

**JOCELINE FRANCO**

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E ANÁLISE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Área de concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, requisito obrigatório para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima

**CURITIBA**

**2005**

Dedico este trabalho aos meus pais  
Luiz e Lourdes, e às minhas irmãs,  
Luzia e Letícia, meus maiores tesouros...

## AGRADECIMENTOS

Pela sublime presença de Deus em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espriar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade;

À meus pais Luiz e Lourdes que mesmo estando distante fisicamente, fizeram-se presente em cada momento desta importante jornada;

Às minhas irmãs Loz e Leite que unidas ajudaram a fortalecer meu ideal;

A Andrei Dall’Agnol, pelo companheirismo e dedicação, que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima pela sua preciosa orientação, compreensão e principalmente pela amizade conquistada nestes dois anos;

A Universidade Federal do Paraná (UFPR), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade para realização do Mestrado;

Aos professores componentes da banca de avaliação: João Carlos Palazzo de Mello (UEM) e Brás Heleno de Oliveira (UFPR) pela colaboração despendida para análise do trabalho em questão;

Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Departamento de Farmácia, pela colaboração na realização do curso;

À Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Regina Montrezol, pela disposição em sempre elucidar algo que lhe foi solicitado com prontidão e boa vontade;

À Professora Luiza Efig que disponibilizou Laboratório de Microbiologia da PUCPR para realização de ensaios antimicrobianos;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da PUCPR, Cleuza Aparecida Cardoso e Agosmando Mello, pela colaboração na realização de testes antimicrobianos;

Ao Laboratório de Controle de Qualidade II, nas pessoas da Professora Wanda M. Abrahão e da funcionária Geni Peruzzo, pela colaboração de na realização de testes antimicrobianos;

Ao Professor Olavo Guimarães do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo auxílio na identificação botânica;

Ao Laboratório de Saúde Pública da UFPR, pela utilização de suas dependências físicas para realização de testes antimicrobianos;

Ao Laboratório de Análises Químicas do Boticário, em particular à funcionária Klézia Moraes da Silva Belletti, pela realização das cromatografias gasosas;

À funcionária Hilda Aparecida dos Santos, do Laboratório de Fitoquímica, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho;

Aos meus colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos colegas professores, alunos e funcionários do Laboratório de Fitoquímica;

Aos amigos: Christian Boller, Elisa Perez, Gustavo Bertol, Rafaela Mattoso Guarise, Ana Cristina Toledo e Thamy Nakashima Possamai;

Às alunos do Curso de Farmácia (UFPR) que colaboraram na realização de algumas análises: Sandra Evangelista, Dayse Souza e Luciane Priscila Cavalheiro e Laureane Faveri;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Da terra, o Senhor criou os remédios, e o homem de bom senso não os despreza. Não foi para manifestar o poder do Senhor que as águas foram adoçadas com um pedaço de madeira? O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-lo por causa das maravilhas dele. Com elas, o médico cura e elimina a dor, e o farmacêutico prepara as fórmulas. Dessa maneira, as obras de Deus não têm fim, e dele vem o bem-estar para a terra”.*

ECLESIÁSTICO 38, 4-8

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE.....	4
3.2 GÊNERO <i>Eucalyptus</i> .....	4
3.3 <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. Ex. BENTH., MYRTACEAE.....	6
3.3.1 Enquadramento taxonômico.....	8
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	11
3.4.1 Óleos essenciais de eucaliptos.....	12
3.4.1.1 Eucaliptol (1,8-cineol).....	14
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	17
3.5.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.....	21
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EUCALIPTOS.....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	24
4.2 PESQUISA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	24
4.2.1 Extração do óleo essencial.....	24
4.2.1.1 Extração por Hidrodestilação direta por arraste de vapor.....	24
4.2.1.2 Extração por solvente orgânico.....	25
4.2.2 Determinação do rendimento do óleo essencial.....	25
4.2.3 Análises físico-químicas do óleo essencial.....	25
4.2.3.1 Determinação da densidade relativa $d_{20}^{20}$ .....	25
4.2.3.2 Determinação do índice de refração.....	26
4.2.4. Análises cromatográficas do óleo essencial.....	26
4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada.....	26
4.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massa.....	27
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	28
4.3.1 Extração por maceração do material vegetal.....	28
4.4 ENSAIOS FITOQUÍMICOS DAS FOLHAS DE <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	28
4.4.1 Extrato aquoso a 20% (m/v).....	28
4.4.1.1 Teor de sólido.....	28
4.4.1.2 Abordagem fitoquímica sistêmica.....	28
4.4.1.2.1 Pesquisa de glicosídeos antociânicos.....	28
4.4.1.2.2 Pesquisa de glicosídeos saponínicos.....	29
4.4.1.2.3 Pesquisa de aminogrupos.....	29
4.4.1.2.4 Pesquisa de ácidos fixos.....	29

4.4.1.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis.....	30
4.4.1.2.6 Pesquisa de taninos.....	30
4.4.1.2.6.1 Reações com sais de ferro III.....	30
4.4.1.2.6.2 Reação com gelatina a 2,5% em cloreto de sódio 0,9%.....	30
4.4.1.2.6.3 Reação com cloridrato de emetina 1%.....	30
4.4.1.2.6.4 Reação com cianeto de potássio a 10% (m/v).....	31
4.4.1.2.6.5 Reação com ácido nitroso.....	31
4.4.1.2.6.6 Reação de formol-clorídrico.....	31
4.4.1.2.7 Pesquisa de alcalóides.....	31
4.4.1.2.8 Pesquisa de glicosídeos flavônicos.....	32
4.4.1.2.8.1 Reação de Shinoda, cianidrina ou redução.....	32
4.4.1.2.9 Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos.....	32
4.4.2 Extrato hidroalcoólico a 20%.....	32
4.4.2.1 Teor de sólidos.....	33
4.4.2.2 Abordagem fitoquímica sistemática.....	33
4.4.2.2.1 Pesquisa de glicosídeos antociânicos.....	33
4.4.2.2.2 Pesquisa de glicosídeos saponosídicos.....	33
4.4.2.2.3 Pesquisa de aminogrupos.....	33
4.4.2.2.4 Pesquisa de taninos.....	33
4.4.2.2.4.1 Reações com sais de ferro III.....	33
4.4.2.2.4.2 Reação com gelatina a 2,5% em cloreto de sódio 0,9%.....	34
4.4.2.2.4.3 Reação com cloridrato de emetina 1% (m/v).....	34
4.4.2.2.4.4 Reação com cianeto de potássio a 10% (m/v).....	34
4.4.2.2.4.5 Reação com ácido nitroso.....	34
4.4.2.2.4.6 Reação de formol-clorídrico.....	34
4.4.2.2.5 Pesquisa de alcalóides.....	35
4.4.2.2.6 Pesquisa de glicosídeos flavônicos.....	35
4.4.2.2.6.1 Reação de shinoda, cianidina ou redução.....	35
4.4.2.2.6.2 Reação oxalo-bórica.....	35
4.4.2.2.7 Pesquisa de cumarinas.....	36
4.4.2.2.8 Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos.....	36
4.4.2.2.9 Pesquisa de esteróides e triterpenos.....	36
4.4.2.2.9.1 Reação de Liberman-Bouchard.....	37
4.4.2.2.9.2 Reação de Keller Klilliani.....	37
4.4.3 Pesquisas de glicosídeos cianogênicos.....	37
4.4.4 Pesquisa de ácidos voláteis.....	37
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.5.1 Prova de sensibilidade por difusão em disco (Bauer-Kirby).....	38
4.5.1.1 Preparo da amostra.....	38
4.5.1.2 Preparo dos discos de papel.....	38
4.5.1.3 Preparo do meio de cultura.....	39
4.5.1.4 Preparo do inóculo.....	39
4.5.1.5 Ensaio de difusão em disco.....	39
4.5.2 Prova de sensibilidade por diluição em caldo.....	40
4.5.2.1 Preparo da amostra.....	40
4.5.2.2 Preparo do meio de cultura.....	40
4.5.2.3 Preparo do inóculo.....	41
4.5.2.4 Ensaio de diluição em caldo.....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>

5.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	42
5.1.1 Determinação do Rendimento do óleo essencial.....	42
5.1.2 Análises físico-químicas do óleo essencial.....	43
5.1.3 Análises cromatográficas do óleo essencial.....	45
5.1.3.1 Cromatografia em camada delgada.....	45
5.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massa .....	45
5.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS DAS FOLHAS DE <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	53
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	56
5.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae.....	56
5.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae.....	60
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>7 RECOMENDAÇÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	ASPECTO DA FOLHA DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	9
<b>FIGURA 2 -</b>	ASPECTO DA FLOR DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	9
<b>FIGURA 3 -</b>	ASPECTO DA ARVORE DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	10
<b>FIGURA 4 -</b>	ASPECTO DA FOLHA DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE .....	10
<b>FIGURA 5 -</b>	MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS.....	18
<b>FIGURA 6 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F1.....	47
<b>FIGURA 7 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F2.....	48
<b>FIGURA 8 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F3.....	49
<b>FIGURA 9 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F4.....	50
<b>FIGURA 10 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE T.....	51
<b>FIGURA 11 -</b>	CROMATOGRAMA EM CG/EM DE S.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO SEGUNDO CRONQUIST (1981) E SEGUNDO ENGLER (1964).....	8
<b>TABELA 2 -</b>	ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NA QUIMIOTERAPIA DE INFECÇÕES BACTERIANAS E FÚNGICAS.....	18
<b>TABELA 3 -</b>	FASES E REVELADORES UTILIZADOS PARA CCD DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
<b>TABELA 4 -</b>	RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	42
<b>TABELA 5 -</b>	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.....	44
<b>TABELA 6 -</b>	SOLUBILIDADE EM ETANOL DO ÓLEO ESSENCIAL (T) e FRAÇÕES DE <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. MUELL. ex. BENTH.,MYRTACEAE.....	44
<b>TABELA 7 -</b>	COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL TOTAL E FRAÇÕES EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. EX BENTH.,MYRTACEAE.....	46
<b>TABELA 8 -</b>	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO AQUOSO 20% (m/v).....	54
<b>TABELA 9 -</b>	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% (m/v).....	55
<b>TABELA 10 -</b>	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus cinerea</i> , F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO..	59
<b>TABELA 11 -</b>	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Eucalyptus cinerea</i> E SUAS FRAÇÕES ( $\mu$ l/mL) FRENTE A DIFERENTES MICROORGANISMOS.....	59
<b>TABELA 12 -</b>	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.....	61

## LISTA DE SIGLAS

<b>Rf</b>	Relação de frente
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia
<b>BP</b>	British Pharmacopeia
<b>IR</b>	Índice de Retenção

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>C<sub>10</sub></b>	10 carbonos
<b>C<sub>5</sub></b>	5 carbonos
<b>S</b>	Óleo essencial obtido por extração por solvente
<b>C3</b>	Carbono 3
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida mínima
<b>CG/EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b><i>E. alba</i></b>	<i>Eucalyptus alba</i>
<b><i>E. camaldulensis</i></b>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
<b><i>E. cinerea</i></b>	<i>Eucalyptus cinerea</i>
<b><i>E. cloeziana</i></b>	<i>Eucalyptus cloeziana</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. deglupta</i></b>	<i>Eucalyptus deglupta</i>
<b><i>E. fruticetorum</i></b>	<i>Eucalyptus fruticetorum</i>
<b><i>E. glandis</i></b>	<i>Eucalyptus glandis</i>
<b><i>E. globulus</i></b>	<i>Eucalyptus globulus</i>
<b><i>E. microcorys</i></b>	<i>Eucalyptus microcorys</i>
<b><i>E. saligna</i></b>	<i>Eucalyptus saligna</i>
<b><i>E. smithii</i></b>	<i>Eucalyptus smithii</i>
<b><i>E. tereticornis</i></b>	<i>Eucalyptus tereticornis</i>
<b><i>E. urophylla</i></b>	<i>Eucalyptus urophylla</i>
<b>F1</b>	Fração 0 – 15 minutos de extração de óleo essencial
<b>F2</b>	Fração 15 minutos – 1 hora de extração de óleo essencial
<b>F3</b>	Fração 1 – 2 horas de extração de óleo essencial
<b>F4</b>	Fração 2 – 3 horas de extração de óleo essencial
<b>GC/MS</b>	Gás Chromatography/ Mass Spectrometry
<b>HSV-1</b>	Vírus herpes simples 1
<b>HSV-2</b>	Vírus herpes simples 2
<b>p.</b>	página
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. epidermidis</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>T</b>	Óleo essencial obtido em 3 horas de hidrodestilação por arraste de vapor

## RESUMO

*Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., também conhecido como “silver dollar gum” e “silver dollar tree”, é uma espécie originária da Austrália utilizada como ornamental pelo formato de suas folhas. Contém óleo essencial em sua constituição, fonte de 1,8-cineol e outros compostos. Por apresentar escassez de estudos a seu respeito, objetivou-se neste trabalho a prospecção dos metabólitos secundários e análises química, físico-química e antimicrobiana do óleo essencial característicos desta espécie. Investigou-se o rendimento do óleo essencial extraído ininterruptamente durante três horas e fracionado em quatro horários diferentes de coleta, assim como as análises da constituição química utilizando CG/EM, análises físico-químicas, e testes de atividade antimicrobiana pelos métodos de difusão em disco e diluição em caldo. Foram detectados os principais metabólitos secundários presentes na folha mediante triagem fitoquímica. O rendimento do óleo essencial foi de 6,07% (v/m), o qual grande parte foi extraído na primeira hora de hidrodestilação. Também foi observada maior concentração de 1,8-cineol na fração coletada em quinze minutos e uma hora. Os principais componentes identificados no óleo essencial de *E. cinerea* por CG/EM foram: 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ -terpineol. As análises físico-químicas confirmaram características peculiares aos óleos essenciais de eucaliptos. A prospecção fitoquímica revelou a presença de taninos, aminogrupos, ácidos voláteis, ácidos fixos, glicosídeos saponínicos, flavônicos, antraquinônicos e esteróides e/ou triterpenos. A avaliação de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco indicou qualitativamente o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie em questão frente a bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e levedura. A pesquisa da CIM por meio do teste de diluição em caldo demonstrou que as frações coletadas em duas e três horas de extração apresentaram atividade antimicrobiana com concentrações inferiores às demais frações e ao óleo essencial, em especial frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

*Eucalyptus cinerea* is a species native from Australia and also known as “silver dollar gum” e “silver dollar tree”, it has a ornamental utility due to its seeds format. This species has a essential oil, raw materia to 1,8-cineole and other components. Studies with this eucalypts are rare. The aim of this work was the investigation of phytochemicals and chemical, physical-chemistry and antimicrobial analysis of the essential oil from this species. It was investigated the yield of the essential oil extracted during three hours and fragmented in four different collections, such as chemical analysis using GC/MS, physical-chemistry and antimicrobial analysis by diffusion disc and broth dilution methods. It was detected the aim phytochemicals in teh seeds by a phytochemical screening. The yield of the essential oil was 6,07% (v/w) colleted in the first hour of hidrodestilation. It was observed also more concentration of 1,8-cineole in the fraction collected in a quarter of hour and and one hour. The mainly components investigated in the essential oils by GC/MS were: 1,8-cineole,  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ -terpineol. Physical-chemistry analysis confirmed the same characteristic of the eucalyptus essential oils. The phytochemical analysis showed tannins, volatile acid, fixed acid, flavonoids glycosides, saponin glycosides, steroids and/or triterpenes. The antmicorbial study using agar diffusion method showed the antimicrobial activity of essential oil against Gram-positive, Gram-negative bacterias and yeast. The research of CIM by broth dilution presented that the fractions collected at two and three hour after the beggining of the extraction had antimicrobial activity with less concentration than other fractions and than essential oil, special against *Pseudomonas aeruginosa*.