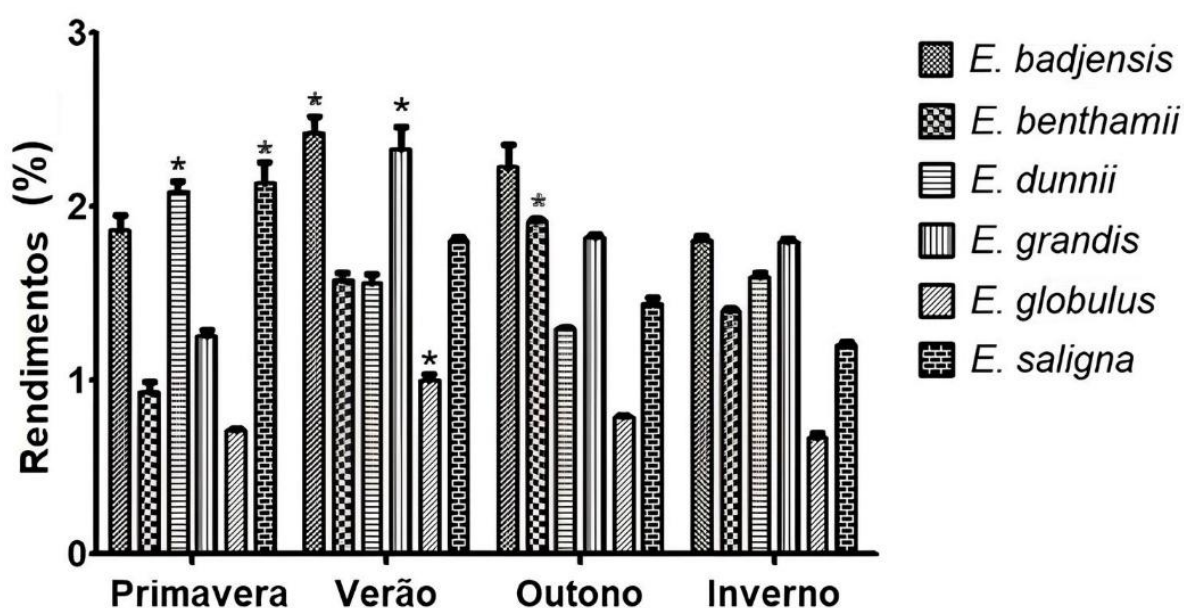
A extração dos OEs a partir de folhas secas de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* foi realizada por hidrodestilação em aparato de Clevenger (ANVISA, 2019) por 4 horas. Os resultados relacionados às variações sazonais no rendimento dos OEs estão ilustrados na Figura 25.

A produtividade média obtida para OEs extraídos das folhas de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus*, e *E. saligna* apresentaram importante

variação sazonal ($p < 0,05$) na primavera, verão e outono. No inverno não houve diferença significativa entre as espécies (interespecífica). Os rendimentos variaram de 0,7 a 2,43% (v/p), com o maior rendimento para *E. badjensis* no verão e o menor para *E. grandis* no inverno. Em geral, todas as espécies tiveram maior rendimento no verão, seguido pela primavera, outono e inverno.

A presença e o tamanho das cavidades secretoras do pecíolo das espécies desse estudo, corrobora com os resultados de maior rendimento do OE obtido em *E. badjensis* conforme ilustrado na figura 19.

Figura 25 - Representação gráfica dos rendimentos médios (% m/v) em função da sazonalidade



Fonte: A autora

Nota: Os rendimentos apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey * $p < 0,05$. As barras de erro indicam o erro padrão da média para 3 repetições.

Considerando os resultados deste estudo, a época ideal para a coleta de folhas visando a extração de óleos essenciais (OEs) na região centro-sul do Paraná varia conforme a espécie de eucalipto. Para *E. badjensis*, *E. grandis* e *Eucalyptus globulus*, o verão é a estação mais indicada. Para *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus saligna*, a primavera se mostra a mais adequada. Por fim, para o *Eucalyptus benthamii*, o outono é a melhor época de coleta.

Assim, para otimizar a produção de OE, é recomendado realizar a coleta de folhas de *E. badjensis*, *E. grandis* e *E. globulus* durante o verão. Para *E. dunnii* e *E. saligna*, a primavera é a melhor estação. Enquanto para *E. benthamii*, a coleta deve ser feita no outono, visto que essa estação proporciona o melhor rendimento para essa espécie.

Nas mesmas condições experimentais de extração do presente estudo, *E. cinerea* apresentou alto rendimento de 5,4% (v/p) de folhas secas (Pauzer *et al.*, 2021), enquanto em *E. saligna* o rendimento foi de 1,03 % (v/p). No entanto, Bett *et al.* (2017) afirmaram 0,38% (v/p) para *E. saligna*.

Portanto, existem muitas variações no rendimento dos OEs atribuídas ao ambiente de cultivo (solo, clima, sazonalidade e regime de chuvas), bem como os processos de secagem e extração (Gobbo-Neto *et al.*, 2007; Tischer *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2023) e fase de desenvolvimento da planta (Limam *et al.*, 2020). Em *Eucalyptus*, a variação na produção de OEs foliares é fortemente influenciada pela quantidade de água no solo e a temperatura no ano em que a sazonalidade da coleta é analisada (Silva *et al.*, 2006).

As variações na produção de OEs observadas no presente estudo podem ser atribuídas as diferenças genéticas entre as espécies de *Eucalyptus* estudadas. Vale ressaltar que os procedimentos de cultivo, coleta e extração de OEs foram padronizados, e amostras de todas as espécies foram coletadas de árvores da mesma idade e cultivadas em condições agroclimáticas e de solo idênticas. Assim, os resultados indicam que, além dos fatores ambientais, as diferenças genéticas desempenham um papel crucial na variação do rendimento dos OEs entre as diferentes espécies de *Eucalyptus*.

Esta padronização no cultivo e na coleta permitiu uma avaliação mais precisa do potencial de cada espécie para a produção de OEs, isolando os efeitos dos fatores ambientais e destacando as características intrínsecas de cada espécie.

Um estudo desenvolvido por Ghazghazi *et al.* (2019) analisaram a potencialidade para a produção de OE a partir de folhas frescas de 9 espécies de *Eucalyptus*, incluindo *E. badjensis*. Nesse estudo, *E. badjensis* obteve um rendimento de $1,25 \pm 0,78\%$, sendo o segundo maior entre as espécies pesquisadas. Segundo os autores, na Austrália, sob as mesmas condições experimentais, exemplares de *E. badjensis* podem alcançar um rendimento de 2,8% de OE. Esse valor foi superior aos encontrados na literatura para *E. globulus* ($1,4 \pm 0,32\%$), *E. viminalis* ($1,23 \pm 0,43\%$) e *E. bosistoana* F. Muell. ($1\% \pm 0,5\%$).

Outro estudo comparou a produção de OE de espécies cultivadas em Colombo, Paraná, Brasil, e observou maior produtividade para *E. tereticornis* Sm. (2,55 %) e *E. dunnii* (2,48 %) em comparação com *E. robusta* Sm. (0,78 %), *E. benthamii* (1,21 %) e *E. camaldulensis* Dehnh (1,27 %) (Denardin *et al.*, 2017). Os maiores rendimentos

de OE relatados na literatura foram para *Corymbia citriodora* Hook. (sin. *Eucalyptus citriodora* Hook.) (1,0-1,6%), *E. globulus* (1,7-5%) e *E. staigeriana* F.Muell ex. F. M.Bailey (1,2-1,5%) (Vitti; Brito, 2003).

Adicionalmente, os rendimentos encontrados nesse estudo foram semelhantes ao obtido para o OE de *E. benthamii*, no outono (Döll-Boscardin *et al.*, 2010; Vitti e Brito (2003) afirmaram que, no Brasil, as principais espécies que apresentam maior rendimento no OE extraído de folhas são *E. globulus* (1,7-5%) e *E. staigeriana* (1,2-1,5%).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

De uma maneira geral os OE analisados possuem coloração amarela-clara, com exceção de *E. saligna* que apresenta coloração amarelo-escura. Essas características físicas também foram observadas nos OEs de *E. benthamii* (Döll-Boscardin *et al.*, 2010) e *E. globulus* (Vitti; Brito, 2003).

Conforme verificada na Tabela 1, a densidade variou de 0,8946 a 0,9261 g/mL, sendo o menor valor para *E. grandis* e o maior valor para *E. saligna*. Os resultados diferiram com os definidos para *E. globulus*, com densidade entre 0,904 e 0,924 (Farmacopéia Brasileira, 2010). Segundo a *International Standard Organization* (ISO), a densidade relativa para os OEs de *Eucalyptus* ricos em eucaliptol deve estar entre 0,906 e 0,925 (ISO 770–1980) ou entre 0,918 e 0,928 (ISO 3065–1974) (Vitti; Brito, 2003).

Tabela 1 - Densidade do “Pool” do óleo essencial de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna*

Espécies	Densidade (g/mL)
<i>Eucalyptus badjensis</i>	0,8907
<i>Eucalyptus benthamii</i>	0,8957
<i>Eucalyptus dunnii</i>	0,9063
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,9040
<i>Eucalyptus grandis</i>	0,8946
<i>Eucalyptus saligna</i>	0,9261

Fonte: A autora

Nota: “Pool”: (alíquota equivalente de 1:1:1:1 parte do óleo essencial proveniente de cada estação).

As espécies deste estudo apresentaram um índice de refração para os OEs de (1,44 - 1,47) (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos óleos essenciais com as amostras de cada estação de coleta (primavera, verão, outono e inverno)

	Índice de Refração (IR)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
<i>Eucalyptus badjensis</i>	1,45	1,44	1,44	1,45
<i>Eucalyptus benthamii</i>	1,47	1,47	1,47	1,46
<i>Eucalyptus dunnii</i>	1,46	1,47	1,46	1,45
<i>Eucalyptus globulus</i>	1,47	1,46	1,46	1,44
<i>Eucalyptus grandis</i>	1,47	1,47	1,45	1,46
<i>Eucalyptus saligna</i>	1,46	1,46	1,45	1,45

Fonte: A autora

O OE extraído de folhas secas está de acordo com o preconizado por Guenther (1977) para OEs medicinais, que determina valores entre 1,4600-1,4700. Para OEs ricos em 1,8-cineol, os valores desejados estão entre 1,4580-1,4650. Para o OE de *E. globulus*, os valores devem estar entre 1,4590 e 1,4670 (Vitti; Brito, 2003).

5.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

As composições químicas dos OEs extraídos por hidrodestilação de folhas secas das seis espécies de *Eucalyptus* foram analisados qualitativa e quantitativamente por CG-EM e CCDAE, nas diferentes estações do ano (primavera, verão, outono e inverno entre 2019-2020) e os resultados foram apresentados e comparados na Tabela 3 e na Figura 27.

5.4.1 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

Os OEs das seis espécies de *Eucalyptus* estudadas compreendem misturas complexas de monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 3). Foram encontrados 86 compostos onde os monoterpenos oxigenados foram predominantes nos OEs de *E. badjensis*, *E. globulus* e *E. saligna* em todas as estações. Por outro lado, os monoterpenos de hidrocarbonetos foram predominantes nos OEs de *E. benthamii* e *E. grandis* ao longo das estações. A maioria dos compostos diferiu entre e intraespécies tanto em constituintes quanto em proporções (Tabela 2). O estudo revelou variações significativas nas proporções dos compostos majoritários dos OEs entre diferentes espécies de *Eucalyptus* e entre as estações do ano. A seguir estão descritos os principais achados:

- *E. badjensis*:
 - 1,8-cineol: 77,35% na primavera, 69,46% no verão, 95,30% no outono, 89,30% no inverno;
- *E. benthamii*:

- α -pineno: 36,16% na primavera, 41,49% no outono, 41,84% no inverno;
- Globulol: 22,73% no verão;
- *E. globulus*:
 - 1,8-cineol: 84,87% na primavera, 79,94% no verão, 81% no outono, 86% no inverno;
- *E. dunnii*:
 - 1,8-cineol: 43,31% na primavera, 58,83% no verão;
 - α -pineno: 43,18% no outono, 41,48% no inverno;
- *E. grandis*:
 - o-Cimeno: 21% na primavera, 20% no verão;
 - α -pineno: 22% no outono, 33,9% no inverno;
- *E. saligna*:
 - Epatulenol: 17,46% na primavera;
 - o-Cimeno: 21,59% no verão, 20,60% no outono, 31,15% no inverno.

As variações observadas nas proporções dos compostos dos OEs das diferentes espécies de *Eucalyptus* indicam que tanto a espécie quanto a estação do ano influenciam significativamente a composição dos OEs. Isso pode ter implicações importantes para a utilização desses OEs em diferentes aplicações, considerando que os constituintes e suas proporções determinam as propriedades terapêuticas e industriais dos OEs.

Por exemplo, o 1,8-cineol é um componente comum em muitas espécies de *Eucalyptus* e é conhecido por suas propriedades expectorantes e descongestionantes, o que o torna valioso em produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais para tratamento de problemas respiratórios. O α -pineno é outro composto significativo, com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, tornando-se útil em produtos de limpeza e desinfetantes, além de ter aplicações terapêuticas. O globulol possui propriedades antibacterianas e antifúngicas, enquanto o espatulenol é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Limam *et al.*, 2022). Portanto, compreender como a composição dos OEs varia entre as espécies de *Eucalyptus* e ao longo das estações pode orientar escolhas mais precisas na utilização desses OEs em diferentes contextos, sejam eles terapêuticos ou industriais.

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continua)

(continued)															
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	PR	VE	OU	IN	PR	% Área de pico			PR	VE	OU	IN
									VE	OU	IN		VE	OU	IN
					<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>		
1	940	939	1R- α -Pinene	4,61	4,62	1,91	2,88	36,16	22,31	41,49	41,84	3,86	22,12	43,10	41,40
2	976	970	Tricyclene	0,26	0,19	-	-	-	-	-	0,39	-	-	-	-
3	977	978	β -Pinene	-	-	-	-	0,63	0,23	0,38	0,39	0,08	0,19	0,43	0,51
4	920	925	β -Myrcene	0,19	0,27	-	-	0,18	0,05	0,08	0,0-9	0,25	0,09	0,10	0,14
5	1002	1000	α -Phellandrene	-	0,18	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
6	1016	1018	<i>o</i> -Cymene	4,54	4,68	2,79	3,45	6,91	0,37	1,86	1,87	10,43	5,51	0,66	1,21
7	1026	1031	D-Limonene	-	-	-	-	2,14	0,52	0,99	1,00	-	-	-	-
8	1053	1059	γ -Terpinene	0,12	0,24	-	-	1,81	-	0,06	-	6,08	-	-	-
	Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)			4,80	9,71	4,70	6,33	47,65	23,43	44,72	45,49	40,37	27,63	23,76	22,61
					<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>		
1	940	939	1R- α -Pinene	4,08	3,84	2,60	2,89	17,59	20,05	22,03	33,90	0,28	0,64	0,68	0,57
2	976	970	Tricyclene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	977	978	β -Pinene	0,20	0,19	0,19	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-
4	920	925	β -Myrcene	0,43	0,40	0,42	0,68	0,11	0,12	0,11	-	-	-	-	-
5	1002	1000	α -Phellandrene	0,77	0,73	0,95	0,86	-	-	-	-	0,08	0,17	0,18	0,17
6	1016	1018	<i>o</i> -Cymene	8,16	7,68	7,52	6,70	21,05	20,06	16,23	7,79	12,42	21,59	20,60	31,15
7	1026	1031	D-Limonene	-	-	-	-	2,49	2,27	2,76	39,05	1,59	3,36	2,15	5,44
8	1053	1059	γ -Terpinene	1,49	1,40	1,73	2,33	4,46	8,14	8,14	0,50	0,12	0,22	0,11	0,21
	Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)			14,73	14,05	13,22	13,46	45,59	50,52	49,16	55,24	14,29	25,59	23,43	37,16
					<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>		
9	1027	1033	1,8-Cineol or 1,8-eucalyptol	77,35	69,46	95,30	89,13	-	-	-	-	43,31	58,83	1,38	7,95
10	1052	1056	γ -Murolene	-	-	-	-	0,30	0,30	0,23	0,23	-	-	-	-
11	1085	1095	Linalool	-	-	-	-	1,68	0,58	0,29	0,30	0,08	0,06	1,14	1,31
12	1089	1091	Epoxide of α -pinene	0,23	-	-	-	0,49	0,30	0,59	0,60	-	-	-	-
13	1090	1095	Isopentyl isovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,82	0,33	0,47
14	1096	1098	<i>trans</i> -Verbenol	-	-	-	-	0,34	0,19	0,40	0,40	-	-	-	-
15	1104	1006	Phellandral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1111	1115	<i>trans</i> -2-Mentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1120	1120	Limonene oxide	0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1128	1126	1-Isobutyl-1-cyclohexene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	1130	1130	L-Pinocarveol	-	-	-	-	0,21	0,46	0,14	0,14	-	0,71	0,95	0,72

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continuação)															
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN
				<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>			
20	1151	1149	Biisocrotyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	1155	1156	<i>endo</i> -Borneol	-	-	-	-	0,40	0,18	0,23	0,23	-	-	-	0,44
22	1161	1160	Kryptonium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	1163	1162	Cryptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	1163	1166	<i>p</i> -Cymen-8-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1168	1162	Terpinen-4-ol	0,70	0,81	-	0,41	0,46	0,05	0,08	0,08	2,07	0,25	0,20	0,22
26	1176	1177	Terpineol	1,48	1,92	-	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1177	1189	L- α -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1177	1189	neol	-	-	-	-	0,91	0,52	0,74	0,74	9,72	10,41	1,29	1,29
29	1194	1191	<i>cis</i> -Sabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	1201	1209	<i>p</i> -Cumenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	1218	1219	Cumaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1218	1221	2-methyl-3-phenyl-propanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	1220	1222	D-Carvone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	1233	1242	Piperitone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	1264	1261	<i>p</i> -Cymen-7-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	1277	1269	<i>p</i> -Thymol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	1297	1299	1-Formyl-5-ethylcyclopentene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	1336	1345	α -Terpinyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpenos Oxigenados (MO)				79,84	72,19	95,30	90,37	4,12	2,1	2,48	2,50	54,90	63,02	19,77	21,09
				<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>			
9	1027	1033	1,8-Cineol or 1,8-eucalyptol	84,87	79,94	81,01	85,88	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1052	1056	γ -Muroleone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1085	1095	Linalool	-	-	-	-	2,26	2,01	1,91	0,22	-	-	-	0,08
12	1089	1091	Epoxide of α -pinene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1090	1095	Isopentyl isovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1096	1098	<i>trans</i> -Verbenol	-	-	-	-	0,06	-	-	0,14	-	-	-	-
15	1104	1006	Phellandral	-	-	-	-	-	-	-	-	2,43	2,30	4,43	1,04
16	1111	1115	<i>trans</i> -2-Mentenol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39	0,49	0,25	-
17	1120	1120	Limonene oxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1128	1126	1-Isobutyl-1-cyclohexene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49	0,47	0,61	0,53

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continuação)															
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	PR	% Área de pico										
					VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN
					<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>		
19	1130	1130	L-Pinocarveol	-	-	-	-	0,06	-	1,03	0,52	-	-	-	-
20	1151	1149	Biisocrotyl	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,24	0,31	0,33
21	1155	1156	endo-Borneol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	1161	1160	Kryptonium	-	0,88	1,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	1163	1162	Cryptone	-	-	-	-	-	-	-	0,52	15,56	17,20	18,31	17,82
24	1163	1166	p-Cymen-8-ol	-	-	-	-	0,30	0,23	0,34	0,27	-	-	-	-
25	1168	1162	Terpinen-4-ol	-	0,53	0,57	-	3,73	3,73	3,86	-	2,93	3,56	2,51	5,22
26	1176	1177	Terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1177	1189	L-α-Terpineol	-	-	-	-	1,07	0,92	1,25	6,91	-	-	-	-
28	1177	1189	neol	-	1,04	0,80	-	-	-	-	-	0,59	0,69	0,6	0,8
29	1194	1191	cis-Sabinol	-	-	-	-	-	-	0,07	-	0,24	0,27	0,36	0,19
30	1201	1209	p-Cumenol	-	-	-	-	-	-	-	-	1,05	0,87	1,25	0,68
31	1218	1219	Cumaldehyde	-	0,27	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1218	1221	2-methyl-3-phenyl-propanal	-	-	-	-	-	-	-	-	5,04	5,22	4,83	6,33
33	1220	1222	D-Carvone	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	0,28	0,29	0,31
34	1233	1242	Piperitone	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	0,35	0,33	0,35
35	1264	1261	p-Cymen-7-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	1,34	1,19	1,64	0,80
36	1277	1269	p-Thymol	-	-	-	-	-	-	-	-	4,46	3,67	3,84	2,73
37	1297	1299	1-Formyl-5-ethylcyclopentene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,33	0,29	0,25
38	1336	1345	α-Terpinyl acetate	-	0,33	-	-	-	-	-	2,71	-	-	-	-
	Monoterpenos Oxigenados (MO)			84,87	82,99	84,07	85,88	7,36	6,89	7,36	13,63	35,59	37,17	39,85	37,38
					<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>		
39	1381	1385	Isoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	1419	1419	α-Gurjunene	-	-	-	-	1,88	1,55	1,21	1,22	2,15	0,22	0,61	0,60
41	1432	1436	1,1,3a-Trimethyl-7	-	-	-	-	0,29	0,33	0,26	0,27	0,07	-	0,12	0,10
42	1441	1449	β-Gurjunene	0,79	1,33	-	-	0,59	0,79	0,63	0,64	0,71	0,14	0,40	0,31
43	1440	1445	β-Maaliene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	0,92	0,84
44	1443	1449	α-Maaliene	-	-	-	-	0,19	0,22	0,19	0,19	-	-	-	-
45	1449	1439	Aromadendrene	-	-	-	-	16,02	24,68	20,37	20,54	5,64	1,23	12,10	9,94
46	1467	1467	Alloaromandrene	-	-	-	-	1,75	2,24	1,71	1,73	1,14	0,22	1,03	0,90
47	1476	1478	γ-Gurjunene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	0,13	0,11

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continuação)																
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	PR	VE	OU	IN	% Área de pico								
				PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	
					<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>			
48	1487	1488	5,7-Dimethyltetraline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	1491	1492	β -Eudesmene	-	-	-	-	0,57	0,48	0,39	0,39	0,14	-	0,20	0,18	-
50	1495	1496	β -Panasinsene	-	-	-	-	0,34	0,27	0,22	0,22	-	-	-	-	-
51	1496	1496	9- <i>epi</i> - β -Caryophyllene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	1520	1520	β -Cadinene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	0,09	0,10	-
53	1548	1549	1,Z-5,E-7-Dodecatriene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	1565	1567	4- <i>epi</i> - α -Acoradiene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	1580	1580	Caryophyllene oxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	1594	1594	Cuparene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	1602	1601	Seline-3,7(11)-diene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	0,10	1,27	1,10	-
58	1624	1625	Caryophylladienol II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	1630	1630	β -Guaiene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	1657	1659	Alloaromandrene oxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Hydrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)	0,79	1,33	0,00	0,00	21,43	30,34	24,25	25,01	9,42	1,87	15,93	13,38	
					<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>			
39	1381	1385	Isoleno	-	-	-	-	0,24	0,27	0,17	-	-	-	-	-	-
40	1419	1419	α -Gurjunene	-	-	-	-	2,97	3,33	1,52	-	-	-	-	-	-
41	1432	1436	1,1,3a-Trimethyl-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1441	1449	β -Gurjunene	-	-	-	-	0,81	0,73	0,64	-	-	-	-	-	-
43	1440	1445	β -Maaliene	-	-	-	-	0,07	0,08	-	-	-	-	-	-	-
44	1443	1449	α -Maaliene	-	-	-	-	0,28	0,26	0,22	-	-	-	-	-	-
45	1449	1439	Aromadendrene	-	0,27	-	-	16,46	15,95	13,34	-	-	-	-	-	-
46	1467	1467	Alloaromandrene	-	-	-	-	1,98	1,90	1,54	-	0,32	0,21	0,49	-	-
47	1476	1478	γ -Gurjunene	-	-	-	-	0,36	0,34	0,24	-	-	-	-	-	-
48	1487	1488	5,7-Dimethyltetraline	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99	0,71	1,00	0,36	-
49	1491	1492	β -Eudesmene	-	-	-	-	0,39	0,37	0,28	-	-	-	-	-	-
50	1495	1496	β -Panasinsene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	1496	1496	9- <i>epi</i> - β -Caryophyllene	-	-	-	-	0,47	0,46	0,28	-	-	-	-	-	-
52	1520	1520	β -Cadinene	-	-	-	-	0,36	0,33	0,26	-	-	-	-	-	-
53	1548	1549	1,Z-5,E-7-Dodecatriene	-	-	-	-	0,33	0,33	0,26	-	0,45	0,35	0,39	0,18	-
54	1565	1567	4- <i>epi</i> - α -Acoradiene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	0,33	0,38	-	-

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continuação)

[illegible]

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(continuação)															
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	PR	VE	OU	IN	PR	% Área de pico			PR	VE	OU	IN
									VE	OU	IN				
					<i>E. badjensis</i>				<i>E. benthamii</i>				<i>E. dunnii</i>		
84	1642	1643	Selin-6-en-4α-ol	-	-	-	-	0,39	0,58	0,28	0,28	-	-	-	-
85	1642	1646	T-Muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-
86	1645	1648	Isoaromadendrene epoxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	0,13
			Sesquiterpenos Oxigenados (SO)	9,02	15,42	0,00	3,30	19,92	38,38	22,79	22,97	6,34	3,16	19,66	17,22
			Compostos Identificados	99,6	99,12	99,7	99,63	94,27	95	95,34	96,39	93,08	100	96,55	97,45
			Monoterpenos Oxigenados (MO)	84,53	73,10	95,30	93,05	4,34	2,18	2,57	2,57	56,77	63,88	19,84	22,25
			Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)	5,08	9,83	4,70	6,52	50,22	24,27	46,41	46,81	41,75	28,01	23,84	23,85
			Sesquiterpenos Oxigenados (OS)	9,55	15,62	0,00	3,40	20,99	39,76	23,65	23,64	6,56	3,20	19,73	18,16
			Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)	0,84	1,35	0,00	0,00	22,59	31,43	25,17	25,74	9,74	1,90	15,98	14,11
					<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>		
61	1248	1649	β-Eudesmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	1549	1550	9-Cedranone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	1549	1550	(2E)-2-Metil-4,2-butenal	-	-	-	-	0,43	0,34	0,29	-	-	-	-	-
64	1558	1559	Epiglobulol	-	-	-	-	2,66	2,15	2,84	-	-	-	-	-
65	1565	1565	Maaliol	-	-	-	-	0,52	0,40	0,57	-	-	-	-	-
66	1569	1569	Palustrol	-	-	-	-	0,22	0,16	0,20	0,60	-	-	-	-
67	1572	1571	Spathulenol	-	1,27	1,44	-	-	-	-	-	17,46	13,29	12,89	9,08
68	1629	1630	γ-Eudesmol	-	-	-	-	-	-	-	-	2,25	1,41	1,45	0,88
69	1637	1638	Agarospírol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	1583	1586	Globulol	-	-	-	-	9,42	7,66	10,64	0,26	-	-	-	-
71	1590	1591	Viridiflorol	-	-	-	-	1,89	1,51	1,90	0,21	-	-	-	-
72	1652	1653	α-Eudesmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	1598	1599	Rosifoliol	-	-	-	-	0,48	0,38	0,55	-	-	-	-	-
74	1602	1601	Eremofilene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	1602	1603	1H-Cycloprop[e]azulene	-	-	-	-	0,72	0,50	0,84	-	-	-	-	-
76	1604	1603	Humulene epoxide II	-	-	-	-	-	-	-	-	1,01	0,78	0,67	0,51
77	1617	1616	4-tert-Butylanisole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	1617	1616	1H-Indene	-	-	-	-	0,73	0,63	0,87	-	-	-	-	-
79	1626	1627	Iso-spatulenol	-	-	-	-	-	-	-	-	4,96	2,71	2,97	1,52
80	1629	1630	T-Cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	1635	1635	cis-α-Copaene-8-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	0,25	0,29	-

Tabela 3 - Composições químicas dos óleos essenciais de *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna* analisados na primavera (PR), verão (VE), outono (OU) e inverno (IN) de 2019-2020

(conclusão)															
Nº	LRI_exp	LRI_lit	Nomes dos componentes	% Área de pico											
				PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN
					<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>				<i>E. saligna</i>		
82	1640	1640	Cryptomeridiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	1641	1642	Muurolo-4,10(14)-dien-1β-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72	0,42	0,44	0,67
84	1642	1643	Selin-6-en-4α-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	1642	1646	T-Muurolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	1645	1648	Isoaromadendrene epoxide	-	-	-	-	-	-	-	-	2,44	1,39	1,45	1,11
			Sesquiterpenos Oxigenados (SO)	0,20	1,27	1,44	0,00	17,07	13,73	18,7	11,07	29,38	20,25	20,16	13,77
			Compostos Identificados	99	99,69	99,6	99,12	99,7	99,63	94,27	95	95,34	96,39	93,08	100
			Monoterpenos Oxigenados (MO)	85,04	83,15	84,23	86,45	7,68	7,11	7,77	13,84	36,84	38,41	41,08	38,35
			Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)	14,76	14,08	13,25	13,55	47,59	52,13	51,93	56,09	14,79	26,47	24,15	38,12
			Sesquiterpenos Oxigenados (OS)	0,20	1,27	1,44	0,00	17,82	14,17	19,75	11,24	30,41	20,95	20,78	14,13
			Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)	0,00	1,19	1,09	0,00	25,39	24,70	19,53	16,93	17,69	13,96	13,68	8,65

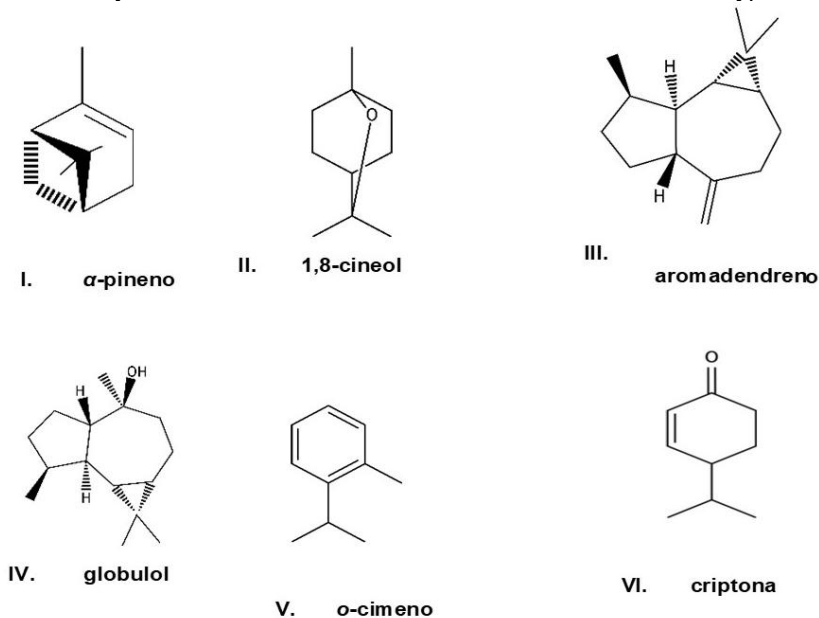
Fonte: A autora

Nota: As comparações foram realizadas entre as seis espécies, mas para a otimização do layout e cumprimentos das normas da biblioteca a tabela teve que estar no formato apresentado. Nº: Número de compostos identificados; LRI_lit: índice de retenção linear obtido na literatura; LRI_exp: índice de retenção linear obtido experimentalmente nesta pesquisa (Adams, 2007; NIST, 2023).

O 1,8-cineol, ou eucaliptol, é realmente um composto fundamental nos OEs de espécies de *Eucalyptus*, sendo reconhecido por suas diversas aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Sua versatilidade e valor comercial significativo tornam-no um componente de grande interesse. O estudo destacou que *E. globulus*, *E. badjensis* e *E. dunnii* apresentaram maiores proporções de 1,8-cineol em seus OEs, enquanto esse composto não foi encontrado em *E. benthamii*, *E. grandis* e *E. saligna*. Essa variação na presença do 1,8-cineol entre as espécies de *Eucalyptus* ressalta a importância de se determinar o perfil químico de cada espécie para sua aplicação industrial e terapêutica. Além disso, as atividades biológicas dos OEs estão diretamente relacionadas à composição química. Os principais compostos (componentes majoritários) presentes nos OEs são responsáveis pelas atividades terapêuticas e farmacológicas associadas a esses OEs. Portanto, um estudo detalhado da composição química de cada espécie, incluindo a influência da sazonalidade, é essencial para entender melhor suas propriedades terapêuticas e maximizar seu potencial

de uso em diversas aplicações (Figura 26).

Figura 26 - Compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de *Eucalyptus* sp



Fonte: A autora

Nota: *E. badjensis* (II), *E. benthamii* (I e IV), *E. dunnii* (I e II), *E. globulus* (II), *E. grandis* (I e V) e *E. saligna* (V e VI).

As diretrizes da *International Standard Organization* (ISO) estabelecem padrões para a qualidade e pureza dos OEs, incluindo os oriundos de *Eucalyptus*. Para os OEs de *Eucalyptus* destinados à indústria farmacêutica, é recomendado que apresentem uma concentração de 1,8-cineol entre 80% e 85% em sua composição. Essa faixa garante a presença de uma quantidade significativa do composto ativo 1,8-cineol, o qual possui diversas propriedades terapêuticas.

Em relação às atividades biológicas do 1,8-cineol, elas são bastante diversificadas e abrangem uma variedade de benefícios para a saúde. Entre essas atividades reconhecidas, destacam-se sua ação expectorante, anestésica, antisséptica, antibacteriana, antifúngica e repelente. Essas propriedades tornam o 1,8-cineol um componente valioso em diversos produtos farmacêuticos, desde xaropes para tosse até pomadas antissépticas e repelentes naturais.

Vários fatores ambientais, incluindo local de cultivo, métodos de coleta, estabilização, condições de armazenamento, qualidade do solo e condições climáticas, podem influenciar a composição volátil e as concentrações de compostos químicos nos OES de plantas (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Almeida *et al.*, 2023).

Ao comparar diferentes espécies, a idade das plantas é um fator crucial que determina a quantidade e concentração de metabólitos secundários produzidos. Este estudo garantiu que todas as seis espécies tivessem a mesma idade fenológica e fossem cultivadas em condições ambientais idênticas, incluindo fertilidade do solo, precipitação, evapotranspiração da cultura, exposição ao vento, ocorrência de geadas e fotoperíodo. Os métodos de coleta, secagem e extração também foram padronizados para todas as espécies. Assim, quaisquer diferenças observadas nos metabólitos secundários poderiam ser atribuídas às características genéticas únicas de cada espécie.

Eucalyptus são abundantes em monoterpenos, que podem ser categorizados em hidrocarbonetos, com α -pineno e D-limoneno como constituintes principais, e monoterpenos oxigenados, incluindo 1,8-cineol e α -terpineol (Bizzo *et al.*, 2009). O D-limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico predominantemente encontrado em OEs de eucalipto, é amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentos e produtos de limpeza (Bakkali *et al.*, 2008). Por outro lado, o α -pineno, outro constituinte importante, é conhecido por suas atividades farmacológicas, incluindo propriedades antinociceptivas, antifúngicas e antibacterianas (Him *et al.*, 2008; Nissen *et al.*, 2010).

Os monoterpenos oxigenados dos OEs de *Eucalyptus* compreendem álcoois (como linalol e terpinen-4-ol), éteres (1,8-cineol), aldeídos (α -canfolenal) e cetonas (verbenona e piperitona) (Bizzo *et al.*, 2009; Regnault-Roger *et al.*, 2012). 1,8-Cineol é o terpenoide predominante em OEs de *Eucalyptus* de importância industrial, e as espécies cultivadas para seu uso terapêutico contêm principalmente este composto (Dhakad *et al.*, 2018).

Apresenta atividades antialérgicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Juergens *et al.*, 2014; Liapi *et al.*, 2007; Batish *et al.*, 2008). O α -terpineol é um monoterpeno oxigenado também encontrado entre os principais compostos de algumas espécies de *Eucalyptus*. É utilizado principalmente na indústria de perfumaria e apresenta atividades analgésica, antimicrobiana e antinociceptiva, entre outras (Quintans-Júnior *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012).

Sesquiterpenos são isoprenoides compostos por 15 átomos de carbono ou três unidades de isopreno (Kirby; Keasling, 2009). Eles são menos voláteis e possuem características organolépticas mais sutis em comparação aos monoterpenos (Ninkuu

et al., 2021). Dentre os hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes nos OEs de *Eucalyptus*, destaca-se o 9-*epi*- β -cariofileno.

Este composto, encontrado em fragrâncias cosméticas, apresenta potencial anestésico e anti-inflamatório (Ghelardini *et al.*, 2001). Dentre os sesquiterpenos oxigenados, o globulol é um dos principais voláteis, apresentando atividades antifúngica e antibacteriana. Também é encontrado em *E. globulus* (Tan *et al.*, 2008). *E. globulus* é a espécie mais explorada para obtenção de 1,8-cineol em todo o mundo (Vitti; Brito, 2003). Este componente também é encontrado em outras espécies de *Eucalyptus*, como *E. saligna* (28,9%) (Saulle *et al.*, 2018) e *E. camaldulensis* (17,9%) (Lucia *et al.*, 2007).

5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

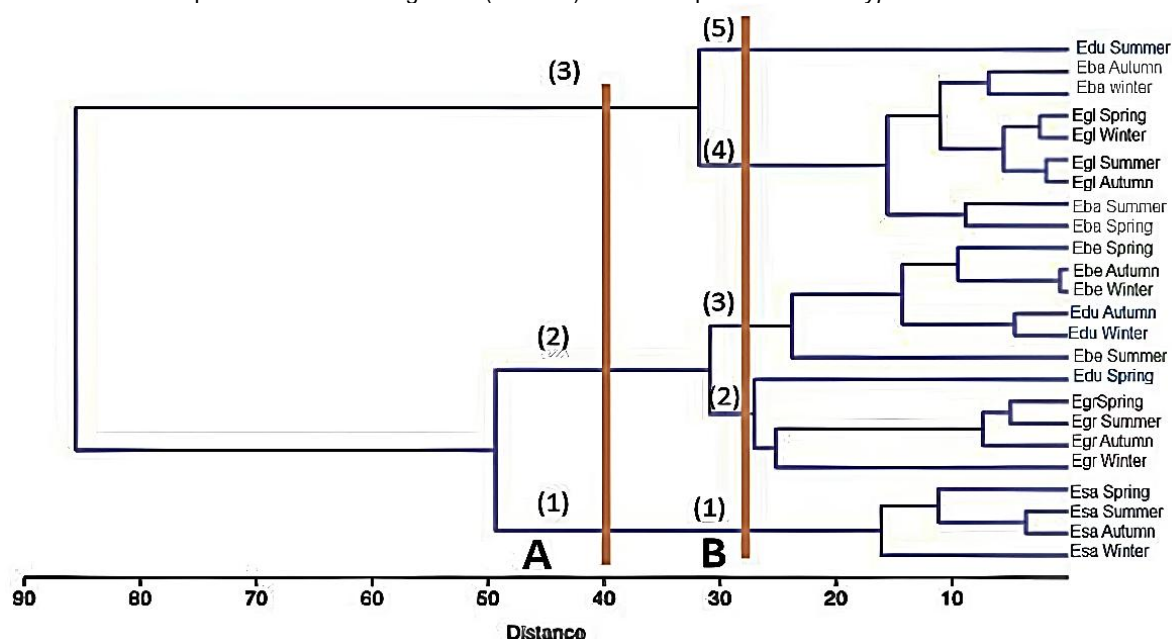
A análise de correlação e multivariada realizada neste estudo revelou diferenças na composição química dos OEs das seis espécies de *Eucalyptus*. O dendograma resultante dessa análise, representado na Figura 27, identificou cinco quimiotipos diferentes, os quais foram classificados da seguinte forma:

- Cluster 1: compreende *E. saligna* (Esa) em todas as quatro estações. Isso sugere que o OE de *E. saligna* mantém uma composição química consistente ao longo do ano;
- Cluster 2: possui *E. grandis* (Egr) em quatro estações. Indicando uma consistência na composição química do OE de *E. grandis* ao longo do ano;
- Cluster 3: evidencia *E. benthamii* (Ebe) em quatro estações e *E. dunnii* (Edu) no outono e inverno. Isso sugere uma semelhança na composição química dos OEs de *E. benthamii* ao longo do ano, enquanto o OE de *E. dunnii* apresenta variações sazonais;
- Cluster 4: *E. badjensis* (Eba) nas estações de primavera e verão e *E. globulus* (Egl) em outono e verão, as diferenças sazonais na composição química dos OEs entre as espécies podem ser atribuídas a diversos fatores, como variações na temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes do solo e padrões de chuva ao longo do ano. Esses fatores podem influenciar a biossíntese e a acumulação de metabólitos secundários nas plantas, levando a diferenças na composição química dos OEs;

- Cluster 5: consiste apenas no óleo essencial de *E. dunnii* (Edu) no verão, a observação de uma composição química única nesta estação do ano sugere que as condições ambientais específicas do verão podem ter um impacto significativo na produção de metabólitos secundários por esta espécie em particular. Isso ressalta a importância de considerar não apenas a espécie de *Eucalyptus*, mas também o período de coleta, ao avaliar a composição química dos OEs.

Esses resultados destacam a complexidade da composição química dos OEs de *Eucalyptus* e a influência de fatores sazonais e genéticos nessa composição. Essas informações são valiosas para entender melhor as propriedades e o potencial de uso dos OEs de diferentes espécies de *Eucalyptus* em diversas aplicações.

Figura 27 - Gráfico de análise de agrupamento hierárquico baseado no perfil químico de 24 amostras de óleos essenciais obtidas por análise cromatográfica (GC-MS) de seis espécies de *Eucalyptus*



Fonte: A autora

Nota: Amostras de óleos essenciais obtidas por análise cromatográfica (GC-MS) de seis espécies de *Eucalyptus*: *E. badjensis* (Eba), *E. benthamii* (Ebe), *E. dunnii* (Edu), *E. grandis* (Egr), *E. globulus* (Egl) e *E. saligna* (Esa) nas quatro estações, primavera, verão, outono e inverno, através do método de agrupamento do vizinho mais próximo e com a distância euclidiana como medida de dissimilaridade, mostrando a divisão das amostras em dois grupos A e B.

Como resultado da comparação do dendrograma e dos dados referentes à composição química das amostras (Tabela 3), observou-se que algumas estações interespecíficas dentro da mesma espécie apresentaram diferenças em suas composições químicas. Isso indica que a época de coleta das folhas para extração

Nota: (PCA1=80,01, PCA2=15,17% e PCA3=1,96) de 24 amostras de OE de seis espécies de *Eucalyptus* em diferentes épocas obtidas por GC-MS com a correlação de todos os componentes químicos identificados na análise. *E. badjensis* (Ebd), *E. benthamii* (Ebt), *E. dunnii* (Ebn), *E. grandis* (Erg), *E. globulus* (Egl) e *E. saligna* (Esg) na primavera, verão, outono e inverno.

Três grupos de variáveis foram identificados pelo gráfico bidimensional, Componente 1 e Componente 2. O primeiro grupo de variáveis incluiu 1,8-cineol, e o segundo teve α -pineno, aloaromadendreno e globulol, que estão fortemente correlacionados com o componente 1. O terceiro grupo de variáveis que se correlacionou fortemente com o componente 2 incluiu *o*-cimeno, criptona, espatulenol, óxido de cariofileno e 2-metil-3-fenil-propanal.

5.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os OEs de *E. badjensis* (faixas 5-8) sob luz UV a 366 nm exibiram uma impressão digital específica, composta por uma zona laranja em R_F 0,47, 1,8-cineol em R_F 0,39, e uma zona acastanhada em R_F 0,21 com uma faixa dupla logo abaixo (Figura 29). Sob luz branca, zonas semelhantes, mas com cores diferentes, foram observadas. Avaliando essas impressões digitais por inspeção visual, é possível notar que a concentração desses metabólitos varia nas diferentes estações do ano, conforme detalhado na análise por GC-MS (Tabela 3).

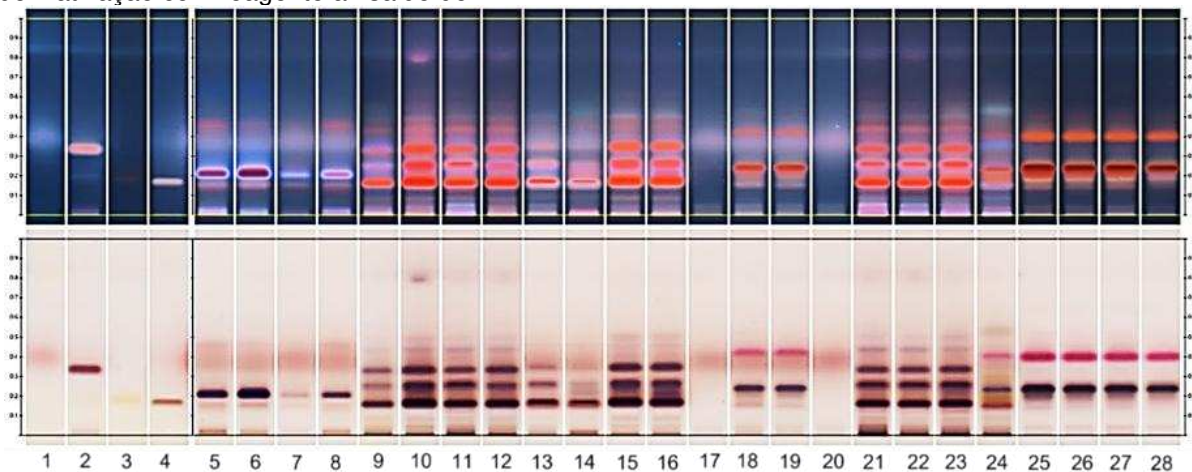
A descoberta de 1,8-cineol nos OEs de *E. badjensis* concorda com os resultados da análise por GC-MS. As impressões digitais dos OEs de *E. benthamii* (faixas 9-12) mostraram três zonas laranja principais sob UV 366 nm em R_F 0,34, 0,25 e 0,17, com algumas zonas mais fracas entre R_F 0,40 e 0,55. As principais zonas descritas foram mais fracas nos OEs da primavera em comparação com as outras estações. As impressões digitais de verão, outono e inverno pareciam consistentes, e o 1,8-cineol não foi detectado em nenhum OE desta espécie, conforme também observado por GC-MS.

As impressões digitais dos OEs de *E. dunnii* (faixas 13-16) foram muito semelhantes às descritas para *E. benthamii*. No entanto, uma diferença notável foi a ocorrência de 1,8-cineol, claramente observada nas impressões digitais dos OEs da primavera e do verão, mas não observada no outono e no inverno. Os dados de GC-MS revelaram a presença de 1,8-cineol nas quatro estações, mas o rendimento deste metabólito no outono e inverno foi menor do que nas outras estações. A menor concentração de 1,8-cineol no outono e inverno detectados por GC-MS apareceu como zonas laranja intensas em R_F 0,35 nas impressões digitais de OEs do outono e inverno, podendo ser devida à ausência desse metabólito nessas impressões digitais. O OE de *E. globulus* (faixas 17-20) mostraram duas zonas principais laranja-acastanhadas sob UV 366 nm em R_F 0,43 e 0,25 e algumas mais fracas sob a zona

mais retida para o verão e outono. O 1,8-cineol foi o principal composto observado na primavera e no inverno, mas também foi claramente detectado no verão e no outono. As impressões digitais dos OEs de *E. grandis* (faixas 21-24) extraídas na primavera, verão e outono mostraram características semelhantes às observadas para *E. benthamii*, incluindo a ausência de 1,8-cineol. A impressão digital do OE do inverno exibiu um resultado não observado em nenhuma outra estação ou espécie. As impressões digitais dos OEs de *E. saligna* (faixas 25-28) revelaram impressões digitais específicas com duas zonas principais laranja e acastanhadas em R_F 0,4 e 0,24 com pequenas diferenças entre as estações, e nenhum 1,8-cineol foi detectado.

Além disso, a análise HPTLC revelou que a maioria das espécies de *Eucalyptus* apresentam composições químicas diferentes, demonstrando a utilidade das “impressões digitais químicas” na autenticação de espécies. A sazonalidade também foi identificada como um fator que interferiu no perfil químico de todos os OEs analisados, indicando que as características químicas dos OEs podem variar ao longo do ano.

Figura 29 - Comparação de impressões digitais HPTLC sob UV 366 nm (A) e luz branca RT (B) após derivatização com reagente anisaldeído



Fonte: A autora

Nota: As faixas 1-4 são os padrões de 1,8-cineol, α -bisabolol, borneol e óxido de bisabolol, respectivamente. As faixas 5 a 28 são impressões digitais de OEs de *Eucalyptus* em diferentes estações (primavera, verão, outono e inverno). *E. badjensis* (5-8), *E. benthamii* (9-12), *E. dunnii* (13-16), *E. globulus* (17-20), *E. grandis* (21-24) e *E. saligna* (25-28).

Estes resultados sugerem que a análise HPTLC de OEs de *Eucalyptus*, tanto sob luz branca quanto após derivatização com anisaldeído, pode ser um método simples, barato e rápido para autenticar a maioria das espécies e estudar a influência da sazonalidade na composição química destes OEs.

5.6.1 Atividade Antioxidante

Este estudo avaliou a atividade antioxidante de OEs utilizando três métodos diferentes: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e ácido linoleico.

Através da aplicação de diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante, obtém-se uma visão mais precisa dos mecanismos de ação dos OEs, identificando sua capacidade de sequestrar radicais livres, prevenir a peroxidação lipídica e outros possíveis mecanismos antioxidantes.

Ao analisar os dados da Tabela 4, pode-se observar que o método ABTS foi mais eficiente na avaliação da atividade antioxidante. Uma comparação dos dados de IC₅₀ obtidos (Tabela 4) indicou atividade potente para todos os OEs com valores de IC₅₀ de 0,007-0,009 mg/mL, comparável ao antioxidante comercial BHT. Os outros métodos não apresentaram efeitos inibitórios sobre radicais livres ou efeitos antioxidantes, o que pode ser justificado pelo elevado número de monoterpenos, especialmente os oxigenados (Döll-Boscadin *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Atividade antioxidante de OEs de eucalipto pelos ensaios DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoléico

Amostras	IC 50 mg. mL ⁻¹		β -caroteno/linoleico ácido % oxidação inibição
	DPPH	ABTS	
<i>E. badjensis</i>	1.904 a	0,007 a	2.02
<i>E. benthamii</i>	1.748 a	0,008 a	NE
<i>E. dunnii</i>	1.041c _	0,008 a	NE
<i>E. globulus</i>	1.307b	0,007 a	1,28
<i>E. grandis</i>	0,668d _	0,008 a	NE
<i>E. saligna</i>	0,742d _	0,009 a	3h40
BHT	0,009	0,005	46,74

Fonte: A autora

Nota: Dentro de cada coluna, os valores médios com a mesma letra não diferem por Tukey.

O método DPPH é comumente utilizado para determinar a capacidade dos compostos antioxidantes de eliminar radicais livres. Um radical livre estável, DPPH, pode ser medido espectrofotometricamente pela sua mudança de cor de roxo para amarelo quando é reduzido por um antioxidante. Quanto maior a capacidade do OE em sequestrar o DPPH, maior será sua atividade antioxidante. Outro método para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres é o ensaio ABTS, que envolve a utilização do radical ABTS gerado pela reação entre ABTS e persulfato de potássio.

À medida que os radicais ABTS são reduzidos pelos antioxidantes, eles mudam de cor para verde, o que também pode ser medido espectrofotometricamente. O método do ácido linoleico é empregado para avaliar a capacidade dos OEs em inibir a peroxidação lipídica. Neste ensaio, o ácido linoleico sofre oxidação na presença de oxigênio, levando à geração de produtos de peroxidação lipídica. Porém, a presença de um antioxidante pode impedir ou retardar a formação desses produtos, indicando sua capacidade antioxidante (Kaur; Geetha, 2006).

5.6.2 Atividade Inseticida Contra *Cimex Lectularius* L.

Os OEs das seis espécies de *Eucalyptus* foram expostos a testes de toxicidade contra duas cepas de percevejos (*C. lectularius*), uma resistente (Bayonne) e outra suscetível (Ft. Dix) a inseticidas piretroides (deltametrina). A dose utilizada foi de 125 µg/inseto. Dois métodos de aplicação foram utilizados no experimento do inseticida: tópico e fumigação. Estes, demonstraram diferenças significativas nos resultados, com taxa de mortalidade superior a 50% (Tabela 5).

Tabela 5 - Toxicidade tópica e por vapor induzida por óleos essenciais de *Eucalyptus* contra *Cimex lectularius*

Espécie	Toxicidade tópica média % de mortalidade±SE		Toxicidade por vapor média % de mortalidade ±SE
	(Ft. Dix) *	(Bayonne)**	Bayonne
<i>E. badjensis</i>	83,3±8,82	86,7±6,67	13,3±6,67
<i>E. benthamii</i>	93,3±3,33	93,3±3,33	66,7±13,33
<i>E. dunnii</i>	73,3±6,67	66,7±6,67	40,0±20,00
<i>E. globulus</i>	50,0±0,00	50,0±5,77	0,00±0,00
<i>E. grandis</i>	53,3±8,82	23,3±3,33	13,3±6,67
<i>E. saligna</i>	56,7±3,33	93,3±6,67	33,3±6,67

Fonte: A autora

Nota: *cepa suscetível (Ft. Dix); ** cepa resistente a piretróides (Bayonne); SE= Erro Padrão

De acordo com os dados médios de mortalidade mostrados na Tabela 5, *E. benthamii* foi o mais tóxico para percevejos (*C. lectularius*) no bioensaio de toxicidade tópica (93,3%) em cepas resistentes e suscetíveis, enquanto induziu toxicidade moderada por vapor (66,7%) na cepa Bayonne.

Foi seguido por *E. badjensis*, induzindo 83,3 e 86,7% de mortalidade em cepas suscetíveis e resistentes, respectivamente, enquanto foi menos eficaz na toxicidade por vapor. Os benefícios dos inseticidas naturais são numerosos, especialmente aqueles obtidos a partir de OEs e seus constituintes, como as propriedades sinérgicas

de seus compostos, produtos mais acessíveis economicamente e o uso de compostos ecologicamente corretos para controle de insetos (Yunes *et al.*, 2001).

Portanto, as espécies de *Eucalyptus* são fontes promissoras para esse fim, uma vez que os OEs apresentam baixo custo (Cimanga *et al.*, 2002; Salvatori *et al.*, 2023), fator crucial para o controle de pragas principalmente quando se trata de problemas de saúde pública em diversos países, como é o caso de *C. lectularius* (Machado *et al.*, 2019; Afshar *et al.*, 2023). A maioria dos inseticidas e repelentes à base de plantas são derivados de plantas que contêm OE. Além disso, os receptores que respondem ao DEET (*N*, *N*-dietil-3-metilbenzamida) também podem responder aos terpenos voláteis (Budel *et al.*, 2018).

Budel *et al.* (2018), utilizando a mesma metodologia, afirmaram que *Baccharis sphenophylla* Dusen ex Malme EO atingiu 66,67% de mortalidade contra a cepa resistente a inseticidas 'Bayonne', enquanto apresentou 83,33% de mortalidade sobre a cepa suscetível 'Ft. Dix' 24 horas após o tratamento.

Da mesma forma, *Schinus molle* L. EO apresentou mortalidade de 100,0% (Ft. Dix) e 90,0% (Bayonne) 24 horas após o tratamento (Machado *et al.*, 2019). O OE de *Ocotea porosa* também foi testado e nenhuma mortalidade foi observada em ambas as cepas (Brustulim *et al.*, 2020).

A natureza noturna de *C. lectularius* torna seu controle difícil, especialmente para atingir o alvo (fase adulta) (Gaire *et al.*, 2020). Durante o dia ele se esconde em fendas de móveis de madeira ou outros locais (Ghauri, 1973). Nas últimas décadas, este inseto ressurgiu e se tornou uma grande preocupação nos EUA e em outros países devido à sua comprovada resistência ao inseticida deltametrina, um piretroide comumente usados para controlar o inseto (Koganemaru; Miller, 2013; Cambronero-Heinrichs *et al.*, 2020).

A proliferação deste inseto tem sido amplamente considerada como um importante problema de saúde pública. A resistência aos piretroides tem constituído um grande obstáculo, limitando significativamente o controle efetivo de *C. lectularius*. Conforme afirmado por Afshar *et al.* (2023), OEs e compostos voláteis como carvacrol, linalol e timol foram testados em diferentes países para encontrar um inseticida ecológico contra percevejos.

Além disso, os OEs de espécies de *Eucalyptus* têm comprovada atividade inseticida. Por exemplo, *E. benthamii* tem ação contra *Pediculus humanus capitis*

(piolhos do couro cabeludo) (Döll -Boscardin *et al.*, 2015) e *E. saligna* tem atividades contra *Aedes aegypti* (Lucia *et al.*, 2007), *Acanthoscelides obtectus*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Sitophilus zeamais*, *Sitotroga cerealella*, *Thyrinteina arnobia* e *Tribolium castaneum* (Bett *et al.*, 2017).

5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.7.1 Edema, Hiperálgia Mecânica e ao Frio Induzidos por Carragenina em Pata de Camundongos

Na inflamação da pata induzida pela carragenina foram analisados três parâmetros: edema, hiperálgia mecânica (Von Frey) e alodinia. No modelo de edema, o tratamento oral com dose única de OE de *Eucalyptus* (10 mg/kg) inibiu significativamente a formação de edema em comparação ao grupo controle (solução salina) às 0,5, 1, 2 e 4 horas após a indução de carragenina (Figura 30). Apenas *E. badjensis* às 0,5 h não diferiu significativamente, como mostrado na Figura 30a.

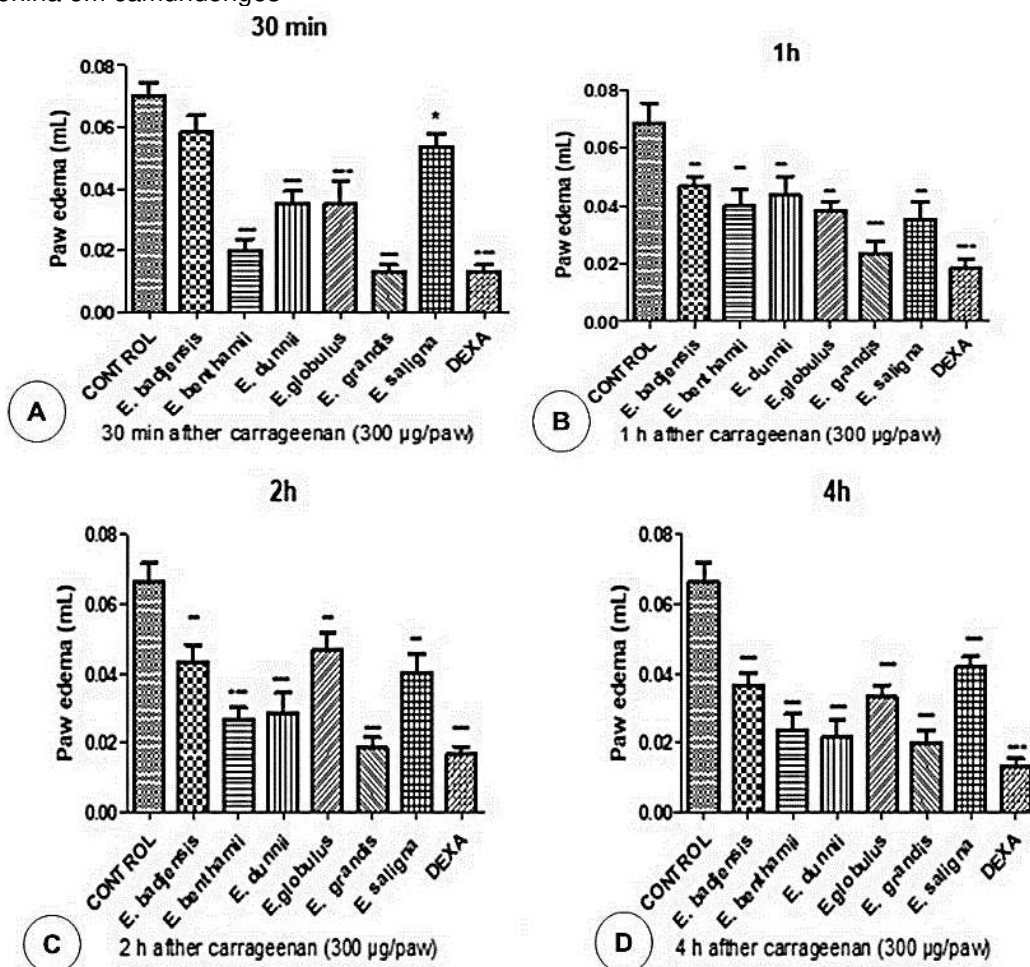
Em 1 h, apenas *E. grandis* apresentou diminuição na formação de edema, com inibição máxima de $67 \pm 5\%$ (Figura 30b). Durante o experimento, *E. benthamii*, *E. dunnii* e *E. grandis* apresentaram diminuição significativa do edema em comparação ao grupo controle com inibições de $63 \pm 4\%$, $60 \pm 3\%$ e $74 \pm 2\%$, após 2 h, respectivamente e $67 \pm 4\%$, $70 \pm 5\%$ e $71 \pm 4\%$, após 4 h (Figura 30c, Figura 30d).

O positivo controle (DEXA - Dexametasona) apresentou redução significativa em todos os tempos pontos, com inibição de $81 \pm 5\%$ em 0,5 h, $74 \pm 5\%$ em 1 h, $77 \pm 5\%$ às 2 horas e $81 \pm 4\%$ às 4 horas (Figura 30).

Supõe-se que a resposta anti-inflamatória dos OEs no tratamento seja devida ao efeito sinérgico dos compostos dos OEs, incluindo terpenos, principalmente sesquiterpenos. Vários estudos relataram que os sesquiterpenos têm atividades anti-inflamatórias (Recio *et al.*, 2000; Feltenstein *et al.*, 2004; Valério *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010; Mckinnon *et al.*, 2014; Butturini *et al.*, 2014; Butturini *et al.*, 2014; Turk *et al.*, 2019).

Em todos os momentos de avaliação, os OEs de *E. grandis* inibiram a inflamação. Essa espécie possui α -pineno e *o*-cimeno como compostos principais, sugerindo que essa atividade é modulada pelos efeitos sinérgicos destes constituintes.

Figura 30 - Efeito da administração oral de óleos essenciais de *Eucalyptus* no edema de pata induzido por carragenina em camundongos



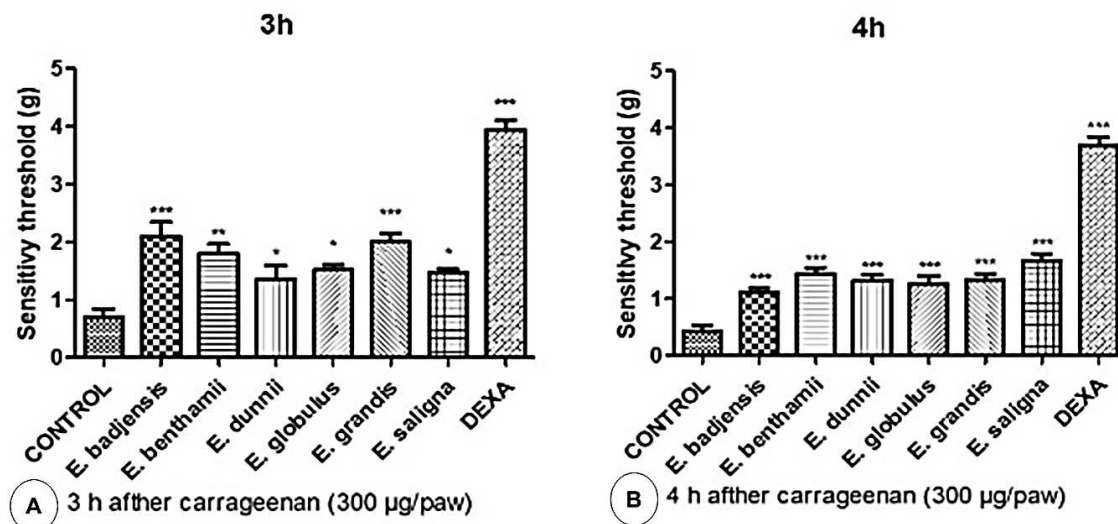
Fonte: A autora

Nota: Os animais receberam o óleo essencial de cada espécie (10 mg/kg, vo) ou o controle (veículo) ou dexametasona (DEXA, 1 mg/kg, sc). E após 1 hora, foi administrada uma injeção de carragenina (300 µg/pata). Cada barra representa a média ± SEM de n = 6 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA unilateral seguida do teste de Newman-Keuls.

A importância do sinergismo entre várias moléculas dentro de um OE, em contraste com a ação de um ou dois componentes principais, pode levantar questões. No entanto, vale ressaltar que a atividade dos componentes primários pode ser influenciada por outras moléculas presentes em pequenas concentrações (Hoet *et al.*, 2006). As propriedades anti-inflamatórias sistêmicas dos OEs de *Eucalyptus* na inflamação aguda foram avaliadas usando um modelo de edema de pata induzido por carragenina. As medições foram feitas 0,5, 1, 2 e 4 horas após a administração de carragenina. Este é um teste padrão usado para analisar a primeira fase da reação

inflamatória, onde múltiplos mediadores atuam sequencialmente para produzir uma resposta inflamatória.

Figura 31 - Efeito de óleos essenciais de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* (10 mg/kg, vo)



Fonte: A autora

Nota: Veículo (soro fisiológico) e dexametasona (1 mg/kg, via subcutânea, controle positivo). Modelo de administração em hiperalgesia mecânica. As medições foram realizadas três e quatro horas após a gavagem. Cada barra representa a média $\pm$ SEM de $n = 6$ animais/grupo. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA unilateral seguida do teste de Newman-Keuls.

Os OEs de *E. tereticornis* e *E. globulus* produziram efeitos anti-inflamatórios, conforme demonstrado pelo teste de inibição do edema da pata de camundongos induzido por carragenina. (Silva *et al.*, 2003). Os mecanismos das propriedades anti-inflamatórias dos OEs de *Eucalyptus* não estão totalmente definidos. No entanto, estudos relataram que os monoterpenos presentes OEs de *Eucalyptus*, como o 1,8-cineol, são potentes inibidores de mediadores de citocinas inflamatórias (Juergens *et al.*, 1998).

Os OEs das seis espécies de *Eucalyptus* (10 mg/kg) exibiu propriedades anti-hiperalgésicas, inibindo a hiperalgesia mecânica (Figura 31a, Figura 31b) e a sensibilidade ao frio (Figura 31a, Figura 31b). Tratamento com *E. badjensis* e *E. grandis* apresentaram efeitos anti-hiperalgésicos significativos, com redução de $67 \pm 5\%$ e $65 \pm 6\%$, respectivamente, às 3h (Figura 31a).

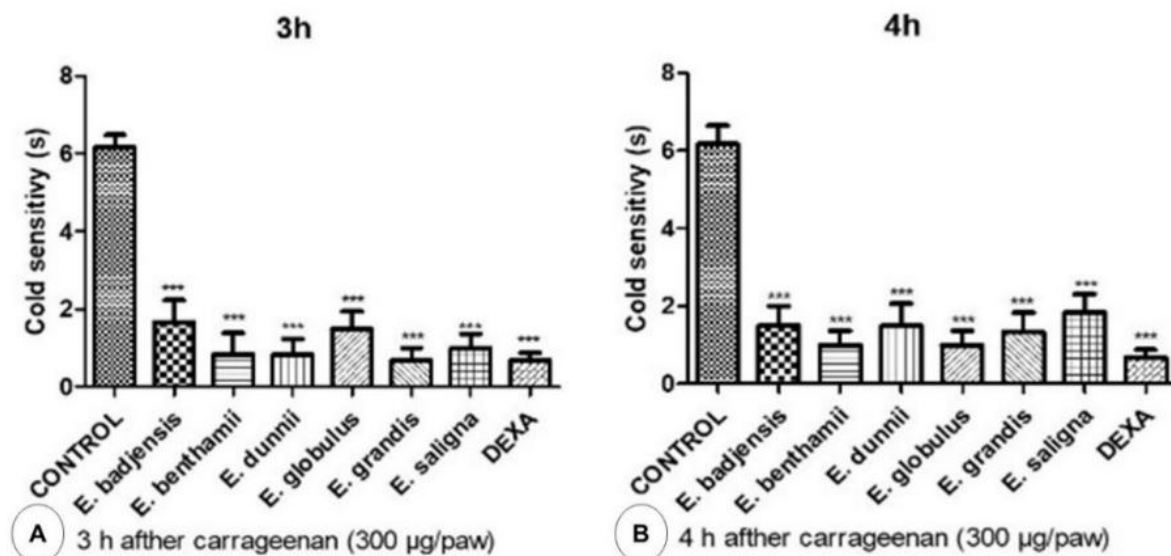
Às 4 h após o tratamento com carragenina, todos os OEs investigados foram capazes de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina variando de 61 a 73% (Figura 31b). A dexametasona (DEXA) resultou em redução da sensibilidade mecânica em $82 \pm 2\%$ após 3 h (Figura 31a) e em $96 \pm 2\%$ após 4 h (Figura 31b). Os

OEs foram eficazes na inibição do comportamento nociceptivo induzido por inflamação aguda (causada por carragenina), avaliada por estímulo mecânico (Von Frey).

Tsai *et al.* (2011) demonstraram atividade anti-inflamatória de *E. bridgesiana* R. T. Baker nos modelos experimentais semelhantes aos utilizados no presente estudo. Através da análise de extratos de *E. globulus*, esses autores observaram efeitos anti-inflamatórios, demonstrados por uma redução na circunferência da pata inflamada em modelos de camundongos após o tratamento (Tsai *et al.*, 2011).

Administração de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* OEs demonstraram uma redução potencial na sensibilidade ao estímulo frio da acetona, com reduções variando de 83% a 70% avaliadas em 3 h (Figura 32a) e 74% a 88% em 4 h (Figura 32b). DEXA na dose de 1 mg/kg exibiu alta inibição de 90% quando avaliada em 3 e 4 horas (Figura 32a, Figura 32b).

Figura 32 - Efeitos de óleos essenciais de *Eucalyptus* (10 mg/kg, po), veículo (solução salina) e dexametasona (1 mg/kg por via subcutânea, controle positivo) em modelo de carragenina induzido por acetona



Fonte: A autora

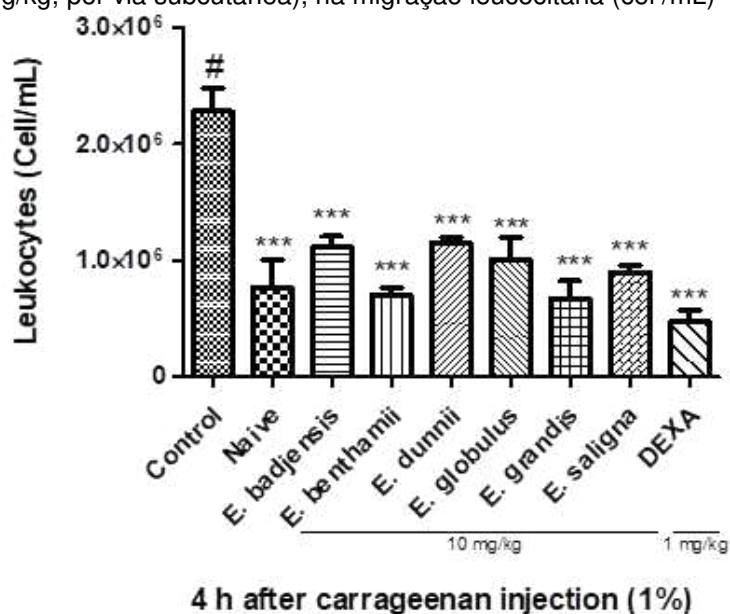
Nota: Cada coluna representa uma média de 6 animais. Os asteriscos indicam níveis de significância em comparação com os dados do grupo tratado com veículo (Controle) *** $p < 0,001$ As diferenças entre os grupos foram observadas por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Newman-Keuls.

No geral, na dor induzida pela carragenina, os OEs inibiram efetivamente a hiperalgesia mecânica e a resposta ao frio, demonstrando potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos para doenças inflamatórias ou analgésicas.

5.7.2 Migração de Células Pleurais e Exsudação de Proteínas

O efeito anti-inflamatório dos OEs foi confirmado usando outro marcador inflamatório, a migração de leucócitos e proteína total induzida por carragenina. O tratamento de animais com o OE de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna* em doses (10 mg/kg, po) evidenciou redução significativa ($p < 0,001$) a migração de leucócitos induzida pela carragenina no exsudado pleural (Figura 33).

Figura 33 - Efeitos dos óleos essenciais de *Eucalyptus* (10 mg/kg vo), controle (solução salina) e dexametasona (1 mg/kg, por via subcutânea), na migração leucocitária (cel /mL)



Fonte: A autora

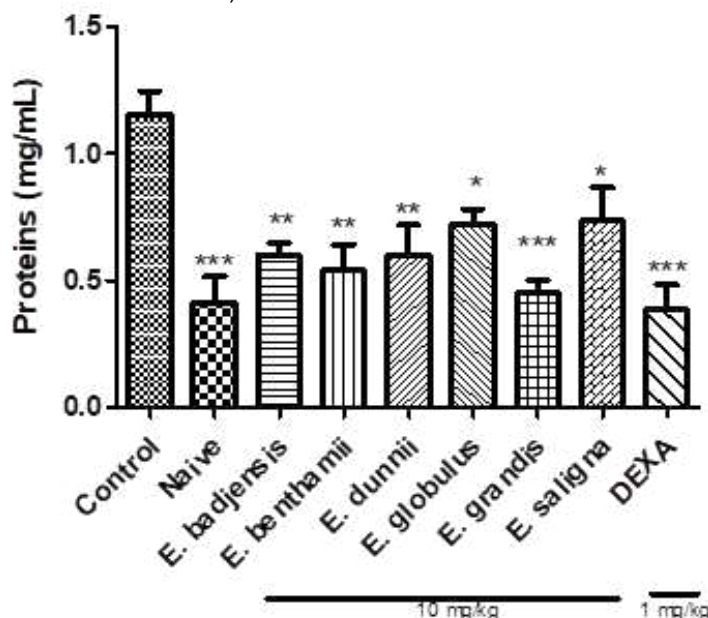
Nota: Cada coluna representa a média de 6 animais. Os asteriscos indicam níveis de significância comparados com os dados do grupo controle. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os dados do grupo tratado com veículo (Controle). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Em relação aos resultados das proteínas totais (Figura 34), observou-se que a administração de carragenina no espaço pleural dos camundongos também induziu aumento no extravasamento de proteínas no grupo controle. Tratamento com *E. grandis* na dose de 10mg/kg resultou em uma diminuição significativa no vazamento total de proteínas ($61 \pm 3\%$), reduzindo assim o exsudato e demonstrando a atividade anti-inflamatória do OE. Esses achados sugerem que os efeitos observados podem ser atribuídos à inibição da formação de exsudato pleural e da migração de leucócitos pelos OEs, confirmando sua atividade anti-inflamatória.

Estudos demonstraram que a inibição do recrutamento de leucócitos pode mitigar as alterações associadas a condições inflamatórias (Kelly; Hwang; Kubes, 2007). Portanto, substâncias que podem interferir no processo quimiotático são promissoras no tratamento de doenças inflamatórias.

Portanto, os resultados experimentais, particularmente aqueles envolvendo os OEs de *E. benthamii*, *E. dunnii* e *E. grandis*, mostram-se promissores no desenvolvimento de medicamentos com potencial anti-inflamatório. Mais pesquisas são necessárias para avaliar a toxicidade e a resposta à dose do OE de *E. grandis*.

Figura 34 - Efeitos dos óleos essenciais de *Eucalyptus* (10 mg/kg, vo), controle (soro fisiológico) e dexametasona (1 mg/kg, via subcutânea) no número de proteínas totais expressas por mg/mL (cada coluna representa a média de 6 animais)



Fonte: A autora

Nota: Os asteriscos indicam níveis de significância comparados com os dados do grupo controle. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com os dados do grupo tratado com veículo (Controle). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Pesquisas anteriores relataram que o OE de *E. globulus* contendo *o*-cimeno, embora não seja o componente principal, também foi capaz de estimular a resposta fagocítica dos macrófagos através da inibição dos leucócitos. Foi demonstrado que o monoterpeno *o*-cimeno afeta o comportamento quimiotático dos leucócitos ao inibir os leucócitos rolantes e aderentes, um processo modulado por citocinas responsáveis pela regulação desses efeitos (Serafino *et al.*, 2008).

Santos e Rao (2000) examinaram o potencial do 1,8-cineol como agente anti-inflamatório e antinociceptivo. Eles demonstraram que o 1,8-cineol era eficaz após

administração oral e era substancialmente mais potente na dose de 400 mg/kg. Não apenas inibiu o edema de carragenina e aumentou a permeabilidade capilar, mas também inibiu a formação de granuloma. Com estas pesquisas portanto, pode se relacionar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória aos monoterpenos, que é a classe de terpenos predominante nos OEs de *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. saligna*, podendo ser uma justificativa aos resultados significativos do presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a analisar e comparar a composição química de óleos essenciais de *Eucalyptus* com padronização de cultivo e idade fenológica das plantas, além de realizar uma análise minuciosa dos pecíolos. A morfoanatomia dos pecíolos revelou diferenças entre as espécies em termos de tamanho e formato em seção transversal, tamanho de cavidade, disposição e número de feixes vasculares, além dos morfotipos cristalinos.

Os resultados do estudo indicam que a composição química e a quantidade de óleos essenciais (OEs) em diferentes espécies de *Eucalyptus* podem variar significativamente e são influenciadas por fatores genéticos e pela estação do ano. Todas as seis espécies analisadas apresentaram variações no teor, constituição química volátil e nas concentrações de OEs ao longo das diferentes estações do ano.

De acordo com nossos resultados, 86 substâncias foram identificadas nos óleos essenciais das seis espécies de *Eucalyptus*. *E. globulus*, *E. badjensis* e *E. dunnii* apresentaram maiores proporções de 1,8-cineol (eucaliptol) enquanto esse composto não foi encontrado majoritariamente em *E. benthamii*, *E. grandis* e *E. saligna*. Essa variação na presença do 1,8-cineol entre as espécies de *Eucalyptus* ressalta a importância de se determinar o perfil químico de cada espécie para definir sua aplicação comercial: industrial ou terapêutica.

O CCDAE foi utilizado com sucesso como uma técnica rápida para monitorar a composição química de óleos essenciais em *Eucalyptus* durante a sazonalidade. As análises por CG-EM e CCDAE mostraram que diferentes espécies de *Eucalyptus* apresentaram composições químicas únicas em seus óleos essenciais. Este achado foi demonstrado no cluster de componentes principais.

Entre as espécies estudadas, *E. badjensis*, *E. dunnii* e *E. globulus* destacam-se como fontes promissoras para a exploração comercial de terpenos bioativos no Paraná, Brasil, principalmente devido ao seu alto teor de 1,8-cineol presente em seus OEs.

Eucalyptus badjensis, especificamente no Paraná, Brasil, tem um potencial significativo para a exploração comercial de OEs. Esta espécie está bem adaptada às condições de geada, apresenta rápido crescimento da madeira – seu principal objetivo de cultivo – e possui um alto rendimento de OE, com mais de 80% de 1,8-cineol.

O OE de *Eucalyptus benthamii* mostrou a maior atividade contra *Cimex lectularius* (percevejos da cama). Além disso, os OEs das seis espécies demonstraram atividade antioxidante no modelo ABTS. Especificamente, os OEs de *E. benthamii*, *E. grandis* e *E. dunnii* exibiram notável atividade anti-inflamatória nos modelos experimentais testados.

As atividades biológicas observadas podem ser atribuídas a efeitos sinérgicos entre os compostos presentes nos OEs. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão de como esses compostos bioativos contribuem para os efeitos comprovados.

Adicionalmente, este estudo estabelece as bases para a utilização da biomassa de folhas de *Eucalyptus* como um recurso inovador para as indústrias farmacêutica, nutracêutica, cosmética e inseticida. Esta abordagem de reaproveitamento enfatiza uma estratégia de biofarmácia sustentável, promovendo um futuro mais sustentável e aprimorado para a comunidade global, em alinhamento com os objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 9, (Indústria, Inovação e Infraestrutura), 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e 15 (Vida Terrestre), conforme recomendado pelas Nações Unidas.

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

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: 2007.
- AFSHAR, A. A.; SHARIFIFARD M.; JAHANIFARD E.; GOROUHI M. A.; YOUSEFI S.; SHIRANI- BIDABADI L.; FARAJI M.; ALIZADEH I. Application of plants as eco-friendly components against common bed bugs (*Cimex lectularius* L.): a systematic review of the literature. **Journal of Essential Oil Research**, v. 35, n. 3, p. 238-246, 2023.
- ALMAS, I.; INNOCENT, E.; MACHUMI, F.; KISINZA, W. Chemical composition of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* grown in Tanzania. **Scientific African**, v. 12, p. e00758, 2021.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v.1000, n. 1-2, p. 40-56. 2004.
- ALMEIDA, V. P.; HIRT, A. A.; RAESKI, P. A.; MIKA, B. E.; JUSTUS, B.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; PAULA, J. P.; BUDEL, J. M. Comparative morphoanatomical analysis of *Mikania* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 9–19, 2017.
- 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, n. 5, p. 551–557, 2020.
- ALMEIDA, V. P.; TOLOUEI, S. E. L.; MINTEGUIAGA, M.; CHAVES, D. S. A.; HEIDEN, G.; KHAN, S. I.; TROTT, J.; WANG, M.; DELLACASSA, E.; RAMAN, V.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; MANFRON, J. Chemical profiles and cytotoxic activities of essential oils from six species of *Baccharis* subgenus *Coridifoliae* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 10, p. e202300862, 2023.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. D. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ANBG. Australian National Botanic Gardens. **Centre for Australian National Biodiversity Research**, 2022. Disponível em: <https://www.anbg.gov.au/search/index.html>. Acesso em: 02 jun. 2024.
- ANTUNES, K. A.; MONTEIRO, L. M.; ALMEIDA, V. P.; MONCHAK, I. T.; PERERA, W. H.; HEIDEN, G.; GUARINO, E. S. G.; SANTOS, V. L. P.; FARAGO, P. V.; RAMAN, V.; KHAN, I. A.; MANFRON, J. Authentication and quality control of the Brazilian traditional herb “Espinheira-Santa”(Monteverdia ilicifolia) by morpho-anatomy and microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1809-1821, 2023.
- ASIF, M.; SALEEM, M.; SAADULLAH, M.; YASEEN, H. S.; AL ZARZOUR, R. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 1153-1161, 2020.

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 plants infection and pollution. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 7, p. 88-100, 2019.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1–33, 2016.

BATISH, D. R.; SINGH H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest ecology and management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Ltda, 1976.

BELKHODJA, H.; MEDDAH, B.; SIDELARBI, K.; BOUHADI, D.; MEDJADEL, B.; BRAKNA, A. In vitro and in vivo anti-inflammatory potential of *eucalyptus globulus* essential oil. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 80-88, 2022.

BENDAOUD, H. *et al.*. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, 2010.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. 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. DC. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 8, p. 831-837, 2017.

BETT, P. K.; DENG, A. L.; OGENDO, J. O.; KARIUKI, S. T.; KAMATENESI-MUGISHA, M.; MIHALE, J. M.; TORTO, B. Residual contact toxicity and repellence of *Cupressus lusitanica* Miller and *Eucalyptus saligna* Smith essential oils against major stored product insect pests. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 65-74, 2017.

BETT, P. K.; DENG, A. L.; OGENDO, J. O.; KARIUKI, S. T.; KAMATENESI-MUGISHA, M.; MIHALE, J. M.; TORTO, B. Chemical composition of *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus saligna* leaf essential oils and bioactivity against major insect pests of stored food grains. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 51–62, 2016.

BIRCHNELL, M. J.; GIBSON, M. Long-term flowering patterns of melliferous *Eucalyptus* (Myrtaceae) species. **Australian Journal of Botany**, v. 54, n. 8, p. 745-754, 2006.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BOSCARDIN, P. M. D. **Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus Benthamii* Maiden et Cambage**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 229–238, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: 2009.

BRITO, P. S.; SABEDOTTI, C.; FLORES, T. B.; RAMAN, V.; BUSSADE, J. E.; FARAGO, P. V.; MANFRON, J. Light and scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy, and histochemistry of *Eucalyptus tereticornis*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1295-1303, 2021.

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. Field Guide to *Eucalyptus*, vol. 1, Bloomings. **Melbourne, South-eastern Australia**, 2006.

BRUSTULIM, L. J. R.; MONTEIRO, L. M.; ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; MAIA, B. H. L. N. S.; CASAPULA, I.; PALUDO, K. S.; BUSSADE, J. E.; REHMAN, J. U.; KHAN, I. A.; FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M. Ocotea porosa: anatomy and histochemistry of leaves and stems, chemical composition, cytotoxicity and insecticidal activities of essential oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. e20190082, 2020.

BUDEL, J. M.; WANG, M.; RAMAN, V.; ZHAO, J.; KHAN, S. I.; REHMAN, J. U.; TECHEN, N.; TEKWANI, B.; MONTEIRO, L. M.; HEIDEN, G.; TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2620, 2018.

BURROWS, G. E.; HORNBY, S. K.; WATERS, D. A.; BELLAIRS, S. M.; PRIOR, L. D.; BOWMAN, D. M. J. S. Leaf Axil Anatomy and Bud Reserves in 21 Myrtaceae Species from Northern Australia. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 9, p. 1174–1186, 2008.

BUTTURINI, E.; DI PAOLA, R.; SUZUKI, H.; PATERNITI, I.; AHMAD, A.; MARIOTTO, S.; CUZZOCREA, S. Costunolide and Dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 107-115, 2014.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005.

CAMBRONERO-HEINRICHS, J. C.; SÁNCHEZ-PORTILLA, L. S.; CALDERÓN-ARGUEDAS, Ó.; TROYO, A. *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae) in Costa Rica: first case report confirmed by molecular methods in Central America. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 969-973, 2020.

CAMPBELL, B. E.; MILLER, D. M. Insecticide resistance in eggs and first instars of the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). **Insects**, v. 6, n. 1, p. 122-132, 2015.

CHAGAS, A. C. D. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247-253, 2002.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; MALHURET, R.; CHOPINEAU, J. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. **Journal of essential oil research**, v. 9, n. 1, p. 67-75, 1997.

CHANDORKAR, N.; TAMBE, S.; AMIN, P.; MADANKAR, C. A. A systematic and comprehensive review on current understanding of the pharmacological actions, molecular mechanisms, and clinical implications of the genus *Eucalyptus*. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100089, 2021.

CIMANGA, K.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; VAN MIERT, S.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; KAMBU, K.; TONA, L. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 5, p. 382–387, 2002.

COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, n. 6, p. 524–554, jun. 2007.

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

DALE, R.; STACEY, B. Multimodal treatment of chronic pain. **Medical Clinics**, v. 100, n. 1, p. 55-64, 2016.

DAROUI-MOKADDEM, H.; KABOUCHE, A.; BOUACHA, M.; SOUMATI, B.; EL-AZZOUNY, A.; BRUNEAU, C.; KABOUCHE, Z. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil of fresh leaves of *Eucalyptus globulus*, and leaves and stems of *Smyrniololus* from Constantine (Algeria). **Natural product communications**, v. 5, n. 10, p. 1934578X1000501031, 2010.

DAUDT, A. W.; HADLICH, E.; FACIN, M. A.; APRATO, R. M. D. S.; PEREIRA, R. P. Opioides no manejo da dor — uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.44, n. 2, p. 106-110. 1998.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: **Fertilidade do Solo**. 2007. p. 94-104.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-158, 2000.

DENARDIN, I. C.; LAZZAROTTO, M.; LAZZAROTTO, S. D. S.; MAGALHAES, W. L. E.; QUEIROZ, D. L. Caracterização térmica de óleos essenciais de eucalipto visando material genético resistente ao ataque de *Glycaspis brimblecombei*. In: VIII SIMPÓSIO DE ANÁLISE TÉRMICA, 8, 2017, Ponta Grossa. **Livro de resumos** [Ponta Grossa: UEPG, 2017]. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166436/1/Livro-Doc-307-1518-completo-32.pdf>. Acesso em: 17 set. 2023.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Antibacterial activity and chemical composition of the leaf essential oil of *Mentha rotundifolia* from Morocco. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry**, v. 9, n. 1, 2010.

DHAKAD, A. K.; PANDEY, V. V.; BEG, S.; RAWAT, J. M.; SINGH, A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p. 833–848, 2018.

DILOKSUMPUN, S.; WONGKATTIYA, N.; BUABAN, K.; SALEEPOCHN, T.; SUTTIARPORN, P.; LUANGKAMIN, S. Variation in the antibacterial and antioxidant activities of essential oils of five new *Eucalyptus urophylla* ST Blake clones in Thailand. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 680, 2022.

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

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; BORSATO, D. M.; MIRANTE, D. C.; NAKASHIMA, T.; BUDEL, J. M.; KOVALICZN, R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; PAULA, J. P.; FARAGO, P. V. Antioxidant, antimicrobial and pediculicidal activities of *Eucalyptus benthamii* essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 9, p. 1823-1829, 2015.

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 etCambage. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 94-101, 2010.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; SARTORATTO, A.; SALES MAIA, B. H. L. D. N.; PADILHA DE PAULA, J.; NAKASHIMA, T.; FARAGO, P. V.; KANUNFRE, C. C. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

ELAISSI, A.; ROUIS, Z.; SALEM, N. A. B.; MABROUK, S.; BEN SALEM, Y.; SALAH, K. B. H.; AOUNI, M.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; KHOUJA, M. L. Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1–15, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2000. Parte II. Farmacopéia Brasileira. Brasília: 2016.

FELTENSTEIN, M. W.; SCHÜHLY, W.; WARNICK, J. E.; FISCHER, N. H.; SUFKA, K. J. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and Bear's foot. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 2, p. 299-302, 2004.

FLORA DO BRASIL. **Eucalipto na Flora e Funga do Brasil**. 2024. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB614473>. Acesso em: 18 jul. 2024.

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

FONSECA, L. C.; DADARKAR, S. S.; LOBO, A. S.; SUTHAR, A. C.; CHAUHAN, V. S.; CHANDRABABU, S.; SHARNA, S. D.; DAGIA, N. M.; PADIGARU, M. 7-hydroxyfrullanolide, a sesquiterpene lactone, inhibits pro-inflammatory cytokine production from immune cells and is orally efficacious in animal models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 644, n. 1-3, p. 220-229, 2010.

FORMAGIO, A. S. N.; VILEGAS, W.; VOLOBUFF, C. R. F.; CARDOSO, C. A. L.; PEREIRA, Z. V.; SILVA, R. M. M. F.; YAMAZAKI, D. A. S.; GAUZE, G. F.; MANFRON, J., MARANGONI, J. A. Exploration of essential oil from *Psychotria poeppigiana* as an anti-hyperalgesic and anti-acetylcholinesterase agent: Chemical composition, biological activity and molecular docking. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 115220, 2022.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; DO CARMO VIEIRA, M.; PEREIRA, Z. V.; BAGATIN, M. C.; FREITAS GAUZE, G. *Psychotria leiocarpa* Extract and Vincosamide Reduce Chemically-Induced Inflammation in Mice and Inhibit the Acetylcholinesterase Activity. **Inflammation**, v. 42, n. 5, p. 1561–1574, 2019.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy** 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals in plants. **The Botanical Review**, v. 46, p. 361-427, 1980.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, n. 1, p. 41-71, 2005.

GAIRE, S.; LEWIS, C. D.; BOOTH, W.; SCHARF, M. E.; ZHENG, W.; GINZEL, M. D.; GONDHALEKAR, A. D. Bed bugs, *Cimex lectularius* L., exhibiting metabolic and target site deltamethrin resistance are susceptible to plant essential oils. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 169, p. 104667, 2020.

GHAURI, M. S. K. Taxonomic notes on a collection of Fulgoroidea from tea in southern India. **Bulletin of Entomological Research**, v. 62, n. 4, p. 541-544, 1973.

GHAZGHAZI, H.; ESSGHAIER, B.; RIGUENE, H.; RIGANE, G.; EL ALOUI, M.; OUESLATI, M. A.; BEN SALEM, R.; SADFI ZOUAOUI, N.; NASER, Z.; LAARBI KHOUJA, M. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *eucalyptus* essential oil: a comparative study between *eucalyptus marginata* L. and

eucalyptus pauciflora L. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 64, n. 12, p. 1055-1062, 2019.

GHELARDINI C.; GALEOTTI N.; MANNELLI L.D.C.; MAZZANTI G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 387-389, 2001.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731-737, 2010.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOLDBECK, J. C.; NASCIMENTO, J. E.; JACOB, R. G.; FIORENTINI, Â. M.; SILVA, W. P. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 304-309, 2014.

GONZALEZ, J. A. Z.; COSTA, M. D.; SILVA, I. R.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. D.; BORGES, A. C. Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto.: II-formação de cristais de oxalato de cálcio induzida por fungos ectomicorrízicos em raízes laterais finas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 555-562, 2009.

GOODGER, J. Q.; 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, p. e0151432, 2016.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUENTHER, E. Individual essential oils of the plant family Myrtaceae. **The essential oils**. New York, Van Nostrand, v. 4, 1977.

GUNDIDZA, M.; DEANS, S. G.; KENNEDY, A. I.; MAVI, S.; WATERMAN, P. G.; GRAY, A. I. The essential oil from *Heteropyxis natalensis* Harv: its antimicrobial activities and phytoconstituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 63, n. 3, p. 361-364, 1993.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* et Cabbage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 38, p. 121-123, 1999.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; ALVES, E. C. Comportamento de progênies de *Eucalyptus badijensis* Beuzev. & Welch em dois locais da Região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 45, p. 89-97, 2002.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, A. C. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. 7, p. 363-9, 2008.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; HÉRENT, M. F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta medica**, v. 72, n. 05, p. 480-482, 2006.

IBA. Indústria Brasileira de Árvores. **Árvores plantadas**. 2020. Disponível em: <https://www.iba.org/arvores-plantadas>. Acesso em: 02 jun. 2024.

IBÁ. Indústria Brasileira de produtores de Árvores. Relatório IBÁ 2017 ano base 2016. 2017. Disponível em: <http://iba.org/pt/biblioteca-iba/publicacoes>. Acesso em: 20 de nov. de 2023.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience research**, v. 41, n. 4, p. 299-332, 2001.

JASROTIA, P.; KUMARI, P.; MALIK, K.; KASHYAP, P. L.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, A. K.; SINGH, G. P. Conservation agriculture based crop management practices impact diversity and population dynamics of the insect-pests and their natural enemies in agroecosystems. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1173048, 2023.

JERBI, A.; DERBALI, A.; ELFEKI, A.; KAMMOUN, M. Essential oil composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* leaves extracts from Tunisia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 2, p. 438-448, 2017.

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

JUERGENS, U. R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug research**, v. 64, n. 12, p. 638-646, 2014.

JUERGENS, U. R.; STÖBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of euclyptol (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, 1998.

KAISER, H. F. The application of electronic computers to factor analysis. **Educational and psychological measurement**, v. 20, n. 1, p. 141-151, 1960.

KARERU, P. G.; KENJI, G. M.; GACHANJA, A. N.; KERIKO, J. M.; MUNGAI, G. Traditional medicines among the Embu and Mbeere people of Kenya. **African Journal**

of **Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 75-86, 2007.

KASSUYA, C. A.; SILVESTRE, A.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; MAROTTA, D. M.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*: evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European journal of pharmacology**, v. 546, n. 1-3, p. 182-188, 2006.

KAUR, I. P.; GEETHA, T. Screening methods for antioxidants-a review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 3, p. 305-312, 2006.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual review of plant biology**, v. 60, n. 1, p. 335-355, 2009.

KOGANEMARU, R.; MILLER, D. M. The bed bug problem: past, present, and future control methods. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 106, n. 3, p. 177-189, 2013.

LIAPI, C.; ANIFANTIS, G.; CHINOU, I.; KOUROUNAKIS, A. P.; THEODOSOPOULOS, S.; GALANOPOULOU, P. Antinociceptive properties of 1, 8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta medica**, v. 73, n. 12, p. 1247-1254, 2007.

LIEBERMAN, Philip. Histamine, antihistamines, and the central nervous system. In: **Allergy & Asthma Proceedings**. 2009.

LIMA, D. F.; GOLDENBERG, R.; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 683-693, 2011.

LIMA, E. A.; SILVA, H. D.; LAVORANTI, O. J. Caracterização dendroenergética de árvores de *Eucalyptus benthamii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, p.09-17, 2011.

LIMAM, H.; JEMAA, M. B.; TAMMAR, S.; KSIBI, N.; KHAMMASSI, S.; JALLOULI, S.; DEL RE, GIOVANNI; MSAADA, K. Variation in chemical profile of leaves essential oils from thirteen Tunisian *Eucalyptus species* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. **Industrial Crops and Products**, v. 158, 2020.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003.

LUCIA, A.; AUDINO, P. G.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on aedes Aegypti larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 3, p. 299-303, 2007.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972): modificado-e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 199-212, 1996.

MACHADO, C. D.; RAMAN, V.; REHMAN, J. U.; MAIA, B. H. L. N. S.; MENEGHETTI, E. K.; ALMEIDA, V. P.; SILVA, R. Z.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2019.

MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *Bicostata* (Maiden et al.) JB Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 756-761, 2009.

MANFRON J.; RAMAN V.; KHAN I. A.; FARAGO P. V. MANFRON, J. Essential oils of *Baccharis*: chemical composition and biological activities. In: **Baccharis: From Evolutionary and Ecological Aspects to Social Uses and Medicinal Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2021 a. p. 239-257.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. **Leite, JPV Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas. São Paulo: Atheneu**, 2009.

MCKINNON, R.; BINDER, M.; ZUPKÓ, I.; AFONYUSHKIN, T.; LAJTER, I.; VASAS, A.; MARTIN, R.; UNGER, C.; DOLZNIG, H.; DIAZ, R.; FRISCH, R.; PASSREITER, C. M.; KRUPITZA, G.; HOHMANN, J.; KOPP, B.; BOCHKOV, V. N. Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1695-1701, 2014.

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

MIGACZ, I. P.; MANFRON, J.; FARAGO, P. V.; RAMAN, V.; MUÑIZ, G. I. B., NISGOSKI, S. VIS/NIR spectra and color parameters according to leaf age of some *Eucalyptus* species: influence on their classification and discrimination. **Forest Systems**, v. 31, n. 2, p. e013-e013, 2022.

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, n. 3, p. 273-281, 2018.

MIGACZ, I. P.; WANG, M.; FAORO, J. A. M.; SANTOS, S. M.; FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; REHMAN, J. U.; PERERA, W. H.; GONÇALVES, V. C.; CHAVES, D. S. A.; RAMAN, V.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; MANFRON, J. Bioprospecting and Repurposing of Leaf Biomass to Support Sustainable Biopharmacy: Evaluation of seasonal chemical variations and biological activities of six *Eucalyptus* essential oils. **International Journal of Environmental Research**, v. 18, n. 4, p. 74, 2024.

MINTEGUIAGA, M.; GONZÁLEZ, A.; CASSEL, E.; UMPIERREZ, N.; FARIÑA, L.; DELLACASSA, E. Volatile constituents from *Baccharis* spp. L.(Asteraceae): chemical support for the conservation of threatened species in Uruguay. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 5, p. e1800017, 2018.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da lignificação de células xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.

MONTES, C.; CUADRILLERO, C.; VILELLA, D. Maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) using an artificial feeding technique. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 4, p. 675-679, 2002.

MOSSI, A. J.; ASTOLFI, V.; KUBIAK, G.; LERIN, L.; ZANELLA, C.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DEVILLA, I. A.; CANSIAN, R.; RESTELLO, R. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p. 273-277, 2011.

MÜLLER, M. D.; COUTO, L.; NEVES, J. C. L. Produção de biomassa e balanço nutricional de plantações de eucalipto clonal em diferentes densidades de plantio no município de Itamarandiba-MG. **Biomassa & Energia**, v. 2, n. 2, p. 91-101, 2005.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 901-909, 2003.

NINKUU, V.; ZHANG, L.; YAN, J.; FU, Z.; YANG, T.; ZENG, H. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5710, 2021.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B.; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**, v. 8, n. 1, p. 67-76, 1998.

NISSEN, L.; ZATTA, A.; STEFANINI, I.; GRANDI, S.; SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; MONTI, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 413-419, 2010.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **NIST Livro de Química. Base de dados de Referência padrão do NIST número 69**. 2023. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 17 set. 2023.

PANIKAR, S.; SHOBA, G.; ARUN, M.; SAHAYARAYAN, J. J.; NANTHINI, A. U. R.; CHINNATHAMBI, A.; ALHARBI, S. A.; NASIF, O.; KIM, H. J. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 5, p. 601– 610, 2021.

PARK, J. Y.; KANG, M.; KIM, J. S.; LEE, J. P.; CHOI, W. I.; LEE, J. S. Enhancement of enzymatic digestibility of *Eucalyptus grandis* pretreated by NaOH catalyzed steam explosion. **Bioresource technology**, v. 123, p. 707-712, 2012.

PAUZER, M. S.; BORSATO, T. O.; ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; JUSTUS, B.; PEREIRA, C. B.; FLORES, T. B.; MAIA, B. H. L. N. S.; MENEGHETTI, E. K.; KANUNFRE, C. C.; PAULA, J. F. P.; FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M. *Eucalyptus cinerea*: Microscopic profile, chemical composition of essential oil and its antioxidant, microbiological and cytotoxic activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, n. spe, p. e21200772, 2021.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, M. G. B.; SANTANA, M. F.; SANTANA, M. T.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SOUZA, D. P.; ALMEIDA, R. N. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 6, p. 583-586, 2011.

RAESKI, P. A.; HEIDEN, G.; NOVATSKI, A.; RAMAN, V.; KHAN, I. A.; MANFRON, J. Calcium oxalate crystal macropattern and its usefulness in the taxonomy of *Baccharis* (Asteraceae). **Microscopy Research and Technique**, v. 86, n. 7, p. 862-881, 2023.

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.; MANEZ, S.; CERDA, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual review of entomology**, v. 57, n. 1, p. 405-424, 2012.

RÍOS, N.; STASHENKO, E. E.; DUQUE, J. E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 307-311, 2017.

RÍOS, N.; STASHENKO, E. E.; DUQUE, J. E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 307-311, 2017.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiocnologia. **São Paulo: Premier**, p. 92-121, 1997.

ROMERO, A.; POTTER, M. F.; HAYNES, K. F. Evaluation of piperonyl butoxide as a deltamethrin synergist for pyrethroid-resistant bed bugs. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 6, p. 2310-2315, 2009.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**. V 48, p. 601-606. 2003.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa: 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+**. Embrapa: 2007b.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica:**

determinação da atividade antioxidante total em frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico. Embrapa: 2007c.

SALVATORI, E. S.; MORGAN, L. V.; FERRARINI, S.; ZILLI, G. A. L.; ROSINA, A.; ALMEIDA, M. O. P.; HACKBART, H. C. S.; REZENDE, R. S.; ALBENY-SIMÕES, D.; OLIVEIRA, J. V.; GASPARETTO, A.; MÜLLER, L. G.; DAL MAGRO, J. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of *Eucalyptus* spp. Essential Oils: A Potential Valuable Use for an Industry Byproduct. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2023, n. 1, p. 2582698, 2023.

SALVATORI, E. S.; MORGAN, L. V.; FERRARINI, S.; ZILLI, G. A.; ROSINA, A.; ALMEIDA, M. O. P.; HACKBART, H. C. S.; RESENDE, R. S.; ALBENY-SIMÕES, D.; OLIVEIRA, J. V.; GASPARETTO, A.; MÜLLER, L. G.; DAL MAGRO, J. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of *Eucalyptus* spp. Essential Oils: A Potential Valuable Use for an Industry Byproduct. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2023, n. 1, p. 2582698, 2023.

SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. R. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda.** Brasília, DF: EMBRAPA, 2014. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/121607/1/Apostila-Serie-TT-Eucalipto.pdf>. Acesso em: 17 set. 2023.

SANTOS, A. E. Importância química e biológica dos óleos voláteis de espécies do gênero *Eucalyptus*. **Scientia Naturalis**, v. 3, n. 1, 2021.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000.

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 Árvore**, v. 32, n. 4, p. 769–779, 2008.

SANTOS, S. M.; DE OLIVEIRA JUNIOR, P. C.; DE MATOS BALSALOBRE, N.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; PEREIRA, Z. V.; SILVA, R. M. M. F.; FORMAGIO, A. S. N. Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113495, 2021.

SANTOS, V. L. P. D.; RAMAN, V.; BOBEK, V. B.; MIGACZ, I. P.; FRANCO, C. R. C.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 9–15, 2018.

SANTOS, V. L. P.; RODRIGUES, I. C. G.; BERTÉ, R.; RAMAN, V.; MESSIAS-REASON, I. J.; BUDEL, J. M. Review of Piper species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities. **The Botanical Review**, v. 87, p. 23-54, 2021.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 231-233, 2007.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames, Iowa State College Press, 1958.

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, n. 2, p. 125–134, 2018.

SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Is mPGES-1 a promising target for pain therapy?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 8, p. 399-401, 2006.

SEBEL, K.; SAKOUHI, F.; HERCHI, W.; KHOUJA, M. L.; BOUKHCHINA, S. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. **Biological Research**, v. 48, p. 1–5, 2015.

SERAFINO, A.; VALLEBONA, P. S.; ANDREOLA, F.; ZONFRILLO, M.; MERCURI, L.; FEDERICI, M.; RASI, G.; GARACI, E.; PIERIMARCHI, P. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. **BMC Immunology**, v. 9, p. 1–16, 2008.

SERHAN, C. N. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 3-5, p. 157-163, 2008.

SERHAN, C. N.; WARD, P. A.; GILROY, D. W. **Fundamentals of inflammation**. Cambridge University Press, 2010.

SILVA, D. A.; MULLER, B. V.; KUIASKI, E. C.; ELOY, E.; BEHLING, A.; COLAÇO, C. M. Propriedades da madeira de *Eucalyptus benthamii* para produção de energia. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 84, pág. 481-485, 2015.

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, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA, M. M. D.; IRIGUCHI, E. K.; KASSUYA, C. A. L.; VIEIRA, M. D. C.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. D.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUZA, K. P.; FORMAGIO, A. S. Schinus terebinthifolius: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 445–452, 2017.

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

SILVA, P. P. M.; DE OLIVEIRA, J.; DOS MARES BIAZOTTO, A.; PARISI, M. M.; DA GLÓRIA, E. M.; SPOTO, M. H. F. Essential oils from *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. Ex Bailey and *Eucalyptus urograndis* W. Hill ex Maiden associated to

carboxymethylcellulose coating for the control of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. and *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. in strawberries. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112884, 2020.

SONG, J.-H.; HONG, S.-P. Comparative petiole anatomy of the tribe Sorbarieae (Rosaceae) provide new taxonomically informative characters. **Nordic Journal of Botany**, v. 36, n. 5, p. njb-01702, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia vegetal**, v. 3, p. 309-334, 2004.

TALIP, N.; CUTLER, D. F.; PUAD, A. A.; ISMAIL, B. S.; RUZI, A. R.; JUHARI, A. A. Diagnostic and systematic significance of petiole anatomy in the identification of *Hopea* species (Dipterocarpaceae). **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 111-125, 2017.

TAN, M.; ZHOU, L.; HUANG, Y.; WANG, Y.; HAO, X.; WANG, J. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. **Natural Product Research**, v. 22, n. 7, p. 569-575, 2008.

TANASE, C.; COȘARCĂ, S.; MUNTEAN, D.-L. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1182, 2019.

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

TISCHER, B.; VENDRUSCOLO, R. G.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; BARIN, C. S.; GIACOMELLI, S. R.; BUDEL, J. M.; BARIN, J. S. Effect of grinding method on the analysis of essential oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. **Chemical Papers**, v. 71, p. 753-761, 2017.

TODD, I.; SPICKETT, G.; FAIRCLOUGH, L. **Immunology**. New York: 2015.

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.

TSAI, M. L.; LIN, C. C.; LIN, W. C.; YANG, C. H. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1977-1983, 2011.

TURK, A.; AHN, J. H.; JO, Y. H.; SONG, J. Y.; KHALIFE, H. K.; GALI- MUHTASIB, H.; KIM, Y.; HWANG, B. Y.; LEE, M. K. NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from Lebanese *Laurus nobilis*. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 120-123, 2019.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 228-235, 2011.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. Pharmacognosy, Lea & Febiger. **Philadelphia**, v. 461, p. 2, 1988.

U.S. PHARMACOPEIA. **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 28-NF 23)**. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 2005.

USP. High-performance thin layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin. In: **UNITED STATES PHARMACOPOEIA AND NATIONAL FORMULARY USP40-NF35. ROCKVILLE (MD): UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION**, 2017.

VALÉRIO, D. A. R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI JR, W. A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1-2, p. 155-163, 2007.

VALLI, M.; SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

VELO, G. P.; GIROUD, J. P.; TIMSIT, J.; WILLOUGHBY, D. A. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. **The Journal of Pathology**, v. 111, p. 149-158, 1973.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711-714, 1973.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, n. 3, p. 1-26, 2003.

VUONG, Q. V.; CHALMERS, A. C.; JYOTI BHUYAN, D.; BOWYER, M. C.; SCARLETT, C. J. Botanical, phytochemical, and anticancer properties of the *Eucalyptus* species. **Chemistry & biodiversity**, v. 12, n. 6, p. 907-924, 2015.

WILSON, P. G. The families and genera of vascular plants flowering plants. **Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**, v. 10, 2011.

WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; MOURA, B. B.; BUDEL, J. M.; MORAES SANTOS, C. A. Comparative study of Passiflora taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 328-343, 2015.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAHİ, M. R.; LIANG, H.; YUAN, Q. Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. **Food Control**, v. 50, p. 554-559, 2015.

ZHANG, Y.; BORDERS, B. E.; WILL, R. E.; POSADAS, H. D. L. S. A model for foliage and branch biomass prediction for intensively managed fast growing loblolly pine. **Forest Science**, v. 50, n. 1, p. 65-80, 2004.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

MIGACZ, I. P.; MANFRON, J.; FARAGO, P. V.; RAMAN, V.; MUÑIZ, G. I.; NISGOSKI, S. VIS/NIR spectra and color parameters according to leaf age of some *Eucalyptus* species: influence on their classification and discrimination. **Forest Systems**, v. 31, n. 2, p. e013-e013, 2022.



RESEARCH ARTICLE

Forest Systems
31 (2), e013, 15 pages (2022)
eISSN: 2171-9845
<https://doi.org/10.5424/fs/2022312-19242>
DNA-CSIC

OPEN ACCESS

VIS/NIR spectra and color parameters according to leaf age of some *Eucalyptus* species: influence on their classification and discrimination

✉ Izabel P. Migacz¹, ✉ Jane Manfron¹, ✉ Paulo V. Farago¹, ✉ Vijayasankar Raman², ✉ Graciela I. B. de Muñiz³ and ✉ Silvana Nisgoski¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil. ²National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS, USA. ³Department of Forest Engineering and Technology, Federal University of Paraná, Av. Pref. Lothário Meissner 632, Jardim Botânico, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil.

Abstract

Aim of study: The aim of this study was to verify the differences in VIS/NIR spectra and leaf color parameters of leaves of *Eucalyptus badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunni*, *E. grandis*, *E. globulus* and *E. saligna*, at four ages, and their influence on species discrimination.

Area of study: São Mateus do Sul, Paraná, Brazil.

Materials and methods: Seedlings of the six species, with four replicates for each, were acclimatized in the same environment, in October 2015, in an entirely randomized design. Leaf samples were collected from plants that were 6, 8, 10 and 12 months old. Three leaves from each of four plants at each age were analyzed. Five parameters were recorded referring to the adaxial surface of each leaf, with a total of 15 records from repetitions and 60 per species at each age. The evaluation was performed in the spectral ranges from 360–740 nm (VIS) and 1000–2500 nm (NIR). Principal component analysis and linear discriminant analysis were performed.

Main results: The influence of age differed within each species. In color data, the parameter with most variation among all samples was chromatic coordinate b*. In reflectance spectra (VIS), age of 12 months provided the best discrimination of species. Second derivative NIR spectra produced the best results of external prediction of Linear Discriminant Analysis models based on leaves of 12-month-old trees.

Research highlights: Observation of color parameters and VIS/NIR spectroscopy have potential utility for discrimination of *Eucalyptus* species based on their green leaves.

Additional key words: visible spectra; near infrared spectra; species identification; green leaves; multivariate analysis; chromatic coordinates

Abbreviations used: LDA (linear discriminant analysis); MIR (mid-infrared spectra); NIR (near infrared spectra); PCA (principal component analysis); RENASEM (National Register of Seeds and Seedlings); VIS (visible spectra).

Authors' contributions: Conceptualization: IPM, JM, PVF and SN. Data acquisition and analysis: IPM and SN. Data curation: SN. Supervision: JM, PVF, VR, GIBM. Writing and revision: all authors.

Citation: Migacz, IP, Manfron, J, Farago, PV, Raman, V, de Muñiz, GIB, Nisgoski, S (2022). VIS/NIR spectra and color parameters according to leaf age of some *Eucalyptus* species: influence on their classification and discrimination. *Forest Systems*, Volume 31, Issue 2, e013. <https://doi.org/10.5424/fs/2022312-19242>

Received: 27 January 2022. Accepted: 27 June 2022.

Copyright © 2022 CSIC. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Funding agencies/institutions	Project / Grant
Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)	PQ 306082/2019-5 for S. Nisgoski

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Correspondence should be addressed to Silvana Nisgoski: silvana.ufpr@gmail.com

Introduction

The presence of over 800 species from genus *Eucalyptus* L'Hér., Myrtaceae family, is registered, most of them native to Australia, but several species are cultivated worldwide for commercial purposes. *Eucalyptus* wood is used in civil construction, the pulp and paper industry, and to produce charcoal for steelmaking, while the leaves are used to extract essential oils. In Brazil, *Eucalyptus* plantations occupy 6.97 million hectares and are located

mainly in the states of Minas Gerais, São Paulo and Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2020).

The taxonomy of *Eucalyptus* is problematic due to morphological similarities among different species (Steane *et al.*, 2011; Bayly *et al.*, 2013). Visible (VIS) and near infrared (NIR) spectroscopic analysis of leaves has been explored, with adequate results, as a supplementary technique for species identification *Eucalyptus* (Castillo *et al.*, 2008; Abasolo *et al.*, 2013), as well as some Amazonian tree species (Durgante *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2015), among others.

MIGACZ, I. P.; WANG, M.; FAORO, J. A. M.; SANTOS, S. M.; FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; REHMAN, J. U.; PERERA, W. H.; GONÇALVES, V. C.; CHAVES, D. S. A.; RAMAN, V.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; MANFRON, J. Bioprospecting and Repurposing of Leaf Biomass to Support Sustainable Biopharmacy: Evaluation of seasonal chemical variations and biological activities of six *Eucalyptus* essential oils. **International Journal of Environmental Research**, v. 18, n. 4, p. 74, 2024.

Int. J. Environ. Res. (2024) 18:74
https://doi.org/10.1007/s41742-024-00628-z



RESEARCH PAPER



Bioprospecting and Repurposing of Leaf Biomass to Support Sustainable Biopharmacy: Evaluation of Seasonal Chemical Variations and Biological Activities of Six *Eucalyptus* Essential Oils

Izabel Pietczak Migacz¹ · Mei Wang² · Janaine Alberto Marangoni Faoro³ · Sidney Mariano dos Santos³ · Anelise Samara Nazari Formagio³ · Candida Aparecida Leite Kassuya³ · Junaid Ur Rehman⁴ · Wilmer Hervet Perera⁵ · Vitória Caroline Gonçalves⁶ · Douglas Siqueira de Almeida Chaves⁷ · Vijayasankar Raman⁸ · Paulo Vitor Farago^{1,4} · Ikhlās Ahmed Khan⁴ · Jane Manfron^{1,4}

Received: 11 December 2023 / Revised: 15 February 2024 / Accepted: 7 June 2024
© University of Tehran 2024

Abstract

This study focuses on six *Eucalyptus* species, namely *E. badjensis*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. globulus*, and *E. saligna* aiming at a sustainable use of their green biomass. These species were grown at the same location and stage of development. Leaf essential oils were extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus during the four seasons. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) techniques were used to analyze the chemical composition. *E. badjensis* consistently exhibited a dominant composition, with 1,8-cineole being the predominant component. Notably, the proportion of 1,8-cineole in *E. badjensis* was 77.35% in spring (SP), 69.46% in summer (SU), 95.30% in autumn (AU), and 89.30% in winter (WI). *E. globulus* also exhibited 1,8-cineole as its primary constituent, with proportions fluctuating slightly across seasons at 84.87%, 79.94%, 81%, and 85.88%, respectively. The proportions and constituents of various species differed significantly. HPTLC was successfully used as a swift technique to monitor the chemical composition of essential oils (EOs) in various *Eucalyptus* species during the seasonality. GC–MS and HPTLC analysis showed that different *Eucalyptus* species displayed unique chemical compositions, while both the chemical profile and productivity of all analyzed EOs were affected by seasonality. This finding was demonstrated in the principal components cluster. The analysis of six species has revealed that the EO of *E. benthamii* is the most potent in thwarting the infestation of *Cimex lectularius*. Additionally, all six EOs demonstrated antioxidant activity in the ABTS model. EOs of *E. benthamii*, *E. dunnii*, and *E. grandis* showed significant anti-inflammatory activities in experimental models.

Highlights

- *E. badjensis*, *E. dunnii*, and *E. globulus* are promising sources for the commercial exploitation of 1,8-cineole
- *E. benthamii*, *E. grandis*, and *E. dunnii* presented anti-inflammatory activity
- The essential oils of six species showed antioxidant activity.
- *E. benthamii* EO presented a potent insecticide against *Cimex lectularius* adults.
- *Eucalyptus* leaf biomass as a novel resource for the pharmaceutical, nutraceutical, and insecticidal industries

Extended author information available on the last page of the article.

Published online: 22 June 2024



ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 17 de novembro de 2017.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de espécies vegetais"**, protocolo nº 07/2017, sob responsabilidade de Anelise Samara Nazari Formagio – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 02 de outubro de 2017.

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

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA