



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

**ESTUDOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS DE *Pimenta*
pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum**

Londrina
2009

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

**ESTUDOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS DE *Pimenta*
pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Co-orientadora: Profª. Dra. Terezinha de Jesus Faria

Londrina
2009

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C987e Custódio, Dayana Lacerda.
Estudos anatômicos e químicos de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R.
Landrum / Dayana Lacerda Custódio. – Londrina, 2009.
115 f. : il.

Orientador: Edmilson Bianchini.
Co-orientador: Terezinha de Jesus Faria.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, 2009.
Inclui bibliografia.

1. *Pimenta pseudocaryophyllus*-Anatomia. – Teses. 2. Anatomia vegetal. –
Teses. 3. Química vegetal. – Teses. 4 Botânica. – Teses. I. Bianchini, Edmilson.
II. Faria, Terezinha de Jesus. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU 602.7

DAYANA LACERDA CUSTÓDIO

**ESTUDOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS DE *Pimenta pseudocaryophyllus*
(Gomes) L. R. Landrum.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Ismar Mosqueta
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 06 de Março de 2009.

**Aos meus pais Joentino e Regina
e à minha família, por todo apoio e
incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edmilson Bianchini, pela orientação, apoio, confiança e paciência.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria, pela co-orientação, incentivo e confiança.

Aos Professores Dr. Ismar Moscheta, Dra. Dalva Trevisan Ferreira e Dr. Moacyr Medri pelo auxílio na correção e redação desta dissertação.

Ao LABRE, pelo auxílio na coleta da espécie estudada.

À Profa. Dra. Ana Odete Santos Vieira pelo auxílio na identificação da espécie.

À Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises, pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura da espécie estudada.

À Profa. Dra. Maria Inês Rezende pela orientação e auxílio nos testes de atividade biológica.

À Dra. Jacinta Sanchez Pelayo, a bióloga Barbara Moriel e ao Laboratório de Bacteriologia pelo auxílio e orientação nos testes de atividade biológica.

Ao Mestre Jurandir Pereira Pinto, pelo auxílio e orientação nas análises cromatográficas das amostras obtidas e por todo apoio, amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Leonilde Rodrigues de Moraes Souza por todo auxílio e paciência no desenvolvimento do estudo anatômico da espécie estudada, e por toda amizade, generosidade e apoio durante a realização deste trabalho.

À minha família que sempre me apoiou de todas as formas, que acreditou nas minhas escolhas e que esta sempre ao meu lado me amparando.

Aos meus amigos por toda a confiança, apoio, enfim, por toda a amizade.

Ao meu namorado Iuri Bezerra de Barros por todo amor, carinho, compreensão e incentivo.

Aos meus colegas de turma pelo companheirismo e pelos bons momentos nas aulas.

Aos professores das disciplinas cursadas por toda orientação.

Ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas.

A Capes pelo auxílio financeiro necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

A Deus pela vida e por tudo.

**“O mais sábio e o mais nobre dos
mestres é a própria natureza.”
Leonardo da Vinci**

CUSTÓDIO, Dayana Lacerda **Estudos anatômicos e químicos de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum.** 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Este trabalho descreve a anatomia de folhas e caules e o estudo químico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, uma árvore cujas folhas são usadas pela população para fazer chá para estados gripais e na culinária. Foram coletados segmentos do primeiro, segundo e quarto entrenós e folhas de 10 indivíduos em São Jerônimo da Serra – PR (23°43'34,5"S; 50°43'58,7"W). Os segmentos de caules e folhas foram fixados em álcool 70% e submetidos a técnicas usuais de microscopia e histoquímica. O caule apresenta epiderme unisseriada recoberta por cutícula espessa e córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximo a epiderme. O tecido vascular forma um anel contínuo ao redor da medula com xilema envolto externamente e internamente por floema. O quarto entrenó apresenta estrutura semelhante a do primeiro e segundo entrenós, mas com crescimento secundário evidente no tecido vascular. O pecíolo apresenta epiderme unisseriada coberta por cutícula espessa, córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximas a epiderme e um feixe anficrival envolto por periciclo esclerenquimático. A folha é hipostomática e possui epiderme unisseriada revestida por cutícula evidente. Sua face adaxial é glabra, mas tem muitos tricomas na face abaxial. O limbo apresenta hipoderme múltipla na face adaxial, parênquima paliçádico formado por duas ou três camadas e parênquima lacunoso. Cavidades secretoras estão presentes, especialmente no parênquima paliçádico. A nervura central é formada por epiderme unisseriada coberta por cutícula espessa, córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximas a epiderme e um feixe anficrival envolto por periciclo esclerenquimático. Dentre os testes histoquímicos foram obtidos resultados positivos para lipídios, compostos fenólicos, amido e oxalato de cálcio. A espécie apresenta características anatômicas típicas da família e as cavidades secretoras presentes nas folhas e caules estão relacionados aos metabolitos secundários detectados. Os dados apresentados contribuem para o estabelecimento de um padrão anatômico e químico para a espécie. Foi feito o estudo químico do extrato das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* em acetato de etila e de seu óleo essencial, e a atividade antimicrobiana do óleo essencial. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. Seus componentes foram identificados por CG-EM, CG-DIC e pelo Índice de Kowats e o eugenol foi identificado como constituinte majoritário. O extrato em acetato de etila (35 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel, do qual foram obtidas as frações hexânica, hexano/diclorometano 50 %, diclorometânica e etanólica. As frações hexânica, hexano/diclorometano 50 % e diclorometânica foram submetidas a técnicas de purificação usuais. Os constituintes isolados foram identificados através de métodos espectrométricos (RMN, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, CG-EM, IV). Foram isoladas misturas de hidrocarbonetos de cadeias longas, ácido ursólico, β -amirina e uma mistura oleosa contendo vitamina E e eugenol como constituintes principais. Nos testes de atividade antimicrobiana, o óleo essencial apresentou uma boa atividade contra os microrganismos testados. A espécie apresenta potencial para o uso no desenvolvimento de fármacos e de defensivos agrícolas menos agressivos ao ambiente, uma vez que contém constituintes químicos de reconhecidas atividades biológicas (eugenol, ácido ursólico e β -amirina) e seu óleo apresentou atividade contra microrganismos prejudiciais à saúde humana e a espécies vegetais de interesse agrônomo.

Palavras – chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*-anatomia. Anatomia vegetal. Química vegetal. Botânica.

CUSTÓDIO, Dayana Lacerda **Estudies anatomical and chemical of *Pimenta pseudocaryophyllus* (gomes) L. R. Landrum.** 2009. 115 f. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

This paper describes the leaf and stem anatomy of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, a tree which leaves are used by the population in the production of tea for cold and at culinary. There were collected segments of the first, second and fourth internodes and leaves of 10 individuals in São Jerônimo da Serra (23°43'34,5"S; 50°43'58,7"W), Parana State. The stem and leaf segments were fixed in 70% alcohol and submitted to the usual microtechniques. The stem presents uniseriate epidermis covered by a thick cuticle. The cortex is parenchymatous and has secretory cavities near the epidermis. The vascular tissues form a continuous ring around the pith with the xylem surrounded by phloem in his internal and external face. The fourth internode shows similar structure to the first and second internodes, but with evident secondary growth in the vascular tissue. The petiole shows uniseriate epidermis covered by a thick cuticle, parenchymatous cortex with secretory cavities near the epidermis and an amphicrival bundle surrounded by a sclerenchymatic pericycle. The leaf is hypostomatic and is characterized by a uniseriate epidermis covered by evident cuticle. Its adaxial face is glabrous but has abundant trichomes on the abaxial face. The leaf presents a multiple hypodermis at the upper face, a palisade parenchyma formed by two or three layers and a spongy parenchyma with many intercellular spaces. Several secretory cavities are present at the leaf, especially in the palisade parenchyma. The midrib is formed by a uniseriate epidermis covered by a thick cuticle, parenchymatous cortex with some collenchyma group cells and secretory cavities near the epidermis and an amphicrival bundle surrounded by a sclerenchymatic pericycle. Among the histochemical tests positive results were obtained for lipids, phenolic compounds, starch and calcium oxalate. The species has anatomical features typical of the family and the secretory cavities present in the leaves and stems are related to secondary metabolites detected. Chemical and anatomical studies are needed in order to establish a pattern for the species and identify the substances in their secondary metabolites, and their activities. There was made the chemical study of the extract of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaves in ethyl acetate and its essential oil, and the essential oil antimicrobial activity. The essential oil was obtained by hidrodestilation using the Clevenger apparatus. Its components were identified by CG-MS, GC-FID and by the Kowats Index and the eugenol was identified as majoritary constituent. The extract in ethyl acetate (35g) was chromatographed on silica gel column, which were obtained the fractions hexanic, hexane / dichloromethane 50 %, dichloromethanic and ethanolic. The fractions hexanic, hexane / dichloromethane 50 % and dichloromethanic were submitted to usual purification techniques. The isolated constituents were identified through spectroscopy methods (NMR, ¹H/¹³C, GC-MS, IV). There were isolated mixture of long chairs hydrocarbons, ursolic acid, β-amyrin and an oily mixture containing vitamin E and eugenol as the main constituent. In the antimicrobial activities tests the essential oil showed a good activity against the tested microorganisms. The specie presents potential to use in the development of drugs and of agricultural chemicals less agrasive to environment, since it contains components of known biological activity in its essential oil (eugenol) and in the extract of its leaves (ursolic acid and β-amyrin), and its essential oil presented activity against microorganism harmful to the human health and to plants of agronomic interest.

Keywords: *Pimenta pseudocaryophyllus*-anatomy. Anatomy of plants. Botanical chemistry. Botanical.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Classes de Terpenóides (Santos, 1999)	20
Tabela 2 – Principais fontes de heterosídeos cardioativos e componentes de interesse clínico. O tracejado na tabela significa que não ha substância correspondente (Santos, 1999)	27
Tabela 3 – Classes de compostos fenólicos (Santos, 1999)	32
Tabela 4 – Ligninas estudadas, a planta de origem e sua atividade (Santos, 1999).....	36
Tabela 5 – Classes de flavonóides e principais propriedades biológicas (Santos, 1999).....	39

Capítulo 3

Tabela 1 – Componentes do óleo essencial extraído das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5	85
Tabela 2 – Comparação entre os deslocamentos químicos de Ressonância magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN C ₁₃) da amostra identificada como β-amirina obtida da fração hexano/diclorometano 50 % extraída das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> e dados da literatura.....	89
Tabela 3 – Comparação entre os deslocamentos químicos de Ressonância magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN C ₁₃) da amostra identificada como acido ursólico obtida da fração diclorometânica extraída das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> e dados da literatura.....	91
Tabela 4 – Porcentagens de inibição promovida pelo óleo essencial das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> sobre o crescimento de fungos: grau de inibição menor que 10% (-), grau de inibição entre 10 e 20% (±), grau de inibição entre 20 e 40 % (+), grau de inibição entre 40 e 80% (++) e grau de inibição igual ou maior que 80% (+++).....	93
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	94

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** – Esquema das vias de metabolismo secundário (Santos, 1999) 19
- Figura 2** – Monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais..... 21
- Figura 3** – Tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* var. *regnellii*: glândulas peroladas(GP) e tricomas saculiformes (TS) (Silva e Machado, 1999)..... 22
- Figura 4** – Cavidade secretora no pecíolo de *Eugenia brasiliensis* Lam. mostrando resultado positivo para materiais lipofílicos (seta) e cavidade secretora no limbo foliar e drusas (d) (Donato e Morretes, 2007)..... 22
- Figura 5** – Ductos secretores no caule de *Spodias dulcis* (Anacardiaceae). O asterisco indica que o resultado positivo foi obtido tanto no interior do ducto, quanto no epitélio do ducto (Sant’anna-Santos et al., 2006)..... 23
- Figura 6** – Glândula e canal em *Hypericum perforatum* mostrando resultado positivo para materiais lipofílicos (Ciccarelli et al., 2001) 23
- Figura 7** – Corte transversal da nervura principal de *Eugenia dysenterica* mostrando glândula com conteúdo lipídico (Palhares, 2003) 24
- Figura 8** – Cavidades secretoras (seta) de *Rustia formosa* (Rubiaceae) e estrutura química da curzerenona (Vieira et al., 2001) 24
- Figura 9** – Tricoma glandular de *Salvia áurea* mostrando resultado positivo para terpenos (seta) e estrutura química da canfora (Serrato-Valenti et al., 1997)..... 25
- Figura 10** – Tricoma glandular da folha de *Calceolaria adscendens* (Scrophulariaceae) mostrando os vacúolos das células secretoras (H), da célula do pedúnculo (S) e da célula base (B) do tricoma contendo secreções (setas), espaços subcuticulares contendo secreções (setas) e cutícula parcialmente rompida (*) (Sacchetti et al., 1999) 25
- Figura 11** – Tricomas glandulares capitado e peltado em *Mentha spicata* (cb: célula Basal, cp: célula peduncular, ca: célula apical, es: espaço subcuticular, pc: parede celular, e: epiderme) (Martins, 2002) 26
- Figura 12** – Estruturas químicas da digoxina e digitoxina 27

Figura 13 – Estrutura da saponina 3-O-(β-D-xilopiranosil)-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-hederagenina obtida dos frutos de <i>Sapindus saponaria</i> (Murgu et al., 2008).....	28
Figura 14 – Cavidade secretora (cs) presente nos frutos de <i>Sapindus saponaria</i> , (cv) cavidade secretora; (en) endocarpo; (ep) exocarpo; (fv) feixe vascular; (mp) mesocarpo (Albiero et al., 2001)	29
Figura 15 – Saponinas isoladas de <i>Calendula officinalis</i> (Negri, 2005)	29
Figura 16 – Célula secretora de tricoma glandular de <i>Salvia áurea</i> , mostrando uma gota de material polissacarídeo no espaço subcuticular (Serrato-Valenti et al. 1997).....	31
Figura 17 – Tricoma glandular e corte longitudinal do ducto de <i>Siegesbeckia orientalis</i> mostrando resultados positivos para compostos fenólicos na célula da cabeça do tricoma e no ducto. Ct: cutícula, ES: espaço subcuticular, Ca: célula da cabeça do tricoma, PE: pedúnculo, Du: ducto (Aguilera et al., 2004).....	33
Figura 18 – Células da nervura principal de <i>Cunila microcephala</i> contendo compostos fenólicos (cf) (Toledo et al., 2004).....	33
Figura 19 – Idioblastos contendo compostos fenólicos no caule de <i>Spondias dulcis</i> (Sant’Anna-Santos et al., 2006)	34
Figura 20 – Esquema da síntese de fenilpropanóides (Santos, 1999).....	35
Figura 21 – Exemplos de fenilpropanóides	35
Figura 22 – Esqueleto de flavonóide	38
Figura 23 – Estruturas dos flavonóides identificados: kanferol (1) e flavonóides glicosilados (2-6) (Pizzolatti et al., 2003)	40
Figura 24 – Exemplos de taninos hidrolizável e condensado. Casuarinina isolada de <i>Syphoneugena densiflora</i> (Gallo et al., 2006) e tanino catéquico obtido de <i>Magonia pubescens</i> (Silva et al., 2004).....	41
Figura 25 – Classes de quinonas.....	42
Figura 26 – Estrutura química das quinonas isoladas de <i>Tectona grandis</i> . Tectoquinona (1), lapachol (2), obtusifolina (3) e desidro-α-lapachona (4) (Moreira et al., 2006).....	43
Figura 27 – Classes de alcalóides (Cseke et al., 2006).....	44
Figura 28 – Tricoma glandular (tg) na epiderme abaxial e estomato (et) da folha de <i>Sapindus saponaria</i> (Albiero et al., 2001)	45

Figura 29 – Reação positiva para alcalóides no ducto (Du) presente no parênquima (P) e nas células da endoderme (Em) do caule de <i>Siegesbeckia orientalis</i> (Aguilera et al., 2004).....	46
Figura 30 – Glândula translúcida (A) e canal secretor (B) de <i>Hypericum perforatum</i> . Reação positiva para alcalóides (Ciccarelli et al., 2001).....	46
Figura 31 – <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> . A, ramo com inflorescências do tipo panícula; B, flor após queda das brácteas; C, corte longitudinal do ovário mostrando os lóculos; D, corte longitudinal do ovário mostrando um lóculo; E, corte transversal do ovário; F, semente; G, corte da semente mostrando o embrião espiral (Landrum, 1986).....	49

Capítulo 2

Figura 1 – Secções transversais do caule de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Primeiro entrenó; (b) cavidade secretora no segundo entrenó; (c) tricoma glandular no primeiro entrenó; (d) tecido vascular no primeiro entrenó; (e) quarto entrenó; (f) cavidade secretora no quarto entrenó; (g e h) tecido vascular no quarto entrenó. Barras = 50Qm (a, b, d, e, f, g, h) e 25Qm (c). Abreviações- Ca: cambio vascular; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fl: floema; Md: medula; Pa: parênquima; Pr: procâmbio; Tg: tricoma glandular; Tv: tecido vascular; Xi: xilema.....	60
Figura 2 – Macerado do xilema do caule de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> coletado em São Jerônimo da Serra, PR. Barras= 50qm. Abreviações-Ce: células parenquimáticas; Fi: fibras libriformes; El: elementos de vaso.....	61
Figura 3 – Secções transversais do pecíolo de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a, b) Aspecto geral; (c) cavidade secretora; (d) feixe vascular. Barras= 250Qm (a) e 50Qm (b, c, d). Abreviações- Co: colênquima; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fl: floema; Mx: metaxilema; PA: parênquima; Pe: periciclo; Px: protoxilema; Tv: tecido vascular; Xi: xilema; Xp: xilema primário; Xs: xilema secundário.....	62
Figura 4 – Dissociação epidérmica e Microscopia eletrônica de Varredura das epidermes adaxial e abaxial de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> coletado	

em São Jerônimo da Serra, PR. (a) epiderme adaxial mostrando as células que revestem as cavidades secretoras; (b) epiderme adaxial mostrando cicatriz; (c) superfície da epiderme adaxial; (d) detalhe na epiderme adaxial de possível base de tricoma; (e) epiderme abaxial mostrando células que revestem as cavidades secretoras; (f) epiderme abaxial; (g) detalhe de estômato na face abaxial; (h) epiderme abaxial mostrando tricomas tectores. Barras= 10Qm (d), 20Qm (g), 25Qm (a, b, e, f) e 300Qm (c, h). Abreviações- Bt: base de tricoma; Ci: cicatriz; Cr: células que revestem a cavidade secretora; Ei: epiderme abaxial; Es: epiderme adaxial; Et: estômato; Tr: tricoma tector..... 63

Figura 5 – Folhas difanizadas de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Região apical; (b) região mediana; (c) margem foliar; (d) região de internervura. Barras= 325Qm (d), 525 Qm (c) e 1,25 mm (a e b). Abreviações- Ac: arcos; Ar: areólas; Te: terminações vasculares..... 64

Figura 6 – Microscopia eletrônica de Varredura e Microscopia óptica de secções transversais do limbo foliar de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Aspecto geral; (b) nervura de pequeno porte; (c) cavidade secretora junto ao parênquima lacunoso; (d) detalhe da cavidade secretora; (e) drusas de oxalato de cálcio no mesofilo. Barras= 25Qm (d) e 50Qm (a, b, c e e). Abreviações- Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Dr: drusa; Eb: extensão da bainha; Ed: endoderme; Ei: epiderme abaxial; Es: epiderme adaxial; Fl: floema; Hp: hipoderme; Pe: periciclo; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliádico; Xi: xilema 65

Figura 7 – Secções transversais da nervura central e bordo foliar de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Nervura mediana; (b) detalhe do feixe anficrival na nervura mediana; (c) detalhe do feixe mostrando o periciclo; (d) bordo foliar. Barras= 50Qm (b, c, d) e 200Qm (a). Abreviações- Co: colênquima; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fg: flange cuticular; Fl: floema; Hp: hipoderme; Pe: periciclo; Xi: xilema..... 66

Figura 8 – Secções transversais do caule *Pimenta pseudocaryophyllus*, coletado em São Jerônimo da Serra, PR, mostrando resultados positivos para os

testes histoquímicos. (a) Corado com Sudam III; (b) corado com lugol mostrando a bainha amilífera; (c) corado com cloreto férrico III; (d) detalhe mostrando idioblastos corados com cloreto férrico III; (e) cavidade secretora mostrando material corado por cloreto férrico; (f) cavidade secretora mostrando material corado por Sudam III. Barras= 50Qm (a – b, d, e, f) e 250Qm (c). Abreviações- Ba: bainha amilífera; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Go: gota de material secretado na cavidade secretora; Id: idioblasto; Md: medula; Tg: tricoma glandular; Tv: tecido vascular 67

Capítulo 3

Figura 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial extraído das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	84
Figura 2 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração hexânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	86
Figura 3 – Correlação entre o número de carbonos e o tempo de retenção do padrão de hidrocarbonetos utilizado na comparação com a mistura de hidrocarbonetos da fração hexânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	87
Figura 4 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração hexano/diclorometano 50 % obtida do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	88
Figura 5 – Perfil cromatográfico da β -amirina obtida da fração hexano/diclorometano 50 %, obtida do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	89
Figura 6 – Estrutura química da β - amirina, obtida a partir da fração hexano/diclorometano 50 % extraída de folhas de <i>Pimenta pseudocariophyllus</i> e comparação com a α -amirina.....	89
Figura 7 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração diclorometânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	90
Figura 8 – Estrutura química do ácido ursólico, obtido a partir da fração diclorometano extraída de folhas de <i>Pimenta pseudocariophyllus</i>	91

SUMÁRIO

CAPITULO 1 - METABOLITOS SECUNDARIOS E ESTRUTURAS SECRETORAS EM PLANTAS.....	17
1 INTRODUCAO	17
2 PRINCIPAIS GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	19
2.1 MATERIAIS LIPOFÍLICOS	19
2.1.1 Terpenos e Esteróides.....	19
2.1.2 Heterosídeos Cardioativos.....	26
2.1.3 Saponinas.....	27
2.2 POLISSACARÍDEOS.....	30
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	32
2.3.1 Fenilpropanóides	34
2.3.2 Ligninas	36
2.3.3 Flavonóides	38
2.3.4 Taninos	40
2.3.5 Quinonas.....	42
2.4 ALCALÓIDES	43
3 O GENERO <i>PIMENTA</i>	47
3.1 <i>PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS (GOMES) L.R. LANDRUM</i>	48
Referências	50
CAPITULO 2 – ANATOMIA DE CAULE E FOLHA DE <i>PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS (GOMES) L. R.LANDRUM</i>	53
Resumo	54
Abstract.....	54
1 INTRODUCAO	55
2 MATERIAL E METODOS.....	57
2.1 COLETA DA PLANTA.....	57

2.2	ESTUDOS ANATÔMICOS DE PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS	57
2.2.1	Anatomia de Caule e Folhas.....	57
2.2.2	Testes histoquímicos	58
3	RESULTADOS	59
3.1	ANATOMIA DO CAULE.....	59
3.2	ANATOMIA DA FOLHA.....	61
3.3	TESTES HISTOQUÍMICOS.....	66
4	DISCUSSAO	67
	Conclusão	71
	Referências	72
CAPITULO 3 - ESTUDO QUIMICO DAS FOLHAS DE PIMENTA		
	<i>PSEUDOCARYOPHYLLUS</i> (GOMES) L. R.LANDRUM	74
	Resumo	75
	Abstract.....	75
	Introdução.....	76
	Parte Experimental	78
	Resultados e Discussão.....	84
	CONCLUSOES	95
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXOS	98
	ANEXO A – Normas Revista Fitoterapia	99
	ANEXO B – Normas Revista Química Nova	109
	REFERÊNCIAS	112

CAPITULO 1

METABOLITOS SECUNDARIOS E ESTRUTURAS SECRETORAS EM PLANTAS

1 INTRODUÇÃO

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que ocorrem no interior celular. Os produtos metabólicos são produzidos através de interações complexas entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Estes processos são governados por genes, que são influenciados pela hereditariedade, pela ontogenia (estagio de desenvolvimento) e pelo ambiente (Robbers et al., 1997).

Primariamente, essas reações visam manter as exigências fundamentais de sobrevivência da célula, sendo essas reações chamadas de metabolismo primário. Entretanto, algumas dessas rotas levam a produção de moléculas que não são essenciais a sobrevivência da planta, sendo chamadas de metabolismo secundário. Os metabolitos secundários, apesar de não serem essenciais ao desenvolvimento e crescimento da planta, fornecem algum tipo de vantagem para o individuo que o produz. Essas moléculas apresentam uma distribuição mais restrita entre os organismos, sendo assim elementos de diferenciação e especialização (Taiz e Zeiger, 2004).

Durante muito tempo, os metabolitos secundários foram considerados produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades químicas interessantes. No entanto, atualmente é conhecido que varias dessas substâncias estão relacionadas à sobrevivência da planta no ambiente. Segundo Viegas et al. (2006), além de serem importantes as próprias plantas, os metabolitos secundários tem sido utilizados pela espécie humana há muito tempo. As civilizações Oriental e Ocidental tem uma historia rica em exemplos sobre a utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, sendo que as civilizações egípcia, greco-romana e chinesa tiveram maior destaque.

Os metabolitos secundários frequentemente são depositados em formas que podem ser vistas ao microscópio, sendo bastante utilizadas como características diagnósticas por anatomistas. Essas substâncias podem ser depositadas em células, em espaços

intercelulares ou em estruturas mais elaboradas como canais revestidos por um epitélio secretor, semelhantes àqueles presentes nas hastes de glândulas insetívoras em espécies da família Nepenthaceae (Metcalf e Chalk, 1985). Embora qualquer tecido ou célula vegetal possa realizar a biossíntese de metabolitos secundários, parece que isso ocorre apenas em alguns tecidos ou células especiais, devido ao grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Essa produção de metabolitos secundários pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais (Santos, 1999). Esse armazenamento é garantido pela presença de mecanismos responsáveis pela condução e concentração adequada desses compostos nas plantas. Os metabolitos secundários mais hidrofílicos tendem a ser armazenados nos vacúolos, enquanto os lipofílicos se acumulam em ductos ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos, como membranas, ceras cuticulares e lignina (Wink, 1990 apud Santos, 1999). Em muitas espécies, a biossíntese está restrita a um órgão, podendo os produtos ser armazenados em toda a planta ou em órgãos diferentes, através de um sistema de transporte intercelular (Santos, 1999).

As rotas de metabolitos secundários são mais específicas em relação às do metabolismo primário, podendo ser ativadas durante determinados períodos de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse provocados por limitações nutricionais ou ataque de microrganismos (Mann, 1987 apud Santos, 1999).

A origem dos metabolitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1). Os metabolitos secundários podem estar na forma livre, sendo chamado de aglicona ou genina; ou, podem estar conjugados a açúcares formando os heterosídeos. A partir do ácido chiquímico originam-se os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabolitos secundários aromáticos. Outros são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como as antraquinonas, os flavonóides e os taninos condensados. Os derivados do acetato podem ser classificados, segundo a via metabólica, em derivados do acetato via ciclo do ácido cítrico, derivados do acetato via mevalonato e produtos da condensação do acetato (Santos, 1999).

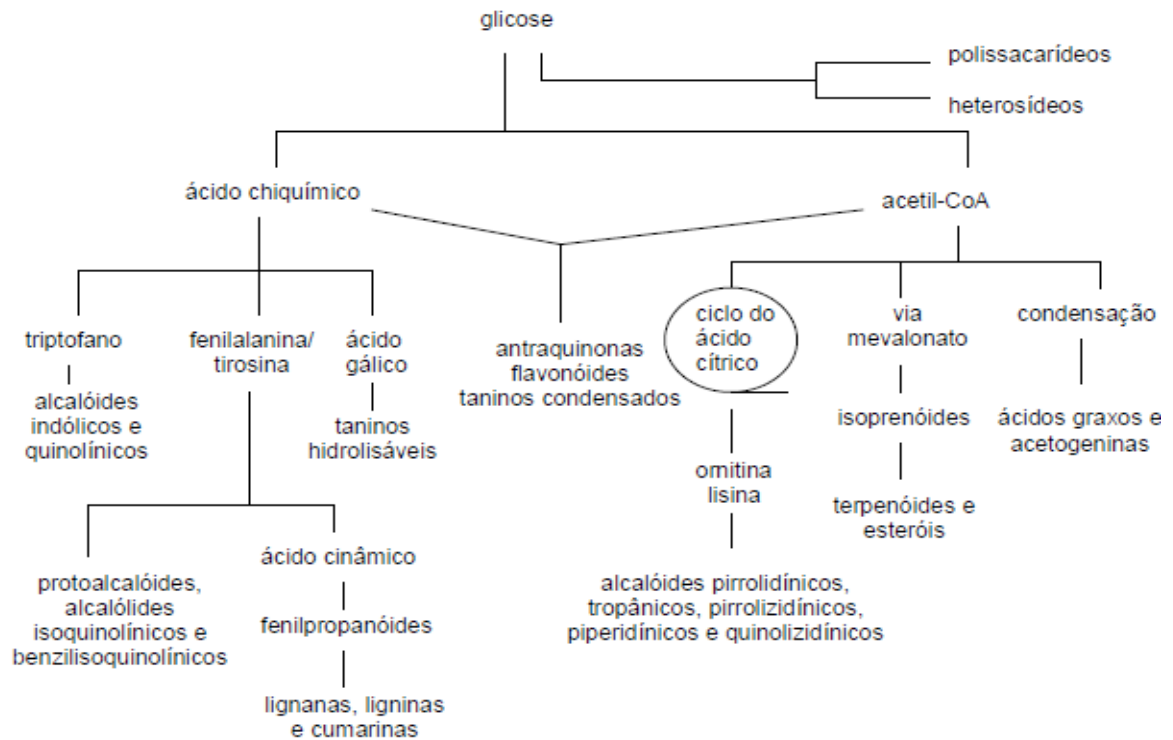


Figura 1 – Esquema das vias de metabolismo secundário.
Fonte: Santos (1999).

2 PRINCIPAIS GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS

2.1 MATERIAIS LIPOFÍLICOS



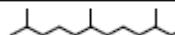




2.1.1 Terpenos e Esteróides

Os materiais lipofílicos secretados pelas plantas podem ser terpenos, ácidos graxos, agliconas flavonoídicas e ceras. Os óleos essenciais e as resinas, que contêm uma grande variedade de terpenos são diferenciados pelo peso molecular de seus componentes, sendo que o primeiro é formado por terpenos de baixo peso molecular e o segundo por terpenos de alto peso molecular (Fahn, 1988).

Bruneton (1991) ressalta que terpenos e esteróides, elaborados a partir dos mesmos precursores, constituem um amplo conjunto de metabolitos secundários dos vegetais. A existência dessas moléculas está relacionada a três sequências fundamentais: formação do

isopreno a partir da acetil-Coa via ácido mevalônico; acoplamento cabecacauda das unidades C₅ formando monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos e politerpenos; acoplamento cauda-cauda das unidades de C₁₅ e C₂₀, formando os triterpenos, esteróides e carotenos (Tabela 1).

Tabela 1 – Classes de Terpenóides.

Nº de unidades de isopreno	Nº de unidades de carbono	Nome ou classe
1	5 	Isopreno
2	10 	Monoterpenóides
3	15 	Sesquiterpenóides
4	20 	Diterpenóides
5	25 	Sesterterpenóides
6	30 	Triterpenóides
8	40 	Tetraterpenóides
n	n	Polisoprenóides

Fonte: Santos (1999).

Os óleos voláteis são, em geral, misturas complexas formadas principalmente por mono e sesquiterpenóides (Figura 2). No entanto, podem apresentar também fenilpropanóides, uma classe de compostos fenólicos que será mencionada mais adiante. São também chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. São bastante voláteis, geralmente apresentam aroma agradável, sabor acre e picante. Normalmente são incolores ou ligeiramente amarelados, com algumas exceções como o óleo essencial extraído de camomila, que apresenta coloração azulada devido seu alto teor de azulenos. Apresentam pouca estabilidade, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais e, a maioria, possui índice de refração. Os óleos essenciais são opticamente ativos, propriedade utilizada na sua identificação e controle da qualidade (Bruneton, 1991).

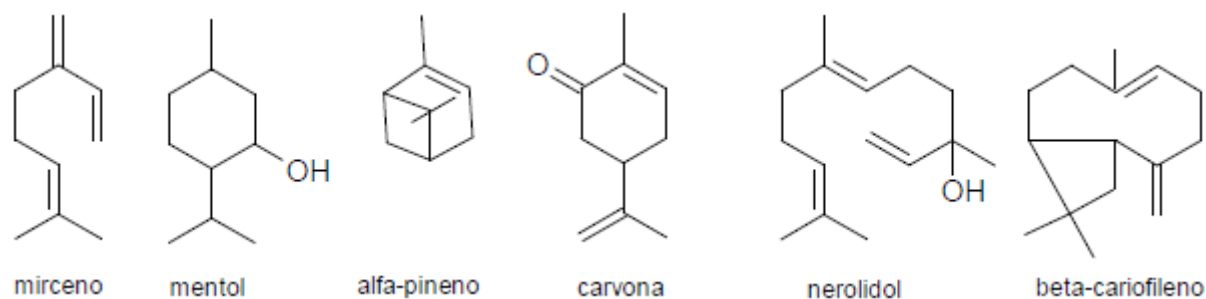


Figura 2 – Monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais.

Por um tempo, os óleos essenciais foram considerados com um desperdício fisiológico ou como produtos de desintoxicação. Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores atuando como repelentes por sua ação inseticida e dissuasiva alimentar, reduzindo a herbivoria, na atração de polinizadores, como no caso dos osmóforos, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003; Duradeva e Pichersky, 2008).

Os óleos essenciais apresentam diversas propriedades farmacológicas, tais como: ação carminativa, ação antiespasmódica, ação estimulante, ação cardiovascular, ação irritante tópica ou repulsiva, ação secrelítica, ações sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), ação anestésica local, ação antiinflamatória, ação anti-séptica (Bruneton, 1991).

Os terpenos de maior peso molecular, como os triterpenos, tetraterpenos e polisoprenóides estão presentes nas resinas. As resinas tem um papel importante na defesa contra patógenos, através do bloqueio de ferimentos e, assim como os óleos essenciais, também afastam os insetos, reduzindo a herbivoria (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003).

Os materiais lipofílicos são secretados por diversas estruturas tais como idioblastos, superfícies epidérmicas, tricomas, cavidades, ductos e emergências (Fahn, 1988; Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003). Muitas estruturas secretoras de material lipofílico podem produzir outras substâncias. Os tricomas secretores de *Inula viscosa* Ait., por exemplo, secretam polissacarídeos e proteínas além do material lipofílico (Fahn, 1988).

Muitas das espécies conhecidas como medicinais, são utilizadas mesmo sem conhecimento sobre as estruturas secretoras presentes na espécie. Considerando essa escassez de informações sobre estruturas secretoras em plantas medicinais, Silva e Machado (1999) estudaram a estrutura e o desenvolvimento dos tricomas secretores presentes em folhas de

Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae), encontrando dois tipos de tricomas secretores: glândulas peroladas e tricomas saculiformes (Figura 3). As glândulas peroladas ocorreram isoladas ou agrupadas em ambas as faces do limbo foliar, sendo mais abundantes na face abaxial das folhas em desenvolvimento, presentes no ápice vegetativo. Os tricomas saculiformes recobrem toda a extensão das folhas jovens, formando uma densa cobertura em ambas as faces do limbo.

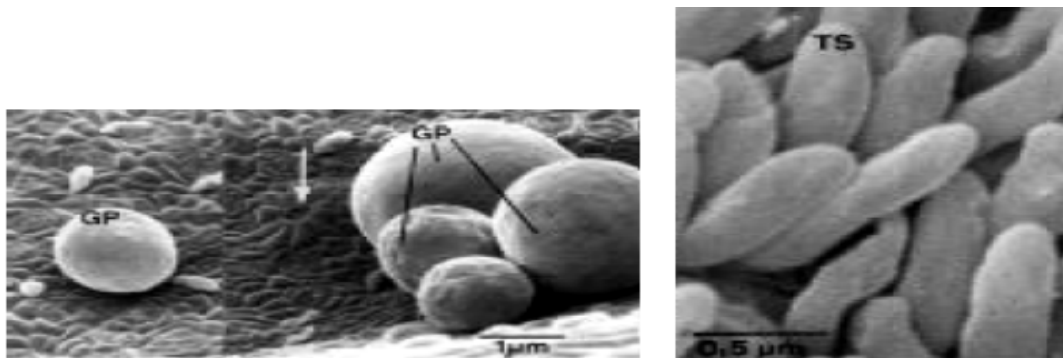


Figura 3 – Tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* var. *regnellii*: glândulas peroladas (GP) e tricomas saculiformes (TS).

Fonte: Silva; Machado (1999).

Donato e Morretes (2007), em um estudo de anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), encontraram várias cavidades secretoras que, segundo Metcalfe e Chalk (1985), são características da família. Essas estruturas apresentaram resultados positivos para lipídeos (Figura 4) e também foram encontrados lipídeos nas células da epiderme (Donato e Morretes, 2007).

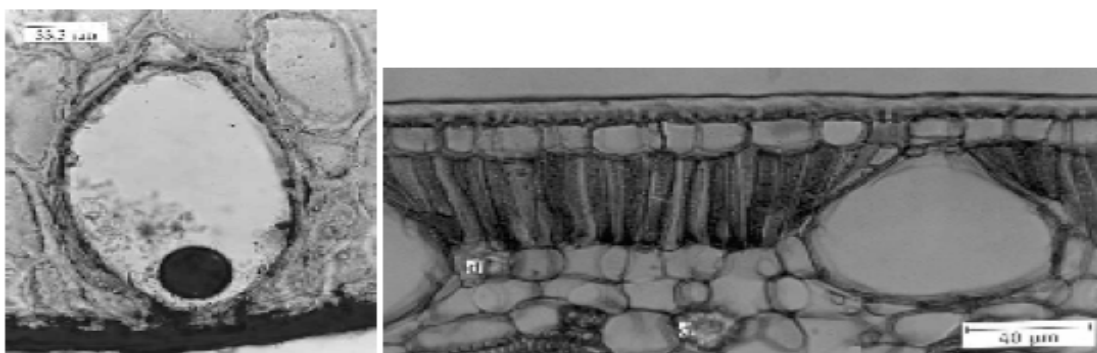


Figura 4 – Cavidade secretora no pecíolo de *Eugenia brasiliensis* Lam. mostrando resultado positivo para materiais lipofílicos (seta) e cavidade secretora no limbo foliar e drusas (d).

Fonte: Donato; Morretes (2007).

Sant'Anna-Santos et al. (2006), em um estudo de anatomia e histoquímica da espécie *Spodias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae), encontraram canais contendo materiais com resultado positivo para óleos essenciais com o Reagente de Nadi (Figura 5).

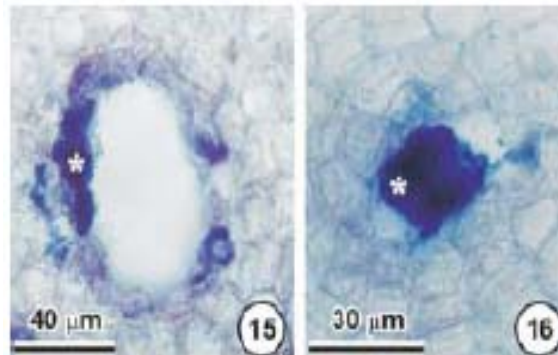


Figura 5 – Ductos secretores no caule de *Spodias dulcis* (Anacardiaceae). O asterisco indica que o resultado positivo foi obtido tanto no interior do ducto, quanto no epitélio do ducto.
Fonte: Sant'anna-Santos et al. (2006).

Na espécie *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), amplamente conhecida e utilizada como antidepressivo e calmante, foram encontrados canais e glândulas secretoras (Figura 6) de diversas substâncias, entre elas, materiais lipofílicos (Cicarelli et al., 2001).



Figura 6 – Glândula e canal em *Hypericum perforatum* mostrando resultado positivo para materiais lipofílicos.
Fonte: Ciccarelli et al. (2001).

Palhares (2003), em um estudo com a espécie *Eugenia dysenterica* DC, conhecida popularmente como cagaita e utilizada no combate a diarreia, encontrou em suas folhas uma grande quantidade de glândulas dispersas no parênquima (Figura 7). O autor observou também que drusas e idioblastos contendo cristais romboédricos de oxalato de cálcio ocorriam apenas ocasionalmente. Ainda no mesmo estudo, o autor observou uma

reação intensa com cloreto férrico, relacionada à grande quantidade de taninos, o que corrobora com o uso antidiarreico, assim como observou que o mesofilo e o floema da nervura primária são locais de deposição de taninos na espécie.

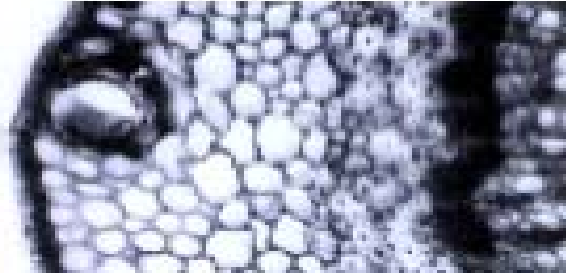


Figura 7 – Corte transversal da nervura principal de *Eugenia dysenterica* mostrando glândula com conteúdo lipídico.

Fonte: Palhares (2003).

Vieira et al. (2001) em um estudo anatômico e análise química de folhas de *Rustia formosa* (Cham. & Schltl. ex DC.) Klotzsch., uma espécie arbustiva da família Rubiaceae, observaram cavidades secretoras entre os parênquimas paliçádico e lacunoso na lâmina foliar, e na região cortical do pecíolo (Figura 8). As cavidades secretoras observadas eram formadas por um espaço intercelular revestido por células epiteliais, as quais são responsáveis pela secreção e depósito na cavidade. Os testes histoquímicos realizados com Sudan III indicaram a presença de lipídeos nas células epiteliais. No mesmo trabalho foi realizado um estudo químico do óleo presente nas folhas e secretado pelas cavidades, sendo o componente majoritário encontrado no mesmo, a curzerenona, substância conhecida por sua atividade antiinflamatória.

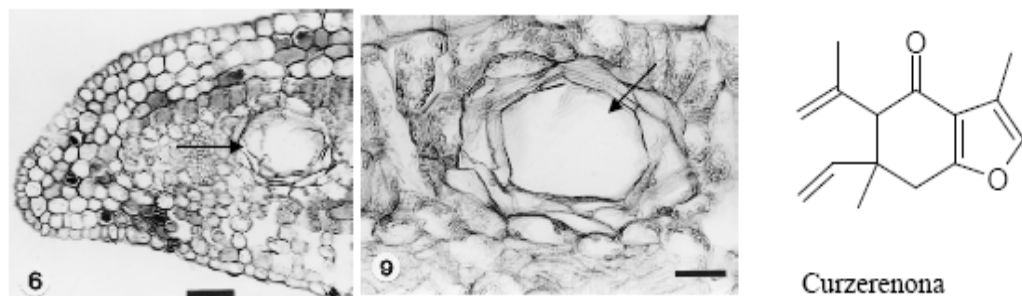


Figura 8 – Cavidades secretoras (seta) de *Rustia formosa* (Rubiaceae) e estrutura química da curzerenona.

Fonte: Vieira et al. (2001).

Os materiais lipofílicos também estão presentes em tricomas glandulares, como em *Salvia aurea* L. (Lamiaceae), que apresenta tricomas glandulares (Figura 9) com seis a oito células secretoras arranjadas em círculo, secretoras do óleo essencial produzido pela planta rico em canfora (Serrato-Valenti et al., 1997).

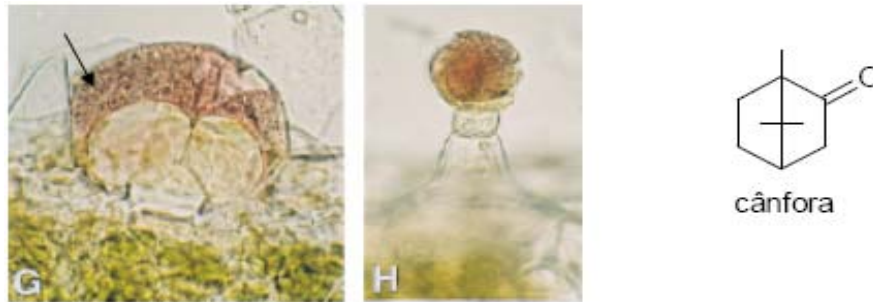


Figura 9 – Tricoma glandular de *Salvia aurea* mostrando resultado positivo para terpenos (seta) e estrutura química da canfora.

Fonte: Serrato-Valenti et al. (1997).

Sacchetti et al. (1999), encontraram tricomas secretores de materiais lipofílicos (Figura 10) em *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae), espécie nativa da América do Sul e utilizada por apresentar propriedades digestivas, diuréticas e bactericidas.

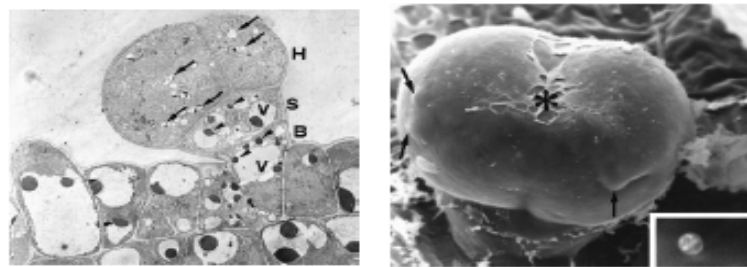


Figura 10 – Tricoma glandular da folha de *Calceolaria adscendens* (Scrophulariaceae) mostrando os vacúolos das células secretoras (H), da silva do pedúnculo (S) e da célula base (B) do tricoma contendo secreções (setas), espaços subcuticulares contendo secreções (setas) e cutícula parcialmente rompida (*).

Fonte: Sacchetti et al. (1999).

Martins (2002), em um estudo da anatomia das folhas de *Mentha spicata* L. e de *Mentha spicata* x *suaveolens* (Lamiaceae), encontrou tricomas glandulares capitados e

peltados (Figura 11), sendo que os primeiros estão presentes em maior número em ambas as espécies.

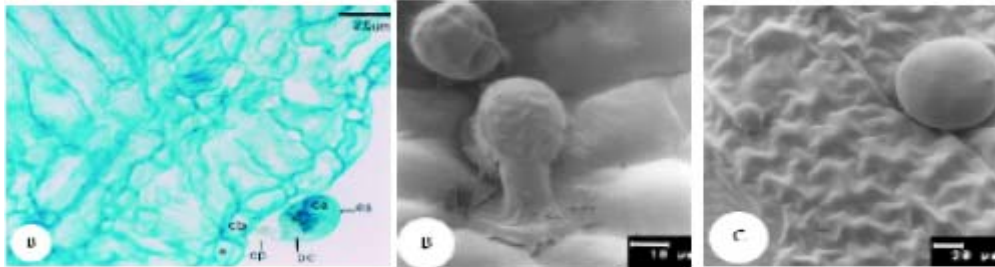


Figura 11 – Tricomas glandulares capitado e peltado em *Mentha spicata* (cb: célula Basal, cp: célula peduncular, ca: célula apical, es: espaço subcuticular, pc: parede celular, e: epiderme).
Fonte: Martins (2002).

2.1.2 Heterosídeos Cardioativos

Esse grupo é representado por esteróides caracterizados por uma alta especificidade e grande ação sobre o músculo cardíaco. Esses esteróides ocorrem como glicosídeos esteroidais e devido sua ação sobre o músculo cardíaco são chamados glicosídeos cardioativos ou cardíacos. No reino vegetal, os glicosídeos cardioativos são restritos as Angiospermas, mostrando que existem especificidades no metabolismo esteroideal das mesmas. Estão restritos a plantas das famílias Plantaginaceae (*Digitalis*), Apocynaceae (*Asclepias*, *Nerium* e *Thevetia*), Ruscaceae (*Urginea* e *Convallaria*), Ranunculaceae (*Helleborus* e *Adonis*) e ainda em Brassicaceae, Celastraceae, Fabaceae, Moraceae e Malvaceae (Santos, 1999).

As principais drogas utilizadas são extraídas de *Digitalis purpurea* L. (digitoxina) e *D. lanata* Ehrh. (digitoxina e digoxina) (Figura 12), responsáveis por 90% da produção total dos heterosídeos cardioativos (Santos, 1999). Na tabela 2, seguem as principais fontes e componentes de interesse clínico.

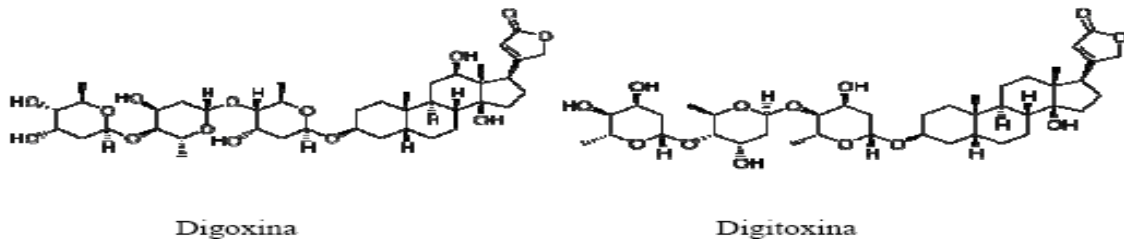


Figura 12 – Estruturas químicas da digoxina e digitoxina.

Tabela 2 – Principais fontes de heterosídeos cardioativos e componentes de interesse clínico. O tracejado na tabela significa que não há substância correspondente (Santos, 1999).

Fonte vegetal	Precursor (heterosídeo primário)	Resíduo liberado pela hidrólise enzimática ou alcalina	Heterosídeo	Resíduo liberado pela hidrólise ácida	Aglicona ou genina
<i>Digitalis purpurea</i> L. (folhas)	purpúrea-glicosídeo A purpúrea-glicosídeo B	glicose glicose	digitoxina gitoxina	digitoxose digitoxose	digitoxigenina gitoxigenina
<i>D. lanata</i> Ehrh. (folhas)	lanatosídeo A lanatosídeo B lanatosídeo C	glicose + ác. acético	digitoxina gitoxina digotoxina	digitoxose	digitoxigenina gitoxigenina digoxigenina
<i>Strophanthus kombe</i> Oliver. <i>S. hispidus</i> DC. (sementes)	estrofantosídeo K estrofantosídeo K β -estrofantidina K -----	glicose glicose glicose -----	estrofantina K cimarina cimarina cimarol	glicose + cinamose cinamose cinamose cinamose	estrofantidina K estrofantidina K estrofantidina K estrofantidol
<i>S. gratus</i> Baill. (sementes)	-----	-----	ouabaina (estrofantina G)	ramnose	ouabagenina (estrofantidina G)
<i>Urginea maritima</i> Baker (bulbo)	cilareno A	Glicose	procilaridina A	ramnose	cilaridina A

2.1.3 Saponinas

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, que possuem uma parte lipofílica e outra hidrofílica, o que explica a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante. As saponinas tem elevada massa molecular e estruturas complexas devido à presença de estruturas com um variado número de açúcares (em cadeias lineares ou ramificadas) e diversas agliconas, o que dificulta

seu isolamento e elucidação estrutural. As saponinas podem ser classificadas pelo seu caráter em ácidas, básicas ou neutras, ou conforme sua aglicona, em esteroidais e triterpênicas (Bruneton, 1991).

As saponinas apresentam uma distribuição restrita, sendo as saponinas esteroidais encontradas principalmente em Liliaceae, Dioscoreaceae, Agavaceae, Scrophulariaceae e Solanaceae. Já as saponinas triterpênicas estão presentes nas famílias Sapindaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae e Araliaceae (Santos, 1999).

As saponinas são componentes importantes para a ação de muitas drogas vegetais, entre elas, aquelas usadas como expectorantes como a *Polygala senega* L. (poligala) e *Primula veris* L. (primula), e diuréticas como a *Smilax* sp. (salsaparilha) e *Herniaria glabra* L. Outros usos farmacêuticos são como adjuvantes para aumentar a absorção de outros medicamentos através do aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção (Santos, 1999).

Murgu et al. (2008), em um estudo químico dos frutos de *Sapindus saponaria* L., espécie conhecida como sabão-de-soldado, isolaram a saponina triterpênica 3-O-(β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina (Figura 13). Albiero et al. (2001) em um estudo anatômico de *Sapindus saponaria* encontrou cavidades secretoras nos frutos (Figura 14). Segundo esse autor, a espécie ocorre nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do Brasil, e seus frutos são utilizados como sabão, no banho e no combate a úlceras feridas na pele e inflamações. As cavidades secretoras encontradas por Albiero et al. (2001), podem estar relacionadas com as saponinas encontradas por Murgu et al. (2008), considerando que a parte utilizada da planta são os frutos.

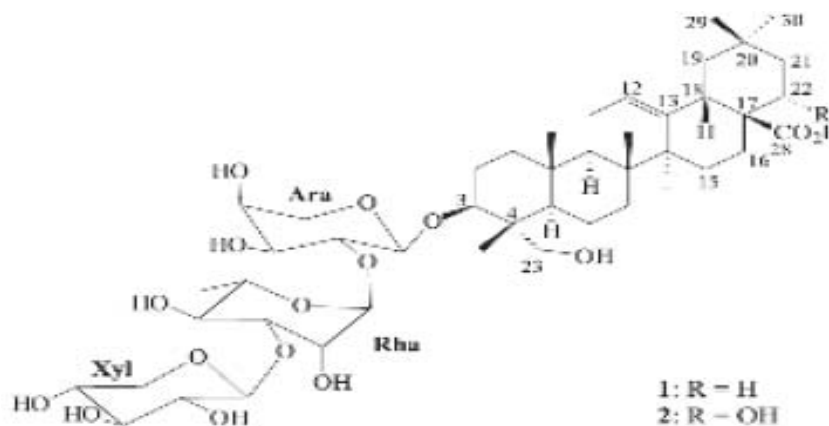


Figura 13 – Estrutura da saponina 3-O-(β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina obtida dos frutos de *Sapindus saponaria*.

Fonte: Murgu et al.(2008).

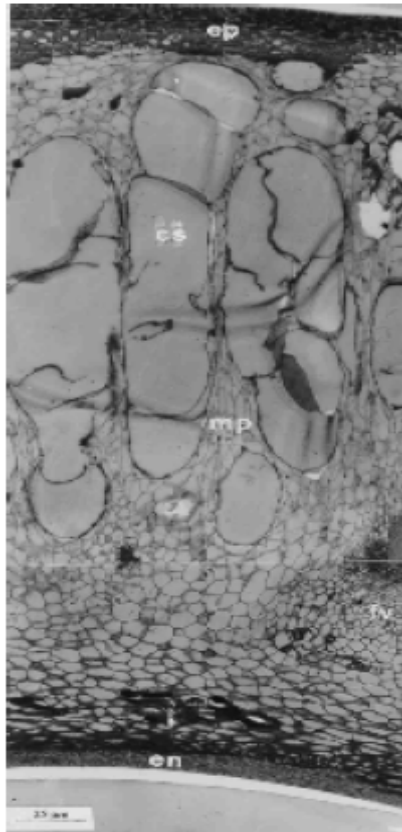


Figura 14 – Cavidade secretora (cs) presente nos frutos de *Sapindus saponaria*, (cv) cavidade secretora; (en) endocarpo; (ep) exocarpo; (fv) feixe vascular; (mp) mesocarpo.
Fonte: Albiero et al. (2001).

Negri (2005) em uma revisão sobre produtos naturais com ação hipoglicemiante, cita que calendasaponinas, isoladas das flores de *Calendula officinalis* L. (Figura 15), apresentaram efeito inibitório sobre o aumento do nível de glicose no sangue.

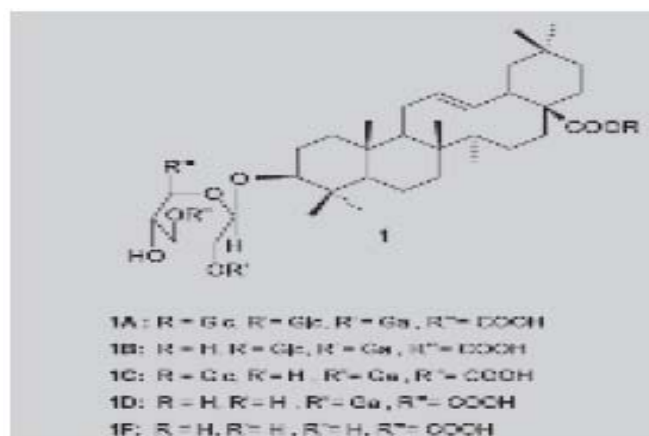


Figura 15 – Saponinas isoladas de *Calendula officinalis*.
Fonte: Negri (2005).

2.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros de estrutura aldeídica ou cetônica que apresentam alto peso molecular. Cada molécula de açúcar é ligada a vizinha por intermédio de uma ligação osídica formada pela ligação da hidroxila hemiacetálica em C-1 com qualquer das hidroxilas da outra molécula de açúcar, com eliminação de uma molécula de água. Esses produtos são amplamente distribuídos no ambiente e são essenciais a todos os organismos. Ocorrem em bactérias e fungos (dextranos e goma xantana), em algas (ácidos algínicos, carragenanas, Agar-agar) e em vegetais superiores (amido, celulose, gomas, mucilagens e pectinas) (Dewick, 2002).

Os polissacarídeos dos vegetais superiores são divididos em homogêneos e heterogêneos. Os primeiros são o amido (polissacarídeo de reserva), a celulose e as hemiceluloses (participam da constituição do corpo da planta). Entre os polissacarídeos heterogêneos, encontramos as gomas, mucilagens e pectinas (Bruneton, 1991).

Gomas e mucilagens diferem entre si principalmente pela viscosidade, que é maior nas gomas que nas mucilagens (Fahn, 1988).

Quimicamente as gomas são formadas por ácidos urônicos, além de açúcares comuns. As gomas são substâncias secretadas quando ocorrem lesões causadas por traumatismo ou pela ação de microrganismos na planta. A secreção de gomas também pode estar relacionada a um processo de adaptação a certas condições climáticas como a seca (Bruneton, 1991). As principais gomas utilizadas são: *goma arábica* (produzida por *Acacia senegal* (L.) Willd. (Fabaceae) e outras espécies do gênero), *goma caraia* (extraída de *Sterculia tomentosa* Guill. et Perr. e *S. urens* Roxb. (Sterculiaceae) ou de *Cochlospermum gossypium* DC. (Bixaceae)), *goma gati* (obtida de *Anogeissus latifolia* Wall. (Combretaceae) e *goma adraganta* (extraída de *Astragalus gummifer* Labill. (Fabaceae) (Robbers et al., 1997).

As mucilagens podem ser neutras, sendo formadas por açúcares comuns, ou ácidas, que, assim como as gomas, apresentam ácidos urônicos em sua composição. Dentre as mucilagens, o *guar* (obtido de *Cyamopsis tetragonolobus* Taub. (Fabaceae) e “goma” *carouba* (retirada das sementes de *Ceratonia siliqua* L. (Fabaceae)), vem sendo as mais estudadas e utilizadas. As mucilagens, ao contrário das gomas, são constituintes comuns à planta, não estando relacionados a alterações patológicas. São frequentes em sementes e parecem estar relacionadas com a retenção de água para auxiliar na germinação, porém podem ocorrer também em outros órgãos vegetais (Bruneton, 1991).

As mucilagens estão presentes nas células do parênquima aquífero, auxiliando na retenção de água pelo mesmo, devido sua característica hidrófila. Esse tipo de parênquima é encontrado em folhas e caules de plantas suculentas, como as Cactaceae, e em folhas e raízes de plantas epífitas e xerófitas. Espécies que são sujeitas ao estresse salino, como *Rhizophora mangle*, também podem ter grandes quantidades deste tecido nos seus órgãos (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003).

As pectinas são macromoléculas glicídicas, presentes na lamela media das paredes celulares, sendo abundantes em frutos. Quimicamente, são formadas por polímeros de ácido galacturônico, podendo apresentar intercalações de raminose, ramificações de galactose, arabinose ou xilose. Auxiliam na retenção de água na planta. As pectinas são utilizadas como reguladores intestinais, e na indústria alimentícia como estabilizante (Fahn, 1988).

As estruturas relacionadas à secreção de mucilagens e gomas são idioblastos, cavidades, ductos, superfícies epidérmicas, parênquima e tricomas. Tais estruturas estão presentes em diversos órgãos de varias famílias como Apocynaceae, Cactaceae, Clusiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rubiaceae e Rutaceae (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003).

Serrato-Valenti et al. (1997), em um estudo de anatomia e histoquímica de *Salvia aurea* (Lamiaceae), encontraram nos tricomas glandulares de suas folhas, gotas com materiais polissacarídeos (Figura 16).

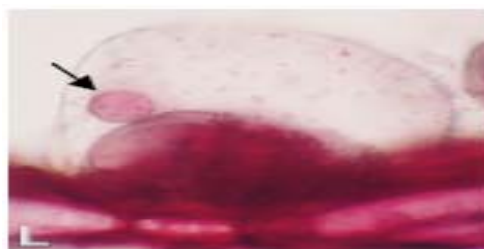


Figura 16 – Célula secretora de tricoma glandular de *Salvia aurea*, mostrando uma gota de material polissacarídeo no espaço subcuticular.

Fonte: Serrato-Valenti et al. (1997).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos incluem substâncias com uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas (Tabela 3), que apresentam o mínimo de um anel aromático, no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (Dewick, 2002).

Tabela 3 – Classes de compostos fenólicos (Santos, 1999).

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples e benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6-C3) ₂	Lignananas
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

As estruturas envolvidas na secreção de compostos fenólicos são idioblastos e células epiteliais, que delimitam cavidades ou ductos, que secretam material heterogêneo de natureza mista, como os presentes nas cavidades de *Eucalyptus* sp. L'Her. e nos ductos do caule de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003).

Compostos fenólicos foram identificados em ductos presentes no caule e em tricomas (Figura 17) presentes nas folhas de *Siegesbeckia orientalis* L. (Asteraceae) (Aguilera et al., 2004).

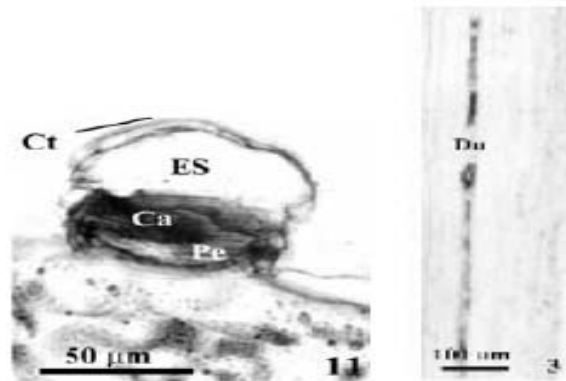


Figura 17 – Tricoma glandular e corte longitudinal do ducto de *Siegesbeckia orientalis* mostrando resultados positivos para compostos fenólicos na célula da cabeça do tricoma e no ducto. Ct: cutícula, ES: espaço subcuticular, Ca: célula da cabeça do tricoma, PE: pedúnculo, Du: ducto.

Fonte: Aguilera et al. (2004).

Idioblastos contendo compostos fenólicos foram encontrados por Toledo et al. (2004), num estudo anatômico das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae) (Figura 18).

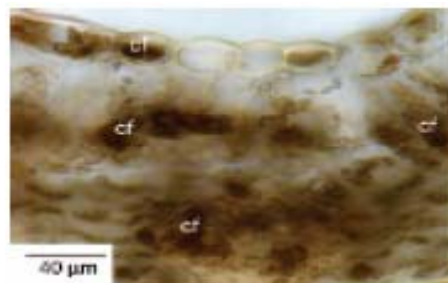


Figura 18 – Células da nervura principal de *Cunila microcephala* contendo compostos fenólicos(cf)
Fonte: Toledo et al. (2004).

Sant'Anna-Santos et al. (2006) encontraram idioblastos (Figura 19) contendo compostos fenólicos no caule de *Spondias dulcis*, espécie conhecida por secretar uma goma que possui ação medicinal.

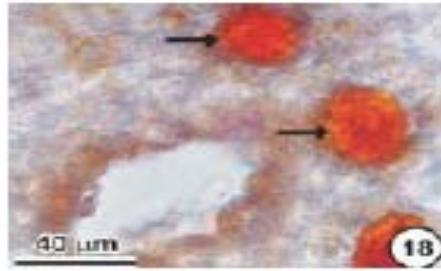


Figura 19 – Idioblastos contendo compostos fenólicos no caule de *Spondias dulcis*.
Fonte: Sant’Anna-Santos et al. (2006).

2.3.1 Fenilpropanóides

São compostos fenólicos bastante encontrados em óleos essenciais. Sua biossíntese inicia-se com a fenilalanina e/ou com a tirosina, que pela ação da fenilalanina amonialiase (PAL) e da tirosina amonialiase (TAL), perde uma molécula de amônia formando os ácidos cinâmicos (Bruneton, 1991). Segundo o mesmo autor, estas substâncias são formadas a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumarico (Figura 20). Estes, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, por meio de oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos enzimáticos, obtendo-se uma grande variedade de estruturas (Figura 21).

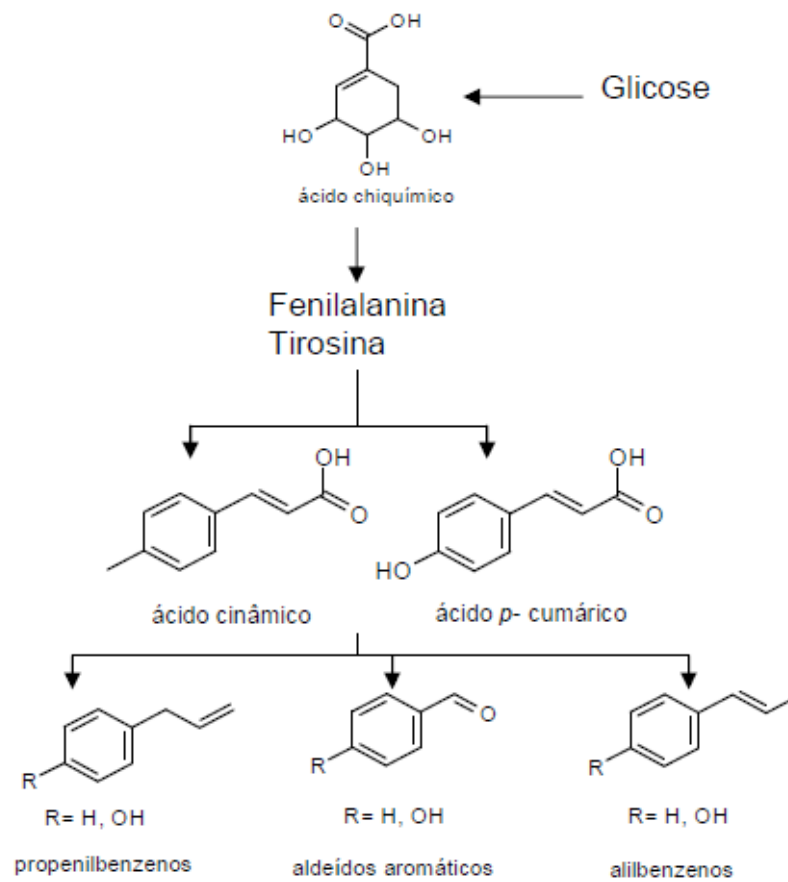


Figura 20 – Esquema da síntese de fenilpropanóides.
 Fonte: Santos. (1999).

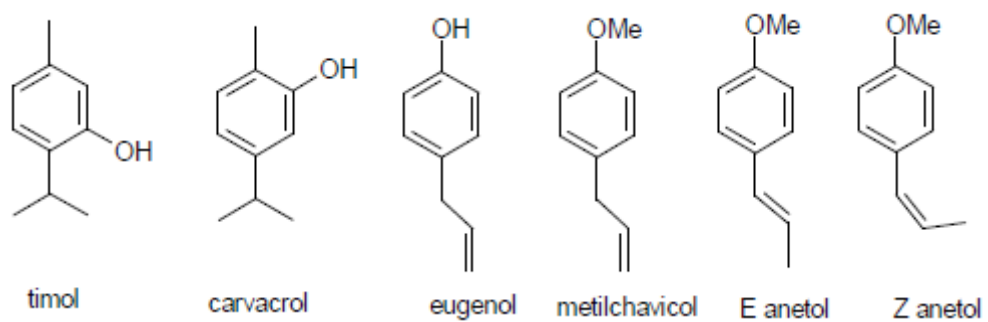


Figura 21 – Exemplos de fenilpropanóides.

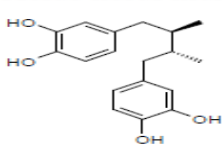
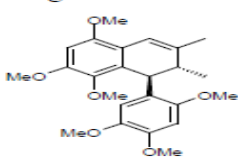
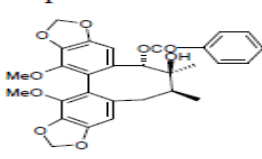
2.3.2 Ligninas

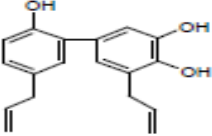
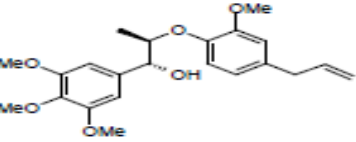
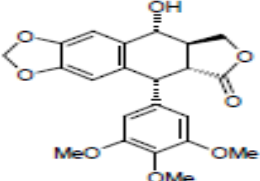
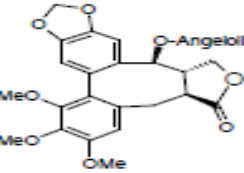
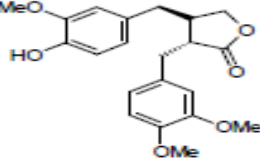
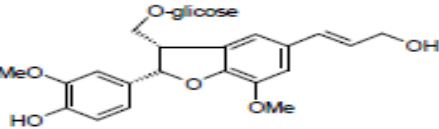
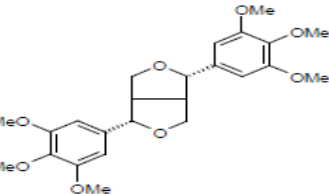
As ligninas são macromoléculas (polímeros da unidade C₆-C₃) que podem estar presentes nas paredes das células vegetais, conferindo rigidez a estas. Trata-se de um grupo complexo, havendo mais de 500 ligninas relatadas na literatura. As principais são: lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides.

As ligninas são amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo as plantas de grande porte ricas em lignanas, enquanto que as plantas de pequeno porte apresentam maior quantidade de neolignanas (Gottlieb e Yoshida, 1984).

Baseado em fotoquímica comparada, Gottlieb (1982 *apud* Santos 1999) mostrou que as ligninas são indicadores do processo evolutivo em angiospermas e desempenham um papel na adaptação ecológica. Existem indícios de que essas substâncias estejam envolvidas em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas. Ainda segundo o autor, é conhecido que algumas ligninas acumulam-se em madeira em resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de microrganismos e que apresentam propriedades defensivas contra insetos, como o efeito antialimentar induzido pela piperenona, isolada de *Piper futokadzura* Sieb. (Piperaceae). A tabela 4 mostra exemplos de ligninas que veem sendo estudadas e as atividades encontradas nas mesmas.

Tabela 4 – Ligninas estudadas, a planta de origem e sua atividade.

Espécie	Substância	Atividade detectada
<i>Larrea cuneifolia</i> Cav. (Zygophyllaceae)	Ácido nordi-hidroguaiarético 	Antitumoral Antifúngica Antioxidante
<i>Magnolia salicifolia</i> Maxim. (Magnoliaceae)	Magnoshinina 	Antiinflamatória
<i>Schizandra chinensis</i> C. (Schizandraceae)	Esquisanterina D 	Anti-hepatóxica
<i>Magnolia officinale</i>	Honoquinol	Relaxante muscular

Rehder & Wilson (Magnoliaceae)		
<i>Virola surinamensis</i> Warb. (Myristicaceae)	Surinamesina 	Cercaricida
<i>Podophyllum hexandrum</i> Royle (Berberidaceae)	Podofilotoxina 	Antineoplásica
<i>Steganotaenia araliaceae</i> Hochst. (Apiaceae)	Esteganacina 	Antileucêmica
<i>Ipomoea cairica</i> Sweet (Convolvulaceae)	Arctigenina 	Anti-HIV
<i>Plagiorhegma dubium</i> Maxim. (Berberidaceae)	Glicosídeo do álcool di- hidroconiferil 	Antiinflamatória
<i>Ocotea duckei</i> Sleum. (Lauraceae)	Iangambina 	Anticonvulcionante Antiespasmódica Antialérgica

Fonte: Santos (1999).

2.3.3 Flavonóides

Os flavonóides estão entre os grupos de compostos fenólicos de maior importância entre produtos de origem vegetal, sendo a maioria encontrada em angiospermas (Bruneton, 1991). Segundo Cseke et al. (2006), os flavonóides podem ter estrutura variada, no entanto, a maioria apresenta 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental, formado por duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas de A, B e C (Figura 22).

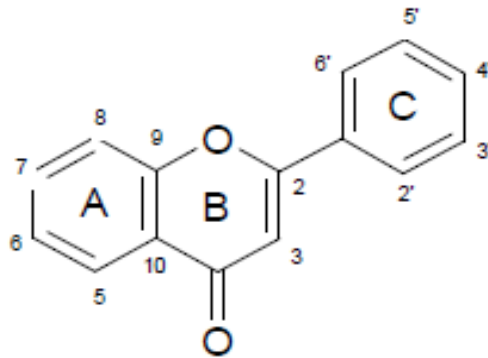


Figura 22 – Esqueleto de flavonoide.

Os flavonóides naturais normalmente encontram-se oxigenados ou conjugados com açúcares, chamados heterosídeos (Santos, 1999). Na tabela 5, estão representadas as principais classes de flavonóides e suas propriedades biológicas mais importantes.

Tabela 5 – Classes de flavonóides e principais propriedades biológicas.

Classes	Número de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Copigmentação de flores; protetores contra raios UV nas folhas
<i>C</i> -heterosídeos	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonas	110	Estão presentes frequentemente na madeira
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes (propriedade de se combinar com as proteínas das peles dos animais tornando-as imputrescíveis)
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

Fonte: Santos (1999).

Nas plantas, os flavonóides apresentam varias funções, como: proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibição de enzimas (Santos, 1999).

Pizzolatti et al. (2003), em um estudo químico de *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae), uma espécie arbórea utilizada como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, contra a elefantíase e na redução da glicosúria, identificou o kanferol e cinco flavonóides glicosilados a parti das flores e folhas da espécie (Figura 23).

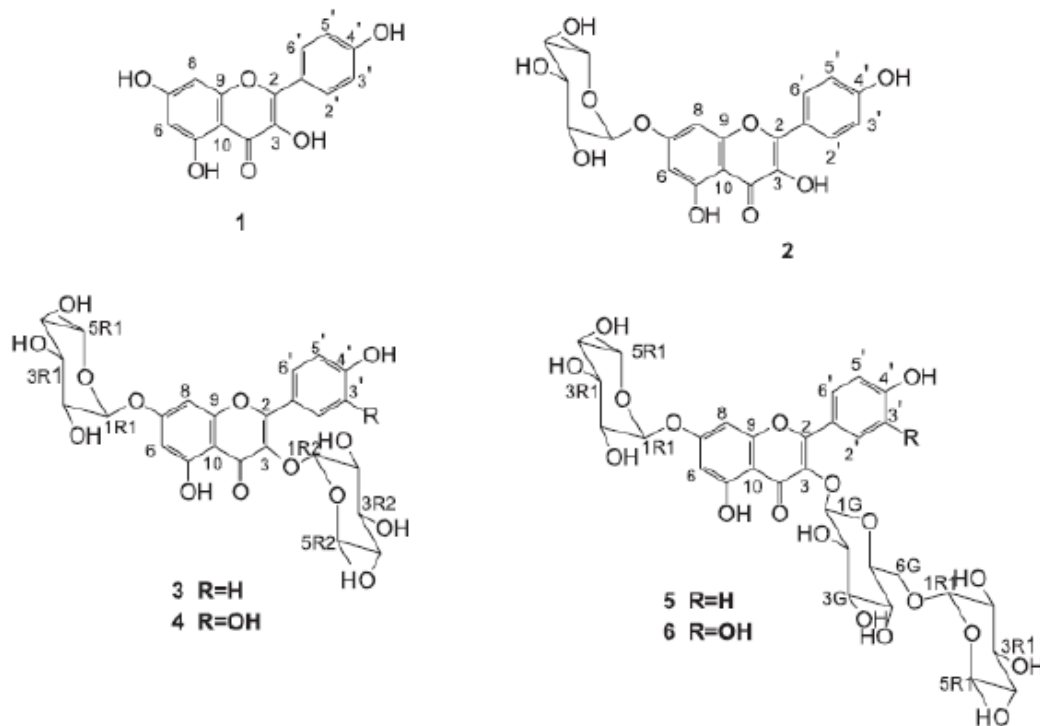


Figura 23 – Estruturas dos flavonóides identificados: kanferol (1) e flavonóides glicosilados (2-6)
Fonte: Pizzolatti et al. (2003).

2.3.4 Taninos

Os taninos são substâncias fenólicas, com massa variando entre 500 e 3000 Dalton, são solúveis em água e apresentam a capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas (Santos, 1999).

Os taninos podem ser classificados em dois grupos: taninos condensados e taninos hidrolisáveis, que diferem entre si pela sua estrutura e por sua origem biogenética. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados como ésteres de β -D- glucose e ácidos fenólicos: ácido gálico (taninos gálicos) e ácido hexahidroxidifênico e seus derivados (taninos elágicos). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados por duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, sendo resistentes a hidrólise (Bruneton, 1991). A casuarinina (Figura 24) e um exemplo de tanino hidrolisável extraído de raízes de *Syphoneugena densiflora* Berg. (Myrtaceae) por Gallo et al. (2006), enquanto que a outra estrutura na figura e um exemplo de tanino condensado, mostrando a repetição de uma unidade básica, que foi isolado de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae), por Silva et al. (2004). Essa substancia

apresentou atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, mostrando-se importante objeto de estudo para o homem.

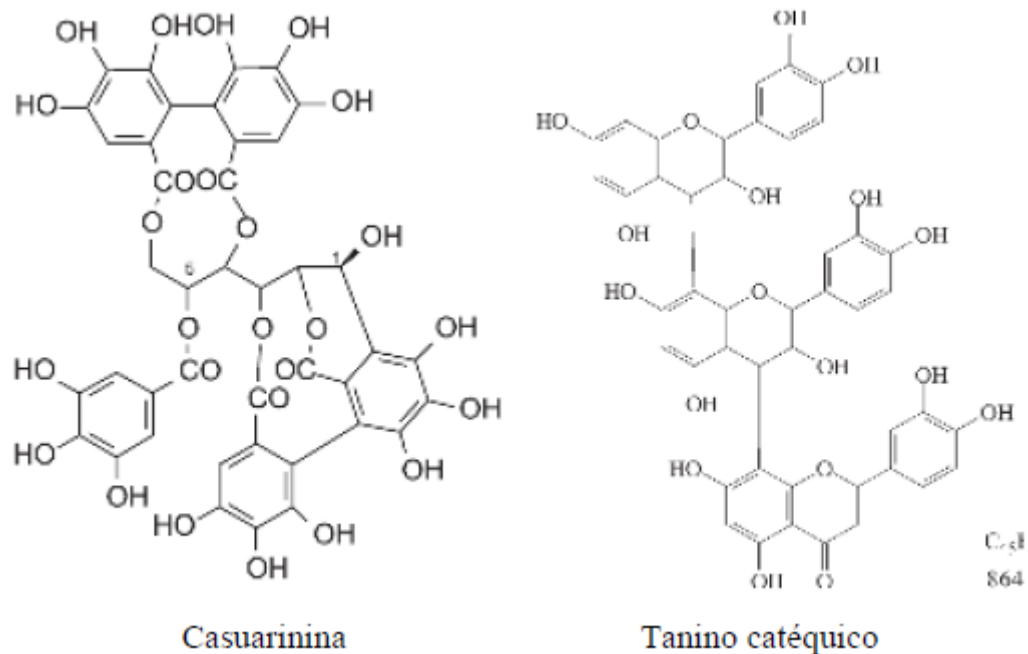


Figura 24 – Exemplos de taninos hidrolisável e condensado. Casuarinina isolada de *Syphoneugena densiflora*.

Fonte: Gallo et al. (2006) e tanino catéquico obtido de *Magonia pubescens* Silva et al. (2004).

Os taninos, assim como os demais compostos fenólicos agem como dissuasivo alimentar contribuindo para a redução da herbívora, e em casos de estresse hídrico, os compostos fenólicos acumulados nos vacúolos garantem a manutenção da estrutura celular e a integridade dos tecidos (Apezzato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos sejam consequências de três características gerais que os compostos desse grupo apresentam em maior ou menor grau: 1) complicação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Suspeita-se que os modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estejam ligados a essas propriedades (Santos, 1999). Espécies vegetais ricas em taninos são utilizadas em casos de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais

e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (Monteiro et al., 2005). Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros mostraram diversas atividades biológicas tais como ação bactericida e fungicida, antitumoral, moluscicida e antitumoral (Monteiro et al., 2005).

Os idioblastos taniníferos estão presentes em vários órgãos de espécies de Crassulaceae, como nas folhas de *Crassula* sp. L., Cyperaceae, como no caule de *Cyperus* sp. L., e Ericaceae, Fabaceae e Myrtaceae, como nas folhas de *Eucalyptus* sp. L'Her (Apezato-da-Gloria e Carmello-Guerreiro, 2003). Tubos taniníferos tem sido encontrados na madeira de alguns gêneros de Annonaceae, Canellaceae, Lamiaceae, Magnoliaceae e Myristicaceae (Metcalf e Chalk, 1985).

2.3.5 Quinonas

Segundo Bruneton (1991) as quinonas são substâncias oxigenadas, que correspondem a oxigenação de compostos aromáticos, caracterizados por um grupamento 1,4-dicetociclohexa-2,5-dieno ou 1,2-dicetociclohexa-3,5-dieno. A principal característica desse grupo é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Devido ao tipo de ciclo no qual o sistema de ligações duplas e cetonas está inserido, as quinonas são classificadas em três grupos principais: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas (Figura 25).

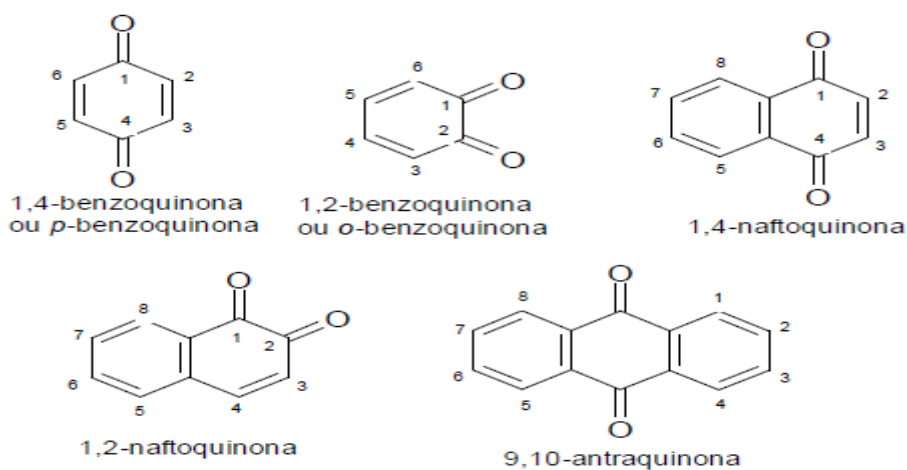


Figura 25 – Classes de quinonas.

Nas plantas, as quinonas tem um papel de defesa contra insetos, fungos patogênicos, além de apresentarem função alelopática (Bruneton, 1991). A atividade laxante e a principal utilização terapêutica da maioria dos vegetais que contem quinonas e, neste caso, as antraquinonas são as substâncias ativas. Naftoquinonas apresentam atividades variadas, como atividade antileishmania, antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Benzoquinonas, como a primina e perezona, apresentaram atividade contra tripanossomatídeos. Industrialmente as quinonas são utilizadas como corantes alimentares, por exemplo, a chiconina (extraída de *Alkanna tinctoria* Tausch., Boraginaceae) (Santos, 1999).

Moreira et al. (2006), em um estudo químico do extrato hexânico do caule de *Tectona grandis* L.F. (Verbenaceae), espécie que possui madeira bastante utilizada na carpintaria e na indústria naval, isolaram lapachol e desidro- α -lapachona (naftoquinonas) e tectoquinona e obtusifolina (antraquinonas) (Figura 26).

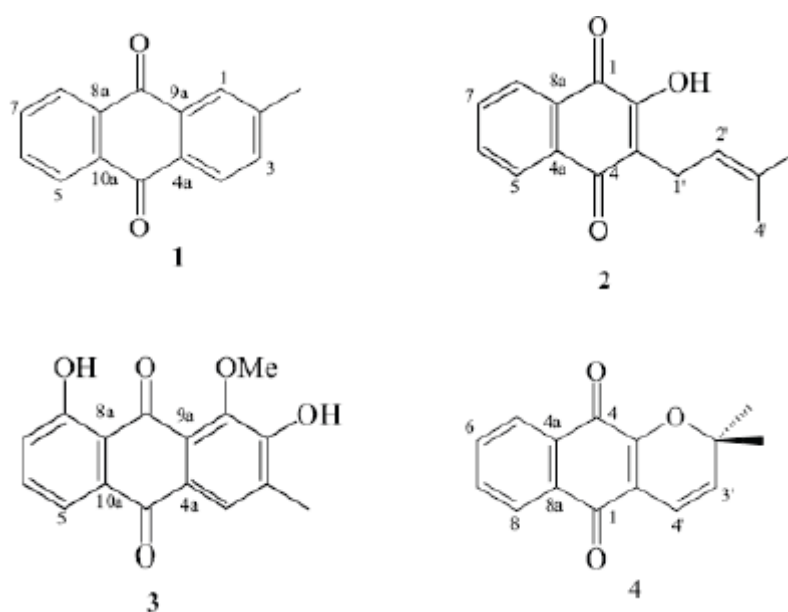


Figura 26 – Estrutura química das quinonas isoladas de *Tectona grandis*. Tectoquinona (1), lapachol (2), obtusifolina (3) e desidro- α -lapachona (4)

Fonte: Moreira et al. (2006).

2.4 ALCALÓIDES

Os alcalóides formam um grande grupo de metabolitos secundários que podem ser de origem vegetal, microbiana e animal. Uma definição exata para a classe é difícil

devido à ausência de separação entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas que ocorrem no ambiente. Anteriormente, o termo alcaloide implicava em bases com atividade farmacológica originadas de plantas. Entretanto, essa definição tem sido reestruturada e, atualmente, o termo engloba a maioria de produtos naturais contendo nitrogênio, com a exceção de aminoácidos simples, proteínas e substâncias de origem policetídica contendo nitrogênio, assim como aminoglicosídeos antibióticos (Cseke et al., 2006). Os alcalóides que apresentam um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e são classificados conforme o sistema anelar presente na molécula (Figura 27). As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são designadas como protoalcalóides. Substâncias nitrogenadas com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (Bruneton, 1991).

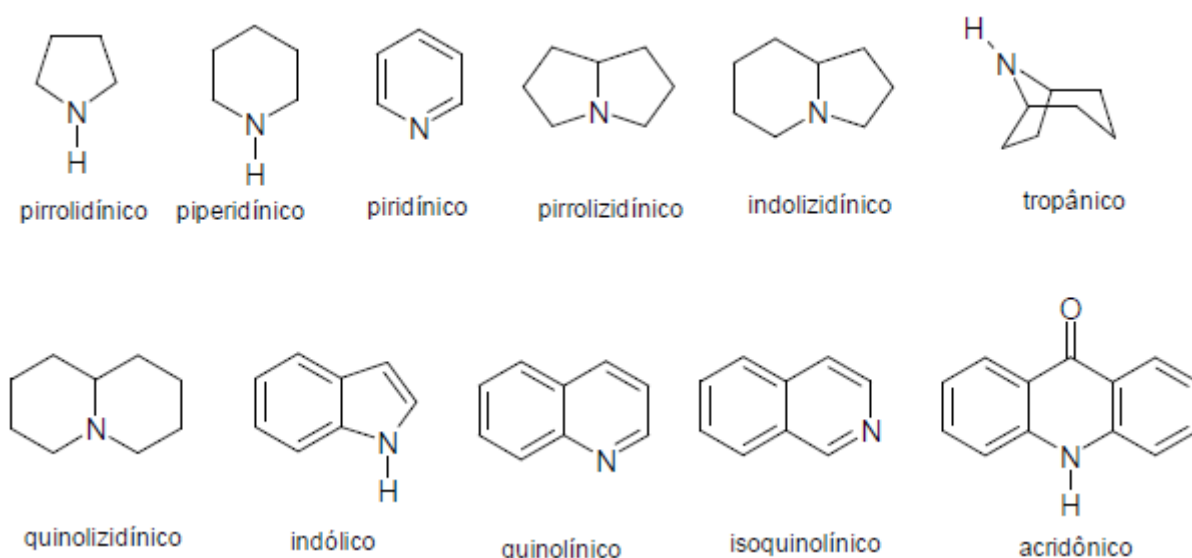


Figura 27 – Classes de alcalóides.

Fonte: Cseke et al. (2006).

Os alcalóides podem ser encontrados em todos os órgãos do vegetal, contudo haverá um acúmulo em um ou mais órgãos. Esse acúmulo pode ocorrer nos tecidos com crescimento ativo, nas células epidérmicas e hipodérmicas, nas bainhas vasculares e nos laticíferos (Santos, 1999). Em relação a sua localização intercelular, os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, acumulando-se nos vacúolos. O local de estoque dos alcalóides frequentemente é diferente daquele onde é sintetizado. Um exemplo bastante

conhecido e o da nicotina, que é produzido nas raízes das plantas de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), mas é translocado para as folhas, onde é armazenado (Santos, 1999).

Os alcalóides apresentam uma função de defesa na planta contra a invasão de microrganismos e vírus e também contra animais, provavelmente devido sua toxicidade ou ao sabor amargo que a maioria deles possui. Outras funções tem sido sugeridas a essa classe de compostos, tais como, produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pela planta no metabolismo primário, reserva de nitrogênio, inibidores da germinação, devido seu poder quelante e/ou citotóxico, auxílio na manutenção do equilíbrio iônico devido seu caráter alcalino e proteção contra irradiação ultravioleta, devido ao fato de, em sua maior parte, serem compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (Santos, 1999).

Essa classe apresenta diversos compostos com atividades biológicas, tais como emetina (amebicida e emético (que causa vômito), atropina, hiosciamina e escopolâmina (anticolinérgicos), reserpina, protoveratina A (anti-hipertensivos), quinina (antimalárico), camptotecina, vimblastina e vincristina (antitumorais), codeína e noscapina (antitussígenos), morfina (hipnoanalgésico), quinidina (depressor cardíaco), cafeína (estimulante do SNC), teobromina e teofilina (diuréticos), colchicina (tratamento da gota), tubocurarina (miorelaxante), efedrina (simpatomimético (imita os efeitos da estimulação do sistema nervoso simpático), castanospermina (antiviral), entre outros (Viegas et al., 2006).

Albiero et al. (2001) em um estudo anatômico de *Sapindus saponaria*, encontrou tricomas glandulares (Figura 28) nas folhas e teste histoquímico positivo para lugol, sugerindo a presença de alcalóides.

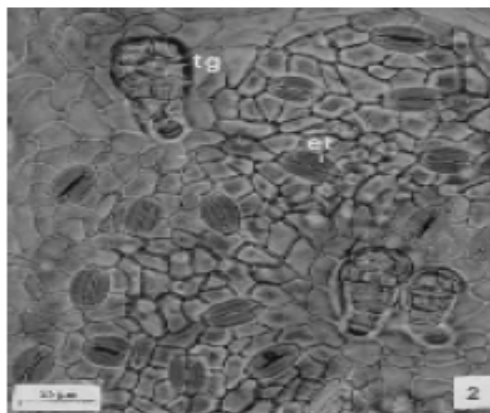


Figura 28 – Tricoma glandular (tg) na epiderme abaxial e estômato (et) da folha de *Sapindus saponaria*.

Fonte: Albiero et al. (2001).

Reações positivas para alcalóides (Figura 29) foram encontradas no lúmen de ductos e em células da endoderme do caule de *Siegesbeckia orientalis* L. (Asteraceae), conhecida como botão-de-ouro no Brasil, e bastante utilizada na medicina chinesa em tratamentos antialérgicos (Aguilera et al., 2004).

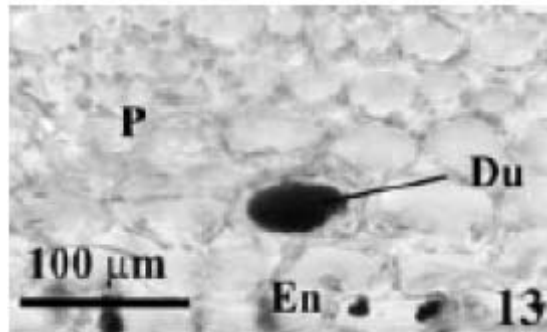


Figura 29 – Reação positiva para alcalóides no ducto (Du) presente no parênquima (P) e nas células da endoderme (En) do caule de *Siegesbeckia orientalis*.

Fonte: Aguilera et al. (2004).

Ciccarelli et al. (2001), em um estudo da anatomia de *Hypericum perforatum* encontrou glândulas translúcidas nas folhas e canais secretores nas sépalas e pétalas, ambas estruturas com resultados positivos para alcalóides (Figura 30).

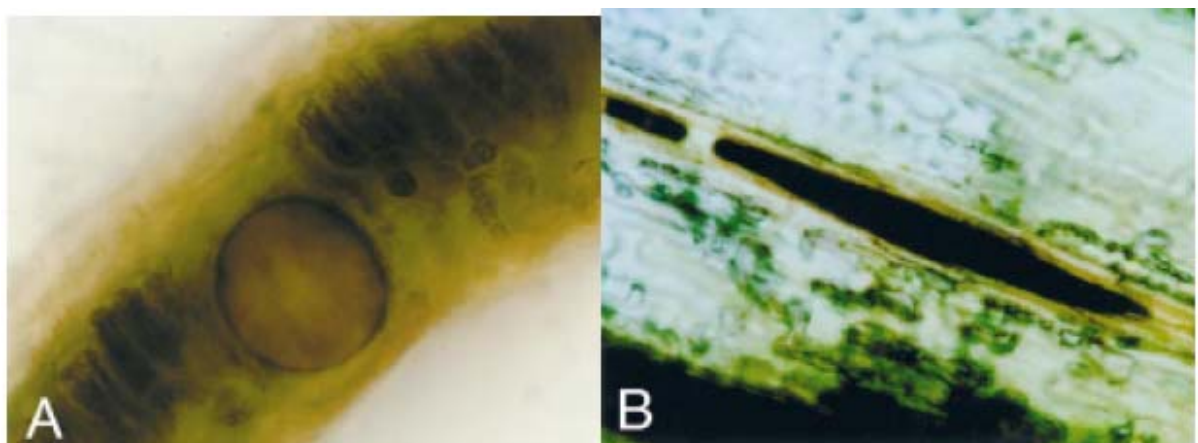


Figura 30 – Glândula translúcida (A) e canal secretor (B) de *Hypericum perforatum*. Reação positiva para alcalóides

Fonte Ciccarelli et al. (2001).

Diante desse contexto, o estudo tanto anatômico, quanto químico de espécies medicinais se mostra necessário, pois assim pode-se adquirir o conhecimento necessário para seu uso seguro. Segundo Donato e Morretes (2005), o uso de plantas identificadas erroneamente e uma atitude arriscada, podendo levar a inobservância dos efeitos farmacológicos previstos ou a reações indesejáveis, devido à presença de substâncias tóxicas nas plantas.

Considerando esse cenário, o objetivo do presente trabalho é fazer um estudo da anatomia das folhas e caules de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (capítulo 2) e um estudo químico das folhas da mesma (capítulo 3).

3 O GÊNERO PIMENTA

A família Myrtaceae apresenta uma distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália. A família inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies. Na flora brasileira, é uma das famílias mais representativas com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (Souza e Lorenzi, 2005).

Pimenta Lindl. é um dos gêneros e é formado por árvores de pequeno a médio porte ou menos frequentemente arbustos, confinado na região do Caribe e América Central, com exceção de algumas espécies nativas do sudeste brasileiro (Landrum, 1986).

Várias espécies do gênero *Pimenta* são utilizadas como medicinais e veem sendo estudadas. Saenz et al. (2004) em um estudo com óleos essenciais verificaram que *Pimenta racemosa* var. *grisea* (Kiarskou) Fosberg e *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* (Burret) Landrum L., utilizadas respectivamente por suas propriedades antiinflamatórias e no tratamento de reumatismo e dor de dente, apresentaram atividade antibacteriana.

Fernandez et al. (2001) estudaram o efeito antiinflamatório de *Pimenta racemosa* var. *ozua* (P. Miller) J. W. Moore, espécie conhecida pelo nome de ozua na República Dominicana e que tem seu óleo essencial extraído a partir de folhas usado pela população no tratamento de casos de reumatismo, dores de dente, contra estados gripais e dores abdominais. Os autores conseguiram resultados promissores através da redução de edemas induzidos em ratos pela aplicação oral e tópica do extrato metanólico das folhas da planta.

Suarez et al. (1997) em um trabalho com *Pimenta dioica* (L.) Merrill, nativa da América central que é utilizada no tratamento de pressão alta, alta taxa de glicose no sangue e digestão irregular, estudaram o seu efeito cardiovascular administrando frações de extratos etanólicos e aquosos a ratos.

De acordo com Paula et al. (2008), em um estudo farmacognóstico realizado com folhas de *P. pseudocaryophyllus*, foi obtida uma quantidade apreciável de compostos fenólicos, flavonóides e taninos, detectados através de métodos diversos, sugerindo que esta espécie possui um importante potencial fitoterapêutico a ser investigado.

Sakita et al. (1994) realizaram um estudo com o óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* detectando e identificando onze componentes: α -pineno, β -pineno, metileptenona, α -copaeno, linalol, β -cariofileno, neral, geranial, geraniol, que foram confirmados pelos seus respectivos padrões.

3.1 PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS (GOMES) L.R. LANDRUM

Pimenta pseudocaryophyllus é uma árvore que ocorre nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás até Santa Catarina, nas regiões de altitude em florestas e caatingas e é conhecida popularmente como craveiro ou cravo-do-campo; nomes provavelmente relacionados ao aroma semelhante ao de cravo-da-índia. Suas folhas são utilizadas pela população na produção de chás para estados gripais e na culinária para aromatização de doces caseiros. Sua madeira é empregada localmente para obras internas em carpintaria, bem como para lenha e carvão. Os frutos são muito procurados por pássaros (Lorenzi, 2002).

A espécie é uma planta aromática, com 4 a 10 m de altura, podendo ocorrer como arbusto em certas regiões. Apresenta tronco geralmente ereto, com 20 a 30 cm de diâmetro, com periderme fissurada. As folhas são inteiras, simples, elípticas, penínervas, opostas-cruzadas, glabras ou densamente cobertas por pelos prateados ou amarelados. Folhas prateadas na face inferior, com 5 a 10 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura, sobre um pecíolo de 1 a 2 mm. As inflorescências são em panículas ou dicásios, com 7 a 15 flores brancas muito perfumadas (Figura 31). Possui fruto do tipo baga, de polpa succulenta, com 1 ou 2 sementes muito duras (Lorenzi, 2002).

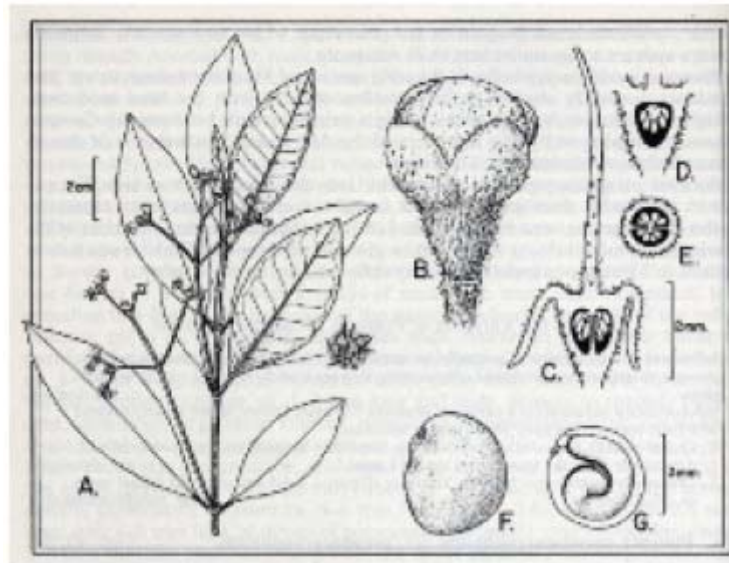


Figura 31 – *Pimenta pseudocaryophyllus*. A, ramo com inflorescências do tipo panícula; B, flor após queda das brácteas; C, corte longitudinal do ovário mostrando os lóculos; D, corte longitudinal do ovário mostrando um lóculo; E, corte transversal do ovário; F, semente; G, corte da semente mostrando o embrião espiral.

Fonte: Landrum. (1986).

A espécie é semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, pioneira, característica e exclusiva de matas de altitude e da caatinga. Pouco exigente quanto à qualidade do solo, ocorre geralmente como população homogênea em solos pobres, bem arenosos e drenados (Lorenzo, 2002).

O presente trabalho foi realizado com indivíduos de uma população de São Jerônimo da Serra. Este município está localizado na região do Médio Tibagi, entre o Segundo e Terceiro Planaltos. A região apresenta morfologia bastante acidentada, típica de áreas de transição entre planaltos, com declividades apreciáveis e ocorrência de “paredões” e relevos escarpados onde a ocupação humana é dificultada. Por ser uma área de transição geológica apresenta solos com baixa fertilidade. O clima é o Cfa/Cfb (misto) subtropical úmido, com verão quente a moderadamente quente, com temperatura média de 19,5°C, chegando a 26°C no verão e 14,5°C no inverno. A pluviosidade média é de 1700 mm. Apresenta vegetação formada de cerrado com estrato herbáceo contínuo e lenhoso composto por partes quase iguais de arbustos e árvores dispersos (Sa, 2004).

Referências

- AGUILERA, D. B.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. 2004. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae), Planta Daninha, 22(4): 483-489.
- ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURAO, K. S. M. 2001. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), Acta Scientiarum, 23(2): 549-560.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. 2003. Anatomia Vegetal. 2. Ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 438p.
- BRUNETON, J. 1991. Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia, Zaragoza, 594p.
- CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A. C.; PAGNI, A. M. 2001. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis, Annals of Botany, 88: 637-644.
- CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. 2006. Natural Products from Plants. 2 ed. Taylor & Francis, Boca Raton, 569p.
- DEWICK, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2. ed. John Wiley & Sons, Chichester, 514p.
- DONATO A. M.; MORRETES B. L. 2005. Estudo químico das folhas de *Psidium widgrenianum* Berg. (Myrtaceae), uma potencial espécie medicinal, Revista Brasileira de Farmácia, 86(2): 65-70.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. 2007. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) provenientes de áreas de restinga e de floresta, Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(3): 426-443.
- DURADEVA, N.; PICHERSKY, E. 2008. Metabolic engineering of plant volatiles, Current Opinion Biotechnology, 19: 181-189.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants, The New Phytologist, 108(3): 229-257.
- FERNANDEZ, A.; ALVAREZ, A.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T. 2001. Antiinflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol, IL Fármaco, 56: 335-338.
- GALLO, M. B. C.; SILVA, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. 2006. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg. (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance, Journal of Brazilian Chemical Society, 17(2): 279-288.
- GOTTIEB, O. R.; YOSHIDA, M. 1984. Lignóides, com atenção especial a química das neolignanas, Química Nova, 7: 250-273.

- LANDRUM, L. R. 1986. Monograph 45: *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae), Flora Neotropica, 4: 72-115.
- LORENZI, H. 2002. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol.2, 2. ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 352p.
- MARTINS, M. B. G. 2002. Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *suaveloens* (Lamiaceae), Bragantia, 61(3): 205-218.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. 1985. Anatomy of the dicotyledons. vol 2, 2 ed., Clarendon Press, Oxford, 297p.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. 2005. Taninos: uma abordagem da química a ecologia, Química Nova, 28(5): 892-896.
- MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, C. A.; SANTOS, L. S.; MULLER, H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E. 2006. Antraquinonas e naftoquinonas de *Tectona grandis* (Verbenaceae), Revista Brasileira de Farmacognosia, 16(3): 392-396.
- MURGU, M.; SANTOS, L. F. A.; SOUZA, G. D.; DAOLIO, C.; SCHNEIDER, B.; FERREIRA, A. G.; RODRIGUES-FILHO, E. 2008. Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a Xylareaceous fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*, Journal of Brazilian Chemical Society, 19(5): 831-835.
- NEGRI, G. 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41(2): 121-142.
- PALHARES, D. 2003. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). Revista Lecta, 21: 29-36, 2003.
- PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. 2008. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae, Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(2): 265-278.
- PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E.; BRAZFILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. 2003. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae), Química Nova, 26(4): 466-469.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. 1997. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia, Editorial Premier, São Paulo, 372p.
- SA, K. L. V. R. 2004. A flórula vascular da Reserva Indígena de São Jerônimo, São Jerônimo da Serra-Paraná: Subsídios para conservação da vegetação, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- SACCHETTI, G.; ROMAGNOLI, C.; NICOLETTI, M.; DI FABIO, A. ; BRUNI, A. ; POLI, F. 1999. Glandular thricomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure, Annals of Botany, 83 : 87-92.

- SAENZ, M.T.; TORNOS, M.P.; ALVAREZ, A.; FERNANDEZ, M.A.; GARCIA, M.D. 2004. Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *Fitoterapia*, 75:599-602.
- SAKITA, M. N.; AGUIAR, O. T.; YATAGAI, M.; IGARASHI, T. 1994. Óleo Essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) I: cromatografia a gás/ espectrometria de massa (CG/EM), *Revista do Instituto Florestal*, 6: 53-61.
- SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A.; ASCENSAO, L. 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae), *Revista Árvore*, 30(3): 481-489.
- SANTOS, R. I. 1999. Metabolismo Básico e Origem dos Metabolitos Secundários. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). Ed. Universidade UFRS / Ed. da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 821p.
- SERRATO-VALENTI, G.; BISIO, A.; CORNARA, L.; CIARALLO, G. 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil, *Annals of Botany*, 79: 329-336.
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. 1999. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *regnellii* (Piperaceae). *Revista brasileira de Botânica*, 22(2): 117-124.
- SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; LIAS, C. N. 2004. Atividade larvívica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5): 396-399.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 640p.
- SUAREZ, A., ULATE, G., CICCIO, J. F. 1997. Cardiovascular effects of ethanolic and aqueous extracts of *Pimenta dioica* in Sprague- Dawley rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 55:107- 111.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 719p.
- TOLEDO, M. G. T.; ALQUINI, Y.; NAKASHIMA, T. 2004. Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(4): 487-493.
- VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. 2006. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna, *Química Nova*, 29(2):326-337.
- VIEIRA, R. C.; DELPRETE, P. G.; LEITAO, G. G.; LEITAO, S. G. 2001. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae), *American Journal of Botany*, 88(12): 2151-2156.

CAPITULO 2

**ANATOMIA DE CAULE E FOLHA DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS*
(GOMES) L.R. LANDRUM (MYRTACEAE)**

Manuscrito a ser enviado à Revista Fitoterapia

**ANATOMIA DE CAULE E FOLHA DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS*
(GOMES) L.R. LANDRUM (MYRTACEAE)**

Resumo

Este trabalho descreve a anatomia de folhas e caules de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, uma árvore cujas folhas são usadas pela população para fazer chá para estados gripais e na culinária. Foram coletados segmentos do primeiro, segundo e quarto entrenós e folhas de 10 indivíduos em São Jerônimo da Serra – PR (23o43'34,5"S; 50o43'58,7"W). Os segmentos de caules e folhas foram fixados em álcool 70% e submetidos a técnicas usuais de microscopia e histoquímica. O caule apresenta epiderme unisseriada recoberta por cutícula espessa e córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximo a epiderme. O tecido vascular forma um anel contínuo ao redor da medula com xilema envolto externa e internamente por floema. O quarto entrenó apresenta estrutura semelhante a do primeiro e segundo entrenós, mas com crescimento secundário evidente no tecido vascular. O pecíolo apresenta epiderme unisseriada coberta por cutícula espessa, córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximas a epiderme e um feixe anficrival envolto por periciclo esclerenquimático. A folha é hipostomática e possui epiderme unisseriada revestida por cutícula evidente. Sua face adaxial é glabra, mas tem muitos tricomas na face abaxial. O limbo foliar apresenta hipoderme múltipla na face superior, parênquima paliçádico formado por duas ou três camadas e parênquima lacunoso. Varias cavidades secretoras estão presentes, especialmente no parênquima paliçádico. A nervura central é formada por epiderme unisseriada coberta por cutícula espessa, córtex parenquimatoso com cavidades secretoras próximas a epiderme e um feixe anficrival envolto por periciclo esclerenquimático. Dentre os testes histoquímicos foram obtidos resultados positivos para lipídios, compostos fenólicos, amido e oxalato de cálcio. A espécie apresenta características anatômicas típicas da família e as cavidades secretoras presentes nas folhas e caules estão relacionados aos metabolitos secundários detectados. Os dados apresentados contribuem para o estabelecimento de um padrão anatômico e químico para a espécie.

Palavras chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*. Cavidades secretoras. Metabolitos secundários.

Abstract

This paper describes the leaf and stem anatomy of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, a tree which leaves are used by the population in the production of tea for cold and at culinary. There were collected segments of the first, second and fourth internodes and leaves of 10 individuals in São Jerônimo da Serra (23o43'34,5"S; 50o43'58,7"W), Paraná State. The stem and leaf segments were fixed in 70% alcohol and submitted to the usual microtechniques and histochemistry. The stem presents uniseriate epidermis covered by a thick cuticle. The cortex is parenchymatous and has secretory cavities near the epidermis. The vascular tissues form a continuous ring around the pith with the xylem surrounded by phloem in his internal and external face. The fourth internode shows similar structure to the first and second internodes, but with evident secondary growth in the vascular tissue. The petiole shows uniseriate epidermis covered by a thick cuticle, parenchymatous cortex with secretory cavities near the epidermis and an ampicrival bundle surrounded by a sclerenchymatic

pericycle. The leaf is hypostomatic and is characterized by a uniseriate epidermis covered by evident cuticle. Its adaxial face is glabrous but has abundant trichomes on the abaxial face. The leaf presents a multiple hypodermis at the upper face, a palisade parenchyma formed by two or three layers and a spongy parenchyma with many intercellular spaces. Several secretory cavities are present at the leaf, especially in the palisade parenchyma. The midrib is formed by an uniseriate epidermis covered by a thick cuticle, parenchymatous cortex with some collenchyma group cells and secretory cavities near the epidermis and an amphicribral bundle surrounded by a sclerenchymatic pericycle. Among the histochemical tests positive results were obtained for lipids, phenolic compounds, starch and calcium oxalate. The species has anatomical features typical of the family and the secretory cavities present in the leaves and stems are related to secondary metabolites detected. Chemical and anatomical studies are needed in order to establish a pattern for the species and identify the substances in their secondary metabolites, and their activities.

Keywords: *Pimenta pseudocaryophyllus*. Secretory cavities. Secondary metabolites.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de plantas medicinais envolve diversas áreas da ciência. A anatomia vegetal contribui para o estudo de espécies medicinais, principalmente em relação a identificação e ao controle de qualidade dos vegetais comercializados. A diagnose de fitoterápicos é feita inicialmente pela análise morfológica de seus órgãos vegetativos e reprodutivos e de suas características organolépticas. Contudo, o conhecimento de sua micromorfologia, é bastante importante para o estabelecimento de paradigmas, com os quais as amostras de exemplares vegetais, utilizados como fármacos, possam ser comparadas, comprovando sua autenticidade. O uso de plantas identificadas erroneamente e uma atitude arriscada, podendo levar a inobservância dos efeitos farmacológicos previstos ou a reações indesejáveis, devido à presença de substâncias tóxicas nas plantas [1,2].

Estruturas secretoras e materiais secretados são de grande interesse para os anatomistas e sistematas, pois eles frequentemente dão uma aparência distintiva aos padrões celulares nas plantas que estão presentes. Além disso, a distribuição restrita de algumas estruturas serve como um valioso diagnóstico [3].

Cicarelli et al. [4] estudando *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), espécie utilizada tradicionalmente como calmante, antidepressivo e antiinflamatório, encontraram glândulas translúcidas na lâmina foliar e também nas sépalas e pétalas e três tipos de canais presentes em toda a planta. Duarte e Debur [5], em estudo com *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. (Celastraceae), utilizada no tratamento de problemas gástricos (gastrites e úlceras) [6], encontraram cristais primários e compostos fenólicos no caule e nas

folhas da espécie. Sant' Anna-Santos et al. [7] avaliaram a anatomia e a histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae) e encontraram idioblastos taniníferos e ductos com secreção complexa formada por óleos essenciais, polissacarídeos e compostos fenólicos. Silva e Machado [8] estudaram a estrutura e o desenvolvimento dos tricomas secretores presentes em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*, encontrando dois tipos de tricomas secretores: glândulas peroladas e tricomas saculiformes. Vieira et al. [9] em um estudo anatômico e análise química de folhas de *Rustia formosa* (Cham. & Schltld. ex DC.) Klotzsch, observaram cavidades secretoras de lipídeos entre os parênquimas paliçádico e lacunoso na lâmina foliar, e na região cortical do pecíolo.

Segundo Metcalfe e Chalk [10], cavidades secretoras são comuns em Myrtaceae. Esta família apresenta uma distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália. A família inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies. Na flora brasileira, é uma das famílias mais representativas com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies [11].

Em folhas de *Psidium widgrenianum* Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como araçá, a qual apresenta atividades anti-inflamatória e antineoplásica, Donato e Morretes [1] encontraram cavidades arredondadas, secretoras de óleos essenciais distribuídas pelas duas faces da lâmina foliar e drusas de oxalato de cálcio próximas aos feixes vasculares. Estes autores [2] avaliaram a anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) provenientes de áreas de restinga e de floresta e encontraram numerosas cavidades secretoras de óleos essenciais nas duas faces da lâmina foliar, sendo esse número maior nas folhas provenientes da área de restinga. Palhares [12], em um estudo com a espécie *Eugenia dysenterica* DC, utilizada no combate a diarreia, encontrou em suas folhas uma grande quantidade de glândulas dispersas no parênquima. O autor observou também que drusas e idioblastos contendo cristais romboédricos de oxalato de cálcio ocorriam apenas ocasionalmente.

Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum, conhecida como craveiro, tem suas folhas utilizadas pela população na produção de chás para estados gripais e na culinária para aromatização de doces caseiros [13]. Considerando o uso dessa espécie como medicinal e a importância do conhecimento sobre a mesma, esse estudo tem como objetivo fornecer informações sobre a anatomia e histoquímica de caules e folhas de *P. pseudocaryophyllus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DA PLANTA

A coleta de *P. pseudocaryophyllus* foi realizada em fragmento de vegetação (23°43'30" S e 50°43'47" W), localizado no Município de São Jerônimo da Serra, PR. O material testemunho foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Londrina sob número FUEL 43025. Para o estudo anatômico foram coletados ramos e folhas de 10 indivíduos, sendo cinco folhas (do segundo no), e dois ramos por indivíduo. As folhas e os ramos foram conservados em álcool 70%. Para os testes histoquímicos foram utilizados ramos e folhas recém coletados, armazenados em sacos plásticos com o ar saturado de água e trazidos ao laboratório. Para a microscopia eletrônica de varredura, foram coletadas cinco folhas do segundo no (uma folha por indivíduo), que foram seccionadas e os fragmentos foram colocados no fixador primário (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2)) por 24 horas a temperatura ambiente.

2.2 ESTUDOS ANATÔMICOS DE PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS

2.2.1 Anatomia de Caule e Folhas

Dos ramos e folhas fixados foram confeccionadas lâminas permanentes e semipermanentes seguindo os procedimentos usuais descritos por Johansen [14] e Kraus e Arduim [15], respectivamente. As lâminas permanentes foram coradas com azul de astra-fucsina básica [16]. Foram utilizados segmentos do primeiro, segundo e quarto entrenós dos ramos, segmentos da região mediana do pecíolo e segmentos, de cerca de 1 cm², da nervura central, da área internervural e do bordo na região mediana do limbo foliar.

O estudo anatômico do caule foi completado com o macerado do mesmo, utilizando ácido crômico 10% e ácido nítrico 10%, na proporção de 1:1 (solução de Jeffrey). O material foi colocado nesta solução até o seu amolecimento. Em seguida, foi lavado em água destilada e posteriormente em etanol 50%. O material foi então mantido em safranina 1% em etanol 50% [15]. O estudo anatômico das folhas foi completado com a diafanização deste órgão, com a dissociação da epiderme e com microscopia eletrônica de varredura. Para a diafanização, folhas foram colocadas em Hidróxido de sódio 5% e mantidas em estufa a 37° até o seu clareamento. Em seguida o material foi lavado em água destilada várias vezes e

transferido para Cloral Hidrato (1,6:1) por uma semana. Posteriormente, a folha foi lavada com água e mantida neste líquido por uma noite. Em seguida o material foi colocado em etanol 70% e posteriormente corado em safranina 1% em etanol 50%, desidratado em série alcoólica e montado em bálsamo-docanada [15].

A dissociação da epiderme foi feita pelo método de Jeffrey [17]. Segmentos de 1 cm² da região internervural foram mantidos na solução de Jeffrey até ocorrer a dissociação da epiderme. Após limpeza e lavagem, a epiderme foi corada com safranina aquosa diluída e montada em gelatina glicerinada.

As lâminas de caule e de folhas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico MOTIC B1-SERIES acoplado a uma câmera MOTICAM 2300 3.0 MP Live Resolution, utilizando o programa Motic Images Plus version 2.0 ML. As folhas diafanizadas foram analisadas e fotografadas no microscópio estereoscópico LEICA MZ 12.5.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. As folhas fixadas no fixador primário foram posteriormente lavadas em tampão fosfato (pH 7,2) 0,1M, sendo 3 banhos de 10 minutos cada. O material foi então pós-fixado em tetróxido de osmio 1% por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) em 3 banhos de 10 minutos cada. Após essa etapa o material passou por uma série de desidratação alcoólica e foi submetido a secagem para obtenção do ponto crítico no Critical Point Dryer CPD 0,30 (Bal-Tec). Em seguida as amostras foram recobertas com uma película de ouro (40nm) em um Spulter Coater SCD 050 (Bal-Tec). As amostras foram montadas em “stubs” e analisadas em microscópio eletrônico de varredura FEI-QUANTA 200.

2.2.2 Testes Histoquímicos

Foram realizados testes histoquímicos em caules e folhas, a fresco, para verificar a ocorrência de substâncias específicas. Para isto, secções a mão livre foram obtidas e submetidas aos seguintes testes: identificação de carbonato de cálcio e oxalato de cálcio com HCl 10% [15], de substâncias fenólicas com Cloreto férrico III, amido com Lugol [14] e lipídeos com Sudan III [15].

3 RESULTADOS

3.1 ANATOMIA DO CAULE

A espécie apresenta o primeiro (Figura 1a) e o segundo entrenós com estruturas semelhantes. Ambos apresentam epiderme unisseriada com presença de cutícula espessa (Figura 1b), tricomas secretores (Figura 1c) e tectores. O córtex e parenquimatoso e apresenta varias cavidades secretoras esquizógenas de secção circular localizadas na sua porção mais externa (Figura 1a, b). O tecido vascular forma um anel em torno da medula e é formado por xilema revestido interna e externamente por floema (Figura 1d). Em ambos os entrenós, não há crescimento secundário evidente. O quarto entrenó apresenta estrutura semelhante aos dois primeiros (Figura 1e, f), porem pode ser observado crescimento secundario evidente no mesmo (Figura 1g, h).

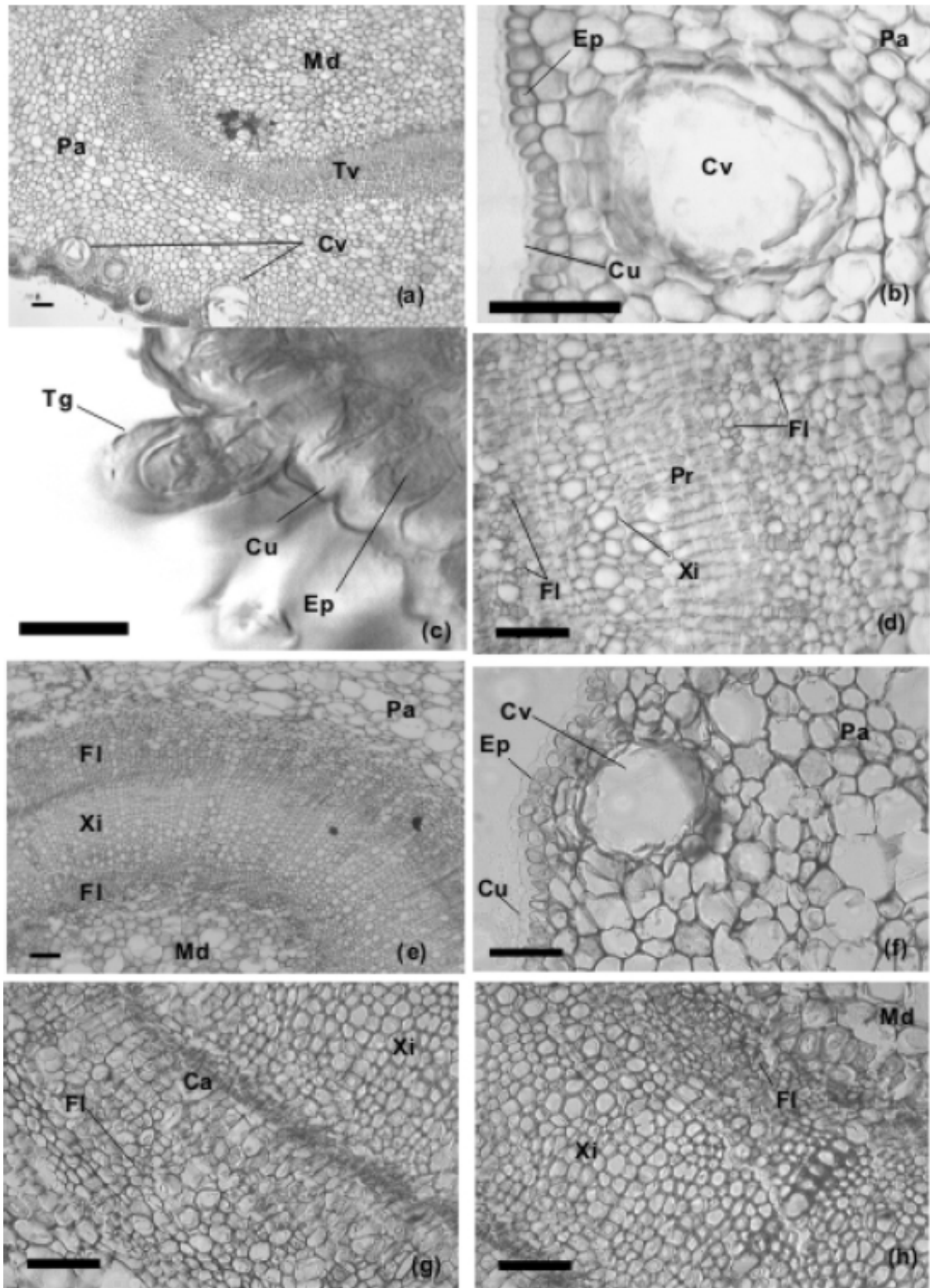


Figura 1 – Secções transversais do caule de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Primeiro entrenó; (b) cavidade secretora no segundo entrenó; (c) tricoma glandular no primeiro entrenó; (d) tecido vascular no primeiro entrenó; (e) quarto entrenó; (f) cavidade secretora no quarto entrenó; (g e h) tecido vascular no quarto entrenó. Barras = 50µm (a, b, d, e, f, g, h) e 25µm (c). Abreviações- Ca: cambio vascular; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fl: floema; Md: medula; Pa: parênquima; Pr: procâmbio; Tg: tricoma glandular; Tv: tecido vascular; Xi: xilema.

O xilema é constituído por uma grande quantidade de fibras libriformes, células parenquimáticas e diferentes tipos de elementos de vaso, sendo alguns mais longos e finos e outros mais estreitos e largos, porém todos com extremidades afiladas (Figura 2).

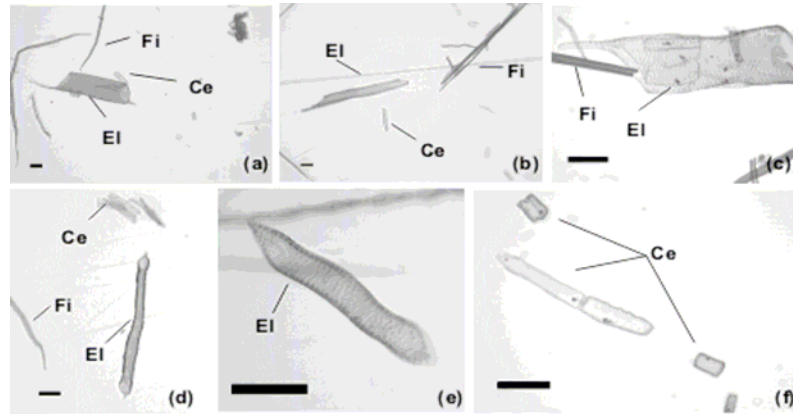


Figura 2 – Macerado do xilema do caule de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. Barras= 50µm. Abreviações- Ce: células parenquimáticas; Fi: fibras libriformes; El: elementos de vaso.

3.2 ANATOMIA DA FOLHA

Em secção transversal, o pecíolo apresenta superfície adaxial plana a ligeiramente côncava e a abaxial convexa (Figura 3a). Apresenta epiderme unisseriada recoberta por cutícula espessa e córtex formado por parênquima com algumas regiões de colênquima localizadas na sua porção mais externa (Figura 3b, c). As cavidades secretoras ocorrem em toda a periferia do pecíolo e são semelhantes as encontradas no caule (Figura 3a, c). O tecido vascular é formado por um feixe anficrival em forma de meia lua, envolvido por periciclo esclerenquimático (Figura 3a, b, d). Nota-se xilema secundário já desenvolvido (Figura 3d).

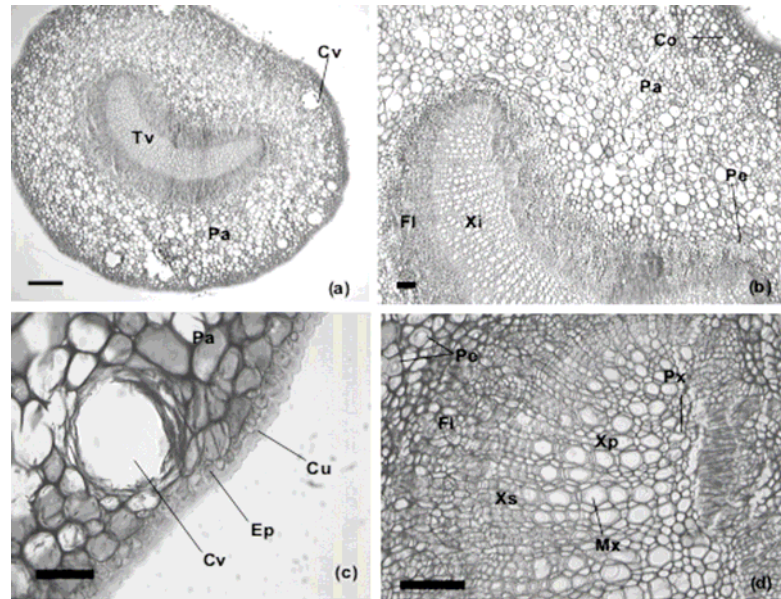


Figura 3 – Seções transversais do pecíolo de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a, b) Aspecto geral; (c) cavidade secretora; (d) feixe vascular. Barras= 250 μ m (a) e 50 μ m (b, c, d). Abreviações- Co: colênquima; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fl: floema; Mx: metaxilema; PA: parênquima; Pe: periciclo; Px: protoxilema; Tv: tecido vascular; Xi: xilema; Xp: xilema primário; Xs: xilema secundário.

A epiderme da face adaxial da folha de *P. pseudocaryophyllus* apresenta, em vista frontal, células com dimensões e formas variadas, com paredes anticlinais espessas e onduladas (Figura 4a, b). A face adaxial é glabra e não apresenta estômatos (Figura 4c), porém foram visualizadas regiões onde as células epidérmicas estão dispostas radialmente (Figura 4b), com aparência de base de tricoma (Figura 4d). São cicatrizes deixadas após a queda destes tricomas, pois eles foram encontrados em abundância em folhas jovens. Foram encontradas regiões formadas por duas ou três células, circundadas por células epidérmicas menores, representando as células que recobrem as cavidades secretoras (Figura 4a).

A face abaxial apresenta epiderme com muitos estômatos (Figura 4e, f), predominantemente anomocíticos, e tricomas tectores unicelulares longos (Figura 4g, h). Suas células apresentam dimensões e formas variadas, com paredes anticlinais espessas (Figura 4e).

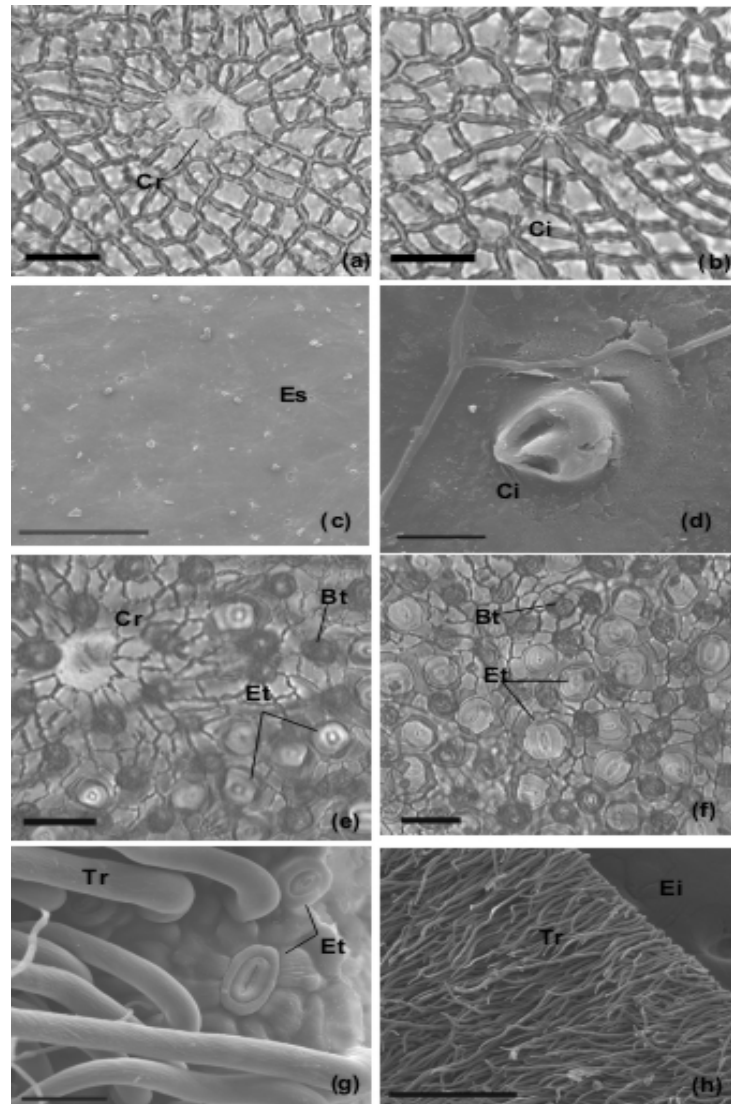


Figura 4 – Dissociação epidérmica e Microscopia eletrônica de Varredura das epidermes adaxial e abaxial de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) epiderme adaxial mostrando as células que revestem as cavidades secretoras; (b) epiderme adaxial mostrando cicatriz; (c) superfície da epiderme adaxial; (d) detalhe na epiderme adaxial de possível base de tricoma; (e) epiderme abaxial mostrando células que revestem as cavidades secretoras; (f) epiderme abaxial; (g) detalhe de estômato na face abaxial; (h) epiderme abaxial mostrando tricomas tectores. Barras= 10 μ m (d), 20 μ m (g), 25 μ m (a, b, e, f) e 300 μ m (c, h). Abreviações- Bt: base de tricoma; Ci: cicatriz; Cr: células que revestem a cavidade secretora; Ei: epiderme abaxial; Es: epiderme adaxial; Et: estômato; Tr: tricoma tector.

A espécie apresenta padrão de venação camptódromo-broquidódromo, com nervuras de primeira a quarta ordem, aréolas de formato irregular, distribuídas sem orientação preferencial no limbo foliar (Figura 5).

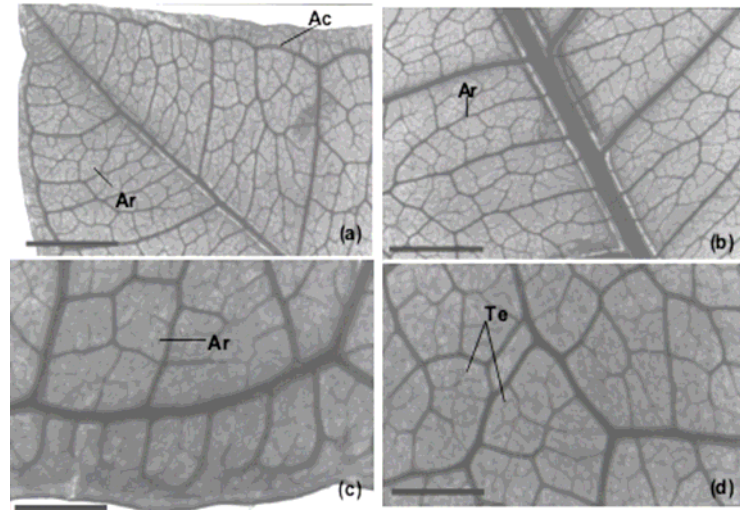


Figura 5 – Folhas difanizadas de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Região apical; (b) região mediana; (c) margem foliar; (d) região de internervura. Barras= 325 μ m (d), 525 μ m (c) e 1,25 mm (a e b). Abreviações- Ac: arcos; Ar: aréolas; Te: terminações vasculares.

A lâmina foliar é dorsiventral, caracterizada por mesofilo heterogêneo com parênquima paliçádico, formado por duas a três camadas, voltado para a face superior e parênquima lacunoso formado por sete a nove camadas voltado para a face inferior (Figura 6a). A epiderme, tanto na face adaxial quanto na abaxial, apresenta-se unisseriada, coberta por cutícula espessa. Na face adaxial, observa-se hipoderme formada por duas ou três camadas de células um pouco maiores que as epidérmicas (Figura 6a). Os feixes vasculares são do tipo colateral e são providos de uma bainha de células esclerenquimáticas que apresenta extensões voltadas para ambas as faces da folha (Figura 6b). Apresenta muitas cavidades secretoras esquizógenas, semelhantes as encontradas no caule (Figura 6a, c - e), sendo a maioria junto ao parênquima paliçádico.

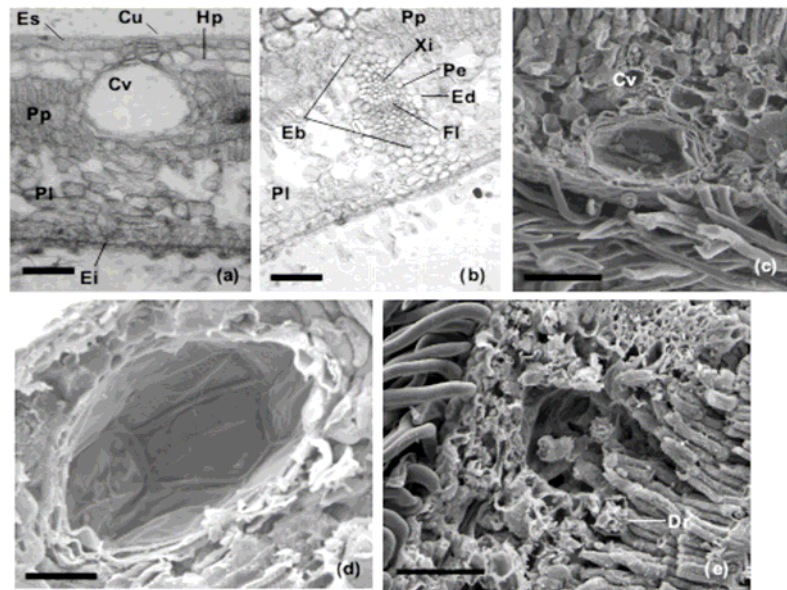


Figura 6 – Microscopia eletrônica de Varredura e Microscopia óptica de secções transversais do limbo foliar de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Aspecto geral; (b) nervura de pequeno porte; (c) cavidade secretora junto ao parênquima lacunoso; (d) detalhe da cavidade secretora; (e) drusas de oxalato de cálcio no mesofilo. Barras= 25 μ m (d) e 50 μ m (a, b, c e e). Abreviações-Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Dr: drusa; Eb: extensão da bainha; Ed: endoderme; Ei: epiderme abaxial; Es: epiderme adaxial; Fl: floema; Hp: hipoderme; Pe: periciclo; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Xi: xilema.

A nervura central é formada por um feixe anficrival, semelhante ao encontrado no pecíolo, também envolto por um periciclo esclerenquimático (Figura 7a - c). O córtex é formado por parênquima e algumas regiões de colênquima. A epiderme é unisseriada, sendo glabra na face adaxial e densamente pilosa na face abaxial. Apresenta hipoderme na face adaxial.

A borda apresenta-se levemente fletida em direção à face abaxial e possui aspecto semelhante à região de internervura, apresentando colênquima em sua extremidade e espessamento maior da cutícula formando flanges cuticulares (Figura 7d).

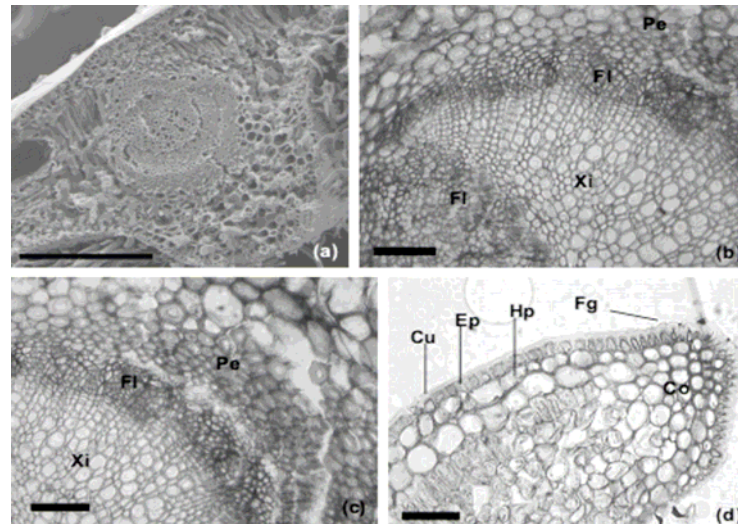


Figura 7 – Secções transversais da nervura central e bordo foliar de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletado em São Jerônimo da Serra, PR. (a) Nervura mediana; (b) detalhe do feixe anficrival na nervura mediana; (c) detalhe do feixe mostrando o periciclo; (d) bordo foliar. Barras= 50 μ m (b, c, d) e 200 μ m (a). Abreviações- Co: colênquima; Cu: cutícula; Ep: epiderme; Fg: flange cuticular; Fl: floema; Hp: hipoderme; Pe: periciclo; Xi: xilema.

3.3 TESTES HISTOQUÍMICOS

Nos testes histoquímicos, constatou-se a presença de lipídeos na cutícula da epiderme de folhas e caules (Figura 8a) e drusas de oxalato de cálcio em ambos os órgãos. Foram encontrados grãos de amido formando uma bainha amilífera ao redor do tecido vascular no caule e no pecíolo (Figura 8b) e idioblastos com compostos fenólicos em caules e folhas (Figura 8c, d). Nas cavidades secretoras de caules e folhas foram obtidos resultados positivos para compostos fenólicos e para lipídeos (Figura 8e, f).

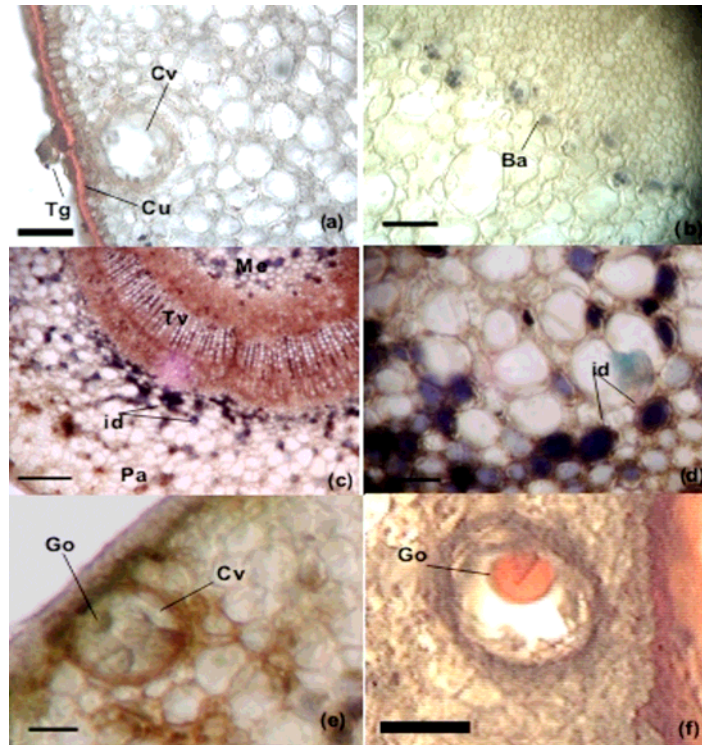


Figura 8 – Secções transversais do caule *Pimenta pseudocaryophyllus*, coletado em São Jerônimo da Serra, PR, mostrando resultados positivos para os testes histoquímicos. (a) Corado com Sudam III; (b) corado com lugol mostrando a bainha amilífera; (c) corado com cloreto férrico III; (d) detalhe mostrando idioblastos corados com cloreto férrico III; (e) cavidade secretora mostrando material corado por cloreto férrico; (f) cavidade secretora mostrando material corado por Sudam III. Barras= 50 μ m (a – b, d, e, f) e 250 μ m (c). Abreviações- Ba: bainha amilífera; Cv: cavidade secretora; Cu: cutícula; Go: gota de material secretado na cavidade secretora; Id: idioblasto; Md: medula; Tg: tricoma glandular; Tv: tecido vascular.

4 DISCUSSÃO

Pimenta pseudocaryophyllus apresenta características anatômicas típicas da família Myrtaceae, tais como a presença de floema interno ao xilema e de cavidades secretoras [3]. Esse arranjo do tecido vascular foi observado também em *Psidium guajava* L. [18].

Cicarelli et al. [4] encontraram dois tipos diferentes de canais secretores no caule de *Hypericum perforatum* com resultados positivos para alcalóides, lipídeos, resinas e taninos. Canais secretores também foram relatados em *Spondias dulcis* [7] como estruturas secretoras de lipídeos, terpenóides e compostos fenólicos.

Epiderme adaxial e abaxial com células de dimensões variadas e paredes anticlinais espessas, grande quantidade de estômatos, predominantemente anomocíticos e tricomas tectores unicelulares longos na epiderme abaxial são descritos também por Paula et

al. [19] para a mesma espécie. Folhas hipostomáticas, com estômatos anomocíticos foram observadas também em *Psidium widgrenianum* [1], *Eugenia dysenterica* [12] e *Eugenia brasiliensis* [2], e segundo Metcalfe e Chalk [10] são comuns em Myrtaceae.

Os tricomas simples e longos encontrados na espécie analisada são bastante comuns em Myrtaceae e dão a sensação aveludada ao tocar a superfície onde eles estão presentes. Essas estruturas podem aparecer em apenas uma ou em ambas as faces da folha, sendo que em *P. pseudocaryophyllus* eles estão presentes apenas na face abaxial [10].

Na face adaxial não foram encontrados estômatos e tricomas, contudo, há algumas regiões onde as células epidérmicas estão dispostas radialmente, indicando a base de um tricoma, mostrando que em determinada fase a espécie apresentou tricomas na epiderme adaxial, o que pode ser confirmado pela observação de folhas em desenvolvimento. Essas regiões na epiderme são também observadas na mesma espécie por Paula et al. [19], sendo chamadas de cicatrizes. Essas estruturas são também relatadas por Landrum [20].

Alem dessas cicatrizes, foram encontradas regiões formadas por duas ou três células, circundadas por células epidérmicas menores, sendo essas regiões elementos que recobrem as cavidades secretoras. Isto também foi observado em indivíduos da mesma espécie coletados nos estados de Goiás e Minas Gerais [19]. Conjuntos de células epidérmicas recobrimo cavidades secretoras são relatados também em *Eugenia dysenterica* [12], *Eugenia brasiliensis* [2], *Marlierea suaveolens* Gard. [21] e em *Gomidesia nitida* (Vell.) Legr. [22]. Estruturas semelhantes foram encontradas na face adaxial das folhas de *Psidium widgrenianum* [1], onde são formadas por um par de células de formato reniforme ou assemelhando-se a asas de borboleta. Fontenelle et al. [23] chamam essas células que recobrem as cavidades secretoras de OLC (overlying cells). Nas espécies de *Eugenia* estudadas por estes autores, elas estão presentes em ambas as epidermes e podem ser encontradas isoladas, aos pares ou em trios.

O padrão de venação observado para *P. pseudocaryophyllus* e similar ao padrão relatado por Cardoso e Sajo [24] para a mesma espécie.

No presente trabalho, foi constatada a presença de um feixe anficrival no pecíolo e na nervura central da folha. Paula et al. [19] encontrou para a espécie um feixe vascular de estrutura semelhante na nervura central e no pecíolo, sendo observado pelos autores a presença de células parenquimáticas portadoras de cristais de oxalato de cálcio no floema externo. Feixe anficrival no pecíolo e relatado também em *Eugenia brasiliensis* [2]. Estrutura semelhante na nervura central foi encontrada também em *Maytenus ilicifolia* [5]. Bordo foliar similar ao de *P. pseudocaryophyllus* foi observado em *Eugenia brasiliensis* [2].

Folha dorsiventral com hipoderme formada por duas a três camadas de células localizada abaixo da epiderme adaxial, e várias cavidades secretoras voltadas predominantemente para a face adaxial foi observado por Paula et al. [19] em estudo com a mesma espécie. No entanto, para uma confirmação segura da identificação como hipoderme seria necessário um estudo de ontogenia para o conhecimento da origem dessa estrutura. Segundo Metcalfe e Chalk [10] uma epiderme múltipla formada ontogeneticamente pelas divisões periclinais de uma camada simples de epiderme não é facilmente diferenciada de uma hipoderme, formada por divisões das células subjacentes a epiderme.

Segundo Solereder apud Paula et al. [19], cavidades secretoras esquizógenas são comuns em Myrtaceae. Cavidades secretoras esquizógenas foram encontradas também em folhas de *Eugenia brasiliensis* [2], *Eugenia dysenterica* [12], *Psidium guajava* [18] e *Psidium widgrenianum* [1]. Feixes vasculares menores do tipo colateral providos de uma bainha de células esclerenquimáticas foram relatados em *Psidium guajava* [18] e em *Eugenia brasiliensis* [2].

Lipídeos presentes na cutícula e epiderme e bainha amilífera foram observados também em *Psidium widgrenianum* [1] e em *Eugenia brasiliensis* [2]. Idiob contendo compostos fenólicos foram relatados em caules de *Spondias dulcis* [7], em folhas e caules de *Psidium guajava* [18], em folhas de *Maytenus ilicifolia* [5] e *Eugenia brasiliensis* [2]. Bainha amilífera no pecíolo foi observada também em *Psidium widgrenianum* [1] e em *Eugenia brasiliensis* [2].

Nas cavidades secretoras foram obtidos resultados positivos para compostos fenólicos e para lipídeos, mostrando tratar-se de um conteúdo complexo. A presença de cavidades secretoras, abundância notável de compostos fenólicos, como taninos, cristais solitários ou agrupados formados de oxalato de cálcio são características comum de Myrtaceae [10].

Cavidades secretoras podem produzir apenas terpenos ou uma mistura de terpenos com carboidratos, entre outras substâncias [25]. Segundo Castro e Machado [26] nas cavidades secretoras de algumas espécies podem ser encontradas secreções heterogêneas, formadas por uma mistura de óleos essenciais e compostos fenólicos. Este conceito pode ser aplicado a *P. pseudocaryophyllus*, considerando os resultados positivos obtidos para lipídeos e compostos fenólicos nas secreções presentes nas cavidades encontradas em folhas e caules. Ainda segundo os autores citados anteriormente, óleos voláteis podem ter papel importante para as plantas como atrativo de polinizadores, ou às vezes, podem repelir insetos devido sua ação como inseticida e dissuasivo alimentar, reduzindo a herbívora.

Óleos essenciais foram isolados das folhas de *P. pseudocaryophyllus* por Sakita et al. [27] Os óleos essenciais são em sua maior parte, compostos de mono e sesquiterpenos, podendo também apresentar fenilpropanóides em sua composição [28].

Com relação aos compostos fenólicos, nas plantas, eles apresentam uma função protetora, devido sua impalatabilidade, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbívora. Em situações de estresse hídrico, os compostos fenólicos contribuem para a manutenção do arcabouço celular [26]. Outra função atribuída a eles é a de filtro solar, aumentando a proteção contra radiação ultravioleta. Estudos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. constataram aumento dos níveis de compostos fenólicos nas folhas após exposição a radiação UV-B [29].

Metcalf e Chalk [3] afirmam que a presença de estruturas secretoras, assim como sua frequência e padrão de distribuição são parâmetros importantes para fins diagnósticos.

Conclusão

A espécie apresenta características anatômicas típicas da família e as cavidades secretoras presentes nas folhas e caules estão relacionados aos metabolitos secundários detectados. Considerando que a espécie é utilizada como medicinal, este estudo contribui para o estabelecimento de um padrão anatômico e químico para a espécie.

Referências

- [1] Donato AM, Morretes BL. Rev. Bras. Farm. 2005; 86: 65.
- [2] Donato AM, Morretes BL. Rev. Bras. Farmacog. 2007; 17: 426.
- [3] Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of the dicotyledons, vol. 2. Oxford: Clarendon;1989. p. 297.
- [4] Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. Annals of Botany 2001; 88: 637.
- [5] Duarte MR, Debur MC. Fitoterapia 2005; 76: 41.
- [6] Lorenzi H, Matos FJ. Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas, Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008. p. 576.
- [7] Sant'Anna-Santos BF, Thadeo M, Meira RMSA, Ascensão L. Revista Árvore 2006; 30: 481.
- [8] Silva EMJ e Machado SR. Rev. Bras. Bot. 1999; 22: 117.
- [9] Vieira RC, Delprete PG, Leitão GG, Leitão SG. American Journal of Botany 2001; 88: 2151.
- [10] Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of Dicotyledons, vol. 1. Oxford: Clarendon Press; 1979. p. 294.
- [11] Souza VC, Lorenzi H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2005. p. 640.
- [12] Palhares D. Revista Lecta 2003; 21: 29.
- [13] Lorenzi H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. p. 352.
- [14] Johansen DA. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill; 1940. p. 790.
- [15] Kraus JE, Arduim M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Seropedica: EDUR; 1997. p. 198.
- [16] Kraus JE, Sousa HC, Rezende MH, Castro NM, Vecchi C, Luque R. Biotechnic & Histochemistry 1998; 73: 235.
- [17] Macedo NA. Manual de Técnicas em Histologia Vegetal. Feira de Santana: Ed. Universidade Estadual de Feira de Santana; 1997. p. 96.
- [18] Duarte MR, Paula FM. Visão Acadêmica 2005; 6: 53.
- [19] Paula JAM, Paula Jr, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD. Rev. Bras. Farmacog. 2008; 18: 265.
- [20] Landrum LR. Flora neotropica 1986; 4: 72.

- [21] Callado CH. *Rodriguesia* 1993/1997; 45/49: 25.
- [22] Gomes DMS, Neves LJ. *Rodriguesia* 1993/1997; 45/49: 51.
- [23] Fontenelle GB, Costa CG, Machado RD. *Bot. J. Linn. Soc.* 1994; 115:111.
- [24] Cardoso CMV, Sajo MG. *Acta Bot. Bras.* 2006; 20: 657.
- [25] Fahn A. *Secretory tissues in plants*, London: Academic Press; 1979. p. 302.
- [26] Castro MM, Machado SR. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Gloria B, Carmello-Guerreiro SM (editoras). *Anatomia vegetal*, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2003. p. 438.
- [27] Sakita MN, Aguiar OT, Yatagai M, Igarashi T. *Rev. Inst. Flor.* 1994; 6: 53.
- [28] Bruneton J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Zaragoza: editorial Acribia; 1991. p. 594.
- [29] Boeger MRT, Poulson M. *Acta Bot. Bras.* 2006; 20: 329.

CAPÍTULO 3**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DAS FOLHAS DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) L. R. LANDRUM**

Manuscrito a ser enviado à Revista Química Nova

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) L. R. LANDRUM

Resumo

Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) é uma árvore cujas folhas são utilizadas pela população na culinária e na produção de chás para estados gripais. O presente trabalho apresenta a avaliação da atividade antimicrobiana e a análise da composição química do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* e descreve o estudo químico do extrato em acetato de etila das folhas da mesma espécie. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação das folhas frescas (80g), com rendimento de 1,0%, utilizando o aparelho de Clevenger. A análise do óleo por CG-EM, CG-DIC e pelo Índice de Kovats revelou o eugenol como constituinte majoritário (92,56%) e outros treze componentes, entre eles, (*E*)-cariofileno, metileugenol, terpinen-4-ol e ocimeno. O extrato em acetato de etila das folhas de *P. pseudocaryophyllus* (35g) foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel, do qual foram obtidas as frações hexânica, hexano/diclorometano 50 %, diclorometânica e etanólica. A fração hexânica forneceu um sólido branco, identificado como uma mistura de alcanos de cadeias longas (C₁₁ a C₁₆ e C₃₀ e C₃₃) e uma mistura oleosa contendo eugenol, vitamina E, derivados terpenóides, ácidos carboxílicos, alcoóis, aldeídos e cetonas de cadeias longas. A purificação da fração hexano/diclorometano 50 % resultou no isolamento de mistura de alcanos (C₂₃, C₂₄ e de C₂₇ a C₃₀) e da β-amirina. A fração diclorometânica forneceu também uma mistura de alcanos de cadeias longas e uma outra mistura contendo o ácido ursólico como constituinte principal. Na avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*, foi realizado o teste de autobiografia em cromatoplacas, no qual mostrou atividade contra o fungo *Claudosporium herbarum*. O componente responsável pela atividade foi isolado e identificado como o eugenol. A atividade antifúngica foi avaliada também pelo método de diluição em agar, onde foi verificada a atividade do óleo contra os fungos *Botryosphaeria ribis*, *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium verticillioides* e *Lasioidiplodia theobromae*. Na avaliação da atividade contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, pelo método de microdiluição, o óleo essencial apresentou uma boa atividade contra todos os microrganismos testados. *P. pseudocaryophyllus* apresenta potencial para uso no desenvolvimento de fármacos e de defensivos agrícolas menos agressivos ao ambiente, uma vez que a espécie contém constituintes químicos de reconhecidas atividades biológicas e seu óleo apresentou atividade contra microrganismos prejudiciais à saúde humana e a espécies vegetais de interesse agrônomo.

Palavras-chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*. Atividade antimicrobiana. Eugenol. Ácido ursólico. β-amirina.

Abstract

Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) is a tree whose leaves are used by the population for cooking and production of tea for the flu. This work presents the evaluation of antimicrobial activity and analysis of chemical composition of essential oil of *P. pseudocaryophyllus* and describes the chemical study of the ethyl acetate extract of the leaves of the same species. The essential oil was obtained by hydrodistillation of fresh leaves (80g) with a yield of 1.0%, using the Clevenger apparatus. The oil analysis GC-MS, GC-FID and

the Kowats Index showed eugenol as the major constituent (92.56%) and thirteen other components, among them, (*E*)-caryophyllene, methyleugenol, terpinen-4-ol and o-cymene. The extract in ethyl acetate from leaves of *P. pseudocaryophyllus* (35g) was fractionated by silica gel chromatography column, whose was obtained the hexane, hexane / dichloromethane 50%, dichloromethane and ethanol fractions. The hexanic fraction provided a white solid, identified as a mixture of long-chain alkanes (C₁₁ to C₁₆ and C₃₀ and C₃₃) and an oily mixture containers eugenol, vitamin E, derived terpenoids, carboxylic acids, alcohols, aldehydes and ketones from long chains. The purification of the fraction hexane / dichloromethane 50% resulted in the isolation of a mixture of alkanes (C₂₃, C₂₄ and C₂₇ to C₃₀) and β-amyrin. The dichloromethane fraction also gave a mixture of long-chain alkanes and a mixture containing ursolic acid as the main constituent. In the evaluation of antifungal activity of essential oil of *P. pseudocaryophyllus*, was performed the autobiography test in cromatoplas, in wich showed activity against the fungus *Claudosporium herbarum*. The component responsible for the activity was isolated and identified as eugenol. The antifungal activity was also evaluated by the dilution in agar method, where it was detected the activity of oil against the fungi *Botryosphaeria ribis*, *Botryosphaeria rhodina*, *Fusarium verticillioides* and *Lasiodiplodia theobromae*. In the evaluation of activity against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* by microdilution method, the essential oil showed good activity against all microorganisms tested. *P. pseudocaryophyllus* shows potential for use in the development of pharmaceuticals and agricultural chemicals less harmful to environment, since the species contain chemical constituents of known biological activities and its oil showed activity against microorganisms harmful to human health and plant species of agronomic interest.

Keywords: *Pimenta pseudocaryophyllus*. Antimicrobial activity. Eugenol. Ursolic acid. β-amirina.

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, os metabolitos secundários foram considerados produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades químicas interessantes. No entanto, atualmente é conhecido que varias dessas substâncias estão relacionadas a sobrevivência da planta no ambiente.¹ Os produtos do metabolismo secundário são produzidos através de interações complexas entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Estes processos são governados por genes, sofrendo influencia de três fatores: hereditariedade, ontogenia (estagio de desenvolvimento) e ambiente.²

Alem de serem importantes as próprias plantas, os metabolitos secundários tem sido utilizados pela espécie humana ha muito tempo. As civilizações Oriental e Ocidental tem uma historia rica em exemplos sobre a utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, sendo que as civilizações egípcia, greco-romana e chinesa tiveram maior destaque.³

Estruturas secretoras de óleos essenciais são comuns nos órgãos vegetativos e reprodutivos de espécies da família Myrtaceae.⁴ Esta família apresenta uma distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália, incluindo cerca de 130 gêneros e 4000 espécies. Na flora brasileira, é uma das famílias mais representativas com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies.⁵

A literatura registra estudos de várias espécies do gênero *Pimenta* utilizadas como plantas medicinais. Atividade antibacteriana foi relatada para os óleos essenciais de *Pimenta racemosa* var. *grisea* (Kierskou) Fosberg, que possui propriedade antiinflamatórias, e *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* (Burret) Landrum L. usada no tratamento de reumatismo e dor de dente.⁶

Pimenta racemosa var. *ozua* (P. Miller) J. W. Moore, espécie conhecida pelo nome de ozua na República Dominicana, possui óleo essencial, extraído a partir de folhas, o qual é usado pela população no tratamento de casos de reumatismo, dores de dente, contra estados gripais e dores abdominais. Atividade antiinflamatória tem sido relatada para a espécie com resultados promissores na redução de edemas induzidos em ratos pela aplicação oral e tópica do extrato metanólico das folhas da planta.⁷

Estudos sobre o efeito cardiovascular em ratos, através da administração de extratos etanólicos e aquosos foram realizados com *Pimenta dioica* (L.) Merrill, utilizada no tratamento de pressão alta, alta taxa de glicose no sangue e digestão irregular.⁸

A espécie arbórea *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum ocorre nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás até Santa Catarina, nas regiões de altitude em florestas e caatingas. A espécie é conhecida popularmente como craveiro ou cravo-do-campo nomes provavelmente relacionados ao aroma semelhante ao de cravo-da-índia presente em suas folhas. Estas são utilizadas pela população na produção de chás para estados gripais e na culinária para aromatização de doces caseiros.⁹

Estudos farmacognósticos realizados com folhas de *P. pseudocaryophyllus*, mostraram uma quantidade apreciável de compostos fenólicos, flavonóides e taninos, detectados através de métodos diversos, sugerindo que esta espécie possui um importante potencial fitoterapêutico a ser investigado.¹⁰ Entretanto, não existem relatos na literatura sobre o isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos de extratos de *P. pseudocaryophyllus*. Estudos anteriores relatam a presença de óleo essencial rico em geranial em indivíduos de Campos do Jordão – SP.¹¹

O presente trabalho, portanto, tem como objetivo o estudo químico do extrato em acetato de etila e do óleo essencial das folhas de *P. pseudocaryophyllus* e a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial.

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta da planta

As folhas de *P. pseudocaryophyllus* foram coletadas em 14/02/2007 em um fragmento de vegetação, localizado no Município de São Jerônimo da Serra (23°43'30" S e 50°43'47" W). O material testemunho foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Londrina sob número FUEL 43025. Parte das folhas foi mantida fresca em refrigerador para a extração de óleo essencial e outra parte foi secada em estufa a 45 oC para o preparo do extrato em acetato de etila.

Estudo químico do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*

Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir das folhas frescas (80 g) por hidrodestilação usando o aparelho de Clevenger.¹² Em seguida, o óleo foi separado da água através de extração com três porções de 70 mL de diclorometano. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio, o solvente foi destilado em evaporador rotatório Fisatom para separação do óleo essencial.

Análise do óleo essencial

O óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG) em equipamento Shimadzu modelo GC-17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar DB5 (J&W Scientific) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com vazão de 1,2 mL min⁻¹. As temperaturas estabelecidas para o injetor e detector foram 220 oC e 300 °C, respectivamente. A inicial da coluna foi de 60 oC por 1 min, sendo programada para ter acréscimos de 7 oC por minuto até 320 oC

permanecendo em 320 por 5 min. A amostra de óleo essencial foi solubilizada em diclorometano na proporção de 1:10 e o volume da injeção foi de 2,0µL com razão de split 1:20. Os dados foram coletados com Software CLASS-CR10 Shimadzu. Foi também realizada uma análise em um sistema cromatográfico composto de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, marca SHIMADZU, modelo GC/MS-QP5000 e coluna capilar DB1 (100% polidimetisiloxano) 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme. A análise foi efetuada com injeção de 1,0 µl da amostra, em modo split (1:10). As temperaturas estabelecidas para o injetor e interface foram 300 e 250 °C, respectivamente. A eleição do material foi realizada sob fluxo de 1,5 mL min⁻¹, sendo utilizado hélio como gás de arraste. A rampa da temperatura da coluna foi programada no intervalo de 60 a 320 °C, sendo desenvolvida do seguinte modo: temperatura inicial de 60 °C por 4,0 min, acréscimo de 10 °C min⁻¹ até 250 °C e acréscimo de 20 °C min⁻¹ até 320 °C. O espectrômetro de massa foi configurado nas seguintes condições: temperatura do separador e fonte iônica de 250 °C e energia a 2,2 kV. Os espectros dos constituintes presentes no óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* foram comparados a espectros catalogados na base de dados NIST 62, procedentes do “National Institute of Standards and Technology”, na qual estão registrados os espectros de aproximadamente 62.000 compostos. A partir desses dados foi obtido o índice de Kovats dos componentes do óleo essencial.¹³ Os índices de Kovats (IK) foram calculados a partir de uma curva de calibração de uma série de alcanos (DRH-004S-R1-5X LUFT/LUST), obtida nas mesmas condições das amostras. As concentrações dos componentes do óleo essencial foram determinadas pela análise no cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (DIC), através do cálculo das áreas integrais de seus respectivos picos, relacionados com a área total dos picos de todos os constituintes da amostra.

Estudo químico do extrato das folhas de *P. pseudocaryophyllus*

Obtenção do extrato em acetato de etila

As folhas de *P. pseudocaryophyllus* (561,75g) foram desidratadas em estufa a 40 °C por 15 dias e, em seguida, trituradas. O material vegetal pulverizado foi extraído exaustivamente com acetato de etila a temperatura ambiente. A mistura resultante foi filtrada e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório para obtenção de 35 g de extrato bruto.

Fracionamento do extrato em acetato de etila

O extrato em acetato de etila (25 g) foi cromatografado em coluna (5,6 cm x 25 cm, 150 g) de sílica gel (70-230 mesh) filtrante, eluída com hexano, mistura de hexano/diclorometano 1:1, diclorometano e etanol. Deste fracionamento foram obtidas quatro frações: fração hexânica (2,3 g), fração hexano/diclorometano 50% (1,2 g), fração diclorometânica (0,99 g) e fração etanólica (7,6 g). As frações hexânica, hexano/diclorometano 50% e diclorometânica foram purificadas através de cromatografia em coluna, cromatografia em placas preparativas, recristalização e precipitação. Também foi utilizada a cromatografia de coluna *flash*¹⁴ e os constituintes isolados foram identificados através de métodos espectrométricos usuais (RMN ¹³C/ ¹H, CG-EM, IV).

Análise dos componentes obtidos do extrato em acetato de etila

Os componentes isolados do extrato em acetato de etila das folhas de *P. pseudocaryophyllus* foram analisados em um sistema cromatográfico composto de cromatografo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, marca SHIMADZU, modelo GC/MS-QP5000 e coluna capilar DB1 (100% polidimetisiloxano) 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme. A análise foi efetuada com injeção de 1,0 µl da amostra, em modo split (1:10). As temperaturas estabelecidas para o injetor e interface foram 300 e 250 °C, respectivamente. A eluição do material foi realizada sob fluxo de 1,5 mL min⁻¹, sendo utilizado hélio como gás de arraste. A rampa da temperatura da coluna foi programada no intervalo de 60 a 330 °C, sendo desenvolvida do seguinte modo: temperatura inicial de 60 °C por 4,0 min, acréscimo de 10 °C min⁻¹ até 250 °C e acréscimo de 20 °C min⁻¹ até 330 °C, permanecendo em 330 °C por 10 minutos. O espectrômetro de massa foi configurado nas seguintes condições: temperatura do separador e fonte iônica de 250 °C e energia a 2,2 kV. Os espectros dos constituintes presentes no extrato em acetato de etila de *P. pseudocaryophyllus* foram comparados a espectros catalogados na base de dados NIST 62. A análise das misturas de hidrocarbonetos foi feita através de comparação com padrão de hidrocarbonetos conhecido, comparando-se o índice de Kowats dos componentes da mistura e os do padrão.¹³ Os sólidos obtidos das frações hexano/diclorometano 50 % e diclorometânica foram submetidos ao teste de Lieberman-Burchard para triterpenos e esteróides.¹⁵

β-amirina ((3β)-olean-12-em-3ol) (C₃₀H₅₀O) aspecto físico: sólido branco recristalizado de acetona. EM *m/z* (intensidade relativa): 426(2), 411(1), 218(100), 203(43),

189(14), 175(6), 161(4), 135(8), 107(9), 95(14), 81(12), 69(18), 55(20). IV (KBr) cm^{-1} : 3442, 2918, 2848, 1635, 1473, 1384, 1037, 997, 669. . RMN de ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)]: δ 0,8 a 1,8; δ 3,25; δ 5,18 (t, J=3,5 Hz). RMN de ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: δ 15,6 (C-24); 15,6 (C-25); 17,0 (C-26) 18,5 (C-6); 23,7 (C-11); 23,9 (C-30); 26,1 (C-27); 26,2 (C-15); 27,1 (C-16); 27,3 (C-2); 28,2 (C-23); 28,3 (C-28); 31,2 (C-20); 32,7 (C-17); 32,8 (C-7); 33,2 (C-29); 34,9 (C-21); 37,3 (C-22); 37,7 (C-10); 38,7 (C-1); 38,9 (C-4); 38,9 (C-8); 41,9 (C-14); 46,9 (C-19); 47,4 (C-18); 47,8 (C-9); 55,3 (C-5); 79,2 (C-3); 121,9 (C-12); 145,4 (C-13).

Acido ursólico (acido (3 β)-3-hidroxiurs-12-em-28-oico) ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$) aspecto físico: sólido branco recristalizado de acetona e metanol. IV (KBr) cm^{-1} : 3433, 2925, 2852, 1691, 1458, 1386, 1271, 1029, 997, 667. RMN de ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)]: δ 0,7 a 1,8; δ 3,23 (dd, J=10,6 Hz e 4,8Hz); δ 5,29 (t). RMN de ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: δ 15,4 (C-24); 15,5 (C-25); 16,8 (C-26); 18,4 (C-6); 21,2 (C-30); 23,4 (C-11); 23,5 (C-16); 23,5 (C-27); 27,7 (C-2); 28,0 (C-23); 28,1 (C-15); 30,7 (C-21); 33,1 (C-7); 36,7 (C-22); 37,0 (C-10); 38,5 (C-1); 38,7 (C-4); 38,7 (C-20); 39,1 (C-19); 39,5 (C-8); 42,1 (C-14); 47,7 (C-9); 47,7 (C-17); 52,8 (C-18); 55,4 (C-5); 79,0 (C-3); 125,5 (C-12); 138,2 (C-13); 180,9 (C-28).

Testes de atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com o óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*. O teste da autobiografia foi realizado, utilizando o fungo *Cladosporium herbarum*.¹⁶ O teste da diluição em agar foi realizado com os fungos *Botryosphaeria rhodina*, *Botryosphaeria ribis*, *Fusarium verticillioides* e *Laisiodiplodia theobrome*, que são fungos prejudiciais à agricultura.¹⁷ O teste de microdiluição foi realizado com o óleo essencial, conforme a norma M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS)¹⁸, utilizando as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (8272) e *Staphylococcus aureus* (25923), as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (27853), e as leveduras, obtidas a partir de isolados clínicos, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Teste de atividade antifúngica por autobiografia em cromatoplasmas de sílica gel

O microrganismo *Cladosporium herbarum* foi cultivado em placas de Petri com meio BDA (Batata dextrose agar) e repicado para tubo de ensaio com meio BDA inclinado. O meio de cultivo aplicado nas cromatoplasmas de sílica gel foi constituído de uma solução formada pelos sais KH_2PO_4 (7 g L^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3 g L^{-1}), KNO_3 (4 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g L^{-1}) e Na Cl (1 g L^{-1}), e de solução de glicose 30%. As soluções foram colocadas em tubos de ensaio, sendo que para a solução de glicose foram colocados 2 mL por tubo e para a solução de sais foram colocados 10 mL por tubo. O óleo essencial foi aplicado em duas placas cromatográficas (0,25 mg spot^{-1}), as quais foram eluídas com mistura de hexano/ diclorometano 50 %. Uma das placas foi revelada com vanilina e usada como controle. Na outra placa foram aplicados os esporos do fungo dispersos em 10 mL de solução de sais e 2 mL de solução de glicose 30 %. Em seguida, a placa borrifada com a mistura de esporos do fungo foi colocada em um suporte e este foi deixado em uma câmara de plástico fechada contendo água em seu interior para manter uma alta umidade. O conjunto foi então deixado em estufa a 28 °C por sete dias. Após este período foi realizada a avaliação do crescimento do fungo na placa, comparando a altura dos halos de inibição na placa borrifada com o cromatograma da placa controle revelada com vanilina. O controle positivo para o crescimento do fungo foi realizado com uma placa cromatográfica eluída no mesmo solvente e borrifada com o microrganismo.

Teste de atividade antifúngica por diluição em ágar

Os fungos foram cultivados em meio de BDA 3,0 % por sete dias em estufa a 27,5 °C. Inicialmente placas de Petri de 7 cm de diâmetro, erlemeyers de 50 mL contendo 16 mL de BDA cada um e ponteiras foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. As amostras de óleo foram solubilizadas em acetato de etila obtendo-se uma solução mãe (0,025 g mL^{-1}). Dessas soluções foram tomados diferentes volumes os quais foram colocados em erlemeyers contendo o meio BDA. Em seguida, o material de cada erlemeyer foi vertido em placa de Petri obtendo-se as concentrações de 4,0 mg, 2,0 mg, 1,5 mg, 1,0 mg, 0,5 mg e 0,25 mg de óleo bruto por placa. As placas foram deixadas em repouso até a secagem do meio BDA. Em seguida, com o auxílio de um furador, foram cortados discos de meios de cultivos de manutenção dos fungos testados. Um disco de meio contendo o fungo foi colocado no centro de cada placa. Após a solidificação do meio, foi colocado um disco de

papel filtro no centro de cada placa de Petri e sobre estes foram aplicadas as alíquotas do óleo essencial. As placas foram fechadas e protegidas com filme plástico e incubadas em estufa BDO a 27,5 °C até que a placa de controle atingisse o crescimento completo. Após este tempo, as placas foram analisadas e os diâmetros dos halos de crescimento foram medidos. Os testes foram feitos em triplicata para todos os fungos testados. Paralelamente foram preparadas triplicatas de dois controles, consistindo de placas contendo meio BDA e acetato de etila e outro consistindo placas contendo meio BDA e fungicida Captan.

Teste de microdiluição

As bactérias submetidas aos ensaios antibacterianos foram previamente reativadas em Caldo Mueller Hinton por 18 a 24 horas e as leveduras em meio Sabourad por 24 a 48 horas, ambos em estufa a 37 °C. Após isso, suas concentrações foram padronizadas conforme a escala de McFarland n° 0,5. Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços foram depositados 100 µL de caldo Muller-Hinton para as bactérias, e Sabourad para as leveduras. Na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL de uma solução do óleo essencial em tween 80 a 0,1 g %, de concentração 67 µL. mL⁻¹. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do óleo. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada a escala de McFarland n° 0,5 e diluídos para concentração final de 10⁴ células mL⁻¹. As placas foram seladas com *parafilm* e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5% e a placa foi incubada por mais 3 horas na referida temperatura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato ou óleo capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Foram também incluídos nos testes os controles dos antibióticos vancomicina e ciprofloxacina para as bactérias e nistatina para as leveduras, controle para a confirmação da esterilidade do meio de cultura e controle para confirmação do crescimento dos microrganismos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo químico do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* com rendimento de 0,96 %. Este resultado está de acordo com o verificado na literatura para o gênero *Pimenta*, o qual possui outras espécies produtoras de óleos essenciais, como a *P. racemosa* var. *terebinthina* (0,75 %) e a *P. racemosa* var. *grisea* (0,23 %).¹⁹ O cromatograma indicou a presença de 29 constituintes (Figura 1), dentre esses, o referente ao pico 19 foi o constituinte majoritário com uma concentração de 92,59 %. O espectro de massas do constituinte principal foi idêntico ao espectro do eugenol obtido na base de dados NIST 62 presente no equipamento. A identidade da substância foi confirmada através da comparação entre seu espectro de massas e seu tempo de retenção com o obtido para amostra autêntica de eugenol. Além do eugenol, foram identificados outros treze constituintes a partir do índice de Kovats (Tabela 1) e dos espectros de massas obtidos. Entre os componentes encontrados em concentrações menores estão o (*E*)-cariofileno, o metileugenol, o terpinen-4-ol e o 1,8-cineol, entre outros.

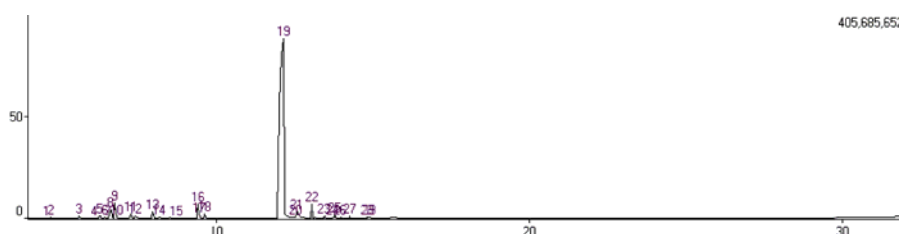


Figura 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Tabela 1 – Componentes do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5.

Substância	IK	IK literatura ¹³	%
β -pineno	958	974	0,15
α -felandreno	999	1002	0,17
<i>o</i> -cimeno	1021	1022	0,73
1,8-cineol	1029	1026	0,38
β -ocimeno	1060	1044	0,10
terpinoleno	1105	1086	0,42
linalol	1118	1095	0,12
terpinen-4-ol	1195	1174	0,79
<i>p</i> -cimen-8-ol	1198	1179	0,30
α -terpinol	1208	1186	0,26
eugenol	1366	1356	92,59
metileugenol	1393	1403	0,99
(<i>E</i>)-cariofileno	1422	1417	0,60
germacreno D	1468	1484	0,13
Total identificado			97,73

A literatura registra outros estudos sobre óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*, os quais revelaram diferentes composições para os óleos de espécimes de diferentes localidades. Um estudo feito com dois espécimes coletados em duas localidades do Estado de São Paulo mostrou resultados diferentes na composição dos óleos. O óleo essencial do espécime coletado na Ilha do Cardoso apresentou como principal componente o eugenol (71,9%), enquanto que o óleo essencial do espécime coletado em Paranapiacaba apresentou como constituinte majoritário o 4-metileugenol (94,6%).²⁰

Analises do óleo essencial de espécimes de *P. pseudocaryophyllus* coletada em Campos do Jordão, estado de São Paulo, identificaram o geranial (34,26%) e o neral (27,85%) como constituintes principais. Além do geranial, foram identificados vários outros componentes, alguns também encontrados no presente estudo, como o cariofileno, o terpinen-4-ol, o linalol, o terpinoleno, o 1,8-cineol e o β -pineno.¹¹

Estudos com *P. dioica*, espécie utilizada por suas propriedades antimicrobianas, também revelaram o eugenol como principal constituinte do óleo essencial da espécie.²¹ Por outro lado o óleo essencial de *P. racemosa* var. *terebinthina* apresentou como principais constituintes o acetato de α -terpinol, o α -terpinol e o 4-metoxieugenol, enquanto que o 4-metoxiisoeugenol foi identificado como constituinte majoritário de *P. racemosa* var. *grisea*.¹⁹

Estudo químico do extrato das folhas

Fração hexânica

A partir dessa fração foi obtido um material branco, que apresentou uma única mancha em placa cromatográfica de sílica gel e, por isso, foi analisado diretamente por espectrometria de infravermelho e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O cromatograma do material, entretanto, evidenciou que o mesmo tratava-se de uma mistura de vários componentes (Figura 2). Os espectros de massas dos constituintes referentes aos picos 2, 4, 6, 8, 12 e 14 apresentaram um padrão de fragmentação característico de hidrocarbonetos de cadeia longa, com grupos de pico separados entre si por 14 unidades; a comparação com os espectros da biblioteca do cromatógrafo também sugeriu a presença destes constituintes.

A identificação da mistura foi feita através da comparação com um padrão de hidrocarbonetos conhecido (DRH-004S-R1-5X LUFT/LUST). A amostra e o padrão de hidrocarbonetos foram injetados nas mesmas condições, os índices de Kovats foram calculados e comparados. Os hidrocarbonetos foram identificados como uma mistura de alcanos C_{11} a C_{16} e C_{30} e C_{33} , através da interpolação em uma curva obtida pelos tempos de retenção versus número de carbonos de padrões de alcanos (Figura 3). Para os picos 9 e 10, os espectros da biblioteca NIST sugeriram a presença de alcoóis de cadeia longa. Outros possíveis componentes da mistura são: Cariofileno (pico 1) e hidrocarbonetos insaturados de cadeia longa (picos 5, 7, 11 e 13). O espectro no infravermelho foi característico de substância alifática por apresentar bandas em 2931 e 2852 cm^{-1} . O espectro evidenciou também a presença de insaturação, pela banda em 1639 cm^{-1} , e de possíveis grupos hidroxilas, pela banda larga centrada em 3431 cm^{-1} .

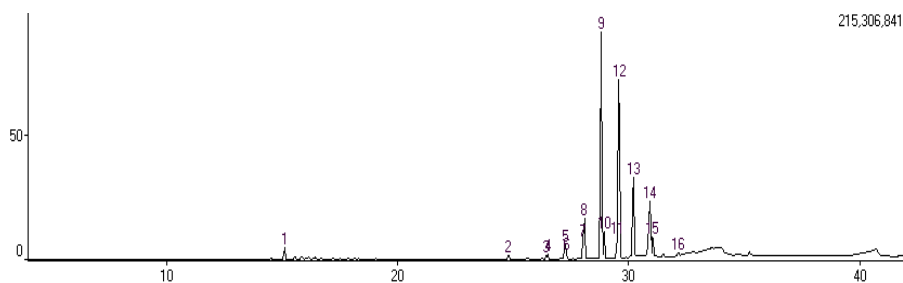


Figura 2 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração hexânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

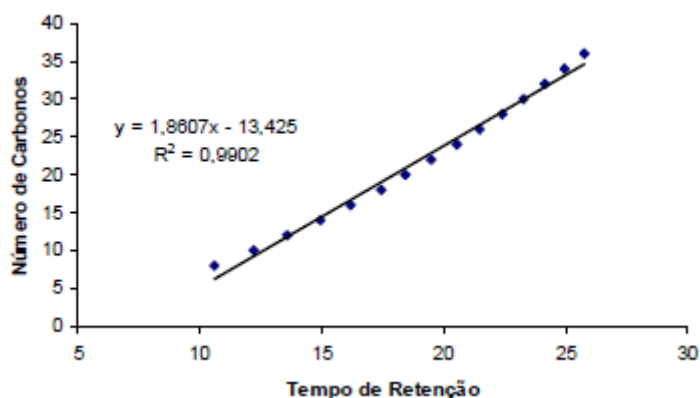


Figura 3 – Correlação entre o número de carbonos e o tempo de retenção do padrão de hidrocarbonetos utilizado na comparação com a mistura de hidrocarbonetos da fração hexânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Foi obtido também um grupo de frações oleosas, cuja análise por cromatografia em camada delgada revelou tratar-se de mistura complexa de constituintes de difícil separação pelos métodos usuais. As amostras foram submetidas a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, a qual confirmou tratar-se de misturas complexas como as que caracterizam óleos essenciais. Os espectros de massas dos componentes mostraram que os grupos de frações oleosas apresentam constituintes químicos comuns que diferem na concentração em que aparecem em cada grupo. Entre os constituintes possíveis destas misturas encontram-se, entre outros, eugenol, vitamina E, derivados terpenóides e ácidos carboxílicos, alcoóis, aldeídos e cetonas de cadeias longas.

Fração hexano/diclorometano 50%

Similar ao ocorrido na fração hexânica, o produto obtido nesta fração foi submetido a espectrometria no infravermelho e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O cromatograma do material mostrou constituintes com um padrão de fragmentação característico de hidrocarbonetos de cadeia longa (Figura 4). A comparação com os espectros da biblioteca do cromatógrafo também sugeriu a presença destes constituintes. Foi feita a comparação com padrões de hidrocarbonetos, como citado anteriormente para a mistura de hidrocarbonetos obtida da fração hexânica, mostrando a presença dos alcanos C_{23} , C_{24} e de C_{27} a C_{30} .

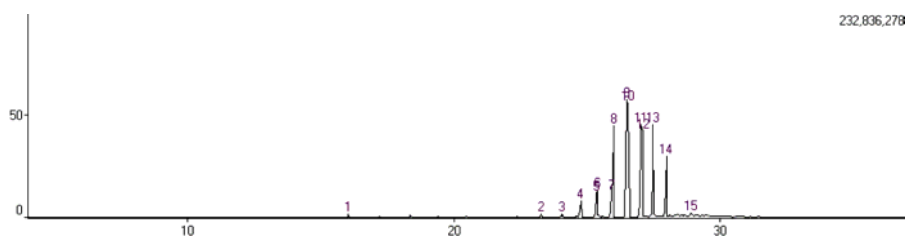


Figura 4 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração hexano/diclorometano 50% obtida do extrato em acetato de etila das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

O outro constituinte isolado desta fração consistiu de um sólido branco, que ao ser submetido ao Teste de Lieberman-Burchard, apresentou resultado positivo para triterpeno pentacíclico. A amostra ao ser submetida a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas apresentou cromatograma que evidenciou a presença de três constituintes (Figura 5). O constituinte principal (pico 2) forneceu um espectro de massas idêntico ao espectro de massas da β -amirina da biblioteca NIST do equipamento, apresentando pico do íon molecular de 426 u e pico base em 218 u característico de núcleo oleano. O espectro de infravermelho também foi compatível com a estrutura da β -amirina, apresentando bandas 3442 cm^{-1} , característica de grupo hidroxila, 2918 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} e 1473 cm^{-1} , características de substâncias alifáticas e banda em 1635 cm^{-1} , correspondente ao estiramento axial de ligação dupla carbono-carbono. O espectro de RMN de ^1H apresentou vários picos na faixa de δ 0,8 a 1,8, característico de hidrogênios metílicos e metilênicos de triterpenos. O sinal complexo em δ 3,25 pode ser atribuído a hidrogênio carbinólico de triterpeno pentacíclico. O tripleto em δ 5,18 ($J=3,5\text{ Hz}$) por sua vez, pode ser atribuído ao hidrogênio vínilico ligado ao carbono 12 da β -amirina. A confirmação da presença da β -amirina foi obtida através da comparação dos dados de RMN de ^{13}C da amostra com os dados registrados na literatura para a β -amirina (Tabela 2). Os sinais em δ 121,9 e δ 145,4 foram atribuídos aos carbonos C_{12} e C_{13} da ligação dupla. O sinal do carbono carbinólico (C_3) aparece em delta δ 79,2. Na maioria dos casos, a β -amirina é isolada em mistura com a α -amirina, entretanto, observa-se neste caso a ausência do pico em δ 139,3 referente ao C_{13} da α -amirina. Este pico diferencia a alfa e a β -amirina, uma vez que, na estrutura da α -amirina, o carbono C_{13} sofre o efeito de proteção do grupo metila em C_{19} , efeito este ausente no C_{13} da β -amirina, cujo deslocamento ocorre em δ 145,4 (Figura 6). A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C também demonstrou a existência de outros constituintes, porém os dados apresentados não deixam dúvida que o principal constituinte trata-se da β -amirina (pico 2).

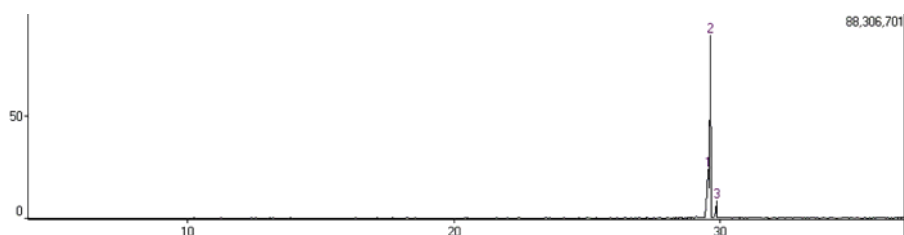


Figura 5 – Perfil cromatográfico da β -amirina obtida da fração hexano/diclorometano 50% obtida do extrato em acetato de etila das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

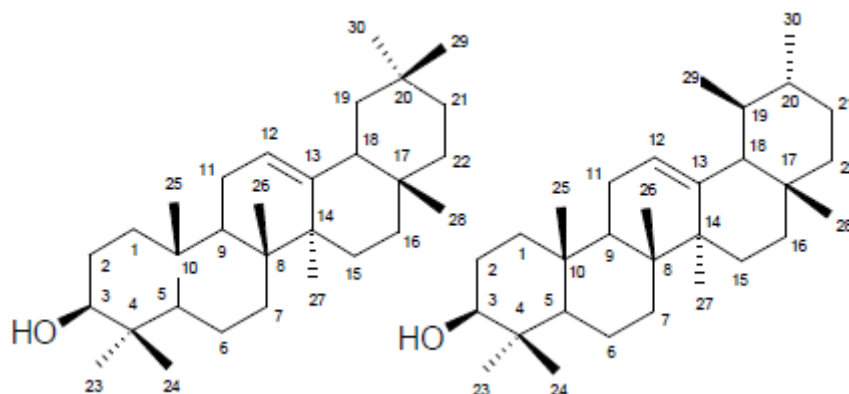


Figura 6 – Estrutura química da β - amirina, obtida a partir da fração hexano/diclorometano 50% extraída de folhas de *Pimenta pseudocariophyllus* e comparação com a α -amirina.

Tabela 2 – Comparação entre os deslocamentos químicos de Ressonância magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) em CDCl_3 da amostra identificada como β - amirina ($\delta 1$) obtida da fração hexano/diclorometano 50 % extraída das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* e dados da literatura ($\delta 2$).²²

Carbono	$\delta 1$	$\delta 2$	Carbono	$\delta 1$	$\delta 2$
1	38,7	38,7	16	27,1	27,0
2	27,3	27,3	17	32,7	32,5
3	79,2	79,0	18	47,4	47,4
4	38,9	38,8	19	46,9	46,9
5	55,3	55,3	20	31,2	31,1
6	18,5	18,5	21	34,9	34,8
7	32,8	32,8	22	37,3	37,2
8	38,9	38,8	23	28,2	28,2
9	47,8	47,7	24	15,6	15,5
10	37,7	37,6	25	15,6	15,6
11	23,7	23,6	26	17,0	16,9
12	121,9	121,8	27	26,1	26,0
13	145,4	145,1	28	28,3	28,4
14	41,9	41,8	29	33,2	33,3
15	26,2	26,2	30	23,9	23,7

A β -amirina foi relatada também em folhas de *Ricinus communis* L.²³, em *Vernonia tweediana* Baker²⁴ e em *Aleurites moluccana* L. Willd., cuja fração hexânica

apresentou propriedades analgésicas.²⁵ Essa substância foi relatada também em *Marlierea tomentosa* Camb. (Myrtaceae), onde foi isolada das folhas.²⁶

Fração Diclorometano

Foi obtido desta fração um material branco, que ao ser submetido a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, mostrou-se tratar de uma mistura de hidrocarbonetos (Figura 7). A amostra foi comparada com um padrão de hidrocarbonetos, da mesma forma que foi feito com a mistura de hidrocarbonetos obtida da fração hexânica, mostrando a presença de hidrocarbonetos de 26, 27, 29, 30 e 33 carbonos.

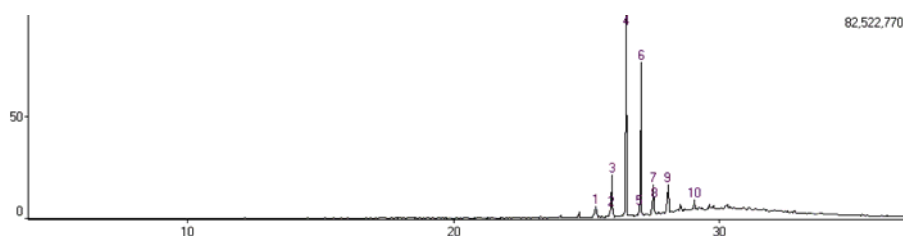


Figura 7 – Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos da fração diclorometânica obtida do extrato em acetato de etila das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

O principal constituinte dessa fração consistiu de um sólido branco amorfo, cujo teste de Lieberman-Burchard apresentou um resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. O constituinte apresentou o mesmo valor de R_f de amostra autêntica de ácido ursólico ao ser comparado em cromatoplaça de sílica gel. O espectro de infravermelho evidenciou a natureza alifática da substância através das bandas em 2925 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 1458 cm^{-1} . As bandas centradas em 3433 cm^{-1} e em 1691 cm^{-1} foram características de grupos hidroxila e carbonila respectivamente. Observa-se que a banda de hidroxila apresenta-se bastante alargada, sugerindo a presença de grupo carboxílico. A banda em 1635 cm^{-1} evidenciou a presença de ligação dupla carbono-carbono. O espectro de RMN de ^1H também confirmou a presença de instauração pelo tripleto largo em δ 5,29 compatível com o sinal do H-12 do ácido ursólico (Figura 8). O duplo duplete em δ 3,23 ($J=10,6\text{ Hz}$ e $4,8\text{ Hz}$) foi característico de hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. O espectro de RMN de ^{13}C também foi compatível com o espectro do ácido ursólico (Tabela 3), apresentando os sinais em δ 180,9, referente ao grupo carbonila, em δ 125,5 e δ 138,2 referente aos carbonos C_{12} e C_{13} da ligação dupla e em δ 79,0 referente ao carbono carbinólico. Ambos os espectros de

RMN de H e de C apresentam outros picos além dos atribuídos ao ácido ursólico indicando a presença de outros componentes na amostra.

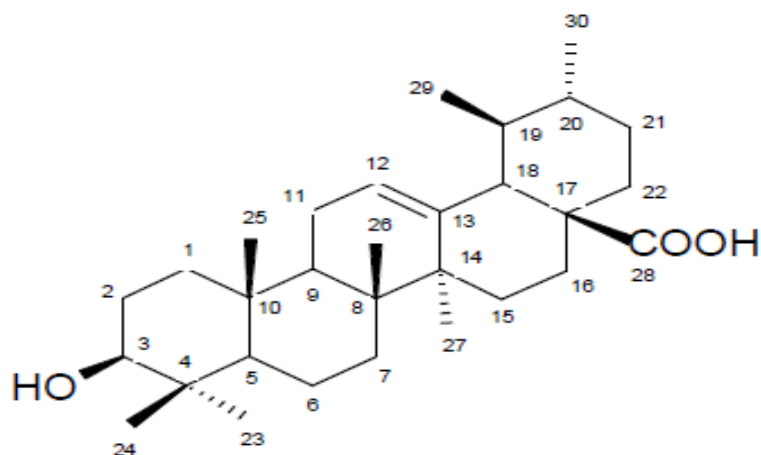


Figura 8 – Estrutura química do ácido ursólico, obtido a partir da fração diclorometano extraída de folhas de *Pimenta pseudocariophyllus*.

Tabela 3 – Comparação entre os deslocamentos químicos de Ressonância magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) em CDCl_3 da amostra identificada como ácido ursólico (δ_1) obtida da fração diclorometânica extraída das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* e dados da literatura (δ_2).²⁷

Carbono	δ_1	δ_2	Carbono	δ_1	δ_2
1	38,5	39,2	16	23,5	25,0
2	27,7	28,2	17	47,7	48,1
3	79,0	78,2	18	52,8	53,6
4	38,7	39,6	19	39,1	39,5
5	55,4	55,9	20	38,7	39,4
6	18,4	18,8	21	30,7	31,1
7	33,1	33,7	22	36,7	37,4
8	39,5	40,1	23	28,0	28,8
9	47,7	48,1	24	15,4	16,5
10	37,0	37,5	25	15,5	15,7
11	23,4	23,7	26	16,8	17,5
12	125,5	125,7	27	23,5	24,0
13	138,2	139,3	28	180,9	179,7
14	42,1	42,6	29	16,8	17,5
15	28,1	28,8	30	21,2	21,4

O ácido ursólico é uma substância de grande interesse na medicina por apresentar diversas propriedades, tais como antiinflamatória, antineoplásica, antivirótica, antimicrobiana, antiparasitária e hepatoprotetora.^{28, 29}

Estudos químicos em *Peltodon radicans* Pohl (Lamiaceae), espécie utilizada no tratamento de mordida de cobras, mostraram a presença de hidrocarbonetos alifáticos, β -amirina e ácido ursólico, entre outros componentes nos extratos da espécie. Segundo os autores, o extrato das flores foi o que apresentou maior atividade.³⁰ Ácido ursólico e outros

triterpenos como o ácido oleanólico são relatados também nas folhas de *Terminalia glabrescens* Mart. (Combretaceae).³¹

Diversas lignanas e triterpenos, entre eles o ácido ursólico, foram identificados em estudo com o extrato das partes aéreas de *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley (Lamiaceae). No mesmo estudo os autores observaram grande atividade citotóxica do extrato frente a linhagens de células tumorais.³²

O ácido ursólico tem sido isolado em espécies da família Myrtaceae, como em caules de *Eugenia florida* DC³³, em folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam.²⁹, em folhas de *Melaleuca leucadendron* L.³⁴ e em culturas de células de *Eucalyptus perriniana* F. Muell ex. Rodway.³⁵ Ácido ursólico foi também isolado em *Eugenia malaccensis* L. em estudo químico da casca do caule e das folhas. No mesmo trabalho o autor relata uma boa atividade moluscicida dos extratos sobre *Biomphalaria glabrata* Say.³⁶

Testes biológicos

No teste de autobiografia, o óleo essencial apresentou uma mancha concentrada com atividade acentuada contra o *Cladosporium herbarum*, correspondente ao eugenol e uma mancha menos concentrada mais próxima a origem, que também apresentou atividade contra o fungo testado, mostrando que há mais de um componente ativo no óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*. Faria et al., num estudo do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. obtiveram resultado semelhante neste teste, onde foi observada uma mancha mostrando grande atividade contra *C. herbarum*, a qual foi identificada como eugenol.¹²

No teste de atividade antifúngica com fungos fitopatógenos, o óleo de *P. pseudocaryophyllus* apresentou boa atividade nas maiores concentrações testadas, inibindo de 40 a 80% o crescimento de *Botryosphaeria rhodina* e *Fusarium verticillioides* e até 40% do crescimento micelial dos demais fungos testados (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagens de inibição promovida pelo óleo essencial das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre o crescimento de fungos: grau de inibição menor que 10% (-), grau de inibição entre 10 e 20% (\pm), grau de inibição entre 20 e 40% (+), grau de inibição entre 40 e 80% (++) e grau de inibição igual ou maior que 80% (+++).

Fungo	Óleo essencial (mg placa ⁻¹)					
	4,0	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	++	+	+	+	-	-
<i>Botryosphaeria ribis</i>	\pm	-	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	++	+	+	\pm	-	-
<i>Lasiodiplodia theobrome</i>	+	-	-	-	-	-

No teste de microdiluição com bactérias e leveduras, o óleo apresentou uma melhor atividade, com uma boa inibição em pequenas concentrações (Tabela 5).

Entre as bactérias testadas, a *P. aeruginosa* foi a que apresentou maior resistência, com CIM de 66 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, a maior concentração presente na microplaca. Nesta concentração o óleo essencial foi bactericida para *P. aeruginosa*. Para o *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus* foram encontrados CIMs com o mesmo valor, 17 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo esse valor bacteriostático para *E. coli* e bactericida para os demais microrganismos.

Com relação as leveduras, o óleo essencial foi fungicida para todas as espécies testadas, apresentando CIMs com valores baixos para as três espécies de *Candida*. Em um estudo da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *P. racemosa* Var. *terebinthina* e a *P. racemosa* var. *grisea*, foi observada uma atividade maior do óleo de *P. racemosa* var. *terebinthina*. Os autores atribuíram essa maior atividade ao fato do óleo dessa variedade apresentar uma elevada concentração de 4-metoxi isoeugenol.⁶ Em outro estudo foi relatada a CIM para eugenol de 2. 103 mg. L⁻¹ frente a *Candida albicans*.³⁷

Estudos sobre a atividade do óleo essencial de dois espécimes de *Pimenta pseudocaryophyllus* mostraram CIM contra *E. coli* de 48 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ para o espécime da Ilha do Cardoso. Entretanto contra *C. albicans*, o espécime coletado próximo a nascente do Rio Paranapicaba apresentou um CIM melhor (24 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) que o primeiro. Os autores atribuem essa diferença de atividade a composição diferente dos óleos essenciais dos espécimes, considerando que o primeiro espécime apresentou o eugenol como componente majoritário e o segundo espécime apresentou majoritariamente o 4-metileugenol.¹⁹ No presente trabalho, foram obtidos melhores resultados com as espécies de *Candida* quando comparados aos resultados com as bactérias, provavelmente devido a presença de grande quantidade de eugenol entre outros componentes, no óleo essencial além do eugenol.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Microrganismo	CIM ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)	Atividade do óleo
<i>Bacillus subtilis</i>	17	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	Bactericida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66	Bactericida
<i>Escherichia coli</i>	17	Bacteriostático
<i>Candida albicans</i>	4	Fungicida
<i>Cândida krusei</i>	4	Fungicida
<i>Cândida tropicalis</i>	8	Fungicida

CONCLUSÕES

Pimenta pseudocaryophyllus apresenta potencial para uso no desenvolvimento de fármacos e de defensivos agrícolas menos agressivos ao ambiente, uma vez que a espécie contém constituintes químicos de reconhecidas atividades biológicas (eugenol, ácido ursólico e β -amirina) e seu óleo apresentou atividade contra microrganismos prejudiciais à saúde humana e a espécies vegetais de interesse agrônomo.

REFERÊNCIAS

- 1 Santos, R. I.; *Metabolismo Básico e Origem dos Metabolitos Secundários. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; org.; Ed. Universidade UFRS / Ed. da UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, 1999, p. 821.
- 2 Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E.; *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*, Editorial Premier: São Paulo, 1997, p. 372.
- 3 Viegas, C. J.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; *Quim Nova* **2006**, 29, 326
- 4 Metcalfe, C. R.; Chalk, L.; *Anatomy of Dicotyledons*, vol. 1. Oxford: Claredon Press; 1979. p. 294.
- 5 Souza, V. C.; Lorenzi, H.; *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2005, p. 640.
- 6 Saenz, M.T.; Tornos, M.P.; Alvarez, A.; Fernandez, M. A.; Garcia, M.D.; *Fitoterapia* **2004**, 75, 599.
7. Fernandez, A.; Alvarez, A.; Garcia, M. D.; Saenz, M. T.; *IL Fármaco* **2001**, 56, 335.
- 8 Suarez, A., Ulate, G., Ciccio, J. F.; *J. Ethnopharmacol.* **1997**, 55, 107.
- 9 Lorenzi, H.; *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 2th ed., Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2002, vol. 2, p. 352.
- 10 Paula, J. A. M.; Paula, J. R.; Bara, M. T. F.; Rezende, M. H.; Ferreira, H. D.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2008**, 18, 265.
- 11 Sakita, M. N.; Aguiar, O. T.; Yatagai, M.; Igarashi, T.; *Rev. Inst. Flor.* **1994**, 6, 53.
- 12 Faria, T. J.; Ferreira, R. S.; Yassumoto, L.; Souza, J. R. P.; Ishikawa, N. K.; Barbosa, A. M.; *Braz. Arch. Biol. Techn.* **2006**, 49, 967.
- 13 Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Illinois, 2007, p. 804.
- 14 Still, W. C.; Kahn, M. & Mitra, A.; *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923.
- 15 Matos, F. J. A.; *Introdução à Fitoquímica Experimental*, Edições UFC: Fortaleza, 1988, p.128.
- 16 Homans, A.L.; Funchs, A.; *Journal of Cromatography* **1970**, 51, 327
- 17 Quiroga, E. N.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 74, 89.
- 18 NCCLS; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 6th ed. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). Wayne, USA, 2003.

- 19 Garcia, D.; Alvarez, A.; Tornos, P.; Fernandez, A.; Saenz, T.; *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2002**, 57, 449.
- 20 Lima, M. E. L.; Cordeiro, I.; Young, M. C. M.; Sobra, M. E. G. & Moreno, P. R. H.; *Pharmacologyonline* **2006**, 3, 589.
- 21 Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Casu, R.; Pierucci, P.; *J. Essent. Oil Res.* **2005**, 17, 530.
- 22 Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, 37, 1517.
- 23 Rodrigues, R. F. O.; Oliveira, F.; Fonseca, A. M.; *Revista Lecta* **2002**, 20, 183.
- 24 Zanon, R. B.; Pereira, D. F.; Boschetti, T. K.; Santos, M.; Athayde, M. L.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2008**, 18, 226.
- 25 Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 680.
- 26 Messias, K. L. S.; Campos-Buzzi, F.; Fischer, L. G. O.; Malheiros, A.; Monache, F. D.; Cchinel Filho, V.; *Química Nova* **2008**, 31, 1747.
- 27 Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O.; *Magn. Reson. Chem.* **2003**, 41, 636.
- 28 Lacikova, L.; Abdel-Hamid, M. E.; Novotny, L.; Masterova, I.; Grancai, D.; *Chromatographia* **2006**, 63, 117.
- 29 Frighetto, N.; Welendorf, R. M.; Silva, A. M. P.; Nakamura, M. J.; Siani, A. C.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2005**, 15, 338.
- 30 Costa, H. N. R.; Santos, M. C.; Alcântara, A. F. C.; Silva, M. C.; Franca, R. C.; Pilo-Veloso, D.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 744.
- 31 Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Miguel, D. L. S.; Serea, A. A. T.; Prado, F. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 461.
- 32 David, J. P.; Silva, E. F.; Moura, D. L.; Guedes, M. L. S.; Assunção, R. J.; David, J. M.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 730.
- 33 Junges, M. J.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Fernandes, M. F. G. S.; Filho, E. R.; Fruhauf, M.; Baranano, A. G.; *Rev. Pesq. Pós-graduação* **2000**, 1, 13.
- 34 Lee, C.; *Phytochemistry* **1998**, 49, 1119.
- 35 Furuya, T.; Orihara, Y.; Hayashi, C.; *Phytochemistry* **1987**, 26, 715.
- 36 Oliveira, A. M.; Humberto, M. M. S.; Silva, J. M.; Rocha, R. F. A.; Sant'ana, A. E. G.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2006**, 16, 618.
- 37 Chami, F.; Chami, N.; Bennis, S.; Trouillas, J.; Remmal, A.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2004**, 54, 909.

ANEXOS

ANEXO A - Normas de Publicação- Revista Fitoterapia

Fitoterapia is a Journal dedicated to medicinal plants and to bioactive natural products of plant origin. It publishes original contributions into these seven major areas:

1. Characterization of active ingredients of medicinal plants;
2. Development of standardization method for bioactive plant extracts and natural products;
3. Identification of bioactivity in plant extracts;
4. Identification of targets and mechanism of activity of plant extracts;
5. Production and genomic characterization of medicinal plants biomass;
6. Chemistry and biochemistry of bioactive natural products of plant origin;

Article critically reviewing the historical, clinical and legal status of medicinal plants and accounts on topical issues are also welcomed. Contributions reporting

1. Activity data on crude extracts that have not been characterized by analysis of their major constituents (HPLC, NMR)
2. Unexceptional and predictable bioactivity (antioxidant properties of phenolics or antibacterial activity of essential oil)
3. Uncritical ethnopharmacological investigations, where a list of plants and their use are simply recorded are not normally considered for publication.

The following immediate rejection criteria apply:

RULE 1: The manuscript does not fall into any of the areas of interest of the Journal;

RULE 2: The manuscript is too preliminary, reporting e.g. activity data without comparison to a reference, or without a positive control;

RULE 3: The botanical source is not clearly identified, authenticated, and documented (voucher);

RULE 4: Bioactivity is not relevant to *in vivo* situations. The journal accepts Reviews, Full Papers and Book Reviews.

Submission

All contributions must be submitted in English and follow the specific submission requirements stated below.

Authors should submit their manuscripts electronically by using the Elsevier submission site at <http://ees.elsevier.com/fitote>

Email and print manuscript submission are discontinued.

After registration, authors will be asked to upload their manuscript and associated artwork. Full instructions on how to use the online submission tool are available at the web address listed above. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned below, that it is written in good English, includes the electronic version and that the manuscript meets the *Fitoterapia* standard and scope.

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the preliminary pages of the journal issue.

It is expected from the authors that they submit only data that have arisen from animal experimentation carried out in an ethically proper way by following guidelines as set by the World Health Organization. The Editor will not accept manuscripts which violate these principles.

Manuscripts should be neatly typed, double spaced throughout, including tables, on pages of uniform size with at least 3 cm margins on all sides. Authors should not break or hyphenate words at the end of the sentence. Words like anti-inflammatory can have a hyphen. Footnotes in text are not permitted.

Submission requirements:

All manuscripts (Reviews, Full Papers) must include:

- 1 Title, author(s) and address(es):**Title: The title must be as brief as possible, comprehensive and descriptive. Each author must provide: forename, initials of other forenames, surname, and address. The Corresponding Author (one only) **must** be marked with an asterisk, **must** include *Email address* and **is** listed first. Additionally the corresponding author must include telephone, fax and an indication where proofs should be sent.
- 2 Abstract:** An abstract should be included at the beginning of the manuscript. This abstract should be factual, not descriptive, and should present the reason of the study, the main findings, and principal conclusions. The abstract should contain no more than 120 words.
- 3 Keywords:** 3-6 keywords are to be assigned by the authors. These keywords should be typed at the end of the abstract.

Reviews are full-length state-of-the-art articles. When submitting a Review, authors are requested to consult with the Editor in advance.

Full Papers should be divided into labelled sections -- Introduction, Experimental, Results and Discussion. The section Experimental should include concise details on the methodology adopted, sufficient to repeat the experiment. Methods for which adequate reference can be cited are not to be described.

Extracts and/or fractions tested for *in vitro* or *in vivo* biological activities should be chemically defined, identifying and quantitating either their major constituents or their marker constituents. Authors are required to include:

- (i) the chemical structure/s, formula/ae and proprietary name/s of new compound/s. Authors are requested to specify the database and the years of coverage on which the novelty status is claimed.

Physical and spectral data of a new compound should be reported according to the following example: Name, mp 233°C (MeOH); $[\alpha]_{20}^D +41^\circ$ (concentration, solvent); UV max

(solvent):225 (log ϵ 4.14), 278 (3.61) nm; IR bands (KBr, solvent, nujol): 3530, 1740, 1623 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (MHz, solvent): δ :0.90 (3H, *b*, *J* 7 Hz), 4.60 (^1H , *bs*), 7-7.2 (4H, *m*), etc; $^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, solvent): 77.9 (C-2), 171.6 (-C=O), 60.8 (-OCH₂-), 14.0 (-CH₃), 132.4 (C-1'), 78.5 (C-1''), etc. Otherwise, preferable : $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data : see Table 1. EIMS *m/z*: 354 [M]⁺(84), 339 (18), 295 (100) or Positive FAB-MS: *m/z* 543 [M+ Na]⁺ (C₂₄H₄₀O₁₂Na⁺) or HREIMS *m/z* : 442.3798 [M] Calc. for C₃₀H₅₀O₂ 442.1290 or HRFABMS *m/z*: 330.1700 [M+H]. Calc.for C₁₉H₂₄ N O₄330.1688 etc. Elemental analysis: C, 71.08; H, 7.42; N, 7.93. Calc. for C₂₁H₂₆N₂O₅: C, 71.16; H, 7.39; N, 7.91.

- (ii) the w/w yield of prepared extracts and fractions or isolated compounds in terms of starting crude plant material;
- (iii) complete formulation details of all crude drug mixtures;
- (iv) investigated plant parts (fresh or dried drug), site and period of harvest, authentication and, in case of less well known plants, voucher herbarium specimen number and name of the herbarium institution where it has been deposited. When first cited, plants must be fully identified as in the following illustration: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. *albus* Pich. (Apocynaceae).

Contributions may include tables, figures, formulae, photographs or slides. Excessive use of tables, diagrams, etc. should be avoided.

Preparation of Tables, Figures and Illustrations

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

References should be referred to by a number [1] in the text and be listed according to this numbering at the end of the paper. Only papers and books that have been published or in press may be cited; unpublished manuscripts or manuscripts submitted to a journal but which have not been accepted may not be cited.

Abbreviations for journal names should conform to those in the Bibliographic Guide for Editors and Authors (American Chemical Society, Washington, D.C.). The style and punctuation of the references should conform to the following examples:

Journals:

- [1] Britton EB. J Ethnopharmacol 1984;12:331.
- [2] Yadav AK, Tandon V, Rao HSP. Fitoterapia 1992;63:395.

Books:

- [3] Perry LM. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Cambridge, Massachusetts, and London: The MIT Press, 1980. p. 358.

Multiauthor Books:

- [4] Nomura T, Fukai T. Phenolic constituents of licorice (*Glycyrrhiza* species). In: Herz W, Kirby G, Moore RE, Steglich W, Tamm CH, editors. Progress in the chemistry of organic natural products, vol 73. Vienna: Springer, 1998. p. 1.

Electronic documents (articles in press):

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document particularly "Articles in press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows:

doi:10.1016/j.fitote.2004.03.013

Articles in Special Issues: Please ensure that the words 'this issue' are added (in the list and text) to any references to other articles in this Special Issue.

Physical and spectral data of a new compound should be reported according to the following example: Name, mp 233°C (MeOH); $[\alpha]_{20}^D +41^\circ$ (concentration, solvent); UV max (solvent):225 (log ϵ 4.14), 278 (3.61) nm; IR bands (KBr, solvent, nujol): 3530, 1740, 1623 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (MHz, solvent): δ :0.90 (3H, *b*, *J* 7 Hz), 4.60 (^1H , *bs*), 7-7.2 (4H, *m*), etc; $^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, solvent): 77.9 (C-2), 171.6 (-C=O), 60.8 (-OCH₂-), 14.0 (-CH₃), 132.4 (C-1'), 78.5 (C-1''), etc. Otherwise, preferable : $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data : see Table 1. EIMS *m/z*: 354 [M]⁺(84), 339 (18), 295 (100) or Positive FAB-MS: *m/z* 543 [M+ Na]⁺ (C₂₄H₄₀O₁₂Na⁺) or HREIMS *m/z* : 442.3798 [M] Calc. for C₃₀H₅₀O₂ 442.1290 or HRFABMS *m/z*: 330.1700 [M+H]. Calc.for C₁₉H₂₄ N O 4330.1688 etc. Elemental analysis: C, 71.08; H, 7.42; N, 7.93. Calc. for C₂₁H₂₆N₂O₅: C, 71.16; H, 7.39; N, 7.91.

Copyright guidelines for authors

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Authors' rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments

(including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/fitote>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

These instructions to authors may also be found at <http://authors.elsevier.com/locate/fitote>

AUTHOR ARTWORK INSTRUCTIONS

Help us reproduce your artwork to the highest possible standards - in both paper and digital formats

Submitting your illustrations, pictures, tables and other artwork (such as multimedia and supplementary files) in an electronic format helps us produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail. These pages show how to prepare your artwork for electronic submission and include information on common problems, suggestions on how to ensure the best results, and image creation guides for popular applications. See the links under Application Guidelines for details about using specific artwork software for Windows and Macintosh platforms.

Checklist

Before you send us your artwork, make sure you can answer 'yes' to the following:

- My files are in the correct format - TIFF, EPS or PDF. MS Office files (Word, Powerpoint, Excel) are also accepted, provided they meet certain conditions. For more information, see File Formats.
- My color images are provided in the RGB colorspace.
- The physical dimensions of the artwork match the dimensions of the journal to which I am submitting.
- The lettering used in the artwork does not vary too much in size. See Sizing of Artwork.
- I have used the recommended naming conventions. See File Naming.

If you are delivering your artwork on disk:

- All illustrations are provided as separate files and as hardcopy on separate sheets.
- All artwork is numbered according to its sequence in the text.
- Figures, schemes and plates have captions and these are provided on a separate sheet along with the manuscript, in addition all figures are referred to in the text.
- If required, I have specified the preferred magnification factor of my artwork on the sheet with filenames that accompany the disk.

My artwork is on a 3.5" disk, CD-ROM, ZIP disk or JAZ disk. See Acceptable Media.

ANEXO B - Normas de Publicação - Química Nova

GERAL Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão destinados a apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no Máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato .pdf, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de *QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (gráficos, esquemas, etc) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm)

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto a empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e envia-la a editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deveser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha a parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. No texto, deveser indicada apenas indicar a inserção de cada um(a).

REFERÊNCIAS

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for obvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
- 2 No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, e recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue: Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

- 3 Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

E recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Angelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.
Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parentêses).

- 4 Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)
- 5 Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)
- 6 Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.
Livros:
- 7 Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.
- 8 Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988. *Programas de computação* (Softwares):
- 9 Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Gottingen, Alemanha, 1993. *Teses:*
- 10 Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997. *Material apresentado em Congressos:*

11 Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://jbcs.sbq.org.br>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em Q.N. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS - A *QN* oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum as duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a **submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato PDF**. Esta disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, **sendo obrigatória** a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer a(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar - Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. **Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.**

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS - Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar a Editoria dentro de **prazo máximo** de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deveser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deveser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de *QN*.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informara automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, ate que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de cinco (cinco) dias para completa-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL - Quando for solicitada a versão final, o autor recebera instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato .pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright © 2008 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Consequentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas consequências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.