

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

ADRIELI GORLIN TOLEDO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *Eugenia  
involucrata* DC.

CASCATEL-PR

Março/2018

ADRIELI GORLIN TOLEDO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Fabiana Gisele da Silva Pinto

CASCVEL-PR

Marco/2018

## Ficha Catalográfica

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Toledo, Adrieli Gorlin  
Composição química e atividades biológicas das  
folhas de *Eugenia involucrata* DC. / Adrieli  
Gorlin Toledo; orientador(a), Fabiana Gisele da  
Silva Pinto, 2018.  
110 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do  
Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Conservação e Manejo de Recursos  
Naturais, 2018.

1. Concentração inibitória mínima. 2. Concentração  
bactericida mínima. 3. Radicais livres. 4. Produtos  
naturais. I. Pinto, Fabiana Gisele da Silva. II.  
Título.

## ADRIELI GORLIN TOLEDO


### COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Aplicada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Luis Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



DeJane Santos Alves

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Realizada em 5 de março de 2018  
Local: Sala 56 Prédio de Sala de Aula

Dedico este trabalho a minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou em todas as minhas conquistas.

“As conquistas dependem 50% de inspiração, criatividade e sonhos, e 50% de disciplina, trabalho árduo e determinação.”  
(Augusto Cury)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas os obstáculos que me permitiram estar aqui hoje.

Agradeço aos meus Pais, José Aldair Toledo e Marli Fatima Gorlin, por todo amor, confiança e compreensão incondicional e por todos os esforços concedidos para que eu vencesse mais essa etapa. Ao Luiz Paulo meu namorado que esteve caminhando comigo desde a graduação e vivenciou todos os momentos que me permitiram concluir mais essa etapa.

A minha orientadora, professora Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto pelo suporte e paciência no pouco tempo que lhe coube, pelo auxílio e sabedoria concedido, e principalmente pela confiança sempre depositada em mim. Agradeço também a Prof<sup>ª</sup> Livia, Prof<sup>o</sup> Luis, Prof<sup>ª</sup> Ana Tereza, Prof<sup>ª</sup> Willian da UEM, Prof<sup>ª</sup> Dejjane da UTFPR e Prof<sup>ª</sup> Teresa Cristina que contribuíram para que conseguisse realizar este trabalho. Aos funcionários da UNIOESTE, em especial a Andreia Bonini, que sempre estive com um sorriso no rosto e disposta a ajudar no que fosse.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia (tem muitos, mesmo não cabendo aqui estão todos no meu coração) Juliete, Rafaela, Adriana, Camila, Ana, Marina, Mayara, Thais e Thiago pela amizade repleta de choros e sorrisos e fins de semana e feriados de trabalho, compartilhando o “Labinho”. Em especial a Juliete pela força e companheirismo todos esses anos, pelos momentos inesquecíveis, os quais sempre farão parte da minha vida, por todas as brigas e alegrias compartilhadas e por todas as conquistas, as quais sem você jamais seriam iguais. As minhas amigas e parceiras desde a graduação Jéssica, Kelly e Bruna pela amizade verdadeira e auxílio incondicional e principalmente pela paciência.

Agradeço a Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais pela oportunidade para realizar esse trabalho e pela CAPES pela concessão da bolsa para pesquisa.

Enfim, agradeço a minha família e amigos, pelo carinho e apoio, me guiando pelo caminho que escolhi e me concedendo forças para seguir em frente e chegar onde estou agora, por tudo isso serei sempre grata, meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Produtos naturais .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Metabólitos secundários: extratos vegetais e óleos essenciais .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Descrição da planta .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Família Myrtaceae .....	13
2.3.2 Gênero Eugenia .....	14
2.3.3 <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	15
<b>2.4 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 Atividade antioxidante .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1: Journal of Food Science and Technology .....</b>	<b>19</b>
<b>Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das folhas de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 2: Industrial Crops and Products .....</b>	<b>42</b>
<b>Prospecção fitoquímica, atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO 1: Normas da revista capítulo 1 .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 2: Normas da revista capítulo 2 .....</b>	<b>88</b>

## RESUMO

TOLEDO, A. G. **Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* DC.** 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

As pesquisas científicas com espécies nativas brasileiras têm despertado um crescente interesse na busca por compostos ativos com potencial biológico. A espécie frutífera *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae), conhecida por cerejeira-do-mato, é popularmente usada na forma de chá com ação antidiarreica e digestiva. Na literatura, apesar de pesquisas com o fruto devido ao seu valor comercial, estudos com as folhas da espécie são escassos, sendo encontrados poucos dados relacionados as atividades biológicas dessa planta. Diante disso, este trabalho objetivou identificar os componentes químicos do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e realizar a prospecção fitoquímica dos extratos vegetais por meio da visualização colorimétrica e/ou na formação de precipitado. Além disso, foi avaliada a atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e a atividade antioxidante pelo método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Na análise do óleo essencial por CG-EM identificou-se 28 compostos, todos sesquiterpenos, correspondendo a 89,41% do óleo essencial. A atividade antimicrobiana do óleo foi observada para todas as bactérias Gram-positivas testadas e para a levedura *C. albicans*. O óleo essencial apresentou capacidade redutora de radicais DPPH de até 66,81%, evidenciando seu potencial antioxidante. A prospecção fitoquímica dos extratos detectou a presença de saponinas, esteroides, flavonoides e taninos. As atividades antimicrobiana e antioxidante foram observadas em todos os extratos testados. Os extratos que apresentaram os melhores resultados foram: metanólico com atividade antimicrobiana entre 3,12 e 25 mg.mL<sup>-1</sup> e percentual antioxidante de 95,85% na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>; e o etanólico com atividade antimicrobiana entre 3,12 e 50 mg.mL<sup>-1</sup> e atividade antioxidante de 92,84% na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Sugere-se que as atividades biológicas encontradas para o óleo essencial estejam relacionadas aos seus compostos majoritários: elixeno (26,53%), β-cariofileno (13,16%), α-copaeno (8,41%) e germacreno D (7,17%). Referente aos extratos, devido a comprovada presença de flavonoides e taninos, sugere-se que estes compostos fenólicos estejam relacionados as atividades encontradas.

**Palavras-chave:** Concentração inibitória mínima, Concentração bactericida mínima, Radicais livres, Produtos naturais, Sesquiterpenos.



## ABSTRACT

TOLEDO, A. G. **Chemical composition and biological activities of the leaves of *Eugenia involucrata* DC.** 2018. 110 f. Dissertation (Master in Conservation and Management of Natural Resources) – Center for Biological and Health Sciences, State University of the West of Paraná, Cascavel, 2018.

Scientific researches with Brazilian native species have aroused a growing interest in the search for active compounds with biological potential. The fruit species *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae), known as “cerejeira-do-mato”, is popularly used in the form of tea with antidiarrheal and digestive action. In the literature, although researches with the fruit because to its commercial value, studies with the leaves of the species are scarce, being few data related to the biological activities of this plant. Therefore, the objective of this work was to identify the chemical components of the essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and to perform the phytochemical exploration of the plant extracts through colorimetric visualization and / or precipitate formation. In addition, the antimicrobial activity by the broth microdilution technique and the antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) method were evaluated. In the analysis of the essential oil by GC-MS 28 compounds were identified, all sesquiterpenes, corresponding to 89.41% of the essential oil. The antimicrobial activity of the oil was observed for all Gram-positive bacteria tested and for yeast *C. albicans*. The essential oil presented a reduction capacity of DPPH up to 66.81%, evidencing its antioxidant potential. The phytochemical prospection of the extracts detected the presence of saponins, steroids, flavonoids and tannins. The antimicrobial and antioxidant activities were observed in all extracts tested. The extracts that presented the best results were: methanolic with antimicrobial activity between 3.12 and 25 mg.mL<sup>-1</sup> and antioxidant percentage of 95.85% in the concentration of 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>; and the ethanolic with antimicrobial activity between 3.12 and 50 mg.mL<sup>-1</sup> and antioxidant activity of 92.84% in the concentration of 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>. It is suggested that the biological activities found for the essential oil are related to its major compounds: elixene (26.53%), β-caryophyllene (13.16%), α-copaene (8.41%) and germacrene D (7.17%). Regarding the extracts, due to the proven presence of flavonoids and tannins, it is suggested that these phenolic compounds are related to the activities found.

**Keywords:** Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration, Free radicals, Natural products, Sesquiterpenes.

## 1. INTRODUÇÃO

O território brasileiro abriga cerca de um terço da flora mundial, sendo detentor de uma rica biodiversidade com um número distinto de espécies vegetais com propriedades medicinais, e que podem ser utilizadas para fins terapêuticos (BRANDÃO et al., 2006; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Por conta da presença dos biomas megadiversos Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado, o país dispõe de matérias-primas ricas em princípios ativos, que a partir de pesquisas e tecnologias, permitem o desenvolvimento e comercialização de alimentos, fármacos, cosméticos, entre outros produtos (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

Os metabólitos secundários de plantas são uma considerável fonte de produtos naturais bioativos, principalmente devido a elevada resistência microbiana a antibióticos comerciais e ao crescente risco dos aditivos químicos a saúde (BOUZIDI et al., 2016; WHO, 2011, 2014). Nesse seguimento, os produtos de origem vegetal podem ser uma alternativa eficiente ao atual problema relacionado a patógenos e compostos sintéticos. Visto seus benefícios a saúde e suas aplicações na indústria vem sendo muito relatados quanto as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (GUANGROG; JIAXIN; DEHUI, 2008; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Dentre as plantas nativas brasileiras, a família Myrtaceae, tem como um de seus maiores representantes o gênero *Eugenia*, o qual compreende cerca de 400 espécies distribuídas por todo o Brasil. No Paraná, são observadas 84 espécies do gênero (SOBRAL et al., 2015a). Uma das características da família é a presença de compostos bioativos variados (HESKES et al., 2012). Estudos com esse gênero revelaram sua importância medicinal, cujas atividades biológicas foram relatadas nas espécies: *Eugenia uniflora* (pitanga) (BRUN; MOSSI, 2010), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia) (SILVESTRI et al., 2010), *Eugenia jambolana* (jambolão) (HAJOORI et al., 2013), entre outras. A espécie *Eugenia involucrata* DC. é uma planta nativa, popularmente conhecida por cerejeira-domato, muito utilizada no setor econômico devido à presença de frutos comestíveis e, também na recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2009). Na medicina popular, suas folhas são aproveitadas como chás para tratamento de problemas digestivos e de diarreia (MARIN et al., 2008; RAMOS et al., 2006).

Considerando que há poucas investigações acerca da composição química e atividades biológicas da espécie *E. involucrata*, o presente trabalho vem a contribuir apresentando o potencial antimicrobiano e antioxidante das folhas dessa espécie nativa,

bem como a detecção de seus metabólitos secundários.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Produtos naturais**

O emprego de plantas para fins medicinais data desde a antiguidade, contudo, suas aplicações não apresentavam embasamento científico que comprovassem seu potencial farmacológico, ou mesmo que descrevessem seus componentes bioativos. Entretanto, cada vez mais, com o advento de tecnologias e novas descobertas científicas, a indústria tem investido consideravelmente em novos produtos originados de fontes naturais, que forneçam compostos terapeuticamente mais eficazes em relação aos comercializados atualmente (ATANASOV et al., 2015).

Neste sentido, o interesse por biomoléculas com potencial biológico, permitiu o estudo desses recursos genéticos de forma sustentável e a validação do conhecimento tradicional para a utilização com comprovada segurança e eficácia (CALIXTO, 2005; PIMENTA et al., 2012).

Uma grande vantagem para descoberta de novas biomoléculas é a disponibilidade de informações etnobotânicas documentadas, o que pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos (HEINRICH, 2010; HEINRICH; GIBBONS, 2001; KINGHORN et al., 2011). Assim, as investigações com produtos naturais foram encorajadas, e o Brasil em vista de sua megadiversidade, tornou-se pioneiro em pesquisas com extratos vegetais e óleos essenciais com bioatividade (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; BARBOSA-FILHO et al., 2005; BRANDÃO et al., 2006).

Para tanto, é necessário realizar uma triagem para selecionar espécies de interesse farmacológico e realizar as coletas, que preferencialmente sejam feitas em locais de alto endemismo e diversidade, uma vez que estas características refletem diretamente na diversidade de constituintes químicos presentes na planta. Dessa forma, é possível formular extratos vegetais ou mesmo extrair óleos essenciais, a partir dos quais pode ser feito o isolamento de moléculas, bem como a realização de bioensaios preliminares para avaliação do potencial biológico das plantas (BARBOSA et al., 2012; HENRICH; BEUTLER, 2013).

## 2.2 Metabólitos secundários: extratos vegetais e óleos essenciais

As plantas produzem muitos compostos orgânicos, provenientes de seu metabolismo, os quais são conhecidos por metabólitos primários e secundários (Figura 1). Os metabólitos primários são aqueles essenciais à planta e estão relacionados ao seu crescimento e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários, influenciam na interação ecológica entre a planta e o ambiente, atuando na defesa contra herbívoros, em infecção microbiana, na atração de polinizadores e animais que realizam a dispersão de sementes e como agentes alelopáticos (interação planta-planta) (BRAZ-FILHO, 1999, 2010; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SIMÕES et al., 2007).

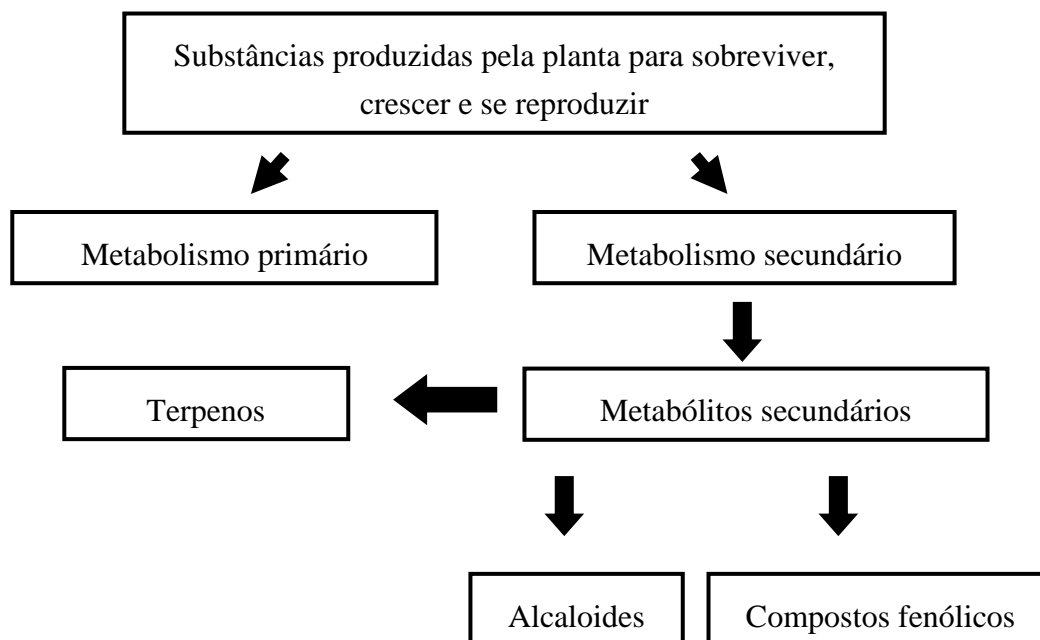


Figura 1. Fluxograma da formação de metabólitos pela planta.  
Fonte: da autora.

As principais classes de metabólitos secundários encontrados nas plantas são os alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (BAKKALI et al., 2008; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; DELBONE; LANDO, 2010). Os alcaloides são compostos nitrogenados heterocíclicos, precursores de muitos compostos biologicamente ativos (SAVOIA, 2012). O primeiro alcaloide reportado foi a morfina isolada da *Papaver somniferum* (papoula), considerado uma droga narcótica com ação analgésica forte (SALEEM et al., 2010). Outros alcaloides isolados de plantas também foram descobertos, tais como a efedrina para o alívio da asma e a vinblastina com efeitos anticancerígenos. Com relação as atividades biológicas foram comprovadas propriedades antibacterianas,

antifúngicas, citotóxica, antiagregante plaquetária e antiplasmódica (LU et al., 2012; SILVA et al., 2007).

O grupo dos compostos fenólicos apresentam uma alta diversidade estrutural e podem ser divididos em várias classes, dentre as quais destacam-se os flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas), os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007). Entre os fenólicos, os flavonoides são os mais conhecidos quanto ao seu modo de ação nas plantas. No geral, estes compostos atraem polinizadores e disseminadores de sementes, são responsáveis pela pigmentação de frutas, flores, sementes e folhas, atuam na sinalização entre plantas e microrganismos, são mediadores na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação ultravioleta (HUBER; RODRIGUEZ-MAYA, 2008).

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários que tem como base estrutural um isopreno. Esse grupo é muito comum em óleos essenciais, sendo conhecidas as suas propriedades antimicrobianas (SALEEM et al., 2010).

Os óleos essenciais por se tratarem de compostos voláteis, lipofílicos e geralmente odoríferos, são conhecidamente constituídos por moléculas com até 20 átomos de carbono, apresentando predominantemente uma constituição terpênica (BAKKALI et al., 2008; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; DELBONE; LANDO, 2010). Contudo, também podem apresentar compostos aromáticos e alifáticos derivados de fenilpropanoides, tais como os álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; SHAABAN; EL-GHORAB; SHIBAMOTO, 2012).

Esses óleos estão presentes em várias famílias de plantas geralmente cultivada em países tropicais e subtropicais: Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, entre outras. E podem ser obtidos de várias partes da planta, incluindo folhas, flores, frutos, sementes, botões, rizomas, raízes e cascas a partir de diferentes técnicas: hidrodestilação, extração com solvente, prensagem a frio, e extração com fluido supercrítico (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014; SHAABAN; EL-GHORAB; SHIBAMOTO, 2012; SIMÕES et al., 2007). As propriedades medicinais e organolépticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, sua atuação em infecções bacterianas e antifúngicas, ou como inseticida (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Já os extratos vegetais, podem conter todas as classes de metabolitos, conforme a biodisponibilidade na planta. São considerados preparações concentradas obtidas a partir de matéria-prima vegetal fresca ou seca, e preparados a partir de processos que envolvem um solvente, com objetivo de extrair diferentes compostos das plantas (ATANASOV et al., 2015; SANTOS et al., 2013).

Para preparação dos extratos, o método de extração pode influenciar diretamente na composição química e, conseqüentemente, na atividade biológica encontrada. Uma vantagem em preparações vegetais com solventes, é que quando não se tem conhecimento dos constituintes bioativos, é possível extrair uma quantidade maior de metabólitos secundários que após uma triagem inicial, podem ser fracionados e isolados para que seus bioativos puros sejam identificados e testados quanto ao seu potencial biológico (HEINRICH, 2010; LIU, 2008).

Os extratos vegetais e os óleos essenciais, por se tratarem de misturas podem apresentar um comportamento sinérgico, antagônico ou aditivo, o qual refletirá diretamente na atividade biológica avaliada. Este fato, apesar de um desafio para a confecção de novas biomoléculas, também tem instigado pesquisas com o objetivo de padronizar seus componentes que podem ser aplicados em vários seguimentos da indústria: como conservantes de alimentos, insumos agrícolas e sanitários, na produção de fármacos, cosméticos e perfumes, em medicamentos alternativos e terapias naturais (BAKKALI et al., 2008; GERTSCH, 2011; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; JUNIO, 2011; LIU, 2008; SALEEM et al., 2010; SAVOIA, 2012).

Nessa perspectiva, visto as funcionalidades dos metabólitos secundários, os extratos vegetais e óleos essenciais têm sido estudados devido a suas promissoras atividades biológicas encontradas em muitas espécies como *Piper aduncum* (pimenta de macaco), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Thymus vulgaris* (tomilho) (ALVES, 2010), *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-bravo) (WEBER et al., 2014), *Guarea kunthiana* (figo-do-mato) (PANDINI et al., 2015) e *Psidium cattleianum* (araçá-rosa) (SCUR et al., 2016).

## **2.3 Descrição da planta**

### *2.3.1 Família Myrtaceae*

Na investigação de plantas nativas, a família Myrtaceae se destaca como uma das maiores e mais complexas famílias de angiospermas, com aproximadamente 145 gêneros e

5970 espécies (THE PLANT LIST, 2013). Apresenta distribuição pantropical, sendo predominante em regiões tropicais e subtropicais, principalmente América do Sul, Sudeste da Ásia e Austrália (DAMETTO, 2014; SOUZA, 2013). No Brasil são registrados 23 gêneros e 1034 espécies distribuídas principalmente na Mata Atlântica e Cerrado. Em relação à região Sul, a família está representada por 257 espécies, com maior concentração no Paraná (SOBRAL et al., 2015a).

Uma particularidade dessa família é a presença de árvores e arbustos que apresentam constantemente casca esfoliante. Suas folhas, flores e frutos são caracterizados pela presença de glândulas secretoras contendo terpenos e/ou compostos resinosos e aromáticos (HESKES et al., 2012; SOUZA, 2013).

Vários membros da família Myrtaceae são empregados na medicinal popular para o tratamento de problemas gastrointestinais, hemorrágicos e doenças infecciosas (CRUZ; KAPLAN, 2004; LAGO et al., 2011). Com muitos representantes frutíferos, ressalta-se seu potencial econômico em diversos setores, desde seu potencial terapêutico até seu uso conhecido na agroindústria, no setor alimentício, cosmético e de produtos farmacêuticos (SARMENTO; SILVA; SILVA, 2012). As partes mais usadas são as folhas, cascas e os frutos que são comumente consumidos, além do interesse devido ao alto teor de vitaminas e a presença de compostos fenólicos e óleos essenciais considerados benéficos a saúde (MARIN et al., 2008; CRUZ; KAPLAN, 2004).

### 2.3.2 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* compõe um dos 145 gêneros de Myrtaceae e representa a grande maioria das espécies vegetais da família. No Brasil são registradas cerca de 400 espécies dispostas por todo o território, sendo que 84 espécies pertencentes a esse gênero se encontram no estado do Paraná (CRUZ; KAPLAN, 2004; MAGINA et al., 2009; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006; SOBRAL et al., 2015a).

Em relação à caracterização morfológica, esta varia de arbusto a árvore, com a presença de fruto de diversas colorações, podendo ser amarelos, alaranjados, vermelhos, vináceos e até pretos quando maduros (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Devido ao seu potencial terapêutico e implicações econômicas, estudos com *Eugenia* spp. têm se tornado de grande interesse, apontando na literatura a utilização de chás das folhas para tratamento de hipertensão, distúrbios gastrointestinais, asma, dor de garganta, diabetes, reumatismo, entre outros (CRUZ; KAPLAN, 2004; QUEIROZ et al.,

2015; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). E com relação as atividades biológicas, foi verificado o potencial antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e antiparasitária desse gênero (CRUZ; KAPLAN, 2004; QUEIROZ et al., 2015; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

### 2.3.3 *Eugenia involucrata* DC.

A espécie *Eugenia involucrata* DC. é uma árvore nativa, distribuída por toda a região sul e sudeste, ocupando os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (SOBRAL et al., 2015b). Pertencente aos domínios fitogeográficos do Cerrado e Mata Atlântica é uma árvore semidescídua que pode atingir entre 5 e 15 metros de altura, com 30 a 40 cm de diâmetro e copa arredondada. Apresenta folhas simples e opostas, com face superior verde-escuro e brilhosa. O caule é descamante com variações de cor do cinza amarronzado para o verde. Os frutos nascem em ramos finos, na ponta dos galhos e as flores apresentam 4 pétalas brancas compostas por 60 a 100 estames (Figura 2) (CARVALHO, 2009; LORENZI, 2009; SOBRAL et al., 2015b).

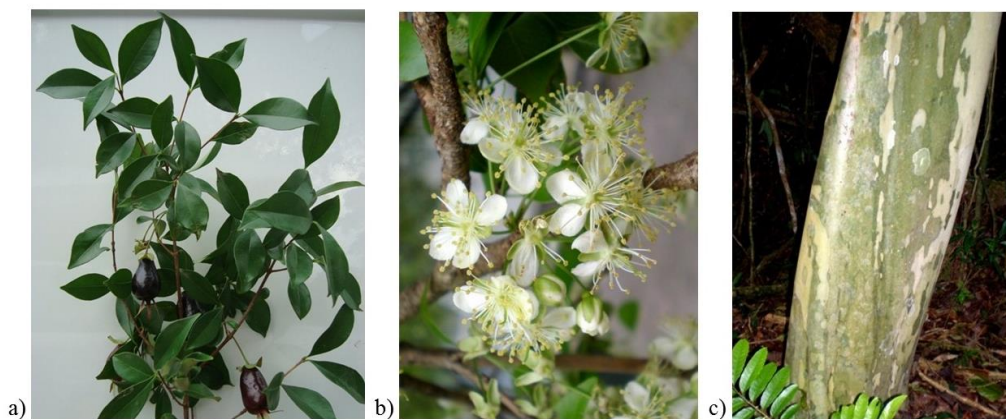


Figura 2. Morfologia da *Eugenia involucrata*: a) folhas e fruto, b) flor e c) caule.

Fonte: Flora Digital; Fotografos: Sergio Bordignon e João A. Bagatini

[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=10753](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=10753)

É popularmente conhecida por vários nomes cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra, cereja-do-rio-grande, cereja-preta, pitanga-preta, entre outros. Essa espécie é muito conhecida no setor econômico devido à presença de frutos comestíveis, os quais podem ser consumidos em forma de geleias, doces ou licores e bastante utilizada na recuperação de áreas florestais (CARVALHO, 2009; DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007; LORENZI, 2009). Na medicina popular, suas folhas são empregadas na forma de chás,



com ação antidiarreica e digestiva (MARIN et al., 2008; RAMOS et al., 2006).

Em relação a suas atividades biológicas, foi comprovada na literatura que o extrato hidroalcoólico e de diclorometano das folhas *E. involucrata* apresentam potencial antitumoral (SILVA et al., 2010), o óleo essencial dos frutos e folhas apresenta atividade antioxidante (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017; MARIN et al., 2008), o extrato aquoso das folhas apresenta efeito alelopático (HÜLLER; SCHOCK, 2011) e o extrato metanólico do fruto tem ação gastroprotetora (ALMEIDA, 2013).

#### **2.4 Atividade antimicrobiana**

Agentes antimicrobianos são substâncias derivadas de fungos, actinobactérias, bactérias e plantas capazes de inibir ou causar a morte dos microrganismos (GOODMAN et al., 2003; MADIGAN et al., 2010). O mecanismo de ação de muitos antimicrobianos conhecidos não está totalmente esclarecido, mas de forma simplificada foi constatado que eles atuam na inibição da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteínas e inibição da síntese de ácidos nucleicos (MADIGAN et al., 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A grande questão é que com o passar das gerações, os microrganismos naturalmente desenvolvem defesas frente a esses mecanismos de ação, ou seja, ocorre uma seleção de cepas resistentes a esses antimicrobianos, o que constitui um problema cada vez maior para a saúde pública (LOGUERCIO et al. 2005; MORAR; WRIGHT, 2010). E essa situação tem se acentuado com a redução na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, bem como pelo seu uso indiscriminado (DONADIO et al., 2010; HOGBERG; HEDDINI; CARS, 2010; MEIRELES, 2008; WHO, 2014).

Outro fator de risco para a saúde humana é a presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal (BLASCO; TORRES; PICO, 2007; SANTOS et al., 2016). Pois para aumentar a produtividade, muitos setores do agronegócio utilizam antimicrobianos para além da saúde animal, mas também como promotores de crescimento (GAVIOLI, 2012; SPINOSA, 2006). E estudos epidemiológicos apontam que esses alimentos colaboram também para a disseminação de microrganismos resistentes (SANTOS et al., 2016).

Além da preocupação com os resíduos de antimicrobianos em alimentos como carne, ovos e leite, têm-se o problema relacionado as doenças transmitidas via alimentos contaminados. Os alimentos devido a sua composição, tornam-se excelentes locais para o

desenvolvimento de patógenos, como *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *E. coli*, *Estafilococos* spp., entre outros (BLOCK; ARISSETO-BRAGOTTO; FELTES, 2017; TRAJANO et al., 2009). E essa condição pode se agravar com a manipulação inadequada durante o processamento e armazenamento dos alimentos pela indústria (SILVESTRI et al., 2010; TRAJANO et al., 2009).

Assim, novas substâncias começaram a ser estudadas a fim de substituir os antimicrobianos atuais, dentre elas podemos citar os compostos probióticos, levedura, extratos vegetais e óleos essenciais (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; SAVOIA, 2012; TORRES; DREHER; SIMIONI, 2015). Sendo que, cada vez mais, investigações acerca de substâncias antimicrobianas derivadas de plantas tornaram-se uma alternativa promissora, visto que o uso desses produtos, além de apresentar benefícios a saúde, reduz consideravelmente o risco de resistência a patógenos devido aos diferentes mecanismos de ação, são normalmente menos tóxicos aos organismos não alvos quando comparados a produtos sintéticos, são degradados mais rapidamente pelo ambiente e provenientes de recursos renováveis (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; SANTOS et al., 2013; SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Nesse panorama, produtos naturais devido a sua diversidade química, são fontes incansáveis de bioativos, sendo muitas espécies vegetais descritas quanto ao seu potencial antimicrobiano: *Eugenia brasiliensis* (grumixama), *Eugenia umbeliflora* (bagaçu) (MAGINA et al., 2009), *E. uniflora* (pitanga) (VOSS-RECH et al., 2011), *Eugenia dysenterica* (cagaita) (NADER, 2010), *Eugenia biflora* (chá-da-terra) e *Eugenia punicifolia* (pitanga-do-campo) (ARAÚJO, 2011).

## **2.5 Atividade antioxidante**

Durante o metabolismo basal celular, existe uma constante produção de radicais livres, que são compostos químicos instáveis e reativos capazes de se ligar a várias moléculas. A produção desses radicais é um processo fisiológico natural, contudo, quando presentes em excesso podem promover diversos danos oxidativos em proteínas, membranas e no DNA celular (CUERDA et al., 2011; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além da presença em sistemas biológicos, os alimentos também podem ser atingidos por danos oxidativos devido a presença dos radicais livres. Como consequência, os alimentos podem deteriorar, ocasionando odor e sabor desagradável com diminuição da qualidade nutricional e sanitária (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI, 1998).

Para evitar esses prejuízos ao organismo e impedir a oxidação dos alimentos, os antioxidantes entram em ação, atuando como inibidores importantes, impedindo os danos causados por radicais livres (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI, 1998). Logo, um antioxidante natural ou artificial pode ser definido como uma substância que em baixas concentrações pode desacelerar ou inibir o processo de oxidação (ALAMED et al., 2009; RAMALHO; JORGE, 2006). Dentre os antioxidantes mais utilizados pela indústria, podemos citar os antioxidantes sintéticos do grupo dos polifenóis o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) e os antioxidantes naturais como os tocoferóis (vitamina E), vitamina C, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (MOON; SHIBAMOTO, 2009; RAMALHO; JORGE, 2006).

No geral, as substâncias antioxidantes são provenientes de vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (OU et al., 2002; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Em razão disso, o uso de antioxidante de origem vegetal como extratos vegetais e óleos essenciais, tem recebido bastante atenção por parte dos pesquisadores e consumidores, uma vez que estas substâncias com potencial antioxidante podem fornecer compostos bioativos benéficos a saúde, permitindo controlar o excesso de radicais livres na célula, bem como evitar a deterioração dos alimentos (MOON; SHIBAMOTO, 2009; PUPO; GALLO, 2007; TOMEI; SALVADOR, 2007).

Logo, muitos estudos referentes ao potencial antioxidante das plantas foram reportados: o extrato etanólico da semente de *E. uniflora* (pitanga) (LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010), o óleo essencial do fruto e das folhas de *E. involucrata* DC. (cereja-do-rio-grande) (CIARLINI; MARANGONI; BOLZAN, 2017; MARIN et al., 2008) e *E. uniflora* (MARIN et al., 2008) e os extratos de diclorometano, acetato de etila e butanólico das folhas e caule de *E. brasiliensis* (grumixama), *Eugenia beaurepaireana* (ingabaú) e *E. umbeliflora* (bagaçu) (MAGINA et al., 2010).

1                                   **CAPÍTULO 1: Journal of Food Science and Technology**

2

3                   **Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das**  
4                                   **folhas de *Eugenia involucrata* DC.**

5

6                                   Adrieli Gorlin Toledo<sup>1</sup>; Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1\*</sup>

7

8     <sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Programa de Conservação e Manejo de Recursos  
9     Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária,  
10    2069, 85819-110, Cascavel, PR, Brasil.

11

12    \*Autor para correspondência: fabiana.pinto@unioeste.br, 554532207201

13

14    **Destaques da Pesquisa**

- 15    • Primeiro estudo referente ao potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eugenia*  
16    *involucrata* DC.
- 17    • A análise cromatográfica do óleo essencial revelou a presença de 28 sesquiterpenos  
18    (89,41%).
- 19    • O potencial biológico da espécie pode estar relacionado aos compostos majoritários  
20    presentes no óleo essencial.

21

22    **Resumo:** Na família Myrtaceae, a espécie *Eugenia involucrata* DC. popularmente  
23    denominada “cerejeira-do-mato” é conhecida tradicionalmente pela ação antidiarreica e  
24    digestiva de suas folhas. Contudo, na literatura não foram encontrados trabalhos referentes  
25    ao seu potencial antimicrobiano e antioxidante. Neste contexto, o objetivo do presente

26 estudo foi determinar a composição química por cromatografia gasosa acoplada a  
27 espectrometria de massas (CG-EM) e avaliar a atividade antimicrobiana pela técnica de  
28 microdiluição em caldo e a atividade antioxidante pelo método do 2,2-difenil-1-picril-  
29 hidrazila (DPPH) do óleo essencial das folhas de *E. involucrata*. A CG-EM identificou 28  
30 compostos, todos sesquiterpenos, correspondendo a 89,41% do óleo essencial. A atividade  
31 antimicrobiana do óleo essencial foi observada para todas as bactérias Gram-positivas  
32 testadas (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e  
33 *Staphylococcus aureus*) e para a levedura *Candida albicans*. O óleo essencial apresentou  
34 capacidade redutora de radicais DPPH de até 66,81%, evidenciando sua potencialidade  
35 antioxidante. Sugere-se que a ação antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *E.*  
36 *involucrata* esteja relacionada à presença dos compostos majoritários, elixeno (26,53%),  $\beta$ -  
37 cariofileno (13,16%),  $\alpha$ -copaeno (8,41%) e germacreno D (7,17%).

38

39 **Palavras-chave:** Cerejeira-do-mato, Myrtaceae, Produtos naturais, Compostos voláteis,  
40 Hidrodestilação, Atividades biológicas

41

## 42 **Introdução**

43 A composição dos alimentos associada a práticas inadequadas de processamento e  
44 armazenamento, proporcionam condições ideais para o desenvolvimento de  
45 microrganismos patogênicos (Frutuoso et al. 2013). Esses patógenos uma vez ingeridos via  
46 alimentos contaminados constituem uma preocupação importante em matéria de segurança  
47 alimentar e representam um problema cada vez maior na saúde pública (Santos et al.  
48 2017). Ainda, a ocorrência de um aumento substancial de cepas com capacidade genética  
49 de adquirir e transferir resistência frente aos antimicrobianos atuais tem dificultado os  
50 tratamentos terapêuticos, impulsionando a indústria farmacêutica e alimentícia na busca

51 por antimicrobianos alternativos (Silva e Fernandes Júnior 2010).

52        Outro fator é uma maior demanda por produtos "verdes" pelo consumidor, o que  
53 levou à necessidade de substituir aditivos químicos, visando novos conservantes para  
54 alimentos mais seguros (Tongnuanchan e Soottawat 2014). Além disso, os antioxidantes de  
55 origem natural têm ganhado espaço na indústria alimentícia, visto que, os antioxidantes  
56 sintéticos, apesar de muito utilizados no processamento de alimentos têm sido  
57 questionados quanto a sua toxicidade ao organismo (Panigrahy et al. 2017). Em vista disso,  
58 os produtos naturais como os óleos essenciais de plantas são fortes candidatos à indicação  
59 de uso na indústria. Além de sua ação antimicrobiana e antioxidante, apresentam  
60 características que permitem o retardo na deterioração e a melhoria da qualidade  
61 organoléptica dos alimentos.

62        A espécie *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira-do-mato) é uma planta nativa  
63 brasileira pertencente à família Myrtaceae, conhecida na medicina tradicional pela seus  
64 benefícios a saúde. Suas folhas são empregadas na forma de chás, com ação antidiarreica e  
65 digestiva (Sausen et al. 2009). Pesquisas com esse gênero revelaram sua importância  
66 terapêutica, cuja atividade antimicrobiana e antioxidante foi relatada em algumas espécies,  
67 como a *Eugenia caryophyllata* (Silvestri et al. 2010) e *Eugenia jambolana* (Hajoori et al.  
68 2013). Contudo, estudos referentes à atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo  
69 essencial das folhas de *E. involucrata* são escassos. Estudos relacionados a composição  
70 química do óleo essencial de *E. involucrata* revelaram a presença de sesquiterpenos,  
71 representando mais de 90% dos constituintes (Ciarlini et al. 2017; Henriques et al. 1993;  
72 Marin et al. 2008; Ramos et al. 2006).

73        Diante disso, o objetivo do presente estudo foi (1) determinar a composição  
74 química do óleo essencial das folhas de *E. involucrata* por cromatografia gasosa acoplada a  
75 espectrometria de massas (CG-EM); (2) avaliar a atividade antimicrobiana pela técnica de

76 microdiluição em caldo; e (3) avaliar o potencial antioxidante pelo método do 2,2-difenil-  
77 1-picril-hidrazila (DPPH).

78

## 79 **Material e métodos**

### 80 **Coleta e identificação do material vegetal**

81 A coleta das folhas de *E. involucrata* foi realizada no parque ecológico Paulo  
82 Gorski, localizado no município de Cascavel, região oeste do estado do Paraná, entre os  
83 meses de outubro de 2016 e março de 2017. A localização geográfica foi realizada  
84 utilizando o Sistema de Posicionamento Global, como segue: 24° 57' 52" S 53° 26' 0,9" W.  
85 A amostra do material botânico foi encaminhada para identificação pelo Herbário da  
86 Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e depositada sob o nº 1650 para  
87 registro do exemplar *voucher*.

88

### 89 **Extração do óleo essencial**

90 As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40° C entre 48 e 72 horas.  
91 Moídas utilizando um moinho de facas, com membrana de 0,42 milímetros de  
92 granulometria. A partir da amostra seca e moída foi adicionada a água destilada na  
93 proporção de 1:10 (p/v) e submetida ao método de hidrodestilação, durante 4 h utilizando  
94 um aparelho do tipo Clevenger (Weber et al. 2014).

95 A porcentagem de rendimento do óleo essencial (%) foi calculado pela equação:

96  $\% = \frac{OE(g)}{MV(g)} \times 100$ , onde *OE* é total de óleo essencial extraído (gramas) e o *MV* massa

97 vegetal seca e moída (gramas). Posteriormente, ele foi armazenado em tubos de fundo  
98 cônico envolto por papel alumínio, ao abrigo da luz e sob refrigeração, em temperatura  
99 média de 4° C até a realização dos ensaios.

100

## 101 **Análise química do óleo essencial (CG-EM)**

102 A análise dos constituintes do óleo essencial de *E. involucrata* foi realizada a partir  
103 do sistema CG-EM Thermo-Finnigan pelo Laboratório de Cromatografia Gasosa acoplada  
104 à Espectrometria de Massas, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.  
105 Esse sistema é composto por um cromatógrafo gasoso GC FOCUS (Thermo Electron),  
106 acoplado a um espectrômetro de massa DSQ II (Thermo Electron) e um injetor automático  
107 TriPlus AS (Thermo Electron). A separação cromatográfica foi realizada com um HP-5ms  
108 coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento, 0,25 e 0,25 um ID do filme;  
109 composição de 5% de fenil-95% de dimetilpolissiloxano). A temperatura do injetor foi de  
110 250° C. As amostras e padrões de alcanos foram injetadas com uma taxa de divisão de  
111 1:25. A programação da temperatura utilizada foi de 50° C mantida durante 2 min,  
112 aumento da temperatura para 180° C a uma razão de 2° C.min<sup>-1</sup> e seguido por um aumento  
113 para 290° C a uma razão de 5° C.min<sup>-1</sup>. A interface entre o CG e EM foi mantida a 270° C  
114 e a temperatura da fonte de ionização do espectrômetro de massa foi de 250° C. A  
115 identificação dos componentes foi feita por comparação dos tempos de retenção com os  
116 obtidos na literatura por meio do índice de retenção (IR) (Adams, 2007; Yu et al., 2007;  
117 Babushok et al., 2011).

118

## 119 **Microrganismos utilizados**

120 O óleo essencial foi testado frente às cepas da coleção American Type Culture  
121 Collection (ATCC) e da Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica (CCCD), sendo seis cepas  
122 Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC  
123 13076), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa*  
124 (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC  
125 13883); quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus*



126 *faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis*  
127 subsp. *spizizenii* (CCCD B005); e 1 levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

128

### 129 **Atividade antimicrobiana**

130 Os microrganismos foram recuperados em caldo de enriquecimento Brain Heart  
131 Infusion e incubados por 24 h a  $36 \pm 0,1^\circ$  C. Após este período, as cepas foram repicadas  
132 em meio Ágar Muller Hinton (MH) e incubadas por 24 h a  $36 \pm 0,1^\circ$  C. Para padronizar o  
133 inóculo, as cepas foram diluídas em solução salina (0,85%) resultando na concentração  
134 final de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para bactérias e  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para levedura *C. albicans*.

135

### 136 *Concentração inibitória mínima (CIM)*

137 Os ensaios para o óleo essencial foram realizados segundo a metodologia de  
138 microdiluição em caldo descrita por Weber et al. (2014). O óleo essencial foi solubilizado  
139 em metanol P.A. e diluído em caldo MH para as cepas bacterianas e em caldo Roswell  
140 Park Memorial Institute (RPMI-1640) para *C. albicans*. Em placas de microdiluição de 96  
141 poços foram distribuídos 150 µL de caldo MH ou RPMI-1640. Foram realizadas diluições  
142 seriadas do óleo essencial entre as concentrações de 7000 e 3,37 µg.mL<sup>-1</sup>. Por fim, foi  
143 adicionado 10 µL de inóculo em cada poço e as placas foram incubadas a  $36 \pm 0,1^\circ$  C entre  
144 18-24 h. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico comercial Gentamicina (200  
145 mg.mL<sup>-1</sup>) e antifúngico comercial Nistatina (200 mg.mL<sup>-1</sup>). Como controle negativo foi  
146 adicionado o inóculo ao MH caldo, sem presença do óleo essencial para comprovar a  
147 viabilidade do microrganismo testado. Também foi realizado o controle de esterilidade do  
148 óleo essencial e o controle do metanol P.A. para verificar a interferência do diluente. O  
149 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % foi utilizado como revelador colorimétrico. A  
150 CIM foi realizada em triplicata, onde foi possível determinar a menor concentração do óleo

151 essencial capaz de inibir o crescimento microbiano.

152

153 *Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)*

154 Para o ensaio foi realizada a metodologia de Weber et al. (2014), com  
155 modificações. Antes da adição do TTC a 0,5 % para determinar o CIM, foi retirada uma  
156 alíquota de 2 µL de cada poço da placa de microdiluição e semeada na superfície do ágar  
157 MH. As placas foram incubadas a  $36 \pm 0,1^\circ \text{C}$ , entre 18-24 h. O ensaio foi realizado em  
158 triplicata e para determinar a CBM/CFM foi observado se houve crescimento microbiano  
159 em ágar MH, permitindo verificar qual foi a menor concentração do óleo essencial capaz  
160 de causar a morte da bactéria/fungo testado.

161

#### 162 **Atividade antioxidante**

163 A atividade antioxidante do óleo essencial foi realizada conforme o método da  
164 redução do radical (DPPH), proposto por Rufino et al. (2007). Inicialmente, foi feita uma  
165 curva de calibração (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM DPPH) para se obter a concentração de  
166 DPPH no meio após a reação com o óleo essencial, encontrando a equação  
167  $y = 0,0118x - 0,005$  ( $R^2 = 0,999$ ), onde  $y$  é a concentração de DPPH e  $x$  é absorvância.  
168 Para tal, alíquotas de 0,1 mL do óleo essencial em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40  
169 e 50 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (60 µM) e  
170 homogeneizadas em agitador de tubos. Como controle negativo foi utilizado 0,1 mL de  
171 uma solução de metanol 50%, acetona 70% e água destilada na proporção 2:2:1 (v/v/v) e  
172 como controle positivo foi utilizado o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno)  
173 em diferentes concentrações (0,0312, 0,062, 0,125, 0,25 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Os testes foram  
174 realizados em espectrofotômetro a 515 nm em intervalos de leitura de 1 min até a  
175 estabilização da absorvância. Como branco, foi utilizado metanol para a calibração do

176 espectrofotômetro. A porcentagem de sequestro do radical livre (AA%) foi expressa pela  
177 equação:  $AA\% = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_1} \right] \times 100$ , onde  $A_0$  é a absorbância do controle negativo e  $A_1$  é a  
178 absorbância da amostra. Para o cálculo de  $IC_{50}$  (quantidade de substância antioxidante  
179 necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), foram utilizadas as  
180 concentrações do óleo essencial e do BHT para obter a equação da reta com  $R^2$  maior que  
181 0,80, e assim, encontrar o valor de  $IC_{50}$ , a partir de regressão linear. Os testes foram  
182 realizados em triplicata e expressos como média desvio  $\pm$  padrão. Os resultados de  $IC_{50}$   
183 foram analisados pelo teste de qui-quadrado de aderência utilizando o programa estatístico  
184 R® (R Development Core Team, 2017).

185

## 186 **Resultados e Discussão**

### 187 **Composição química do óleo essencial de *E. involucrata***

188 A partir da extração do óleo essencial das folhas de *E. involucrata* foi observado  
189 um rendimento total de 0,21%. A composição química do óleo essencial, juntamente com  
190 seus índices de retenção estão expressos na tabela 1. Foram identificados pela análise CG-  
191 EM 28 compostos, correspondentes a 89,41% do óleo essencial.

192 A análise dos componentes químicos do óleo essencial de *E. involucrata*,  
193 demonstrou a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados na proporção de  
194 83,05% e 6,36%, respectivamente. Os componentes mais abundantes na amostra foram  
195 elixeno (26,53%),  $\beta$ -cariofileno (13,16%),  $\alpha$ -copaeno (8,41%) e germacreno D (7,17%),  
196 todos sesquiterpenos hidrocarbonetos (Tabela 2).

197 Na família Myrtaceae, as espécies do gênero *Eugenia* apresentam como  
198 predominantes os compostos químicos do grupo dos sesquiterpenos, e em menor  
199 quantidade, observa-se os compostos do grupo dos monoterpenos (Carneiro et al. 2017;

200 Henriques et al. 1993; Marin et al. 2008; Ramos et al. 2006). Contudo, nessa espécie não  
201 foram encontrados compostos pertencentes aos monoterpenos.

202 Na literatura os constituintes químicos do óleo essencial foliar de *E. involucrata*  
203 foram identificados por vários autores. Ramos et al. (2006) encontraram 27 compostos  
204 químicos, considerando quatro compostos como majoritários: biciclogermacreno (19%),  
205 globulol (14%), epi-globulol (8%) e  $\gamma$ -elemeno (7,2%). Henriques et al. (1993)  
206 caracterizaram 93,5% do óleo essencial, apresentando como compostos majoritários o  
207 viridifloreno (36,2%),  $\beta$ -cariofileno (23,1%) e germacreno D (6%). Mais recentemente,  
208 Ciarlini et al. (2017) detectaram 88,79% dos compostos presentes no óleo de *E.*  
209 *involucrata* sendo os mais abundantes o  $\beta$ -elemeno (48,41%), biciclogermocreno  
210 (22,96%), cariofileno (13,94%) e germacreno D (4,02%).

211 Considerando esses estudos anteriores foi percebido a presença de alguns  
212 compostos em comum nos óleos essenciais de *E. involucrata*, no entanto, por se tratar de  
213 uma mistura foi observado que perfil químico difere em quantidade, número de compostos  
214 e configuração molecular. Essa variação pode estar relacionada a fatores climáticos  
215 (temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação ultravioleta e regime de ventos),  
216 localização geográfica (altitude, habitat e poluição atmosférica), composição do solo,  
217 órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo, diversidade genética, sazonalidade,  
218 ritmo circadiano, disponibilidade hídrica, nutrientes, proteção contra patógenos, entre  
219 outros (Gobbo-Neto e Lopes 2007). Assim, pesquisas voltadas a padronização dos  
220 constituintes químicos de óleos essenciais devem ser realizadas para verificar as  
221 influências ambientais na produção metabólica desses compostos e para sua possível  
222 utilização segura pelo mercado.

223

224 **Atividade antimicrobiana**

225 Os resultados referentes à atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de  
226 *E. involucrata*, estão descritos na tabela 3. Foi constatado o efeito inibitório e bactericida  
227 do óleo para todas as bactérias Gram-positivas testadas e para a levedura *C. albicans*. Os  
228 valores de CIM variaram de 875-7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e os da CBM de 1750-7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As  
229 bactérias mais suscetíveis a ação do óleo foram o *S. epidermidis* e o *B. subtilis*, com CIM  
230 de 875 e CBM de 1750  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

231 Devido às características únicas dos óleos essenciais, acredita-se que a atividade  
232 antimicrobiana dos óleos seja atribuída a vários mecanismos celulares. O perfil hidrofóbico  
233 dos compostos presentes no óleo é a principal característica que comprova seu potencial  
234 antimicrobiano. Seu papel em desestruturar de forma irreversível os lipídios da membrana  
235 celular microbiana, torna a membrana permeável e promove a perda do conteúdo celular  
236 interno (íons, glicose e ATP), ocasionando a morte do microrganismo. Além disso, os  
237 óleos também podem alterar os sistemas enzimáticos que envolvem produção de energia e  
238 síntese de compostos estruturais (Burt 2004; Djilani e Dicko 2012).

239 Apesar de não ter sido encontrado nenhum relato da atividade antimicrobiana do  
240 óleo essencial de *E. involucrata* na literatura, foi observado dentro do gênero *Eugenia*  
241 muitas espécies com propriedades antimicrobianas. Stefanello et al. (2008) testaram o óleo  
242 essencial das folhas de *Eugenia chlorophylla*, comprovando suas propriedades  
243 antimicrobianas frente ao *S. aureus* (CIM=1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Lago et al. (2011) relataram em  
244 seu estudo o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eugenia uniflora* frente ao *S.*  
245 *epidermidis* (CIM=7500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Já Ogunwande et al. (2005) comprovaram efeito  
246 inibitório do óleo essencial de *E. uniflora* para as bactérias Gram-positivas *B. cereus*  
247 (CIM=39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *S. aureus* (CIM=156  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para as Gram-negativas *P.*  
248 *aeruginosa* (CIM=625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *E. coli* (CIM=625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em concentrações  
249 significativamente baixas.

250 Observa-se que na maioria dos estudos sobre a ação dos óleos essenciais, as  
251 bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis que Gram-negativas (Burt 2004; Lago et al.  
252 2011, Stefanello et al. 2008). Concordando com a literatura, nos resultados de nossa  
253 pesquisa foi constatado que as cepas Gram-positivas foram mais suscetíveis em relação  
254 Gram-negativas (*S. Typhimurium*, *S. Enteretidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P.*  
255 *aeruginosa*), que se mostraram resistentes às concentrações do óleo testadas.

256 Uma das explicações para este fato está relacionada à presença de uma membrana  
257 fosfolipídica externa que envolve a parede celular de Gram-negativas. Esta contém  
258 lipopolissacarídeos hidrofílicos que atuam como uma barreira para macromoléculas e  
259 compostos hidrofóbicos, proporcionando assim, maior tolerância a alguns compostos  
260 antimicrobianos, como os encontrados em óleos essenciais (Pandey et al. 2016). Além  
261 disso, o espaço periplasmático contém enzimas capazes de quebrar moléculas e a  
262 membrana contém bombas de efluxo capazes de remover compostos considerados danosos  
263 à célula bacteriana (Burt et al. 2004; Tadeg et al. 2005). Portanto, como Gram-positivas  
264 não contém essa barreira adicional, embora apresentem uma parede celular com maior  
265 espessura, está não é tão complexa, sendo composta por extremidades lipofílicas de ácidos  
266 lipoteicóicos, o que facilita o contato direto do óleo essencial com a célula bacteriana  
267 (Tongnuanchan e Soottawat 2014).

268 Assim como em nosso estudo, alguns autores comprovaram o potencial antifúngico  
269 de espécies de *Eugenia*. Stefanello et al. (2008) testaram o óleo essencial de *E.*  
270 *chlorophylla*, comprovando suas propriedades antifúngicas de *C. albicans* com CIM de  
271  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Isso pode ser observado também por Lago et al. (2011), que em seu estudo  
272 demonstrou a inibição de *C. albicans* pelo óleo essencial de *E. uniflora* na concentração de  
273  $1800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

274 A ação antifúngica encontrada em muitos óleos essenciais está relacionada à

275 presença de sesquiterpenos. E como o óleo apresenta características lipofílicas, isso o  
276 permite penetrar na parede celular fúngica, interferindo na ação de enzimas envolvidas em  
277 sua síntese, podendo também estabelecer um gradiente de pH através da membrana  
278 citoplasmática e o bloqueio da produção de energia, causando alterações na membrana e  
279 mudando a morfologia do fungo (Djilani e Dicko 2012; Pandey et al. 2016).

280 O potencial antimicrobiano do óleo essencial de *E. involucrata* pode ser atribuído  
281 quase que exclusivamente aos componentes majoritários presentes, como  $\beta$ -cariofileno  
282 (Al-Bayati 2008), germacreno D (Jiménez et al. 2012),  $\alpha$ -copaeno (Lin et al. 2012) e  
283 elixeno (Yu et al. 2007). Contudo, por se tratar de uma mistura complexa, a interação  
284 sinérgica, antagônica ou aditiva entre os compostos do óleo essencial deve também ser  
285 levada em consideração, bem como estudos com compostos isolados, para verificar se há  
286 influência dos compostos presentes em menores quantidades no potencial antimicrobiano  
287 deste óleo essencial (Burt 2004).

288

### 289 **Atividade antioxidante**

290 A capacidade antioxidante do óleo essencial das folhas de *E. involucrata*, foi  
291 determinada pela diminuição da absorvância a 515 nm, utilizando o ensaio de sequestro de  
292 DPPH (Tabela 4 e 5). A eliminação dos radicais livres pelo óleo essencial foi dependente  
293 das concentrações, sendo o resultado mais expressivo na maior concentração testada (50  
294 mg.mL<sup>-1</sup>), com potencial antioxidante de 66,81% e valor de IC<sub>50</sub> de 38,61±1,11 mg.mL<sup>-1</sup>  
295 (Tabela 4 e 5). Esse valor de IC<sub>50</sub> foi considerado estatisticamente diferente do valor  
296 encontrado para o antioxidante sintético BHT, com IC<sub>50</sub> de 0,094±0,01 mg.mL<sup>-1</sup> (Teste  $\chi^2$ =  
297 38,329; GL=1; p<0,05), o que demonstra a necessidade de uma concentração maior de  
298 óleo essencial para sequestrar a mesma quantidade de radicais DPPH quando comparado  
299 ao BHT.

300 Sugere-se que a atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *E.*  
301 *involucrata*, seja atribuída principalmente aos seus componentes majoritários: elixeno,  $\beta$ -  
302 cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e germacreno D, sendo comprovado o potencial dos compostos  $\beta$ -  
303 cariofileno e germacreno D, como excelentes antioxidantes na literatura (Carneiro et al.  
304 2017; Hemalatha et al. 2015). Geralmente o potencial dos óleos essenciais, é  
305 correspondente ao conteúdo fenólico presente. Porém, alguns óleos essenciais apresentam  
306 comportamento antioxidante conforme a estrutura química de seus componentes, como é o  
307 caso de alguns terpenos (Amorati et al. 2013; Panigrahy et al. 2017).

308 Estudos recentes sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de  
309 *E. involucrata*, demonstraram potencial antioxidante de 6,41% utilizando a metodologia do  
310  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico (Ciarlini et al., 2017), ou seja, uma atividade cerca de 10 vezes  
311 menor comparada a encontrada nesse trabalho. Ainda segundo os autores, diferentes  
312 técnicas de extração de compostos voláteis podem refletir no potencial antioxidante da  
313 espécie.

314 Apesar de poucos estudos com as folhas de *E. involucrata*, o fruto foi muito  
315 pesquisado quanto ao seu potencial antioxidante, devido ao seu uso na forma de sucos,  
316 licores e geleias (Lorenzi 2009). Marin et al. (2008), Infante et al. (2016) e Nicácio et al  
317 (2017) comprovaram o potencial antioxidante dos frutos da espécie *E. involucrata*. Além  
318 disso, Carneiro et al. (2017) e Infante et al. (2016) evidenciaram atividade antioxidante nos  
319 óleos essenciais de quatro outras espécies: *Eugenia klotzschiana*, *Eugenia brasiliensis*,  
320 *Eugenia myrcianthes* e *Eugenia leitonii*, demonstrando assim o potencial que esse gênero  
321 apresenta.

322 Por fim, sugere-se que estudos relacionados ao método de coleta, secagem e  
323 extração do óleo essencial podem contribuir para maiores esclarecimentos referentes à sua  
324 ação antioxidante, visto que estes fatores influenciam diretamente nos princípios ativos que



325 compõe o óleo essencial (Gobbo-Neto e Lopes 2007; Ciarlini et al., 2017).

326

## 327 **Conclusão**

328 Na caracterização do óleo essencial foram identificados 28 compostos, todos  
329 sesquiterpenos. Os compostos encontrados em maior quantidade na amostra foram elixeno  
330 (26,53%),  $\beta$ -cariofileno (13,16%),  $\alpha$ -copaeno (8,41%) e germacreno D (7,17%), muito  
331 comuns dentro desse gênero, inferindo o potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo  
332 essencial.

333 O óleo essencial das folhas de *E. involucrata* apresentou atividade antimicrobiana  
334 para todas as bactérias Gram-positivas (*S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. subtilis* e *S. aureus*) e  
335 para a levedura *C. albicans*. E foi constatada sua capacidade de sequestrar radicais livres,  
336 demonstrando atividade antioxidante de até 66,81%.

337 Espera-se que estes resultados contribuam para maiores esclarecimentos a certa do  
338 potencial biológico desse óleo essencial, permitindo que no futuro esta pesquisa de  
339 validação científica, forneça subsídios para que a bioengenharia de plantas torne possível a  
340 padronização internacional dos compostos presentes em óleos essenciais, otimizando seu  
341 potencial biológico e aplicação comercial.

342

## 343 **Referências**

344

345 Adams RP (2007) Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass  
346 Spectrometry. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream

347

348 Al-Bayati FA (2008) Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and  
349 *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. J. Ethnopharmacol. 116:403-406.

350 doi: 10.1016/j.jep.2007.12.003

351

352 Amorati R, Foti MC, Valgimigli L (2013) Antioxidant activity of essential oils. J. Agric.

353 Food Chem. 61:10835-10847. doi: 10.1021/jf403496k

354

355 Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG (2011) Retention indices for frequently

356 reported compounds of plant essential oils. J. Phys. Chem. Ref. Data 40:043101-043147.

357 doi: 10.1365/s10337-008-0872-3

358

359 Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in

360 foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 94:223-253. doi:

361 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

362

363 Carneiro NS, Alves CCF, Alves JM, Egea MB, Martins CHG, Silva TS, Bretanha LC,

364 Balleste MP, Micke GA, Silveira EV, Miranda MLD (2017) Chemical composition,

365 antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia*

366 *klotzschiana* Berg (Myrtaceae). An. Acad. Bras. Cienc. 89:1907-1915. doi: 10.1590/0001-

367 3765201720160652

368

369 Ciarlini JJS, Marangoni A, Bolzan A (2017) Selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and

370 atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia*

371 *involutrata* leaves from Southern Brazil. Food Bioprod. Process. 106:29-34. doi:

372 10.1016/j.fbp.2017.08.008

373

374 Djilani A, Dicko A (2012) The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Nutrition, In:

375 Bouayed J (Ed.) Nutrition, well-being and health, InTech, pp. 155-178. Available from:  
376 [http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-  
378 benefits-of-essential-oils](http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-<br/>377 benefits-of-essential-oils). Acesso em: 06 nov 2017

379 Frutuoso AE, Nascimento NT, Lemos TLG, Coelho EL, Teixeira DMA (2013) Essential  
380 oils applied in food: a review. *Brazilian Journal of Food Research*, 4: 69-81

381

382 Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Medicinal plants: factors of influence on the content of  
383 secondary metabolites. *Quim. Nova* 30:374-381

384

385 Hajoori M, Naik M, Naik K, Butani N (2014) Evaluation of antimicrobial activity of  
386 *Eugenia jambolana* seed extract against human pathogens. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*  
387 3:935-939

388

389 Hemalatha R, Nivetha P, Mohanapriya C, Sharmila G, Muthukumaran C, Gopinath M  
390 (2015) Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial  
391 potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *J. Food Sci.*  
392 *Technol.* 53:1189-98. doi: 10.1007/s13197-015-2108-5

393

394 Henriques AT, Sobral ME, Caudurro AD, Schapoval EES, Bassani VL, Lamaty G, Menut  
395 G, Bessière JM (1993). Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of  
396 some *Eugenia* essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 5:501-505. doi:  
397 10.1080/10412905.1993.9698270

398

399 Infante J, Rosalen PL, Lazarini JG, Franchin M, Alencar SM (2016) Antioxidant and anti-

400 inflammatory activities of unexplored brazilian native fruits. PLoS ONE 11:e0152974. doi:  
401 10.1371/journal.pone.0152974  
402  
403 Jiménez D, Araque M, Rojas L, Cordero A, Briceño B (2012) Volatile components and  
404 antibacterial activity from *Myrcia splendens* (Sw.) DC. shoots. Rev. Fac. Farm. 54:7-11  
405  
406 Lago JH, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RC, Baroli AA, Carvalho  
407 BA, Soares MG, Santos RT, Sartorelli P (2011) Chemical and biological evaluation of  
408 essential oils from two species of myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora*  
409 (O. Berg) Kausel. Molecules 16:9827-9837. doi: 10.3390/molecules16129827  
410  
411 Lin J, Dou J, Xu J, (2012) Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of  
412 the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. Molecules 17:5030-9. doi:  
413 10.3390/molecules17055030  
414  
415 Lorenzi H (2009) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas  
416 nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum  
417  
418 Marin R, Apel MA, Limberger RP, Raseira MCB, Pereira JFM, Zuanazzi JÂS, Henriques  
419 AT (2008) Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits  
420 cultivated in Southern Brazil. Lat. Am. J. Pharm. 27:172-177  
421  
422 Nicácio AE, Rotta EM, Boeing JS, Barizão EO, Kimura E, Visentainer JV, Maldaner L  
423 (2017) Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from *Eugenia*  
424 *involucrata* DC. fruits by UHPLC-MS/MS. Food Anal. Methods 10:2718–2728. doi:

425 10.1007/s12161-017-0840-3

426

427 Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN (2005)

428 Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora*

429 L. Int. J. Aromather. 15:147-152. doi: 10.1016/j.ijat.2005.07.004

430

431 Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK (2016) Essential oils: sources of

432 antimicrobials and food preservatives. Front. Microbiol. 7:2161. doi:

433 10.3389/fmicb.2016.02161

434

435 Panigrahy SK, Kumar A, Bhatt R (2017) Antioxidant potentials of successive solvent

436 extracts from the unexplored *Hedhychium coronarium* rhizome. J. Food Sci. Technol.

437 54:3297-3306. doi: 10.1007/s13197-017-2777-3

438

439 R Development Core Team (2017) R: a language and environment for statistical. Vienna.

440

441 Ramos MFS, Siani AC, Souza MC, Rosas EC, Henriques MGMO (2006) Evaluation of the

442 anti-inflammatory activity of evaluation of the anti-inflammatory activity of essential oils

443 from five myrtaceae species. Rev. Fitos 2:58-66

444

445 Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jimenez JP, Calixto FDS

446 (2007) Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre

447 DPPH. Embrapa, 127:1-4

448

449 Santos MIS, Martins SR, Veríssimo CSC, Nunes MJC, Lima AIG, Ferreira RMSD,

450 Pedroso L, Sousa I, Ferreira MASS (2017) Essential oils as antibacterial agents against  
451 food-borne pathogens: are they really as useful as they are claimed to be? J. Food. Sci.  
452 Technol. 54:4344-4352. doi: 10.1007/s13197-017-2905-0  
453

454 Sausen TL, Löwe TR, Figueiredo LS, Buzatto CR (2009) Avaliação da atividade  
455 alelopática do extrato aquoso de folhas de *E. involucrata* e *A. sellowiana*. Polibotânica  
456 27:145-158  
457

458 Silva NCC, Fernandes Júnior A (2010) Biological properties of medicinal plants: a review  
459 of their antimicrobial activity. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 16:402-413. doi:  
460 10.1590/S1678-91992010000300006  
461

462 Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, Mossi A, Toniazzo  
463 G, Oliveira D, Treichel H (2010) Chemical composition and antioxidant and antibacterial  
464 activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb) Rev. Ceres 57:589-594. doi:  
465 10.1590/S0034-737X2010000500004  
466

467 Stefanello MEA, Cervi AC, Ito IY, Salvador MJ, Wisniewski AJ, Simionatto EL (2008)  
468 Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla*  
469 (Myrtaceae). J. Essent. Oil Res. 20:75-78. doi: 0.1080/10412905.2008.9699427  
470

471 Tadeg H, Mohammed E, Asres K, Gebre-Mariam T (2005) Antimicrobial activities of  
472 some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin  
473 disorders. J. Ethnopharmacol. 100:168-175. doi: 10.1016/j.jep.2005.02.031  
474

475 Tongnuanchan P, Benjakul S (2014) Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses  
476 for food preservation. *J. Food Sci.* 79:1231-1249. doi: 10.1111/1750-3841.12492  
477

478 Weber LD, Pinto FGS, Scur MC, Souza JGL, Costa WF, Leite CW (2014) Chemical  
479 composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant  
480 extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *Afr. J. Agric. Res.* 9:846-853. doi:  
481 10.5897/AJAR2013.8260  
482

483 Yu JQ, Liao ZX, Cai XQ, Lei JC, Zou GL (2007) Composition, antimicrobial activity and  
484 cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*  
485 23:162-167. doi: 10.1016/j.etap.2006.08.004

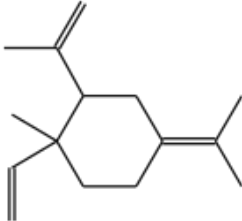
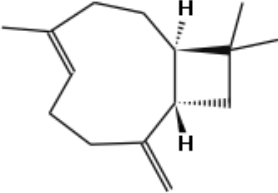
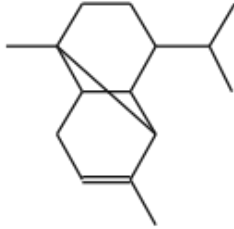
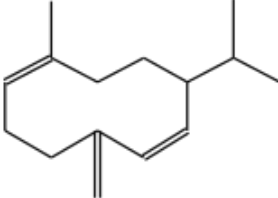
**Tabela 1** Composição química do óleo essencial das folhas de *E. involucrata* obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-EM

Nº	Composto	Area(%)	TR	RI	RI*
1	$\delta$ -Elemeno	4,29	25,97	1331	1337
2	$\alpha$ -Cubebeno	0,25	26,49	1343	1345
3	Ciclossativeno	0,21	27,43	1364	1367
4	$\alpha$ -Copaeno **	8,41	27,74	1371	1376
5	$\beta$ -Bourboneno	0,42	28,07	1378	1381
6	$\beta$ -Elemeno	4,95	28,35	1385	1390
7	$\alpha$ -Gurjuneno	0,48	29,08	1401	1409
8	$\beta$ -Cariofileno**	13,16	29,60	1414	1419
9	$\beta$ -Gurjuneno	0,81	30,05	1424	1431
10	Aromadendreno	0,70	30,38	1432	1440
11	$\alpha$ -cariofileno	3,45	31,11	1449	1459
12	Allo-Aromadendreno	2,82	31,29	1454	1465
13	$\gamma$ - Muroleno	1,04	31,97	1470	1476
14	Germacreno D **	7,17	32,19	1475	1480
15	Elixeno**	26,53	32,80	1489	1492 <sup>1</sup>
16	$\alpha$ -Muroleno	0,85	32,96	1493	1498
17	$\gamma$ -Cadineno	0,53	33,53	1507	1513
18	$\beta$ -Cadineno	6,00	33,75	1512	1518
19	1,4-Cadinadieno	0,06	34,31	1526	1528
20	$\alpha$ -Cadineno	0,11	34,48	1531	1533
21	$\alpha$ -Calacoreno	0,11	34,64	1535	1540
22	Germacreno B	0,70	35,32	1552	1551
	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	83,05			
23	Espatulenol	2,57	36,05	1570	1576
24	Óxido de cariofileno	0,75	36,24	1575	1581
25	Globulol	0,52	36,40	1579	1583
26	Iso-espatulenol	1,85	38,06	1621	1628
27	$\tau$ -Cadinol	0,46	38,60	1635	1638
28	$\alpha$ -Cadinol	0,21	39,09	1648	1652
	Sesquiterpenos oxigenados	6,36			
29	NI	1,75	32,49	1482	-
30	NI	4,25	33,27	1500	-
31	NI	1,07	34,05	1520	-
	Não identificados	7,07			
	<b>Total</b>	<b>96,48</b>			

TR: Tempo de Retenção; IR: valores dos Índices de retenção calculados; IR\*: valores dos Índices de retenção encontrados na literatura; \*\*Compostos Majoritários; NI: não identificado



**Tabela 2** Estrutura dos compostos majoritários do óleo essencial de *E. involucrata*

Nome	Estrutura
Elixeno	
β-Cariofileno	
α-Copaeno	
Germacreno D	

**Tabela 3** Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *E. involucrata* frente a microrganismos patogênicos

Microrganismos	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CBM/CFM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Gram-positivos		
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	875	7000
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	875	1750
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	7000	7000
<i>B. subtilis</i> (CCCD B005)	875	1750
Gram-negativos		
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	-	-
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933),	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATTC 27853)	-	-
Levedura		
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1750	3500

(-) Sem atividade

**Tabela 4** Porcentagem de sequestro de DPPH

Amostra	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )									
	0,0312	0,0625	0,125	0,250	0,500	10	20	30	40	50
<i>E. involucrata</i>	-	-	-	-	-	14,91 $\pm$ 0,33	25 $\pm$ 0,66	35,96 $\pm$ 1,6	51 $\pm$ 1,19	66,81 $\pm$ 2,16
BHT	25,03 $\pm$ 1,88	42,1 $\pm$ 1,49	67,28 $\pm$ 1,64	88,62 $\pm$ 0,45	94,59 $\pm$ 0,41	-	-	-	-	-

(-) não testado; média  $\pm$  desvio padrão

**Tabela 5** Valor de IC<sub>50</sub> pelo ensaio do DPPH.

Amostra	IC <sub>50</sub> ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )
<i>E. involucrata</i>	38,61 $\pm$ 1,11
BHT	0,094 $\pm$ 0,01

média  $\pm$  desvio padrão

## CAPÍTULO 2: Industrial Crops and Products

### Prospecção fitoquímica, atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de *Eugenia involucrata* DC.

Adrieli Gorlin Toledo<sup>a</sup>, Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, PR, Brasil.

\*Autor para correspondência.

*E-mail:* fabiana.pinto@unioeste.br (F.G.S. Pinto)

#### Resumo

A espécie *Eugenia involucrata* DC. é uma planta nativa do Brasil, tradicionalmente empregada em problemas intestinais, usada na forma de chás devido seu efeito antidiarreico e digestivo. No entanto, há poucas pesquisas que documentam o potencial terapêutico e perfil fitoquímico dessa planta. Assim, o objetivo do estudo foi realizar a prospecção fitoquímica para determinar os grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais solúveis em metanol (EM), etanol (EE), acetona (EA), acetato de etila (EAE), hexano (EH), diclorometano (ED) e água destilada (EAD) das folhas de *E. involucrata*, bem como avaliar o potencial antimicrobiano pela técnica de microdiluição em caldo e o potencial antioxidante pelo método de DPPH. A prospecção fitoquímica detectou a presença de saponinas, esteroides, flavonoides (flavonas, flavánois e

26 flavanonóis) e taninos. As atividades antimicrobiana e antioxidante foram observadas em  
27 todos os extratos testados. Os melhores resultados foram observados para o EM com  
28 atividade antimicrobiana entre 3,12 e 25 mg.mL<sup>-1</sup> e percentual antioxidante de 95,85 ±  
29 0,29% (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>), e para o EE com atividade antimicrobiana entre 3,12 e 50 mg.mL<sup>-1</sup> e  
30 atividade antioxidante de 92,84 ± 0,62% (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Sugere-se que as elevadas  
31 atividades biológicas observadas estejam relacionadas à presença dos compostos fenólicos  
32 (flavonoides e taninos) nos extratos testados. Os resultados sugerem que os EM, EE e EAD  
33 podem ser usados como uma fonte promissora de produtos naturais com potencial  
34 antimicrobianos e antioxidantes para aplicação na indústria.

35

36 **Palavras-chave:** Cerejeira-do-mato, Produtos naturais, Myrtaceae, Radicais livres,  
37 Biomoléculas

38

### 39 **1. Introdução**

40 Nos países em desenvolvimento, as plantas medicinais são muitas vezes o único  
41 tratamento acessível à população, e seu uso tem sido cada vez mais reconhecido na  
42 medicina tradicional (Teixeira e Silva, 2013; Who, 1998). As espécies vegetais fornecem  
43 uma grande variedade de constituintes farmacologicamente ativos, e devido a sua  
44 praticidade para preparo de infusões ou chás, permitem seu uso prolongado na medicina  
45 popular (Ziani et al., 2015).

46 Nos últimos anos, houve um crescente interesse em plantas nativas devido aos seus  
47 benefícios para a saúde, e o Brasil como um dos locais mais abundantes em biodiversidade  
48 de espécies vegetais, tornou-se um país de grande procedência na busca por princípios  
49 biologicamente ativos, fornecendo matérias-primas para obtenção de produtos químicos de  
50 alto valor (Andrade et al., 2009; Oliveira et al., 2012).

51 Na investigação por plantas medicinais nativas, a família Myrtaceae, tem como um  
52 de seus maiores representantes o gênero *Eugenia*, o qual compreende cerca de 400 espécies  
53 distribuídas por todo o Brasil (Sobral et al., 2015). Este gênero é bastante interessante do  
54 ponto de vista químico e farmacológico, e se destaca pelo seu potencial terapêutico.  
55 Estudos realizados com espécies deste gênero mostraram resultados promissores, como  
56 atividade antioxidante (Moresco et al., 2016) anti-inflamatória (Infante et al., 2016),  
57 antiviral (Sood et al., 2012), antibacteriana (Simonetti et al., 2016), hipoglicêmica (Sharma  
58 et al., 2008), entre outros.

59 A espécie *Eugenia involucrata* DC. é uma planta arbórea nativa, específica de  
60 região de Mata atlântica, popularmente conhecida por cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra,  
61 cerejeira-do-rio-grande ou cerejeira-preta. Essa espécie é muito utilizada no setor econômico  
62 devido à presença de frutos comestíveis e na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi,  
63 2009). Na medicina popular suas folhas são empregadas em forma de infusão no  
64 tratamento de diarreia e má digestão (Sausen et al., 2009; Huller e Schock, 2011).

65 Pouco se sabe sobre as propriedades antimicrobiana e antioxidante das folhas de *E.*  
66 *involucrata*, o que é intrigante, visto o potencial biológico do gênero. Na literatura não  
67 foram documentados trabalhos referentes à ação antimicrobiana dessa espécie, e somente  
68 mais recentemente, foi relatado a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas  
69 (Ciarlini et al., 2017) e do fruto de *E. involucrata* (Marin et al., 2008; Infante et al., 2016;  
70 Nicácio et al., 2017). Nesse sentido, estudos relacionados à composição química e  
71 potencial biológico de espécies vegetais tornam-se cada vez mais pertinentes, permitindo a  
72 validação do conhecimento etnobotânico e valorização da flora nativa.

73 Ademais, investigações com produtos naturais, tais como extratos vegetais têm  
74 chamado atenção dos consumidores e da indústria de alimentos e farmacêutica, visto o

75 crescente interesse por produtos que sejam fonte de biomoléculas com potencial biológico  
76 (Ahmed et al., 2016; Gyawali e Ibrahim, 2014).

77 Outro ponto importante é a crescente percepção dos consumidores sobre os efeitos  
78 deletérios dos conservantes sintéticos na saúde em relação aos benefícios dos aditivos  
79 naturais, bem como o uso inadequado de antimicrobianos comerciais, os quais podem  
80 resultar em aumento significativo de microrganismos resistentes, e, também mais  
81 tolerantes aos processos de conservação dos alimentos (Ahmed et al., 2016; Gyawali e  
82 Ibrahim, 2014).

83 Em vista disso, o presente estudo tem por objetivo realizar a prospecção  
84 fitoquímica dos principais grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos  
85 vegetais das folhas de *E. involucrata*, bem como investigar o potencial antimicrobiano e  
86 antioxidante dessa espécie.

87

## 88 **2. Material e métodos**

### 89 *2.1 Coleta e identificação do material vegetal*

90 A coleta das folhas de *E. involucrata* foi realizada no parque ecológico Paulo  
91 Gorski, localizado no município de Cascavel-PR, entre os meses de outubro de 2016 e  
92 março de 2017. A localização geográfica foi determinada utilizando o Sistema de  
93 Posicionamento Global (GPS) como segue: 24° 57' 49,8" S 53° 26' 1,4" W. Uma exsicata  
94 do material botânico foi depositada ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do  
95 Paraná (UNOP) sob número de *voucher* UNOP 1883.

96

### 97 *2.2 Obtenção dos extratos vegetais*

98 A partir das folhas de *E. involucrata* secas a 40° C entre 48 e 72 h e moídas em  
99 moinho de facas a 0,42 mm de granulometria, foram preparados os extratos vegetais

100 segundo a metodologia proposta por Pandini et al. (2015), com modificações. O material  
101 vegetal seco (10 g) foi submetido à extração com diferentes solventes (100 mL): metanol  
102 P.A. (EM), etanol P.A. (EE), acetona P.A. (EA), acetato de etila P.A. (EAE), hexano P.A.  
103 (EH), diclorometano P.A. (ED) e água destilada (EAD). Essas preparações líquidas foram  
104 mantidas em agitador rotativo a 220 rpm pelo período 24 h. Em seguida, foram filtradas  
105 utilizando papel filtro Whatman nº 1 e centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. O  
106 sobrenadante foi coletado e rotaevaporado, com exceção do extrato aquoso que foi  
107 liofilizado. Ao final, foram obtidos os extratos brutos orgânicos e o aquoso,  
108 respectivamente, que foram armazenados ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4° C. O  
109 rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela expressão: *Porcentagem (%) = (massa*  
110 *do extrato (g) / massa vegetal seca e moída (g)) X 100.*

111

### 112 2.3 Prospecção Fitoquímica

113 Os testes referentes à prospecção fitoquímica dos diferentes extratos vegetais de *E.*  
114 *involutrata* foram realizados segundo metodologia descrita por Matos (1997). Esses testes  
115 se basearam na visualização colorimétrica e/ou na formação de precipitado após a adição  
116 dos reagentes específicos. As classes de metabólitos secundários identificados foram:  
117 saponinas a partir da reação com água destilada e ácido clorídrico P.A.; esteroides e  
118 triterpenoides por meio da reação de Liebermann-Burchard; alcaloides empregando o  
119 reagente de Dragendorff; antocianidinas, antocianinas, auronas, chalconas, flavanonóis,  
120 flavonas, flavonóis, e xantonas a partir de mudanças de pH no meio; cumarinas por meio de  
121 reação de fluorescência com hidróxido de potássio e taninos através da reação com cloreto  
122 férrico.

123

### 124 2.4 Atividade antimicrobiana

#### 125 2.4.1 *Microrganismos utilizados*

126 Os extratos vegetais foram testados frente às cepas da coleção American Type  
127 Culture Collection (ATCC) e da Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica (CCCD). Como  
128 representantes Gram-negativas foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922),  
129 *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC  
130 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e  
131 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); e entre as Gram-positivas o *Staphylococcus aureus*  
132 (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis*  
133 (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (CCCD B005). Como representante de  
134 fungo foi usada a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

135 Os microrganismos foram recuperados em caldo de enriquecimento Brain Heart  
136 Infusion e incubados por 24 h a  $36 \pm 0,1^\circ$  C. Após este período, as cepas foram repicadas  
137 em meio ágar Mueller Hinton (MH) e incubadas por 24 h a  $36 \pm 0,1^\circ$  C. Para padronização  
138 do inóculo, as cepas foram diluídas em solução salina (0,85%) resultando na concentração  
139 final de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para bactérias e  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para levedura *C. albicans*.

140

#### 141 2.4.2 *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

142 Os ensaios foram realizados segundo a metodologia de microdiluição em caldo  
143 descrita por Weber et al. (2014), com modificações. Os extratos vegetais de *E. involucrata*  
144 foram solubilizados em metanol P.A., obtendo uma solução estoque (400 mg.mL<sup>-1</sup>). Em  
145 placas de microdiluição de 96 poços foram distribuídos a partir da primeira coluna o caldo  
146 MH para as cepas bacterianas e em caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para a  
147 levedura *C. albicans*. E em seguida foi realizada a diluição seriada obtendo concentrações  
148 que variaram de 200 a 0,09 mg.mL<sup>-1</sup>. Ao final, foram adicionados 10 µL de inóculo em  
149 cada poço e as placas foram incubadas a  $36 \pm 0,1^\circ$  C entre 18-24 h. Para o controle positivo



150 foi utilizado o antibiótico comercial Gentamicina ( $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e o antifúngico comercial  
151 Nistatina ( $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Como controle negativo foi adicionado o inóculo ao caldo  
152 MH/RPMI, sem presença do extrato para verificar a viabilidade do microrganismo testado.  
153 Também foi realizado o controle de esterilidade dos extratos solubilizados em metanol  
154 P.A. e um controle do diluente metanol P.A. para verificar se há interferência no ensaio. O  
155 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % foi utilizado como revelador colorimétrico. A  
156 CIM foi realizada em triplicata, sendo possível determinar a menor concentração dos  
157 extratos capaz de inibir o crescimento microbiano.

158

#### 159 *2.4.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)*

160 Para o ensaio foi realizada a metodologia de Weber et al. (2014), com  
161 modificações. Antes da adição do TTC a 0,5 % para determinar o CIM, foi retirada uma  
162 alíquota de  $2 \mu\text{L}$  de cada poço da placa de microdiluição e semeada na superfície do ágar  
163 MH. As placas foram incubadas a  $36 \pm 0,1^\circ \text{C}$ , entre 18-24 h. O ensaio foi realizado em  
164 triplicata, e para determinar a CBM/CFM foi observado se houve crescimento microbiano  
165 em ágar MH, permitindo verificar a menor concentração dos extratos vegetais capaz de  
166 causar a morte da bactéria/fungo testado.

167

#### 168 *2.5 Atividade antioxidante*

169 A atividade antioxidante dos extratos vegetais foi realizada conforme o método da  
170 redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), proposto por Rufino et al.  
171 (2007), com modificações. Como branco, foi utilizado metanol P.A. para a calibração do  
172 espectrofotômetro. Primeiramente, foi feita uma curva de calibração (0, 10, 20, 30, 40, 50 e  
173  $60 \mu\text{M}$  DPPH) para se obter a concentração de DPPH no meio após a reação com o extrato,  
174 encontrando a equação  $y = 0,0117x + 0,0102$  ( $R^2 = 0,999$ ), onde  $y$  é a concentração de

175 DPPH e  $x$  é absorvância. Em seguida, os extratos vegetais foram solubilizados em metanol  
176 P.A., obtendo concentrações que variaram de 0,1 a 15 mg.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 0,1 mL  
177 desses extratos foi adicionada a 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (60 µM) e  
178 homogeneizados em agitador de tubos. Como controle negativo foi utilizado metanol P.A.  
179 e como controle positivo o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno) em  
180 concentrações de 0,025 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A leitura das absorvâncias foram realizados em  
181 espectrofotômetro a 515 nm em intervalos de 1 min até a estabilização. Todas as  
182 concentrações foram definidas a partir de pré-teste para determinar a atividade antioxidante  
183 no intervalo aproximado de 20% a 80% de sequestro de radicais livres DPPH. A  
184 porcentagem de sequestro do radical livre (AA%) foi expressa pela equação: AA%:  $[(A_0 -$   
185  $A_1) / A_0] \times 100$ , onde  $A_0$  é a absorvância do controle negativo e  $A_1$  é a absorvância da  
186 amostra. Para o cálculo de IC<sub>50</sub> (quantidade de substância antioxidante necessária para  
187 reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), foram utilizadas as concentrações dos  
188 extratos vegetais e do BHT para obter a equação da reta com R<sup>2</sup> maior que 0,80, e assim,  
189 encontrar o valor de IC<sub>50</sub>, a partir de regressão linear. Os testes foram realizados em  
190 triplicata e expressos como média ± desvio padrão. Os resultados de IC<sub>50</sub> foram analisados  
191 usando ANOVA com teste de Tukey (p <0,05) utilizando o programa estatístico R® versão  
192 3.3.2.

193

### 194 **3. Resultados e Discussão**

#### 195 *3.1 Prospecção fitoquímica*

196 A partir da confecção dos extratos vegetais de *E. involucrata* com diferentes  
197 solventes, obteve-se os seguintes rendimentos: EM (23,6%), EE (19,42%), EA (9,38%),  
198 EAE (7,6%), EH (6,35%), ED (6,31%) e EAD (9,84%). Muitas variáveis influenciam no  
199 rendimento dos metabólitos em extratos vegetais, desde a temperatura, tempo de extração,

200 relação sólido-solvente, entre outras. No entanto, o fator mais importante é a seleção do  
 201 solvente, que devido as suas complexas características químicas, como a polaridade e  
 202 solubilidade, influenciam diretamente no rendimento dos extratos (Cabana et al., 2013;  
 203 Fernández-Agulló et al., 2013).

204 A investigação fitoquímica dos extratos revelou a presença de compostos  
 205 pertencentes à classe das saponinas, esteroides livres, flavonoides (flavonas, flavánois e  
 206 flavanonóis), xantonas e taninos (Tabela 1). Os esteroides livres foram a única classe de  
 207 metabólitos secundários presentes em todos os extratos. Os extratos que apresentaram a  
 208 maior diversidade de metabólitos secundários foram o EE e o EAD, seguido dos extratos  
 209 de EM, EAE, EA, EH e ED. A literatura relata que os extratos vegetais comumente ricos  
 210 em metabólitos, utilizam como solventes extratores principalmente metanol, etanol,  
 211 acetona e acetato de etila (Cabana et al., 2013; Fernández-Agulló et al., 2013).

Tabela 1 Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos vegetais das folhas de *E. involucrata*.

Metabólitos secundários	EM	EE	EAE	EA	EH	ED	EAD
Saponinas	++	+	-	-	-	-	++
Esteroides livres	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenoides	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	-	-	-	-
Flavonas	-	+	+	-	-	-	+
Flavanóis	-	+	+	-	-	-	+
Xantonas	-	+	+	-	-	-	+
Chalconas	-	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	-	-	-
Flavanonóis	+	-	-	-	-	-	-
Taninos condensados	++	++	-	+	-	-	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-

(+) presença; (-) ausência.

212

213 A diferença verificada na composição dos extratos pode ser explicada pela riqueza  
 214 de metabólitos presentes, o rendimento durante a extração, bem como as características de

215 polaridade do solvente utilizado, sendo estes fatores determinantes na extração de  
216 compostos bioativos com potencial biológico (Fernández-Agulló et al., 2013; Pimentel et  
217 al., 2013).

218 Dentro do gênero *Eugenia* as classes de metabólitos secundários mais encontrados  
219 são os flavonoides, triterpenoides e taninos (Queiroz et al., 2015). Contudo, não foram  
220 encontrados trabalhos relacionados à presença de fitoquímicos em extratos foliares de *E.*  
221 *involucrata*. No entanto, o fruto foi bastante estudado comprovando a presença de  
222 compostos fenólicos, assim como em nossa pesquisa, confirmando o potencial da espécie  
223 como matéria-prima para extração de compostos bioativos (Infante et al., 2016; Nicácio et  
224 al., 2017).

225

### 226 3.2 Atividade antimicrobiana

227 No ensaio de microdiluição em caldo, todos os extratos vegetais das folhas de *E.*  
228 *involucrata* foram testados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento (CIM) ou  
229 causar a morte (CBM/CFM) dos microrganismos (Tabela 2). A CIM e a CBM/CFM dos  
230 extratos vegetais foram classificadas de acordo com Pandini et al. (2015), sendo a  
231 atividade enquadrada em uma das 4 classes: elevada ( $<12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), moderada (12,5 a 25  
232  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), baixa (50 a 100  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e muito baixa ( $>100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

233 Observou-se que a atividade dos extratos variou de acordo com o solvente extrator  
234 e o microrganismo testado. Assim sendo, todos os extratos de *E. involucrata* apresentaram  
235 potencial antimicrobiano frente as 11 cepas testadas, com exceção do EAD, que não  
236 apresentou atividade antimicrobiana frente a cepa *K. pneumoniae*. Este extrato apresentou  
237 as atividades mais baixas, com valores CIM e CBM entre 50 e 200  $\text{mg.mL}^{-1}$ , no entanto,  
238 revelou a maior presença de grupos de compostos secundários. A prospecção fitoquímica,  
239 por se tratar de um método qualitativo, não permite quantificar esses grupos, e a presença

240 destesem baixas quantidades, provavelmente não foram suficientes para promover uma  
 241 inibição efetiva dos patógenos testados.

Tabela 2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos diferentes extratos das folhas de *E. involucrata* frente diferentes cepas patogênicas.

Cepas	CIM/CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )						
	EM	EE	EAE	EA	EH	ED	EAD
<b>Gram-positivas</b>							
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	3,12/25	3,12/6,25	25/50	12,5/25	12,5/50	12,5/100	50/50
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	12,5/12,5	6,25/12,5	12,5/25	12,5/12,5	100/100	12,5/50	50/100
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	6,25/12,5	12,5/50	100/100	12,5/50	25/50	25/200	50/50
<i>B. subtilis</i> (CCCD B005)	3,12/6,25	6,25/12,5	12,5/25	12,5/12,5	50/50	6,25/12,5	100/200
<b>Gram-negativas</b>							
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	25/25	12,5/25	25/100	12,5/25	50/100	50/50	50/ -
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	25/25	12,5/25	25/50	12,5/25	50/100	50/100	50/ -
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	12,5/25	12,5/25	12,5/25	12,5/25	25/50	25/50	50/ -
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	25/25	25/50	6,25/6,25	6,25/12,5	50/50	12,5/50	- / -
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933),	6,25/12,5	12,5/12,5	25/50	12,5/25	50/100	50/50	100/ -
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	12,5/25	12,5/12,5	25/50	25/50	50/100	12,5/100	50/ -
<b>Levedura</b>							
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	12,5/25	12,5/50	25/25	50/50	25/25	25/50	50/200

(-) Sem atividade.

242

243 A atividade antimicrobiana dos extratos declinou na seguinte ordem: EM > EE >  
 244 EA > EAE > ED > EH > EAD. Os EM e EE apresentaram as maiores atividades quando  
 245 comparados aos demais extratos. O EM apresentou valores de atividade antimicrobiana  
 246 que variaram de 3,12 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo classificado com atividade entre elevada e  
 247 moderada. Já o EE apresentou atividade antimicrobiana entre 3,12 e 50 mg.mL<sup>-1</sup>  
 248 apresentando uma variação entre elevada, moderada a baixa. Estes extratos apresentaram  
 249 propriedades antimicrobianas muito similares e compostos fitoquímicos semelhantes,  
 250 apresentando diferença apenas nos tipos de compostos fenólicos encontrados. O EM

251 apresentou flavanonóis, enquanto o EE demonstrou a presença de flavonas, flavánois e  
252 xantonas, o que pode justificar a variação na ação antimicrobiana.

253 Os EAE, ED e EH apresentaram em sua maioria, atividade antimicrobiana  
254 considerada entre moderada e baixa, sendo que não foram encontrados taninos. Já o EA  
255 com comprovada presença de taninos, apresentou melhor desempenho, com atividade  
256 antimicrobiana moderada para maioria (8/11) das cepas testadas.

257 Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para diferentes  
258 espécies de *Eugenia*, como podemos citar: *Eugenia umbeliflora* (Machado et al., 2005),  
259 *Eugenia pyriformis* (Souza et al., 2014), *Eugenia brejoensis* (Azevedo et al. 2012) e  
260 *Eugenia brasiliensis* (Magina et al 2012). Pode-se destacar também o extrato metanólico  
261 das folhas de *Eugenia uniflora* com elevada inibição tanto para Gram-positivas quanto para  
262 Gram-negativas (10-156  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Bouzada et al., 2008) e o extrato etanólico com CIM  
263 alta (0,54-2,18  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) frente as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P.*  
264 *aeruginosa* (Fiúza et al., 2008). Contudo, não foi verificado na literatura dados sobre o  
265 potencial antimicrobiano de extratos vegetais de *E. involucrata*, considerando este o  
266 primeiro relato do potencial antimicrobiano dessa espécie.

267 O perfil antimicrobiano dos extratos vegetais frente à levedura *C. albicans* revelou  
268 ação entre moderada e baixa, com exceção do EAD com CBM 200  $\text{mg.mL}^{-1}$ , considerado  
269 muito baixo. Resultados semelhantes foram encontrados para a atividade antifúngica do  
270 extrato hidro-alcoólico de *E. uniflora* frente a de três espécies de *Candida* (CIM entre 31,2  
271 e 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Holetz et al., 2002).

272 Devido às comprovadas propriedades antimicrobianas dos metabólitos secundários  
273 em plantas, sugere-se que o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de *E.*  
274 *involucrata* esteja relacionado ao seu perfil fitoquímico. Os flavonóides presentes nos EM,  
275 EE, EAE e EAD são substâncias fenólicas hidroxiladas com comprovada atividade

276 antimicrobiana na literatura. Estes por sua vez, atuam na formação de complexos com  
277 proteínas extracelulares e solúveis, que se ligam a parede celular bacteriana causando  
278 danos irreversíveis a célula (Sher, 2009; Samy e Gopalakrishnakone, 2010).

279 Os taninos presentes nos EM, EE, EA e EAD, também pertencentes ao grupo dos  
280 compostos fenólicos, são caracterizados pelas suas propriedades de adstringência, além de  
281 inibirem bactérias Gram-positivas que causam a deterioração dos alimentos (*B. subtilis*),  
282 patógenos transmitidos via alimentos contaminados (*S. aureus*), bem como bactérias  
283 Gram-negativas (*E. coli*), além da comprovada inibição de crescimento de muitos fungos e  
284 leveduras (Samy e Gopalakrishnakone 2010; Gyawali e Ibrahim 2014). Seu modo de ação  
285 pode estar relacionado formação de complexos com enzimas e proteínas microbianas  
286 inativando suas funções, pode inibir o transporte de elétrons através de membranas ou  
287 ainda causar alterações em íons cobre e ferro relacionados a atividades de algumas enzimas  
288 essenciais a célula (Sher, 2009; Samy e Gopalakrishnakone 2010; Mendez et al., 2012;  
289 Gyawali e Ibrahim 2014). Já as saponinas encontradas nos EM, EE e EAD foram relatadas  
290 pelo seu potencial antimicrobiano, agindo sobre a membrana celular bacteriana e  
291 aumentando sua permeabilidade (Simões et al. 2004; Gyawali e Ibrahim 2014).

292 Em geral, todos os extratos afetaram o crescimento ou causaram a morte das cepas  
293 patogênicas, sugerindo que os compostos presentes nesses extratos, principalmente os  
294 compostos fenólicos, desempenham um importante papel antimicrobiano frente às cepas  
295 testada.

296

### 297 3.3 Atividade antioxidante

298 A capacidade antioxidante dos extratos vegetais de *E. involucrata* foi determinada  
299 pelo ensaio de sequestro de radicais livres de DPPH (Tabela 3 e 4). Esse ensaio trata-se de

300 um método direto e confiável para medir a capacidade anti-radical de extratos vegetais  
 301 (Cabana et al., 2013).

Tabela 3. Porcentagem de sequestro de radicais DPPH.

Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Controle BHT	Extratos vegetais de <i>E. involucrata</i>						
		EM	EE	EAE	EA	EH	ED	EAD
15	-	-	-	-	-	80,82±3,03	-	-
10	-	-	-	-	-	66,09±2,42	77,05±0,8	-
7,5	-	-	-	-	-	49,07±2,42	69,67±0,8	87,05±0,1
5,0	-	-	-	-	-	44,06±3,23	54,57±1,11	83,83±0,4
2,5	-	-	-	91,13±0,14	-	25,6±0,8	34,61±1,01	57,79±0,6
1,0	-	95,85±0,29	92,84±0,62	64,52±2,64	91,13±1,03	-	16,88±0,2	29,68±0,1
0,75	-	92,98±0,36	85,69±3,17	54,5±0,89	80,82±0,83	-	-	24,46±0,4
0,50	94,92±0,91	80,68±2,72	74,64±3,27	39,34±2,49	69,52±0,97	-	-	-
0,25	85,12±1,61	54,22±0,87	48,49±3,05	23,46±1,15	42,48±3,08	-	-	-
0,10	57,65±1,82	27,46±1,0	24,32±2,34	-	21,17±1,65	-	-	-
0,05	37,41±0,5	-	-	-	-	-	-	-
0,025	24,46±1,01	-	-	-	-	-	-	-

(-) não testado; média ± desvio padrão.

302

303 Os extratos que apresentaram maior sequestro de radicais DPPH foram os EM, EE  
 304 e EA na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, obtendo um percentual antioxidante de 95,85%,  
 305 92,84% e 91,13%, respectivamente, e valores de IC<sub>50</sub> considerados significativamente  
 306 iguais quando comparados entre si (p<0,05). Dentre todos os extratos vegetais testados, o  
 307 EM foi que o apresentou valor de IC<sub>50</sub> considerado igual ao valor encontrado para o  
 308 antioxidante comercial BHT (p<0,05). Já os EAE, EH, ED e EAD expressaram diferenças  
 309 significativas nos valores de IC<sub>50</sub> quando comparados entre si e com o BHT (p<0,05)  
 310 (Tabela 4). Devido a questionável toxicidade do antioxidante sintético BHT a saúde e a  
 311 preferência do consumidor por produtos naturais, é cada vez mais comum estudos com  
 312 antioxidantes em *Eugenia* spp., principalmente relacionado ao conteúdo fenólico (Durling  
 313 et al., 2007; Magina et al., 2010; Fernández-Agulló et al., 2013; Queiroz et al., 2015).

314 O efeito sequestrador dos extratos foi considerado dependente da concentração, e  
 315 de modo geral, foi verificado que alguns extratos necessitam concentrações maiores para  
 316 alcançar o máximo de potencial antioxidante. Contudo, todos apresentaram porcentagem



317 de sequestro de DPPH excelentes, acima de 70%, sendo possível determinar que o declínio  
 318 de atividade antioxidante seguiu a ordem: EM > EE > EA > EAE > EAD > ED > EH.

319 Tabela 4. Valor de IC<sub>50</sub> pelo ensaio do DPPH.

320 Amostras	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Equação	R <sup>2</sup>
BHT	0,11±0,003 a	y = 0,1396x + 34,088	0,82
321 EM	0,24±0,014 ab	y = 0,0744x + 31,536	0,87
EE	0,31±0,036 b	y = 0,0741x + 26,697	0,90
322 EAE	0,82±0,050 c	y = 0,0275x + 27,136	0,89
EA	0,37±0,018 b	y = 0,0761x + 21,442	0,93
EH	7,28±0,107 d	y = 0,0043x + 18,501	0,96
323 ED	5,09±0,018 e	y = 0,0067x + 15,892	0,95
EAD	2,66±0,002 f	y = 0,0096x + 24,327	0,89

324 média ± desvio padrão; letras distintas na mesma coluna  
 325 expressam diferenças significativas (p <0,05).

326 Dessa forma, foi verificado o importante papel dos solventes na determinação das  
 327 atividades biológicas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana, além de suas  
 328 características determinantes na extração de compostos bioativos. Foi possível observar  
 329 que extratos a base de água, misturas hidroalcoólicas, etanol, metanol e acetona são mais  
 330 efetivos para a extração de compostos antioxidantes, devido a alta polaridade e boa  
 331 solubilidade dos solventes, principalmente para extração de compostos fenólicos (Durling  
 332 et al., 2007; Fernández-Agulló et al., 2013; Onivogui et al., 2016; Kharchoufi et al., 2018).

333 Apesar de nenhum relato na literatura referente à atividade antioxidante dos  
 334 extratos vegetais das folhas de *E. involucrata*, estudos com o fruto demonstraram excelente  
 335 potencial antioxidante correlacionado com o teor de fenólicos presentes (Infante et al.,  
 336 2016; Nicácio et al., 2017).

337 A atividade antioxidante dos extratos está relacionada com os compostos capazes  
 338 de preservar os sistemas biológicos de efeitos nocivos de radicais livres, como por  
 339 exemplo, a deterioração de produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos; o  
 340 crescimento de microrganismos indesejáveis; e a participação fundamental nos danos  
 341 celulares e processos de envelhecimento (Bozin et al., 2009; Fernández-Agulló et al., 2013;

342 Guangrog et al., 2008). Visto isso, pode-se inferir que os EM, EE e EA, juntamente com  
343 EAD devido a sua baixa toxicidade, são excelentes candidatos para uso na indústria,  
344 sugerindo que seu potencial antioxidante esteja relacionado ao conteúdo fenólico  
345 (flavonoides e taninos) presente. Esses compostos fenólicos podem agir sequestrando os  
346 radicais livres e reduzindo assim, o potencial redox do meio, quelando íons metálicos pró-  
347 oxidantes e inibindo algumas enzimas, o que conseqüentemente, pode também restringir o  
348 crescimento de organismos contaminantes (Gyawali e Ibrahim 2014; Oliveira et al., 2009).

349

#### 350 **4. Conclusão**

351       Esse estudo objetivou fornecer informações inéditas referentes ao perfil biológico e  
352 fitoquímico dos diferentes extratos das folhas de *E. involucrata*. De acordo com a  
353 prospecção fitoquímica, os extratos vegetais revelaram a presença de saponinas, esteroides  
354 livres, flavonoides (flavonas, flavánois e flavanonóis) e taninos, inferindo a relação dessas  
355 classes de metabólitos com a atividade antimicrobiana e antioxidante encontradas. Além  
356 disso, nossos resultados demonstraram excelente atividade antimicrobiana, que variou  
357 conforme o solvente extrator e os microrganismos testados; e excelente atividade  
358 antioxidante, com porcentagens de sequestro de radicais DPPH acima de 70%. Os extratos  
359 vegetais que apresentaram os melhores resultados referente às atividades biológicas  
360 testadas foram, o EM e EE, e destaca-se também o EAD devido a sua baixa toxicidade.  
361 Referente aos EM e EE, fica evidente a influência dos compostos fenólicos (flavonoides e  
362 taninos) na elevada atividade antimicrobiana e antioxidante. De acordo com esses  
363 resultados promissores, as informações sobre o “pool” de fitoquímicos e atividades  
364 biológicas de *E. involucrata* são uma contribuição valiosa para futuros bioensaios e,  
365 possível uso nos diferentes setores da indústria.

366

367 **Conflitos de interesse**

368 Os autores declaram não haver conflito de interesses em relação à publicação deste artigo.

369

370 **Agradecimentos**

371 O primeiro autor agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
372 Superior - CAPES (órgão governamental vinculado ao Ministério da Educação brasileiro  
373 encarregado de promover altos padrões de pós-graduação no Brasil) pela bolsa concedida  
374 para o estudo; e ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) pela  
375 identificação botânica.

376

377 **Referências**

378 Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S., 2016. A review on plants extract mediated  
379 synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. J. Adv.  
380 Res., 7, 17–28.

381

382 Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009. Bioactive extracts  
383 from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. Ind. Crops Prod. 30, 165-167.

384

385 Azevedo, P., Silva, L., Silva, A., Macedo, A., Araujo, J., Silva, M., 2012. Antimicrobial  
386 activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*.  
387 Sci. Plena. 8, 1-4.

388

389 Bouzada, M.L.M., Fabrin, R.L., Nogueira, M., Konno, T.U.P., Duarte, G.G., Scio, E.,  
390 2009. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening some traditional medicinal  
391 plants in Brazil. Pharm. Biol. 47, 44-52.

392

393 Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E., 2007. Antimicrobial and antioxidant  
394 properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.,  
395 Lamiaceae) essential oils. J. Agric. Food Chem. 55, 7879-7885.

396

397 Cabana, R., Silva, L.R., Valentao, P., Viturro, C.I., Andrade, P.B., 2013. Effect of different  
398 extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia*  
399 (Phil.) Epling (Lamiaceae). Ind. Crops Prod. 48, 49-56.

400

401 Ciarlini, J.J.S., Marangoni, A., Bolzan, A., 2017. Selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> extraction  
402 and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia*  
403 *involutrata* leaves from Southern Brazil. Food Bioprod. Process. 106, 29-34.

404

405 Durling, N.E., Cathpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry,  
406 N.B., 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*)  
407 using ethanol-water mixtures. Food Chem. 50, 5294-5299.

408

409 Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M.S., Valentão, P., Andrade, P.B., González-  
410 Álvarez, J.A., Pereira, J.A., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial  
411 properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Ind. Crops Prod. 42, 126–132.

412

413 Fiúza, T.S., Sabóia-Morais, S.M.T., Paula, J.R., Tresvenzol, L.M.F., Pimenta, F.C., 2008.  
414 Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L.  
415 leaves (in Portuguese). Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 29, 245-250.

416

417 Guangrog, H., Jiabin, J., Dehui, D., 2008. Antioxidative and antibacterial activity of the  
418 methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1335- 1338.  
419

420 Gyawali, R., Ibrahim, S.A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.*  
421 46, 412–429.  
422

423 Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., 2002. Screening  
424 of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.  
425 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.  
426

427 Huller A., Schock, A.A., 2011. Evaluation of allelopathic potential of three species of  
428 *Eugenia* L. (Myrtaceae) about the germinative process of *Lactuca sativa* L. (in  
429 Portuguese). *Rev. Ciênc. Ambient.* 5, 25-37.  
430

431 Infante, J., Rosalen, P.L., Lazarini, J.G., Franchin, M., Alencar, S.M., 2016. Antioxidant  
432 and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. *PLoS One.* 11,  
433 e0152974.  
434

435 Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., Restuccia, C.,  
436 2018. Antimicrobial and antioxidant features of ‘Gabsi’ pomegranate peel extracts. *Ind.*  
437 *Crops Prod.* 111, 345-352.  
438

439 Lorenzi, H., 2009. Brazilian trees: identification and cultivation of native tree plants in  
440 Brazil (in Portuguese), third ed. Instituto Plantarum, Rio de Janeiro.  
441

442 Machado, K.E., Cechinel-Filho, V., Tessarolo, R., Mallmann, C., Meyre-Silva, C., Bella-  
443 Cruz, A., 2005. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharm. Biol.* 43, 636-  
444 639.

445

446 Magina, M.A., Gilioli, A., Moresco, H.H., Colla, G., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C.,  
447 2010. Antioxidant activity of three species of *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 29,  
448 376-382.

449

450 Magina, M.D.A., Dalmarco, E.M., Dalmarco, J.B., Colla, G., Pizzolatti, M.G., Brighente,  
451 I.M.C., 2012. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Quim.*  
452 *Nova.* 35, 1184-1188.

453

454 Marin, R., Apel, M.A., Limberger, R.P., Raseira, M.C.B., Pereira, J.F.M., Zuanazzi, J.Â.S.,  
455 Henriques, A.T., 2008. Volatile components and antioxidant activity from some  
456 Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Lat. Am. J. Pharm.* 27, 172-177.

457

458 Matos, F.J.A., 1997. Introduction to experimental phytochemistry (in Portuguese), second  
459 ed. UFC, Fortaleza.

460

461 Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo,  
462 F.D, Aguilar, C.N., 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative  
463 organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Ind. Crops Prod.* 37, 445-450.

464

465 Moresco, H.H., Colla, G., Cavalcante, I.D., Queiroz, G.S., Pizzolatti, M.G., Brighente,  
466 I.M., 2016. Chemical constituents of *Eugenia catharinae* and their antioxidant activity.  
467 Nat. Prod. Res. 13, 1-5.  
468  
469 Nicácio, A.E., Rotta, E.M., Boeing, J.S., Barizão, E.O., Kimura, E., Visentainer, J.V.,  
470 Maldaner, L., 2017. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from  
471 *Eugenia involucrata* DC. fruits by UHPLC-MS/MS. Food Anal. Methods 10:2718-2728.  
472  
473 Oliveira, A.P., Valentão, P., Pereira, J.A., Silva, B.M., Tavares, F., Andrade, P.B., 2009.  
474 *Ficus carica* L. Metabolic and biological screening. Food Chem. Toxicol. 47, 2841-2846.  
475  
476 Oliveira, V.B., Yamada, L.T., Fagg, C.W., Brandão, M.G.L., 2012. Native foods from  
477 Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. Food Res. Int. 48, 170-179.  
478  
479 Onivogui, G., Letsididi, R., Diaby, M., Wang, L., Song, Y., 2016. Influence of extraction  
480 solvents on antioxidant and antimicrobial activities of the pulp and seed of *Anisophyllea*  
481 *laurina* R. Br. ex Sabine fruits. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 6, 20-25.  
482  
483 Pandini, J.A., Pinto, F.G.S., Scur, M.C., Alves, L.F.A., Martins, C.C., 2015. Antimicrobial,  
484 insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A.  
485 Juss. J. Med. Plant Res. 9, 48-55.  
486  
487 Pimentel, F.A., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Queiroz, F., Barbosa, L.C.A., Morais,  
488 A.R., Nelson, D.L., Andrade, M.A., Zacaroni, L.M., Pimentel, S.M.N.P., 2013. Extracts

489 from the leaves of *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction with  
490 CO<sub>2</sub> employing ethanol and methanol as co-solvents. Ind. Crops Prod. 43, 490–495.  
491

492 Queiroz, J., M. Suzuki, M., Motta, A., Nogueira, J., Carvalho, E., 2015. Popular and  
493 scientific aspects of *Eugenia* species use as herbal (in Portuguese). Rev. Fitos 9, 87-100.  
494

495 Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Jimenez, J.P.,  
496 Calixto, F.D.S., 2007. Determination of total antioxidant activity in fruits by the capture of  
497 free radical DPPH (in Portuguese). Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado técnico  
498 127, 1-4.  
499

500 Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., 2010. Therapeutic potential of plants as antimi-  
501 crobials for drug discovery. Evid. Based Compl. Altern. Med. 7, 283–294.  
502

503 Sausen, T.L., Löwe, T.R., Figueiredo, L.S., Buzatto, C.R., 2009. Avaliação da atividade  
504 alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O.  
505 Berg) Burret (in Portuguese). Polibotânica 27, 145-158.  
506

507 Sharma, B., Balomajumder, C., Roy, P., 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of  
508 flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic  
509 rats. Food Chem. Toxicol. 46, 2376-2383.  
510

511 Sher, A., 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. Gomal J.  
512 Med. Sci. 7, 72-78.  
513



514 Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R.,  
515 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento (in Portuguese), quinta ed. UFSC, Porto  
516 Alegre.

517

518 Simonetti, E., Ethur, M.E., Castro, L.C., Kauffmann, C., Giacomini, A.C., Ledur, A.,  
519 Arossi, K., Pacheco, L.A., Goettert, M.I., Faleiro, D., Freitas, E.M., 2016. Evaluation of  
520 the antimicrobial activity of extracts of *Eugenia anomala* and *Psidium salutare*  
521 (Myrtaceae) against the *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* (in Portuguese). Rev.  
522 Bras. Pl. Med. 18, 9-18.

523

524 Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E., 2015. Myrtaceae in Lista de  
525 Espécies da Flora do Brasil. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>. (Acesso  
526 em 7 de janeiro de 2018).

527

528 Sood, R., Swarup, D., Bhatia, S., Kulkarni, D.D., Dey, S., Saini, M., Dubey, S.C., 2012.  
529 Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. against highly pathogenic  
530 avian influenza (H5N1) virus. Indian J. Exp. Biol. 50, 179-186.

531

532 Souza, A.M., Armstrong, L., Merino, F.J.Z., Cogo, L.L., Monteiro, C.L.B., Duarte, M.R.,  
533 Miguel, O.G., Miguel, M.D. 2014. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess,  
534 Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and  
535 Fluconazole. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 8, 862-867.

536

537 Teixeira, R., Silva, L.R., 2013. Bioactive compounds and in vitro biological activity of  
538 *Euphrasia rostkoviana* Hayne extracts. Ind. Crops Prod. 50, 680-689.

539

540 Weber, L.D., Pinto, F.G.S., Scur, M.C., Souza, J.G.L., Costa, W.F., Leite, C.W., 2014.  
541 Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and  
542 various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. Afr. J. Agric. Res. 9, 846-853.

543

544 World Health Organization (Who), 1998. Guidelines for the Appropriate use of Herbal  
545 Medicines. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2945e/> (Acesso em 8 de janeiro de  
546 2018).

547

548 Ziani, E.C.B., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Hazzit, M., Ferreira, I.C.F.R.,  
549 2015. Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the  
550 species with the highest potential in view of application purposes. Ind. Crops Prod. 77,  
551 582-589

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALAMED, J. et al. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2969–76, 2009.

ALMEIDA, C. L. B. de. **Estudo químico e farmacológico de frutos silvestres obtidos de Santa Caratina e Mato Grosso**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí, 2013.

ALVES, R. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimento de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods - a brief review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ARAÚJO, I. S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, W. L. R. et al. Selecting medicinal plants for development of phytomedicine and use in primary health care. In: RASOOLI, I (Ed.). **Bioactive compounds in phytomedicine**. Londres: InTech, 2012, p. 978-953. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/selecting-medicinal-plants-for-development-of-phytomedicine-and-use-in-primary-health-care>>. Acesso em 10 nov 2017.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from South Central, and North America with hypoglycemic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICO, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007.

BLOCK, J. M.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P.; FELTES, M. M. C. Current policies in Brazil for ensuring nutritional quality. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 4, p. 275–288, 2017.

BOUZIDI, A. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects of *Tunisian Limoniastrum guyonianum*, Durieu ex Boiss extracts, Pak, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 1299–1305, 2016.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p 408-420, 2006.

BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 1663-1672, 1999.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRUN G. R.; MOSSI A. J. Caracterização química e Atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Perspectiva**, v. 34, p. 135-142, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, P. E. R. (Eds.). **Cerejeira - *Eugenia involucrata***. Embrapa Florestas (Comunicado técnico, 224). Colombo: Embrapa Florestas, p. 1-8, 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2010/46373/1/CT224.pdf>>. Acesso em 19 fev. 2018.

CIARLINI, J. J. S.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. Selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 29-34, 2017.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Eds.) **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250–1268.

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

CUERDA, C. et al. Revisión Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, p. 68-78, 2011.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em

Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, C.; COSTA, R. R. (Eds.). **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)**. Embrapa Clima Temperado (Documentos, 211). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 10-20, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/746075/1/documento211.pdf>>. Acesso em 19 fev. 2018.

DELBONE, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: CONGRESSO DE EDUCAÇÃO DO NORTE PIONEIRO, 10., 2010, Jacarezinho. **Anais eletrônicos...** Jacarezinho: UENP, 2010. Disponível em: <<http://www.uenp.edu.br/trabalhos/cj/anais/congressoEducacao2010/Camila%20Ap%20Castelani.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2017.

DONADIO S. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, p. 423-430, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61- 68, 1997.

GAVIOLI, D. F. **Efeito de promotores de crescimento para suínos sobre o desempenho zootécnico, a qualidade intestinal e a eficiência da biodigestão dos dejetos**. 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

GERTSCH, J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. **Planta Medica**, v. 77, p. 1086-1098, 2011.

GOODMAN, G. A. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2003.

GUANGROG, H.; JIAXIN, J.; DEHUI, D. Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1335-1338, 2008.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HAJOORI, M. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Eugenia jambolana* seed extract against human pathogens. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 935-939, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Clarendon, 2007.

HEINRICH, M. Ethnopharmacology in the 21st century — grand challenges. **Frontiers in**

**Pharmacology**, v. 1, p. 8, 2010.

HENRICH, C. J.; BEUTLER, J. A. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 1284-1298, 2013.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 425-432, 2001.

HESKES, A. M. et al. Localization of oleuropeyl glucose esters and a flavanone to secretory cavities of Myrtaceae. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. 1-9, 2012.

HOGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 509-515, 2010.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonoids and flavones: the Brazilian sources and factors that influence the composition in food. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HÜLLER, A.; SCHOCK, A. A. Avaliação do potencial alelopático de três espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) sobre o processo germinativo de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 1, p. 25-37, 2011.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.

JUNIO, H. A. et al. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1621-1629, 2011.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1539-1555, 2011.

LAGO J. H. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.

LIU, Z. Preparation of botanical samples for biomedical research. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 8, p. 112-121, 2008.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de Jambolão (*Syzygium cumini*). **Ciência Rural**, v.35, n. 2, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009.

LU, J. J. et al. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

LUZIA, D. M. M.; BERTANHA, B. J.; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 175-180, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MAGINA, M. D. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.

MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico**. 2008. 47 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MOON, J. K.; SHINAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MORAR M.; WRIGHT G. D. The genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annual Review of Genetics**, v.44, p. 25-51, 2010.

NADER, T. T. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

OU, B. et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PANDINI, J. A. et al. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, p. 48-55, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PIMENTA, A. F. G. et al. Economia verde, sustentabilidade e as plantas medicinais de Minas Gerais. In: SEMINÁRIO SOBRE A ECONOMIA MINEIRA, 25., 2012, Diamantina. **Anais...** Diamantina: Universidade Federal de Minas Gerais, 2012, p. 1-9.

PUPO, M. T.; GALLO, M. C. B. Biologia química: uma estratégia para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

QUEIROZ, J. M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, M. F. S. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v. 2, n. 2, p. 58-66, 2006.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O. Gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238–254, 2010.

SAMY, R. P., GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 283-294, 2010.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 1-16, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A. Main methods used in lipid oxidation determination. **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 391-399, 1998.

SANTOS, A. V. et al. Aditivos antibiótico, probiótico e prebiótico em rações para leitões desmamados precocemente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2016.

SANTOS, P. L. et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 2562- 2576, 2013.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no sul do Brasil. **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 250-262, 2012.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p.98-102, 2014.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, p. 979–990, 2012.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different



plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2016.

SHAABAN, H. A. E.; EL-GHORAB, A. H.; SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, p. 203-212, 2012.

SILVA, C. R. da et al. Estudos químicos de diferentes espécies de Myrtaceae biomonitorados por ensaios de atividade antitumoral e antimicrobiana. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 18., 2010, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010. Disponível em: <<http://www.prp.rei.unicamp.br/pibic/congressos/xviiiicongresso/paineis/181802.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2017.

SILVA, D. B. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015a. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em: 7 Maio 2017.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015b. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10419>>. Acesso em: 7 Maio 2017.

SOUZA, A. M. de. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eugenia pyriformis* cambess., Myrtaceae e estudo da associação sinérgica com agentes antibacterianos e antifúngicos de uso clínico**. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: aminoglicosídeos, polimixinas, bacitracina e vancomicina. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 396-399.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73-94, 2011.

THE PLANT LIST. **Myrtaceae**. 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>>. Acesso em: 8 fev 2018.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7., 2007, Campinas. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2007. v. 1, p. 1963-1967.

TORRES, R. N. S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 6, p. 4348-4358, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAJANO, V. N. et al. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 542-545, 2009.

VOSS-RECH, D. et al. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 314-320, 2011.

WEBER, L. D. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 9, p. 846-853, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014. 256f. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 12 ago 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Combat Antimicrobial Resistance**. In: **World Health Day 2011**. World Health Organization, 2011, 2f. Disponível em: <[http://www.who.int/world-health-day/2011/WHD201\\_FS\\_EN.pdf?ua=1](http://www.who.int/world-health-day/2011/WHD201_FS_EN.pdf?ua=1)>. Acesso em: 8 maio 2017.

## ANEXO 1: Normas da revista capítulo 1



Journal of Food Science & Technology

Editor-in-Chief: Narpinder Singh

ISSN: 0022-1155 (print version)

ISSN: 0975-8402 (electronic version)

### REVISED INSTRUCTION TO AUTHORS

(effective from 01 November 2015)

#### **Pre-submission tips for faster handling of Manuscripts**

- Before you begin your submission, you have the following ready in order to make the submission easy and faster
- Please do not contact the editor-in-chief (EIC) or editor(s) for seeking opinion on suitability of your manuscript (MS) for submission to the journal, as this is the decision best left to you (and your co-authors). As JFST depends on the Editorial Manager® (EM) electronic submission system, the EIC or editors cannot pre-screen your MS outside the electronic system. All papers have to be submitted through the EM system.
  - Cover letter as per the requirements of JFST
  - List of potential reviewers
  - Title page as a separate file
  - Blinded copy of the MS either complete with tables & figures
  - If submitting MS as single file then arrange in the following order - text (including references), tables, list of figures and figures
  - File containing tables, if not included in the blinded copy
  - File containing figures, if not included in the blinded copy
  - Make sure that list of figures is appended at the beginning of the file containing figures  
(or at the beginning point from where figures start in case of single file)
  - Additional electronic material in support of your MS, if any
- Include only those who have contributed meaningfully and have made primary contributions (like design of work, interpretation of results, writing of the paper etc) to the

work. It is the responsibility of the corresponding author to make sure that every author has read and approved the paper before submission.

Make sure that you have used both line numbering (continuous) and page numbering in your MS apart from using double spacing for the text.

Please take note of the following when making suggestions about the possible reviewers

-

1. The reviewers suggested should not be from your own institution.

2. They all cannot be from your own country (if suggesting from your own country, restrict it to only one of the three or more reviewers suggested).

3. Make sure that expertise in your field (and not your collaboration with the suggested person) must be the criteria in suggesting the name of the reviewer. Your suggestion, however is not binding on the Editor(s) for use as first choice for the review of your paper.

The presentation language must be consistent in usage (either British or American) and should be, in the view of the Editor(s) concerned, adequate for submission to JFST. If the language standard does not meet the Journal's requirement, the MS will be rejected without review. Please use the English language service offered by Springer, if needed.

Make sure that your MS clearly demonstrates that it fits within the scope of the journal. Novelty of work and its ability to advance the knowledge in the field should be clearly highlighted in the text of the MS as well as briefly mentioned in the cover letter.

Proper citations must be provided to prior work or mentioning/quoting of sentences, paragraphs or tables/figures. Copy right permission must be obtained for use of tables/figures from other works and the responsibility for the same rests solely with the corresponding author. Please note that JFST screens each MS through an anti-plagiarism software and excessive reproduction of previous works might result in rejection of MS.

The MS should clearly identify and define the procedures used in the work, unless it is a standard protocol accepted globally. Mere mention and reference to previous work would make the paper insufficient and dependent one in turn making the other researchers who would like to use the method to depend on cross references.

If the MS is reporting data involving human/animal subjects or radioactive materials, make sure that permission details or approved protocol numbers are clearly provided in the text of the MS. If reporting studies related to bacterial cultures/cell lines, make sure to mention its public accession numbers.

## **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript (MS) implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## **Cover Letter**

Authors must enclose a cover letter specifically covering the following aspects –

- (a) the type of article being submitted (original research article / review / short communication)
- (b) the total word count of the Manuscript (excluding tables and figure legends), number of references and number of tables and / or figures in the MS should be clearly spelt out.
- (c) highlights / novelty of the work being submitted (***not more than 3 sentences; each sentence should not exceed 125 characters including spaces***)
- (d) a statement on conflict of interest, if any or otherwise.
- (e) should clearly mention about the originality of work, its non-submission / consideration in other journal
- (f) a statement to the effect that all authors have read and approved the MS; and, that all are aware of its submission to JFST
- (g) and, ***the corresponding author must undertake in the covering letter that he/she shall review at least three manuscripts (in his/her own specialization) submitted to JFST.***

If author(s) do not enclose a covering letter mentioning all the above, the MS would be

returned by the Editorial Office.

### **Types of Manuscripts**

The journal accepts *Original Research Papers*, *Reviews* and *Short Communications*. Authors must include continuous line numbering on all the manuscript pages; and, the pages should be sequentially numbered. Following are the limits of word count, tables figures etc for different types of articles -

#### ***Original Research Paper***

Abstract word count (maximum): 250

Word count (including abstract & references; excluding tables & figure legends): 6500

Total no. of figures+Tables: 06

Total no. of references (maximum): 36

#### ***Short Communication***

Abstract word count (maximum): 200

Word count (including abstract & references; excluding tables & figure legends): 3250

Total no. of figures+Tables: 03

Total no. of references (maximum): 30

#### ***Review***

Abstract word count (maximum): 250

Word count (including abstract & references; excluding tables & figure legends): 9000

Total no. of figures+Tables: 08

Total no. of references (maximum): 75

*Please note that in case of MS dealing with bacteriological cultures or strains, invariably the culture deposition numbers as given by public culture collection (e.g., ATCC, MTCC, NCIM etc) must be provided, without which such MS will not be considered for the review process.*

### **Online Submission**

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially

reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Additional remark Online Submission**

Highlight the changes made in the revised MS for faster processing and provide a point-by-point reply to the reviewer(s) comments as a separate file. Insert continuous line numbers and page numbers throughout the text to facilitate reviewing process.

### **Text**

#### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### **Article Structure**

#### **- Title page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author
- Acknowledgements & any information that would reveal author(s) identity should be placed here, as JFST follows a double blind review process, at the time of initial submission and revision(s).

### **- Research highlights**

Research highlights to be provided on a separate page preceding the abstract – Max 5 highlights with each highlight not exceeding 100 characters including spaces

### **- Abstract**

Please provide an abstract of a maximum of 200 or 250 words (depending on the type of manuscript). The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### **- Keywords**

Please provide a minimum of 4 and a maximum of 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### **- Body of the main text**

The article should be divided into clearly defined sections as mentioned below and each section heading should appear on its own in a separate line. Any subsection may be given a brief heading. Please do not use more than three levels of displayed headings. If the MS uses abbreviations, they should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### **- Introduction**

Provide an adequate background to your work (do not resort to self citation, unless it is very essential) outlining the issue that is being addressed and clearly state the objectives of your work. Avoid a detailed literature survey and do not summarize previously published results.

### **- Material and methods**

This section should have sufficient details in order to allow the work to be reproduced by any fellow researcher interested in the area. If standard methods / globally accepted protocols are used, mere mention of the method along with details of any relevant modifications made should be described. The section should also provide details of the raw material/starting material, the source, the components in it and changes that would have happened due to any processing before or after use, if it is relevant to the study. In case of theoretical papers / engineering calculations, the section should provide an extended (not repeating what is already dealt in introduction) foundation for the current and further work. In other words, the calculation section should represent its practicality in the context of the MS from a theoretical basis.

### **- Results and Discussion**

Results should be very concise and clear. To avoid repetition of results of the work, a



combined section of results and discussion is often appropriate. Extensive citations and discussion of published literature without importance to the results of the work should be avoided. If author(s) choose to separate results and discussion sections, they are free to do so. However, in such cases the results section should be very clear, comprehensive and concise. Repetition of results in the discussion section should be avoided. Discussion should clearly focus on the significance of the work and the improvements over the already available knowledge.

#### **- Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### **- Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

#### **- Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. In the first instance, this section shall be in the title page, when uploading the blinded copy.

#### **- References**

##### *Citation in text*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples: Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990). This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996). This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

##### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished

works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

#### *Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

#### *Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

#### *Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

#### *Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

#### *Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php) For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list. EndNote style (zip, 3kB)

#### **- Tables**

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

- Each table should stand alone and has to provide all the details
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### **- Artwork and Illustrations Guidelines**

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

#### **- Electronic Figure Submission**

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### **- Line Art**

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### **- Halftone Art**

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### **- Combination Art**

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### **- Color Art**

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### **- Figure Lettering**

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc

Do not include titles or captions within your illustrations.

#### **- Figure Numbering**

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### **- Figure Captions**

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number,

also in bold type.

- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### **- Figure Placement and Size**

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### **Permissions**

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### **Electronic Supplementary Material**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This

feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### **Submission**

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### **Audio, Video, and Animations**

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### **Text and Presentations**

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### **Spreadsheets**

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### **Specialized Formats**

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### **Numbering**

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the

material as a citation, similar to that of figures and tables.

- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### **Captions**

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### **Processing of supplementary files**

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### **Does Springer provide English language support?**

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process. The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

### **After acceptance**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can indicate whether you wish to order offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### *Copyright transfer*

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Society. This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

#### *Offprints*

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### *Color illustrations*

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

#### *Proof reading*

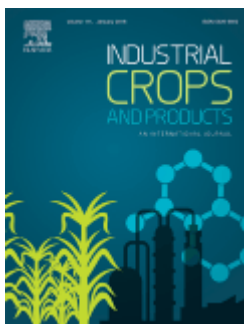
The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### *Online First*

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.



## ANEXO 2: Normas da revista capítulo 2



### Introduction

*Industrial Crops and Products*, an International Journal, publishes papers reporting the results of original research, short communications and critical reviews on all aspects of industrial crops and products (defined as non-food/non-feed uses of plants and plant products). This covers a wide range of aspects of cultivation, crop improvement, crop compounds, processing, and integrated chain control, all focusing on the exploitation of agricultural crops for industrial use.

The scope of the journal covers a vast range of crops and research disciplines. Crops should contain significant renewable resources such as:

- Fibres and fibre compounds
- Carbohydrates
- Oils and fatty acids
- Waxes, resins, gums, rubber, and other polymers
- Proteins
- Essential oils for ink, lubricants, plastics, cosmetics
- Biologically active compounds for pharmaceutical, herbicides and insecticides, and preservatives.

Some examples of industrial (non-food/non-feed uses) crops are agave, cassava, crambe, cuphea, elephant grass, fibre hemp, flax, guar, guayule, jojoba, kenaf, lesquerella, maize, meadowfoam, oil palm, peas, plantago, potato, pyrethrum, rape seed, safflower, soybean, Stokes aster, sugar beet, sunflower, vernonia, and wheat.

Papers within the above indicated frame-work will be accepted if they cover or integrate research on:

- Agronomic production and modelling
- Breeding, genetics, and biotechnology
- Post-harvest treatment and storage
- (Bio)process technology

- (Bio)chemistry
- Product testing, development, and marketing
- Economics, and systems analysis and optimization

### **Types of paper**

1. Original research papers (regular papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Review articles* Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. We welcome reviews but authors should contact the Editors-in-Chief before submission to ensure appropriateness for publication.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address

- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors

must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be

suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail 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. 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. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### ***Subscription***

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

#### ***Open access***

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### ***Creative Commons Attribution (CC BY)***

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised

versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

### ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 24 months.

### ***Elsevier Researcher Academy***

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/indcro/>

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

### ***Use of wordprocessing software***

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically



designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with

Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. **Lines should be double-spaced and every line and page should be numbered.**

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

## **Article structure**

### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names.

Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented

separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### ***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Try not to over-use abbreviations.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the

references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:  
Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:  
This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Nomenclature and Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from**

**Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full

citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

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

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:



<http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference formatting***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### ***Reference style***

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on

depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### ***Data in Brief***

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief

website. Please use this template to write your Data in Brief.

### ***MethodsX***

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

### **After Acceptance**

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. It is important to ensure that all 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.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **Author Inquiries**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.