



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

GISELE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Trattinnickia burserifolia* Mart. (BURSERACEAE) DA
SERRA DO TEPEQUÉM, AMAJARÍ - RORAIMA**

Boa Vista, RR

2014

GISELE GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Trattinnickia burserifolia* Mart. (BURSERACEAE)
DA SERRA DO TEPEQUÉM, AMAJARÍ - RORAIMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital.

Boa Vista, RR

2014

In memoriam

Benedito da Gama Guimarães, meu avô.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, por ter permitido a conclusão deste trabalho e por sua imensa misericórdia ao me proporcionar orientação através de pessoas competentes no ensino da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva, por ter aceitado o desafio desta pesquisa e por ter colaborado em momentos difíceis na elucidação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Marcos Vital, por sua sabedoria e criticidade na construção do conhecimento e sobre tudo por mostrar sua dedicação ao desenvolvimento do conhecimento como um todo.

A Profa. Dra. Gardênia de Holanda Cabral por sua paciência e sabedoria em orientar nas decisões difíceis.

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento, por orientar com dedicação etapas desta pesquisa e por ter sido um ombro amigo durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho, por acreditar nos resultados desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Habel Nasser por colaborar no projeto de pesquisa com orientações valiosas e necessárias.

Ao Prof. Dr. Romanul Bispo por sua colaboração na elucidação dos resultados desta pesquisa.

Especialmente a amiga da minha filha Sarah, MSc. Andréia Alencar que hoje considero minha amiga a qual não tenho palavras para agradecer a valiosa e impagável colaboração para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos colegas de curso pelo apoio e alteridade nos períodos em que o conhecimento parecia inatingível.

Ao meu irmão Rafael, por ter ajudado na formatação deste trabalho e pelos momentos de descontração quando tudo parecia tão cansativo.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do PRONAT: Karla, Eduardo, Jafet, Eliane, Ana, Daniele e Mariana por terem colaborado com esta pesquisa.

Aos mestrandos do programa de Pós-graduação em Química: Shirley, Graciliano, Leandro e Wilson e Ricardo por terem colaborado e apoiado nas horas difíceis.

Aos meus pais: Ademar Coelho de Oliveira e Rosicleide Guimarães de Oliveira, por me apoiarem em mais uma de minhas conquistas.

Ao Carlos Figueira, meu amigo e companheiro que incansavelmente me ajudou na coleta do material botânico desta pesquisa.

Ao MSc. Ricardo Perdiz, por fazer a identificação do material botânico desse estudo.

A minha amiga Aurilene Freitas por me apoiar e me ajudar em todos os sentidos durante todo o tempo possível. Para ela toda minha gratidão.

Aos colegas da Escola Estadual Lobo D'Almada, pelo apoio.

Às meninas, Natália, Luiza e Carolina, da secretaria do PRONAT, pela paciência e profissionalismo durante todo período em que esta pesquisa se desenvolveu.

Aos moradores tradicionais da serra do Tepequém, que me apresentaram a possibilidade de realizar este estudo, através de conhecimentos empíricos.

A uma menina muito especial, minha amiga, filha e companheira que me ajudou muito e que soube compreender minha ausência nos momentos que ela precisava de mim como mãe: a pequena e grande Sarah de Oliveira Silva, toda minha admiração e todo o meu amor.

Um pouco de ciência nos afasta de
Deus, muito nos aproxima.

(Louis Pasteur)

RESUMO

A Amazônia apresenta cerca de 99,6% de sua flora quimicamente desconhecida e estima-se que apenas 10% do total das plantas do globo terrestre foram pesquisadas em seus constituintes químicos. A família Burseraceae pertence a ordem Sapindales, é constituída de 21 gêneros e mais de 600 espécies. A pesquisa objetivou investigar a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca do caule de *Trattinnickia burserifolia* no período seco e chuvoso em um garimpo extinto de Roraima chamado de Tepequém. As exsiccatas foram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Roraima sob o número de tombamento. O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação em aparelho *clevenger*. Foi calculado o rendimento do óleo essencial (p/v). Foi utilizado um sistema CG/EM com o hélio (He) como gás de arraste. Utilizou-se o padrão de hidrocarbonetos C9-C22, sendo calculado o índice Kovats e percentagens dos constituintes. Foram identificados 23 constituintes no período seco e 47 no período chuvoso. Entre os constituintes identificados, destacaram-se o α -pineno, o δ -3-careno e o limoneno para ambos períodos com percentuais distintos. Foi realizada também a verificação do potencial antioxidante através da captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl). O resultado obtido tanto no período seco quanto no chuvoso foi inferior a 14% de atividade antioxidante, caracterizando o óleo essencial de *T. burserifolia* sem atividade antioxidante. Realizou-se o teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, os resultados de ambos os períodos foram considerados altamente tóxicos: período seco ($DL_{50} = 86,072 \mu\text{g/mL}$); chuvoso ($DL_{50} = 45,286 \mu\text{g/mL}$). Nos testes antimicrobianos, foram utilizadas cepas padrões (ATCC; INCQS) e um fungo do gênero *Penicillium* sp. proveniente de contaminação. O óleo essencial de *T. burserifolia* apresentou atividade antimicrobiana no período seco somente para dois micro-organismos (*Penicillium* sp., *Proteus mirabilis*) enquanto que no período chuvoso todos os micro-organismos testados tiveram seu crescimento inibido (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* e *Penicillium* sp.). O óleo essencial de *T. burserifolia* possui atividade antimicrobiana eficaz para aplicação do óleo essencial nos micro-organismos testados. Os valores médios dos halos de inibição foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) apresentando diferenças significativas. Para cada micro-organismo foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Palavras-chave: Óleo essencial. *Trattinnickia burserifolia*. Constituintes químicos. Antimicrobiano.

ABSTRACT

The Amazon holds about 99.6% of its flora chemically unknown and it is estimated that only 10% of plants of the globe were surveyed on their chemical constituents. The Burseraceae family owned Sapindales order consists of 21 genera and over 600 species. The research aimed to investigate the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from the stem bark of *Trattinnickia burserifolia* the dry and rainy season in a dormant mining Roraima called Tepequém. The herbarium specimens were identified and deposited in the Herbarium of the Federal University of Roraima under number of damping. The essential oil was obtained by hydrodistillation in Clevenger apparatus. The yield of essential oil (W / V) was calculated. One GC / MS system was used with helium (He) as carrier gas. We used the standard hydrocarbons C9-C22 Kovats index and the percentages of the constituents being calculated. 23 constituents were identified in the dry period and 47 in the rainy season. Among the identified constituents, stood the α -pinene, the δ -3-carene and limonene for both periods with different percentages. Antioxidant potential scanning was also carried out by capturing the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl). The results obtained both in the dry and in the rainy period was less than 14% antioxidant activity, featuring the essential oil of *T. burserifolia* no antioxidant activity. Held the toxicity test using microcrustacean *Artemia salina*, the results of both periods were considered highly toxic: dry period (LD50 = 86.072 g / mL); rainy (LD50 = 45,286 / mL). And a fungus *Penicillium* sp, the antimicrobial tests, standard strains (ATCC INCQS) were used. from contamination. The essential oil of *T. burserifolia* showed antibacterial activity in the dry season only two micro-organisms (*Penicillium* sp., *Proteus mirabilis*) while in the rainy season all micro-organisms tested were inhibited its growth (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* and *Penicillium* sp.). The essential oil of *T. burserifolia* has effective antimicrobial activity of essential oil for application in micro-organisms tested. Mean values of inhibition zones were statistically analyzed by Tukey (p <0.05) with significant differences. For each micro-organism Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined.

Key-words: Essential Oil. *Trattinnickia burserifolia*. Chemical constituents. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características botânicas de <i>T. burserifolia</i> ocorrentes no Tepequém.....	22
Figura 2 -	Constituintes químicos encontrados em óleos essenciais.....	25
Figura 3 -	Estrutura molecular de constituintes químicos de óleos essenciais.....	26
Figura 4 -	Área de coleta do material botânico.....	42
Figura 5 -	Micro-organismos utilizados para o teste antimicrobiano com o óleo essencial.....	51
Figura 6 -	Cromatograma do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> - período seco.....	58
Figura 7 -	Cromatograma do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> - período chuvoso.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Crescimento da exportação mundial do comércio de óleos essenciais.....	29
Gráfico 2 - Exportação de óleos essenciais.....	29
Gráfico 3 - Rendimento do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i>	56
Gráfico 4 - Efeito Dose-Resposta do Óleo Essencial de <i>T. burserifolia</i> no período seco e chuvoso.....	65
Gráfico 5 - Curva de calibração para atividade antioxidante (DPPH).....	66
Gráfico 6 - Absorbância do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i>	67
Gráfico 7 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial puro.....	73
Gráfico 8 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> obtido no período chuvoso na concentração de 25%.....	75
Gráfico 9 - Resultado das médias dos halos de inibição microbiana da Concentração Inibitória Mínima.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituintes identificados em óleos essenciais.....	26
Tabela 2 -	Obtenção de concentrações para o teste de toxicidade.....	47
Tabela 3 -	Concentração de óleo essencial para teste toxicidade.....	48
Tabela 4 -	Concentração de óleo essencial para atividade antimicrobiana...	53
Tabela 5 -	Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> no período seco.....	60
Tabela 6 -	Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> no período chuvoso.....	61
Tabela 7 -	Valores de DL ₅₀ para aplicação do óleo essencial dos períodos seco e chuvoso de <i>T. burserifolia</i> com o micro crustáceo <i>A. salina</i>	64
Tabela 8 -	Mortalidade dos náuplios de <i>A. salina</i> frente a ação do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i>	64
Tabela 9 -	Redução do DPPH pelo óleo essencial de <i>T. burserifolia</i>	67
Tabela 10 -	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i>	69
Tabela 11 -	Média do diâmetro do halo de inibição microbiana [100%] do óleo essencial de <i>T. burserifolia</i> obtido no período chuvoso.....	72
Tabela 12 -	Resultado do teste de Tukey ($p < 0.05$) para concentração de 25% do óleo essencial obtido no período chuvoso.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BM	Bio Manguinhos
BUTA	Instituto Butantan
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCT	Coleção de Culturas Tropical- Fundação André Tosello
CG	Cromatografia Gasosa
CGL	Cromatografia gás-líquido
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CGS	Cromatografia gás-sólido
COMTRADE	United Nations Commodity Trade Statistics Database
DAP	Diâmetro na Altura do Peito
DBBM	Departamento de Biologia e Bioquímica Molecular/FIOCRUZ
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
EC	Concentração Eficiente
FAP	Fundação Atauilpho de Paiva
FDA	Food and Drugs Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GYMP	Glicose Yest Extract Malt Extract Sodium Phosphate monobasic
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INTRACEN	International Trade Centre – ITC
ISSO	International Standardization Organization
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NCTC	National Collection of Type Cultures
OE	Óleo Essencial
OED	Óleo Essencial dissolvido
OETb	Óleo Essencial de <i>Trattinnickia burserifolia</i>
OETbC	Óleo Essencial de <i>Trattinnickia burserifolia</i> Período Chuvoso
OETbS	Óleo Essencial de <i>Trattinnickia burserifolia</i> Período Seco
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	15
1.2	A FAMÍLIA BURSERACEAE.....	19
1.3	O GÊNERO <i>Trattinnickia</i>	21
1.4	A ESPÉCIE <i>Trattinnickia burserifolia</i>	22
1.5	ÓLEO ESSENCIAL.....	22
1.6	PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	24
1.7	UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
1.8	A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E O SEU CONSUMO.....	28
1.9	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS).....	30
1.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
1.11	TOXICIDADE.....	32
1.12	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
1.12.1	Caracterização dos micro-organismos	35
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	42
3.1.1	Caracterização da área de estudo	42
3.2	AMOSTRAGEM.....	43
3.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	44
3.4	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	44
3.5	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Trattinnickia burserifolia</i>	45
3.6	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (CG-MS).....	45
3.7	TESTE DE TOXICIDADE.....	46
3.8	TESTE ANTIOXIDANTE.....	49
3.8.1	Preparo de soluções	49
3.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
3.9.1	Micro-organismos utilizados	51
3.9.2	Preparo dos materiais para realização da atividade antimicrobiana ..	51
3.9.3	Reativação dos micro-organismos	51
3.9.4	Obtenção de cultura pura	52
3.9.5	Cálculo das concentrações de óleo essencial	52
3.9.6	Impregnação dos discos	53
3.9.7	Padronização dos inóculos	53
3.9.8	Incubação dos micro-organismos	54
3.9.9	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	54
3.9.10	Preservação dos micro-organismos	55
3.9.11	Análise da atividade antimicrobiana	55

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>T. burserifolia</i> NO PERÍODO SECO E CHUVOSO.....	56
4.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	57
4.3	TESTE DE TOXICIDADE.....	63
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	66
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	68
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Atualmente muito se fala em tecnologia e na sua colaboração para melhoria da qualidade de vida da humanidade. Na verdade existe uma busca incansável para que sejam encontradas na natureza substâncias que colaborem com a cura para muitos males que ainda são vistos pela ciência como desafios a serem vencidos. Entre as fontes promissoras de novas descobertas para cura de doenças, estão os óleos essenciais (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE,2007).

É incontestável que a Amazônia apresenta uma riqueza de matéria prima para a extração de óleos essenciais. Estudos realizados por Gottlieb e Mors (1980) citam que cerca de 99,6% de nossa flora é quimicamente desconhecida.

O Estado de Roraima localizado no extremo norte do Brasil, possui muitos lugares em que a flora ainda espera estudos científicos para sua caracterização. A extração de óleos essenciais de forma não sustentável pode possibilitar o desaparecimento de espécies, por isto é importante que ocorram estudos relacionados a identificação e a conservação dos organismos promissores para colaboração de novas descobertas que possam fazer a diferença no meio científico.

A área de coleta do material botânico com delineamento totalmente casualizado para cinquenta árvores da espécie em estudo, é localizada na Serra do Tepequém no município de Amajari. Devido a quantidade de cachoeiras na região, atualmente o Tepequém é um dos pontos turísticos mais conhecidos de Roraima (RORAIMA, 2012).

Todos os objetivos propostos nesta pesquisa foram atingidos. Esta pesquisa possibilita complementação de conhecimentos de outros estudos (LIMA et al., 2004) e apresenta contribuição científica relevante na área de bioprospecção através da valorização dos elementos encontrados na natureza do Estado de Roraima.

1.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A botânica sempre andou de mãos dadas com a medicina, em todo mundo se conhece inúmeros remédios provenientes de plantas medicinais, a utilização da união inseparável da botânica com a medicina é relatada desde a época em que os

egípcios faziam a prática de embalsamento dos cadáveres para guardá-los da deterioração. A prática do uso de plantas medicinais começou a ser mais difundida quando os árabes no século XIII fizeram o uso mais intenso das plantas medicinais difundindo a cultura inclusive em outros países através da busca por novos conhecimentos sobre os fitoterápicos (BALBACH, 2002).

Vilar, Carvalho e Furtado (2005) relatam em uma pesquisa sobre ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas que o conhecimento sobre as plantas medicinais foi adquirido através das gerações. Cita os babilônios, assírios e hebreus como utilizadores de plantas medicinais e os gregos como sistematizadores do uso através de relatos contidos nas obras de Aristóteles (384-322 a.C.), Hipócrates (460-377 a.C.), Teofrasto (370-285 a.C.) e Galeno (129-199 d.C.).

Os livros que primeiro descreveram as propriedades curativas das plantas medicinais brasileiras foram “Ensaio sobre o cinchoeiro e sua influência nas virtudes da quina”, escrito pelo português Bernardino Antônio Gomes em 1812, e o livro “Systema de Matéria Médica Vegetal Brasileira”, escrito por Henrique Velloso D’Oliveira, em 1854, sendo o brasileiro Manuel Pio Corrêa (1874-1934) apontado como um dos pioneiros nos estudos sobre plantas medicinais brasileiras. As informações relatadas por Pio Corrêa foram reunidas em seis volumes na clássica obra “Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas” (VILAR; CARVALHO; FURTADO, 2005).

O número de pesquisas sobre plantas medicinais parece ser incessante para os pesquisadores, uma vez que na natureza ainda existe um número considerado de espécies que ainda não foram identificadas e que podem conter a cura para muitos males que fazem parte da vida do homem contemporâneo.

Nesse sentido a ciência busca conquistar resultados através das mais distintas pesquisas envolvendo o uso de plantas medicinais a exemplo a avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* em ratas wistar Sher et al. (2003). Também em camundongos foram testados os efeitos cardiovasculares e a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *Costus spicatus* por Menezes et al. (2007). Cunha et al. (2004), Santos et al. (2005), Vilar; Carvalho; Furtado (2007) também verificaram efeito do óleo essencial em camundongos. Podendo ainda ser citados estudos químicos que buscam identificar constituintes químicos das plantas consideradas medicinais (OTTOPELLI et al.,

2011) e a verificação do extrato aquoso da entrecasca de *B. cheilantha* como atividade antinociceptiva realizada por Silva et al. (2005) entre tantas outras inúmeras pesquisas. Há registros de plantas medicinais utilizadas por comunidades quilombolas (SILVA, 2012).

Segundo Veiga Junior (2008), no Brasil, existem poucas pesquisas que avaliam o grau de utilização das plantas como medicamentos e sua inserção na cultura popular. Em 2008 foi realizada a análise de 1.320 formulários preenchidos pela população do interior do estado do Rio de Janeiro e por profissionais da área de saúde. A pesquisa concluiu que as plantas medicinais são as principais formas de tratamento para 63% dos entrevistados, apesar da disponibilidade de medicamentos alopáticos. Sendo observada a utilização de plantas como automedicação antes da consulta ao médico, concomitante com o medicamento alopático e, em muitos casos, substituindo-o, sem o conhecimento do médico (VEIGA JUNIOR, 2008).

Antes de Veiga Junior (2008), com o objetivo de investigar o uso de plantas medicinais em crianças na faixa etária de zero a 12 anos internadas no Hospital Infantil Arlinda Marques, da cidade de João Pessoa (PB), entre agosto de 2000 a junho de 2001, Torres et al. (2005) entrevistaram 132 acompanhantes das crianças para a obtenção dos dados. A pesquisa concluiu que cerca de 27,3% dos acompanhantes usaram plantas medicinais em suas crianças antes de procurarem o serviço hospitalar e 41,7% associaram plantas com alguma medicação.

O boldo, capim-santo, hortelã e poejo foram as plantas identificadas como mais frequentes em um estudo que objetivou realizar um inventário das plantas medicinais conhecidas e usadas pela população do distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, no Estado de São Paulo (PILLA; AMOROZO; FURLAN, 2006).

Em um estudo mais recente objetivando conhecer o perfil dos pacientes em tratamento contra o câncer da Unidade Oncológica de Anápolis quanto ao uso de plantas medicinais evidenciou-se o uso indiscriminado de plantas medicinais entre os pacientes. A maioria dos entrevistados compartilha a opinião errônea de que plantas medicinais não fazem mal. A orientação sobre a forma de utilização das plantas ocorre, principalmente, pela informação de familiares ou amigos, e os profissionais da saúde muitas vezes são ignorados neste processo. Constatou-se que as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de enfermidades de

baixa a alta gravidade, como o câncer. Dentre as 14 espécies usadas pelos pacientes com finalidade antineoplásica as mais mencionadas foram as popularmente conhecidas como noni, babosa, graviola e romã (OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014).

Em um reconhecimento da utilização de plantas medicinais por idosos de um município do Paraná ficou constatado que a erva-cidreira, a malva, o quebra-pedra, a sálvia, a camomila, o guaco, a carqueja, a macela, a pata-de-vaca, o alecrim e a babosa foram as mais utilizadas (BALBINOT; VELASQUEZ; DUSMAN, 2013).

Lima et al. (2012) verificaram que o uso das plantas medicinais está incorporado ao cotidiano de homens idosos e que estes homens fazem a prática de cultivo de plantas medicinais, o que pode ser considerado um risco frente a não identificação científica das espécies.

Em um trabalho etnobotânico, Carvalho et al. (2013) concluíram que existe um grande interesse de comunidades na construção de hortas comunitárias para serem cultivadas plantas medicinais.

Considerando o valor das plantas medicinais não apenas como recurso farmacêutico, mas também como fonte de recurso econômico, torna-se importante estabelecer linhas de ação voltadas para o desenvolvimento de técnicas de manejo ou cultivo, tendo em vista a utilização destas espécies vegetais pelo homem aliada a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais (SIMÕES, 2003).

Diante de todas estas citações de pesquisas já realizadas sobre plantas medicinais, é importante que o tema seja visto como de grande importância, uma vez que essa prática é considerada milenar e que dia após dia esse conhecimento passa de uma comunidade para outra. Atualmente com o advento da internet e o uso cotidiano de redes sociais, as informações são recebidas com o mínimo de espaço de tempo diante dos acontecimentos, facilitando assim o conhecimento sobre qualquer coisa, incluindo o uso de plantas medicinais.

Souza et al. (2013) sugerem que as informações sobre o uso da flora medicinal adquiridas nas comunidades estudadas sejam combinadas a estudos químicos/farmacológicos realizados em laboratórios especializados. A capacitação da equipe de saúde pode favorecer a implementação da Portaria nº 971/2006, que tem como objetivo a garantia de acesso a plantas medicinais e fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006; ALVIM, 2006).

Souza e Felfili (2006) reconheceram em sua pesquisa que espécies vegetais do cerrado têm uma gama considerável de utilização humana para quase todos os estratos, ervas, arbustos e árvores como plantas medicinais.

Em Roraima a utilização de plantas medicinais está relacionada com as tradições familiares. Muitas espécies são utilizadas como medicamento caseiro (mirixí, caju, babosa, capim-santo, sucuba) e alguns populares fazem o cultivo de hortas em residências para suprir a necessidade de medicamentos considerados eficazes e de fácil acesso (LUZ, 2001).

O uso de plantas medicinais em Roraima tem influência dos indígenas. Em Boa Vista, a comercialização de plantas medicinais é um mercado livre para comunidade (LUZ, 2001).

Desde a década de 80 o governo brasileiro mostra preocupação em regularizar o uso de fitoterápicos, favorecendo nesse sentido a comercialização legal dos produtos e a guarda dos conhecimentos milenários sobre as plantas medicinais (BRASIL, 1994).

De modo geral apesar do conhecimento sobre a cura para muitas doenças serem historicamente mantidas sob a guarda dos médicos, não se pode negar o poder de cura para as plantas medicinais, pode-se dizer que existe sim a relação de entre o empírico e o científico (BOTELHO, 2013).

1.2 A FAMÍLIA BURSERACEAE

A família Burseraceae é uma família de plantas angiospérmicas, pertencente a ordem Sapindales (DALY, 2012). A família destaca-se por possuir um óleo que é pegajoso e que seca com caracterização de um látex branco. Sendo constituída de 21 gêneros e mais de 600 espécies (KHALID, 1983).

No Brasil, sete gêneros mostram ocorrência (*Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium*, *Tetragastris* e *Trattinnickia*), apresenta ainda organismos que são endêmicos, ocorrendo na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (DALY, 2012). Na América do Sul, espécies de Burseraceae são conhecidas popularmente como breu, almécega, carano, copal e diversos outros nomes, dependendo do país e da floresta onde elas ocorrem (GENTRY, 1993).

A floresta Amazônica é abundante em espécies da família Burseraceae, estes vegetais amazônicos são atraentes para exploração comercial, onde muitas vezes

são extraídos da floresta e utilizados para inclusive colaborar com a sustentabilidade local (LANGENHEIM, 2003).

A utilização da madeira da família Burseraceae é apresentada por Castro et al., (2012) como um negócio altamente rentável. Os paus-de-escora são muito utilizados na construção civil e com exceção dos grandes prédios de apartamentos, a maioria das construções e reformas residenciais ainda utiliza esse produto, inclusive em prédios públicos. Objetivando caracterizar as madeiras comercializadas como pau-de-escora na cidade de Manaus, Amazonas foram apreendidas pelo Batalhão Ambiental-AM 450 "varas" de pau-de-escora. Houve, ainda, aplicação de questionário junto aos estabelecimentos que as vendem, para avaliar a dinâmica do comércio deste produto. A família Burseraceae apareceu entre as sete mais abundantes encontradas. O preço médio geral encontrado em Manaus para a compra de pau-de-escora foi R\$ 2,63 e o de venda foi de R\$ 3,94. Em geral, o pau-de-escora consumido em Manaus é ilegal, da produção à comercialização (CASTRO et al., 2012).

Segundo Lima et al. (2007), na Amazônia, o fogo é ainda o principal trato cultural utilizado no preparo de solo para agricultura e pecuária, tanto pelos pequenos como pelos grandes fazendeiros. Combinando à baixa fertilidade do solo e ao baixo preço da terra, assim que as fontes naturais de nutrientes são exauridas, as áreas são abandonadas e novas florestas primárias são derrubadas e queimadas. Por conta disso, grandes extensões de área da Amazônia são cobertas por florestas secundárias originadas de áreas abandonadas pela agricultura ou pastagem.

Um estudo sobre estrutura e o estoque de fitomassa de uma floresta secundária foi conduzido em uma área experimental usada em uma pesquisa sobre eficiência de combustão e emissão de gás carbônico da floresta amazônica, localizada aproximadamente 50 km ao norte de Manaus. A vegetação da área experimental foi derrubada e queimada em 1991, simulando as condições em que o pequeno agricultor prepara o solo para plantios de subsistência. Dez anos após a queimada, a floresta secundária se mostrou bastante diferente da floresta original e predominou entre as espécies dominantes os organismos da família Burseraceae (LIMA et al., 2007).

A família Burseracea também foi alvo de um estudo de seis espécies selecionadas do Cerrado da região Centro-Oeste do Brasil, que são usadas na

medicina tradicional para o tratamento de doenças infecciosas e apresentou resultados positivos para atividades antimicrobianas sendo sugestionada pelos pesquisadores como potencial para futuras investigações fitoquímicas guiada por bioatividade (VIOLANTE et al., 2012).

Em um estudo florístico e fitossociológico de uma floresta no Estado do Amazonas, a família Burseraceae se destacou como uma das mais frequentes (OLIVEIRA; AMARAL, 2004).

Em Roraima, a família Burseraceae aparece como destaque em um estudo realizado por Marques-Souza e Kerr (2003), a pesquisa identificou tipos polínicos através de uma amostra de mel de abelha que foi adquirido no município de Mucajaí. Entre as famílias identificadas e relatadas em percentual, a família Burseraceae aparece em 60.9% do mel analisado.

1.3 O GÊNERO *Trattinnickia*

O gênero *Trattinnickia* pertence a família *Burseraceae* e está distribuído no Brasil nos Estados do Amazonas, Pará, Mato Grosso e Rondônia, onde são conhecidos popularmente como breus (MARQUES; RIBEIRO, 1994).

Estudos realizados por Daly (1999) mostram que o gênero *Trattinnickia* apresenta as seguintes características: flores trímeras, frutos indeiscentes com mesocarpo oleaginoso-resinoso rodeando três pirenos fundidos e pecíolos com feixes vasculares anômalos na medula. As árvores de *Trattinnickia* normalmente alcançam o dossel da floresta e têm flores relativamente grandes, cálice fortemente cupular, corola tubular longa com pétalas conatas em pelo menos 2/3 do seu comprimento, fruto umbonado a depresso-ovóide com endocarpo pétreo, trilobado (DALY, 1989).

O gênero *Trattinnickia* é citado como endêmico da Mata Atlântica do leste do Brasil e é considerada rara e ameaçada. A primeira espécie do gênero foi coletada em 1935 no leste do estado de Minas Gerais (DALY, 1999).

Siani et al. (2012) verificaram que para a comercialização da resina produzida pelo gênero *Trattinnickia*, são feitas adulterações do produto em até 10% do material comercializado livremente nos mercados em Manaus.

Para (MELO; MACEDO; DALY, 2007), o breu de *Trattinnickia* têm distribuição Neotropical com um centro de diversidade e endemismo de espécies

na Amazônia Central, sendo encontrado da Costa Rica, até o Sudeste do Brasil (Minas Gerais e Espírito Santo). Na Amazônia, as espécies geralmente ocorrem em florestas de várzea, mas estende-se acima de 1000 m de altitude.

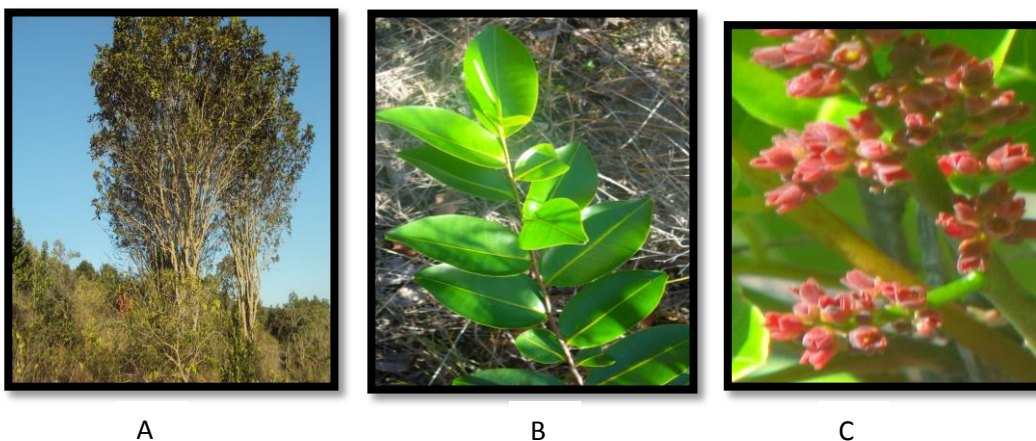
A Serra do Tepequém, local de coleta da *T. burserifolia* estudada nesta pesquisa, possui uma altitude de 1200m e uma população de *Trattinnickia* em áreas distintas da serra.

1.4 A ESPÉCIE *T. burserifolia*

Poucos são os estudos relacionados à constituição química de *T. burserifolia*, podendo ser citado a pesquisa feita por Lima et al. (2004). A falta de identificação botânica ainda é o maior entrave para conduzir pesquisas sobre as espécies de Burceraceae, pois ainda existe um grande número que ainda não foram identificadas (RIBEIRO, et al.,1999).

No Tepequém, observou-se a espécie *T. burserifolia* (figura 1) em habitat rupícola, com indivíduos que chegam a uma altura de 8 metros de altura, sendo estes distribuídos em populações por diferentes locais da serra.

Figura 1- Características botânicas de *T. burserifolia* ocorrentes no Tepequém.



A: hábito da planta; B: filotaxia da planta; C: aspecto de inflorescência da planta.

1.5 ÓLEO ESSENCIAL

Desde a Antiguidade se utiliza óleos essenciais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o valor das plantas medicinais somente a partir de 1970.

No Oriente Médio, na China e na Índia, os óleos essenciais eram utilizados em práticas religiosas, na fabricação de cosméticos e no preparo de alimentos. Os óleos essenciais podem ser encontrados em diversas partes da planta como flores, folhas, caules, raízes, frutos ou sementes. Estes óleos podem sofrer alterações na sua composição devido a condições ambientais, como precipitações ou tipo de solo (MORAIS, 2009).

Segundo Balick e Cox (1997) os óleos essenciais, que também se encaixam como matéria prima para a obtenção de constituintes na fabricação de fármacos, são explorados com a perspectiva de sua utilização na medicina, produção de cosméticos, fabricação de tintas sendo aproveitado também na culinária. A utilização de plantas na medicina é datada de 2.700 anos a.C., naquela época já se utilizavam espécies que fornecem princípios ativos utilizados até hoje, como exemplo a morfina.

De forma geral, óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, de aparência oleosa em temperatura ambiente, por isso a designação de óleo. O aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis é uma característica importante e, portanto, também chamados de essências apresentam a característica de se evaporar quando são expostos ao ar, devido ao fato de serem líquidos e aromáticos (HUFF, 1999).

Os óleos voláteis de plantas são conhecidos e utilizados por suas propriedades biológicas, especialmente por combaterem fungos e bactérias e por possuir propriedades antioxidantes (DEANS, 1993).

A diversidade de espécies oportuniza a identificação de produtos com possível utilização econômica. As plantas são uma fonte de produtos naturais biologicamente ativos (SIMÕES, 2003).

Paracelso introduziu o termo óleo essencial durante a Renascença e este designava “a alma da planta”. Anteriormente a este período, Roma após invadir territórios, como o Egito, disseminou o uso de plantas aromáticas em banhos, sendo que os romanos chegaram a ter mais de 1000 casas de banho por volta de 753 a.C. (SILVA, 1998).

Os óleos essenciais são amplamente estudados por serem capazes de proteger os sistemas biológicos, especialmente membranas lipídicas, dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerado uma causa principal do envelhecimento, das doenças degenerativas e do câncer (COZZI et al., 1997).

Exercendo a função de adaptação da planta ao meio ambiente, o óleo essencial atua na defesa contra o ataque de predadores, proteção contra perda de água e atração de agentes polinizadores beneficiando dessa forma cada espécie. Os óleos essenciais são considerados importantes matérias primas para a fabricação de produtos manufaturados nos setores de perfumaria, cosmética, farmacêutica, higiene e limpeza, alimentos e bebidas (SIANI et al., 2012).

Um estudo feito por Guenther (1977) afirma que dependendo da quantidade de isoprenos, unidades estruturais dos óleos essenciais, estes poderiam ser classificados e apresentar diferentes compostos oxigenados a exemplo: álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres.

Os terpenoides atuam nas plantas em diferentes funções características, como por exemplo, na produção de hormônios (giberelinas), pigmentos fotossintéticos (carotenoides), carreadores de elétrons (ubiquinonas), e em mecanismos de defesa e comunicação. A maioria dos compostos apresenta baixo peso molecular, natureza lipofílica e grande variedade de estruturas e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (BAKKALI et al., 2008).

Cabe ainda afirmar que os óleos essenciais são assim conhecidos devido a sua essência, odor característico que varia conforme a parte em que é encontrado na planta ou ainda conforme a interferência que o meio ambiente causa a ele (MORAIS, 2009).

1.6 PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os principais constituintes dos óleos essenciais são os hidrocarbonetos como os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, e compostos oxigenados como os ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis entre outras substâncias de baixo peso molecular (GUENTHER, 1977).

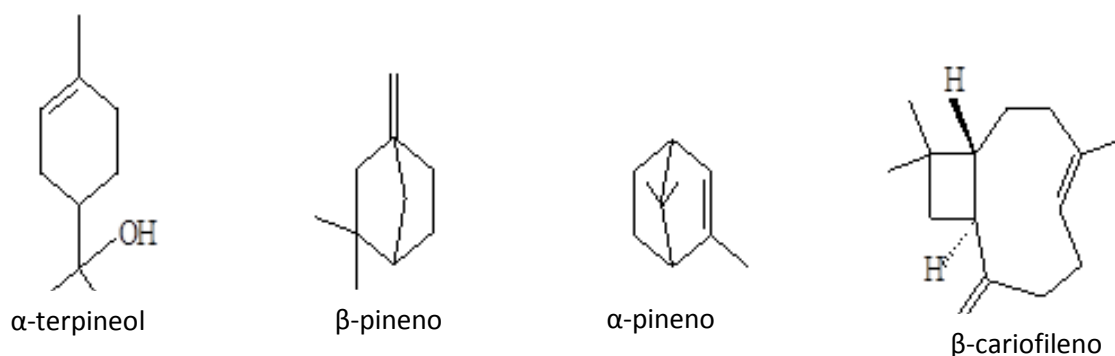
Os constituintes dos óleos essenciais das plantas pertencem a duas classes químicas distintas, os terpenóides e os fenilpropanoídes. Apesar dos terpenos representarem os componentes principais, ocorrendo muito mais freqüente e abundantemente, os fenilpropanoídes presentes são indispensáveis no sentido de fornecer sabor e odor aos óleos. Terpenóides e fenilpropanoídes são originados de precursores metabólicos primários diferentes e são gerados por meio de rotas biossintéticas específicas (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Os terpenóides são sintetizados a partir de cinco unidades de carbono de pirofostato de isopentenil, e seu isômero, pirofosfato de dimetilalil. Apesar dos fenilpropanoídes não serem constituintes comuns nos óleos essenciais, algumas espécies contém porções significantes desse componente. Estes compostos são sintetizados a partir do aminoácido aromático fenilalamina, daí o nome desta classe (TURNER; GERSHENZON e CROTEAU, 2000).

Entretanto devem-se considerar as alterações sofridas pelos constituintes do óleo essencial levando em consideração o estudo de Moraes (2009) ao afirmar que os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Entre estes fatores podem ser citados a luminosidade, temperatura, pluviosidade, a nutrição, época da coleta do material de estudo e o horário em que se realiza a coleta (MORAIS, 2009).

A literatura revela o isolamento de componentes distintos (figura 2) de óleos essenciais, chegando a superar o número de quinhentos por amostra em um estudo. A constituição química de um óleo essencial pode apresentar os seguintes constituintes químicos: α -terpineol, β -pineno, α -pineno, β -cariofileno (MALLAVARAPU; RAMESH, 2000).

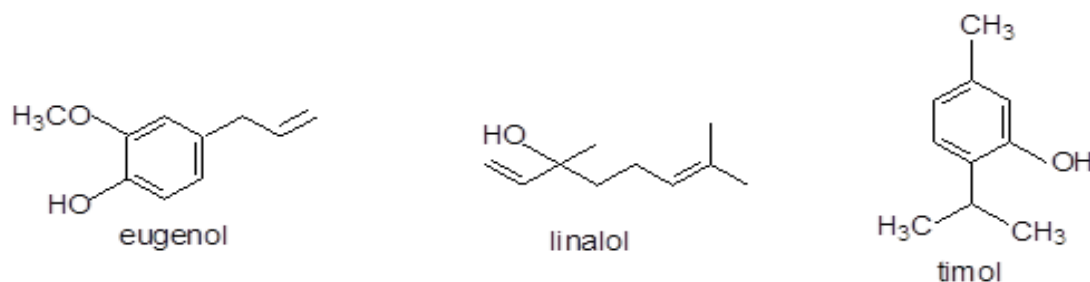
Figura 2 - Constituintes químicos encontrados em óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Mallavarapu; Ramesh, (2000).

Em um estudo sobre a composição química do óleo essencial de duas espécies da família Burceraceae, Siani e colaboradores (2012), identificaram entre outros, os seguintes constituintes químicos: eugenol, linalol e timol (figura 3).

Figura 3 - Estrutura molecular de constituintes químicos de óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Siani et al., (2012).

Entre os mais diversificados estudos sobre óleos essenciais, são identificados distintos constituintes químicos (tabela 1) sendo o mais incidente o limoneno.

Tabela 1- Constituintes identificados em óleos essenciais.

Óleo Essencial	Componentes Principais
Amêndoa Amarga	Benzaldeído
Bergamota	Bergamiol, limoneno, linalool, α -Pineno, γ -Terpineno, geranial, neral, geraniol, acetato de nerilo, acetato de geraniol, e bergapteno
Casca da Canela	Cinaldeído, acetato de cinamilo, eugenol, cariofileno, linalool, e α - Terpineol
Cravo da Índia	Eugenol, cariofileno, acetato eugenilo e α -humuleno
Semente de Coentro	Linalool, γ - terpineno, cânfora, α -pineno, p- cimeno, limoneno e acetato geraniol
Limão	Limoneno, β -pineno, γ -terpineno, geranial, neral, acetato geraniol, acetato nerilo, citronelal, linalool e nonanal
Lima (destilada)	Limoneno, β -pineno, γ -terpineno, terpinoleno, p-cimeno, 1,4 eucaliptol e 1,8 eucaliptol
Casca da laranja (doce)	Limoneno, mirceno, decanal, octanal, linalool, citronelal, neral, geranial, valenceno, α -sinensal e β -sinensal
Óleo de Rosa	Citronelol, geraniol, nonadecano, nerol, metil eugenol, acetato geraniol, eugenol, efenil etanol e óxido de rosa
Óleo de Hortelã	l-carvona, limoneno, mirceno, 1,8 eucaliptol, acetato de carvil, acetato dihidrocarvil, dihidrocarveol, octanol-3, e cis-jasmona
Anis estrelada	Trans-Anetol, limoneno, anisaldeido, linalool e metil cavicol
Ylang ylang	D-Germacreno, linalool, α -farneseno, acetato de benzila, α -cariofileno, acetato garanilo, benzoato de metila, salicato de benzila e acetato de eugenila
Eucalipto	1,8 eucaliptol, α -pineno, p-cimeno e limoneno

Fonte: (ROWE, 2005).

1.7 UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza, e à busca pelo bem estar físico, por meio dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores e sementes (BALBACH, 2002).

As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incenso, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

Segundo Fuentes (2009) copal, nome popular de um gênero de Burseraceae, é uma palavra asteca, que significa “graças a este caminho” uma alusão a queima da resina também conhecida como breu que é comumente utilizado em rituais religiosos. As resinas de Burseraceae são utilizadas para produção de óleos essenciais que como incenso são bastante requeridos em aromaterapia e rituais exotéricos em geral.

A biodiversidade das florestas tropicais constitui-se na principal fonte de biomoléculas para produção industrial de medicamentos, cujas vendas chegaram a nível mundial a 30 bilhões de dólares anuais, mercado este em ampla extensão (SEARS, 1995).

Entre as diferentes aplicabilidades dos óleos essenciais, podem ser citadas inúmeras pesquisas, entre elas as que apresentam as diferentes propriedades biológicas em que os óleos essenciais são usados. Ação larvicida, (RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010), atividade antioxidante, (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória, (MENDES et al., 2010), fungicida, (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008) e atividade antitumoral (SILVA et al., 2008).

Outro estudo relacionado a importância dos óleos essenciais verificou que em razão de vários fatores, vem ocorrendo uma crescente procura por defensivos alternativos para o efetivo controle de insetos-praga. Uma das classes de compostos derivados de plantas, que vem se destacando no controle de insetos, são os óleos essenciais, que já fazem parte de formulações de pesticidas, capazes

de matar e repelir insetos (ISMAN, 2006). A ação dos óleos essenciais contra insetos é confirmada por Simas et al., (2004) ao verificar a eficiência do óleo essencial de *Myroxylon balsamum* contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Os constituintes químicos encontrados em óleos essenciais podem atuar também como aditivos na ração de frango de corte. Nesse estudo, Silva et al. (2011) concluíram que a adição de 0,4% do óleo essencial de aroeira promoveu uma melhoria na superfície absorviva intestinal das aves quando comparadas com aves alimentadas sem promotores de crescimento.

Teixeira et al. (2013), também encontraram resultados positivos para adição de óleo essencial na ração de frangos de corte ao observar a melhoria do peso do frango.

Existe a comprovação científica do poder de cicatrização ocorrida com a utilização de óleo essencial em estudos histológicos realizado (KNEUGER et al., 2007).

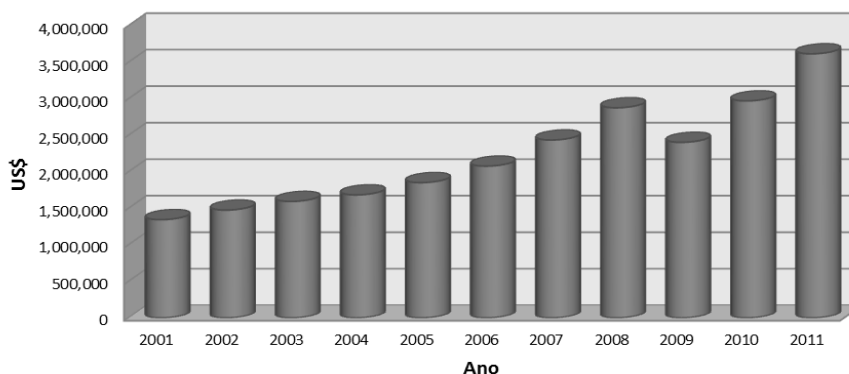
1.8 A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E O SEU CONSUMO

O Brasil aparece entre os principais países fornecedores dos óleos de laranja, limão, lima e outros cítricos. Destacado como o terceiro maior exportador de óleos essenciais, o Brasil apresenta alguns problemas a serem considerados como falta de manejo ao extrativismo, padrão de qualidade e baixos investimentos governamentais que levam ao quadro estacionário do setor (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Atualmente o mercado de óleos essenciais movimenta suntuosos valores financeiros em escala mundial. Por este motivo, desde o ano de 2001 que empresas multinacionais começaram a se instalar na Amazônia, a exemplo Crodamazon, Beraca (Brazmazon) e a Cognus. O mercado mundial gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11 % por ano. A importação de óleo essencial no período de janeiro de 2005 a outubro de 2008 foi de 8.938 t, sendo 42% de mentas, 29% de cítricos, 15% de óleos de folhas, 4% de óleos de flores, 2% de óleos de madeiras e 22% de outros óleos essenciais (INTRACEN, 2013). Quanto à exportação no período, o montante foi de 119.772 t, havendo domínio total dos óleos essenciais oriundos da indústria cítrica, representando acima de 95% destas exportações (COMTRADE, 2013). O registro

2013, feito pela INTRACEN, (gráfico1) mostra o crescente crescimento do mercado de óleos essenciais.

Gráfico 1 – Crescimento da exportação mundial do comércio de óleos essenciais.

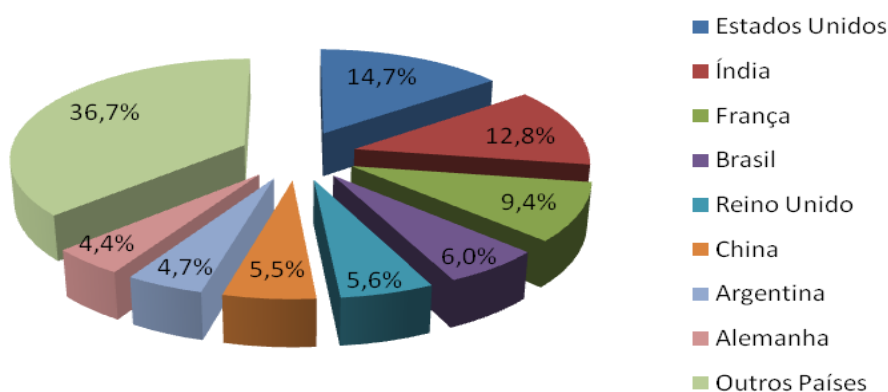


Fonte: (INTRACEN, 2013).

Ocupando a terceira posição de maior exportador de óleos essenciais do mundo, o Brasil perdeu apenas para os EUA e a França, tendo ultrapassado o Reino Unido em 2007. de acordo com a base de dados americana United Nations Commodity Trade Statistics Database (COMTRADE, 2013). Os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são os EUA (40%), a União Européia – UE (30%), sendo a França o país líder em importações (BIZZO, HOVELL; REZENDE 2009).

Informações mais atuais da crescente exportação de óleo essenciais, a INTRACEN (2013) mostra que os EUA ainda ocupam a primeira posição no mercado enquanto que o Brasil passou a ser o quarto (gráfico 2).

Gráfico 2 – Exportação de óleos essenciais.



Fonte: (INTRACEN, 2013).

1.9 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)

A cromatografia é um método empregado de forma ampla para separar, identificar e quantificar constituintes químicos em misturas complexas, pode ser aplicada às componentes relativamente voláteis sendo amplamente utilizada para se estabelecer a pureza de compostos orgânicos. Nenhum outro método de separação é tão eficiente e de aplicação tão generalizada como a cromatografia (SKOOG, 2008).

São conhecidos dois tipos de cromatografia gasosa: cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS). Devido ao grande uso da cromatografia gás-líquido pelo meio científico, seu nome foi abreviado para CG, sendo a combinação da cromatografia a gás e a espectrometria de massas conhecida como CG-MS, do português cromatografia gasosa e do inglês *mass spectrometry*, (SKOOG, 2008).

A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS) é uma das técnicas mais aplicadas na caracterização de compostos químicos voláteis, devido à simplicidade, precisão e rapidez (AVATO et al., 2005).

Segundo Skoog (2008) o conceito de CG foi enunciado pela primeira vez em 1941 por Martin e Synge e somente depois de mais de dez anos foi que a CG foi empregada rotineiramente em laboratórios. Desde 1955 que o método vem evoluindo, principalmente depois de seu lançamento comercial. Hoje, cerca de 50 fabricantes de instrumentos oferecem cerca de 150 modelos diferentes de equipamentos cromatográficos a gás com preços que variam de US\$ 1.000 até mais de US\$ 50.000. Esta técnica permite a separação dos constituintes, que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para cada um dos constituintes geralmente indica a massa molecular e o seu padrão de fragmentação.

O padrão de fragmentação pode ser comparado eletronicamente com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (TAVARES et al., 2005).

O sistema utiliza uma fase móvel e uma fase estacionária, o hélio é a fase móvel gasosa mais comum, embora o argônio, o nitrogênio e o hidrogênio sejam também empregados (SKOOG, 2008).

A identificação de componentes de óleos voláteis por CG-MS faz a associação com a determinação do índice de Kovats. Este procedimento vem sendo aplicado com sucesso na identificação de substâncias de estruturas conhecidas porque, em sua maioria, os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção (índice de retenção) obtidos em colunas de polaridades diferentes e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados (ADAMS, 2007).

1.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existe um grande número de estudos relacionados ao papel fundamental dos radicais livres e outros oxidantes que são vistos como responsáveis pelo envelhecimento das células ou por doenças como câncer, catarata, doenças cardiovasculares, disfunções cerebrais e a aquelas relacionadas a queda da imunidade no corpo humano (ROESLER et al., 2007).

As substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis e que inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos são conhecidos como antioxidantes. Com o combate aos processos oxidativos tem-se menores danos ao DNA e às macromoléculas (VICENTINO; MENEZES, 2007).

O processo metabólico que leva a produção de energia necessária para as atividades essenciais das células é chamado de oxidação. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes causando assim danos aos lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias oxidáveis, prejudicando o metabolismo celular (LEITE, 2003).

Os seres vivos controlam a produção de radicais livres através de diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar; vitamina E, vitamina C, selênio e carotenóides (SOUSA et al., 2007).

Naturais ou sintéticos, os antioxidantes possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular, e por isso desempenham papel

fundamental na prevenção à oxidação de substâncias. A existência de compostos que inibem a oxidação em concentrações específicas auxilia controlando os processos oxidativos em alimentos e organismos (BROINIZI et al., 2008). A ação antioxidante dos chás e condimentos de grande consumo no Brasil, estudada por (MORAIS et al., 2009) é confirmada frente a ação de compostos fenólicos. O processo químico realizado durante a atividade antioxidante é mencionado como de grande importância em uma pesquisa (HUANG, 2005).

Entre os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante de compostos orgânicos, encontra-se o método espectrofotométrico baseado na redução do radical estável DPPH, que permite fazer uma avaliação indireta da capacidade sequestradora de radicais livres e assim associá-la com a capacidade antioxidante da substância em análise testada (BRAND-WILLIAMS; COVELIER; BERSET, 1995).

1.11 TOXICIDADE

Existe uma crescente busca por técnicas analíticas eficientes que consigam detectar substâncias que são considerados tóxicos aos seres vivos. Geralmente esses compostos tóxicos estão presentes em alimentos. Isso faz com que os testes para detectar o grau de toxicidade dessas substâncias maléficas a seres vivos, sejam feitos através de bioensaio. O método de bioensaio mais utilizado no mundo inteiro é realizado com camundongos (RODRIGUES et al., 2009).

Na tentativa de desenvolver uma nova técnica para testar o efeito tóxico de substâncias nocivas ao organismo humano, Rodrigues et al., (2009) realizaram um trabalho sobre a toxicidade da mandioca utilizando o micro crustáceo *Artemia salina*. Esta técnica já foi utilizada anteriormente para avaliar toxicidade de efluentes e poluentes ambientais e também para verificar a toxicidade produzida por cianobactéria (PETER et al., 1997; GARCIA-RODRIGUES et al., 2004). Lewan et al., (1992) também utilizaram a *A. salina* para teste tóxico.

Para Rodrigues et al., (2009) o método que utiliza *A. salina* para verificação de toxicidade é considerado válido, pois apresentou precisão e praticidade além de mostrar viabilidade financeira e ser exequível em um curto espaço de tempo.

1.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Por acreditar que na natureza existem inúmeras possibilidades de adquirir imunidade, a ciência procura desenvolver estudos que contribuam na ação de combate a micro-organismos causadores de doenças aos seres vivos.

Existe uma busca incansável por novas substâncias para combater bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos. Esse desafio parece fazer parte do cotidiano científico, pois existe um número grande de pesquisas relacionadas ao teste de substâncias possivelmente ativas para aquelas propriedades antimicrobianas (PEREIRA et al., 2003).

Os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: na adequação da resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção como atenuante de virulência ou agindo como potencializadores de atividade antimicrobiana colaborando com a ação de antibióticos que não agem mais com eficiência diante da multirresistência desenvolvida por alguns micro-organismos (GONZALEZ-LAMOTHE et al., 2009).

A imunidade é tradicionalmente compreendida como inata ou adquirida. Considera-se como imunidade inata aquela que consiste de elementos sempre presentes e ativos em cada espécie animal para fazer a proteção contra agentes infecciosos enquanto que a imunidade adquirida utiliza antibióticos ou respostas imunes mediadas por células geradas como consequência de exposição a agentes infecciosos (HIRSH; ZEE, 2012).

A busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de produtos naturais vem aumentando o interesse das indústrias farmacêuticas, especialmente, em espécies de plantas que são utilizadas na medicina popular no tratamento de infecções sistêmicas em pacientes que apresentam o sistema imunológico comprometido (LIMA et al., 2006).

As propriedades antifúngica, antibacteriana e inseticida dos óleos voláteis estão entre as mais testadas (STRATTON, 2000). Segundo Bizzo; Hovell e Resende (2009), os óleos essenciais possuem atividade antibacteriana e antifúngica sendo extraídos de plantas aromáticas e medicinais. Os óleos essenciais podem ser obtidos de diversas partes das plantas como: folhas, flores, sementes, raízes, cascas e tubérculos.

Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos (NOSTRO, et al.,2007). Esta capacidade, presente na grande maioria destes compostos, de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, fazendo a defesa contra bactérias e fungos fitopatogênicos (JANSSEN; SCHEFFER; BAERHEIM-SVENDSE, 1987).

Os óleos essenciais por serem amplamente estudados como agentes químicos antimicrobianos, possibilitam o descobrimento de novas substâncias para o combate dos micro-organismos considerados patogênicos a outros seres vivos, a exemplo o homem (MOURA, 2013).

A biotransformação do limoneno em compostos de interesse comercial para o combate de micro-organismos ou para outros fins (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007) é exemplo da importância que a indústria dá aos compostos considerados naturais. A tendência do mercado é justamente a de substituir produtos sintéticos por aqueles encontrados na natureza.

A atividade antibacteriana dos OE's pode abrir perspectivas, no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo que pode ser usado no tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos resistentes (BERTINI, 2005).

Na avaliação de atividade de antibacterianos, deve ser utilizada ao menos uma espécie de micro-organismo Gram-positivo e uma de Gram-negativo como indicador de atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2000). Os métodos de seleção atualmente disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais definem-se em três grupos: os métodos bioautográficos, de difusão e de diluição (VALGAS et al., 2007).

Em um estudo da atividade antimicrobiana deve-se seguir os métodos indicados, a exemplo a aquisição inicial de cepas testadas. Uma das técnicas utilizadas para obtenção de cultura pura é a técnica de esgotamento em placa (HENRY, 1995).

É interessante que a substância testada como antimicrobiano, tenha seu estudo realizado em diferentes concentrações, para que assim possa ser melhor avaliada a concentração mais eficaz com ação antimicrobiana. Para avaliar a quantidade em que a concentração do agente antimicrobiano será capaz de inibir os micro-organismos é realizada a Concentração Inibitória Mínima (MIC). A MIC

consiste em determinar a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do micro-organismo testado (KONEMAM et al., 2008).

As diluições sucessivas cessam ao atingir-se a última concentração em que o óleo se mostra capaz de produzir ação antimicrobiana, ou seja, a formação do halo inibitório (OPLUSTIL et al., 2004).

1.12.1 Caracterização dos micro-organismos testados

Em estudos microbiológicos é importante que os micro-organismos utilizados sejam identificados e tenham histórico de utilização nos testes objetivados na pesquisa. Os pesquisadores utilizam micro-organismos padrão de instituições já reconhecidas como creditadas no meio científico como a American Type Culture Collection, (ATCC) EUA; National Collection of Type Cultures (NCTC) Inglaterra e Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz entre outras.

Mesmo de posse de micro-organismos confiáveis para utilização em testes científicos, é importante que o pesquisador conheça algumas de suas características para melhor interpretar os resultados obtidos na pesquisa (PREVIATI et al., 2012).

Segundo Jawetz; Melnick e Adelberg (2009). Os procariotos apresentam um tamanho relativamente pequeno, geralmente 1µm de diâmetro e geralmente estão associados a ausência de membrana nuclear. Porém a região especializada da célula que contém DNA é denominada nucleóide, podendo ser vista em microscopia eletrônica bem como no microscópio óptico após o tratamento para tornar o nucleóide visível.

A maioria dos procariotos possui apenas um cromossomo e o DNA cromossômico tem que se dobrar mais de mil vezes para ficar contido dentro da membrana da célula procariótica. Estão presentes nos mais diversos ambientes e se adaptam a nichos estreitamente circunscritos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias esféricas. A presença de esporos e flagelos não são observadas e a parede celular consiste em proteínas e polissacarídeos. O *S. aureus* cresce em de doze horas, produzindo culturas opacas, lisas e com mais de 1 mm de diâmetro no ágar. São anaeróbios

facultativos, resistem a dessecação por semanas e a aquecimento por até 60°C por trinta minutos. São encontrados no mundo inteiro em animais homeotérmicos e a transmissão de *S. aureus* entre animais e humanos é rara (HIRSH; ZEE, 2012).

A espécie mais importante do gênero *Staphylococcus*, é o *S. aureus*, bactéria Gram-positiva assim denominada pela pigmentação amarelada de suas colônias. Os membros dessa espécie são anaeróbios facultativos. A bactéria produz toxinas que colaboram para sua patogenicidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O *S. aureus*, embora encontrado com frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, é uma das bactérias mais importantes para estudos patogênicos porque atua como agente de muitas infecções, variando desde as mais superficiais até as mais graves. Geralmente as doenças causadas por esse micro-organismo, se classificam como superficiais, invasivas ou tóxicas, ou ainda apresentar características mistas, tóxicas e invasivas. Devido ao aumento de infecções hospitalares causadas por *S. aureus*, as pesquisas sobre o micro-organismo vêm aumentando nos últimos anos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A maioria dos *S. aureus* possui uma cápsula polissacarídica, cuja função principal é proteger a bactéria contra a fagocitose. O *S. aureus* produz várias toxinas que atuam através de diferentes mecanismos. Algumas são citotoxinas outras são superantígenos. Os problemas na saúde humana causados por essas citotoxinas variam desde a quebra de hemácias até a morte das células ocasionando maiores gravidades. O *S. aureus* também produz uma série de enzimas extracelulares que atuam nas doenças causadas. É conhecido por desenvolver resistência a antibióticos aplicados que ocorrem devido a mutações em seus genes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Entre as doenças causadas por *S. aureus* podem ser citadas a bacteremia, as endocardites, pneumonia, osteomielite, artrites, infecções de órgão e tecidos incluindo abscessos renais e cerebrais assim como meningites, intoxicação alimentar, Síndrome do Choque Tóxico e Síndrome da Pele Escaldada. O diagnóstico das infecções estafilocócicas é feito com exame bacterioscópico de esfregaços corados pelo Gram, isolamento e identificação do micro-organismo. São observados no exame microscópico, colônias em forma de cachos de uva. O *S. aureus* pode ser encontrado em várias partes do corpo humano como fossas nasais, garganta, trato intestinal e pele. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Frequentemente referido como pneumococo, o *Streptococcus pneumoniae* é uma espécie constituída por cocos Gram-positivos que se dispõem aos pares ou em cadeias curtas, são anaeróbios, e crescem em ágar sangue ou em outros meios ricos. É um dos principais patógenos humanos, atingindo na maioria das vezes crianças e idosos. O *S. pneumoniae* possui uma cápsula que protege a célula bacteriana da fagocitose. A infecção pneumocócica tem início na nasofaringe, podendo passar para o ouvido, pulmão e atingir a corrente circulatória. As doenças mais comuns causadas por *S. pneumoniae* são pneumonia, meningite, bacteremia, otite média e sinusite (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os *Streptococcus* são Gram-positivos, entretanto a medida que a cultura envelhece e as bactérias morrem, perdem sua característica Gram-positiva e podem aparecer como Gram-negativos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

Do ponto de vista taxonômico, os *Streptococcus* são os que causam maior variedade de doença que qualquer outro tipo de bactéria. A aparência das bactérias é em forma de cadeia que causam a destruição de células que realizam fagocitose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O envoltório e a parede celular do *Streptococcus* assemelham-se a dos *Staphylococcus*. As cápsulas quando presentes compõem-se de polissacarídeos e são antifagocíticas. São anaeróbios facultativos e obtêm energia mediante fermentação. Temperaturas de 55°C e 60°C destroem *Streptococcus*, apenas *S. pneumoniae* é solúvel em bile. Após a incubação por um período de doze horas, os estreptococos produzem colônias claras (HIRSH; ZEE, 2012).

A *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa e patogênica apresenta quase todas as cepas móveis por flagelos peritríquios. Cepas de *E. coli* capazes de produzir doenças residem no trato gastrointestinal inferior e são abundantes nos ambientes habitados por animais. A transmissão da bactéria se dá pela via fecal-oral podendo produzir diarreia em todas as espécies animais, inclusive no homem (HIRSH; ZEE, 2012).

A *E. coli* é a bactéria mais comumente isolada em laboratórios clínicos. O espectro patogênico da *E. coli* é amplo, e pode causar infecções do trato urinário, pneumonia em pacientes hospitalizados imunossuprimidos, meningite em recém-nascidos e enterite ou gastroenterite. Até o ano de 1982, não havia grande interesse por *E. coli*, porém elas foram associadas a colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica-hurêmica (HUS) uma doença trombótica microvascular dos rins; o que

despertou maior interesse em estudar a espécie. Uma característica típica da *E. coli* é a produção de toxina que pode levar a morte humana. Tipicamente a *E. coli* fermenta lactose (KONEMAN et al., 2008).

A *E. coli* é associada a doenças do trato urinário e a diarreias. O tratamento dessas doenças deve ter a merecida atenção porque se ocorrer a contaminação da corrente sanguínea poderá ocorrer sepse (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

O gênero *Proteus* é encontrado no solo, na água e em materiais contaminados com fezes. As espécies do gênero provocam infecções nos seres humanos somente quando deixam o trato intestinal, sendo encontradas em infecções urinárias e causando bacterímia e pneumonia, bem como lesões focais em pacientes debilitados ou naqueles que recebem infusões intravenosas. As espécies de *Proteus* produzem uréase, resultando em rápida hidrólise da ureia, com liberação de amônia, nesse sentido, infecções do trato urinário se tornam alcalinas, favorecendo a formação de cálculos e tornando a acidificação praticamente impossível (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

O gênero *Proteus* possui a característica de motilidade e inclui cinco espécies entre estas a *Proteus mirabilis* a mais comumente isolada em humanos. Classificada como Gram-negativa, a bactéria afeta o trato urinário e causa feridas. Praticamente todas as cepas de *P. mirabilis* são sensíveis a ampicilina e cefalosporinas, (KONEMAN et al., 2008).

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais. São amplamente distribuídas na natureza e com frequência são encontradas no cotidiano como pó branco que encobre frutas e folhas. Algumas leveduras produzem brotos que são chamados de pseudo-hifas que normalmente estão presentes em *Candida albicans* para invadir os tecidos mais profundos em células humanas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Candida albicans é uma levedura parasitária que habita as membranas mucosas da maioria de mamíferos e aves. Apresenta coloração branca a creme, lisas e brilhantes após 3 dias de crescimento em uma temperatura de 25°C. *C. albicans* é de grande interesse clínico, podendo causar lesões granulomatosas (cutâneas, mucosas e viscerais), casos de endocardite e meningite; ocorrendo com frequência o comprometimento do trato urinário. O gênero *Candida* está associado a infecções oportunistas, em pacientes imunodeprimidos, a pesquisa da manana

de *C. albicans* no sangue circulante vem sendo praticada, através do método Elisa (LACAZ et al., 2002).

A parede celular é rica em manana e glucana possuindo a *C. albicans* estrutura antigênica bastante complexa. *C. albicans* tem sido isolada de águas de piscinas, introduzida provavelmente pelos próprios banhistas. A espécie prevalece na secreção vaginal e possui habilidade em formar hifas ou pseudo-hifas para se aderir a superfície dos epitélios e secretar enzimas hidrolíticas (LACAZ et al., 2002).

As doenças produzidas pelas espécies do gênero *Candida*, rotineiramente ocorre em um hospedeiro imunocomprometido. As Células de *Candida* são eucariotas, a parede celular contém glicoproteínas que são glicanas e principalmente mananas. Também estão presentes lipídeos e quitina. A espécie é aeróbia obrigatória, cresce satisfatoriamente em ágar sangue ou ágar Sabouraud (HIRSH; ZEE, 2012).

Os fungos filamentosos possuem o corpo constituído de filamentos denominados hifas. Na maioria dos filamentosos, as hifas possuem paredes denominadas septos. Cada parte da hifa é capaz de crescer e quando um fragmento é quebrado, ele é capaz de se alongar e formar nova hifa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Amplamente distribuído na natureza o gênero *Penicillium* é encontrado em matéria orgânica em decomposição e no solo, sendo habitual contaminante em cultivos rotineiros em laboratórios. Geralmente estes fungos são isolados de secreções brônquicas, do escarro e lesões cutâneas. Pacientes submetidos a diálise ou que receberam transfusões de sangue ou soros contaminados por *Penicillium*, apresentam reações febris e sinais de intoxicação. Algumas espécies de *Penicillium* são potentes produtoras de micotoxinas (LACAZ et al., 2002).

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos microscópicos. Alguns autores estimam o número de espécies fúngicas existentes entre 100 mil e 250 mil, das quais somente 200 têm a capacidade de produzir micotoxinas, e 30 delas, efetivamente, são responsáveis por quadros micotóxicos, entre estes fungos o gênero *Penicillium* sp. faz parte da estatística daqueles produtores de micotoxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O *Penicillium* é constituído de hifa estéril, estipe, ramos, râmulos, métulas, fiálides e conídeos. A incubação para o crescimento pode chegar a sete dias.

Algumas espécies de *Penicillium* produzem pigmento no reverso da colônia, variando a cor de amarelo opaco a marrom. O gênero pode produzir colônia com aparência de veludo (velutina) ou de algodão (flocosa). Espécies de *Penicillium* provocam infecções no ouvido externo, endocardite e ceratite, sendo também registrados casos de infecção no trato urinário, cerebral e pulmonar (LACAZ et al., 2002).

2 OBJETIVOS

A pesquisa se desenvolveu buscando atingir os seguintes objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os constituintes químicos e verificar a atividade biológica do óleo essencial de *T. burserifolia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o óleo essencial através da técnica de hidrodestilação com aparelho cleverger;
- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial de *T. burserifolia* obtidos nos períodos seco e chuvoso;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de *T. burserifolia*;
- Verificar atividade antioxidante do óleo essencial de *T. burserifolia* obtidos nos períodos seco e chuvoso;
- Verificar a atividade de toxicidade do óleo essencial de *T. burserifolia* obtidos nos períodos seco e chuvoso.

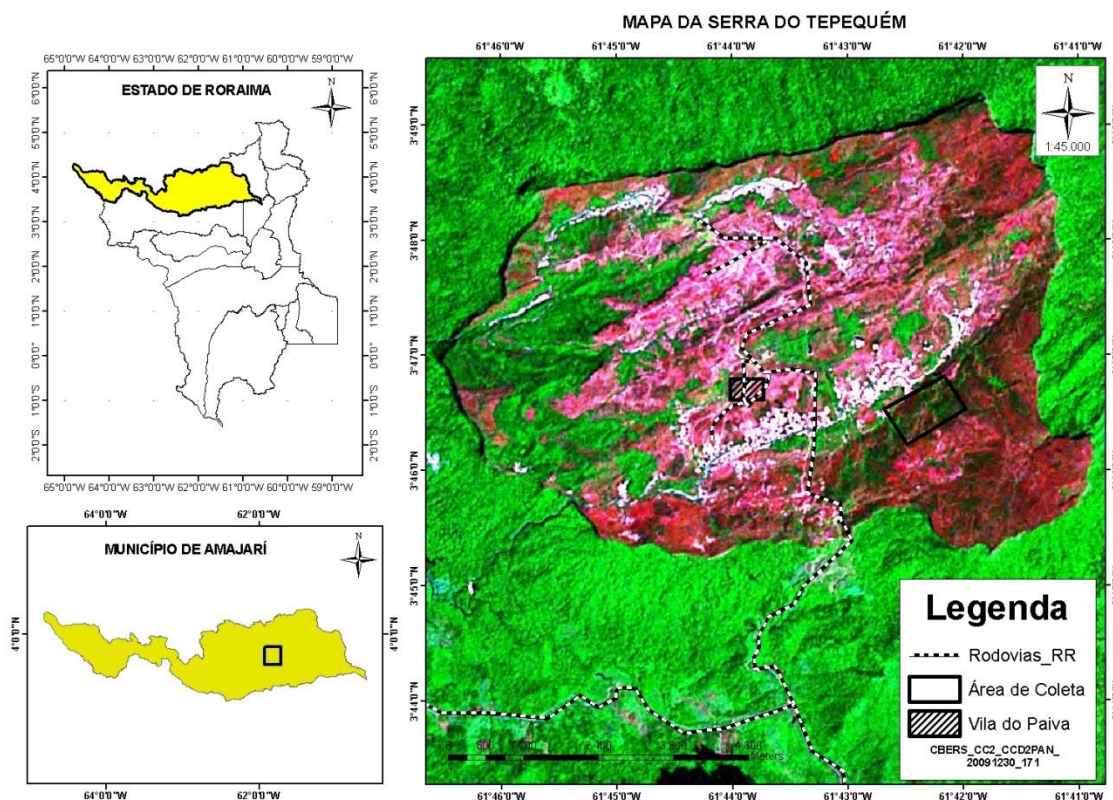
3 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização da pesquisa, foram utilizados os seguintes materiais e aplicados os seguintes métodos.

3.1 Área de estudo

O material botânico da pesquisa foi coletado na Serra do Tepequém, localizada no município de Amajari (Figura 4).

Figura 4 – Área de coleta do material botânico.



Fonte: Adaptado de Nascimento; Tavares Júnior; Bezerra Neta, (2012).

3.1.1 Caracterização da área de estudo

A Serra do Tepequém possui uma paisagem composta de cerrado e de floresta amazônica, com uma altitude de aproximadamente 1200 metros acima do nível do mar no seu ponto mais alto e constitui uma formação tipo tepui, o clima predominante na região é o quente e úmido (tipo Am) na classificação de Köppen,

com temperaturas médias anuais entre 22 a 24°C . Para Nascimento, Tavares Júnior e Bezerra Neta (2012) o clima do Tepequém é caracterizado por possuir um período seco bem definido com chuvas intensas ao longo do ano. Com uma biodiversidade ainda pouco estudada, o Tepequém tem sido o destino de pesquisas para muitas instituições de ensino (RORAIMA, 2012).

Devido à ação do garimpo, em meados de 1936 até a década de 80, a paisagem do Tepequém sofreu a ação antrópica de forma desordenada. Situada no município de Amajari, apresentando como limite ao norte o rio Amajari e ao sul a ilha de Maracá, a formação Tepequém localiza-se entre o estado de Roraima e a Venezuela (BARBOSA, 1992).

A Serra do Tepequém apresenta uma riqueza de fauna e flora exuberantes, possuindo espécies endêmicas. Atualmente o local se destaca como um dos pontos turísticos mais visitados do Estado de Roraima e desenvolve sua economia baseada neste perfil (RORAIMA, 2012).

Segundo Nascimento, Tavares Júnior e Bezerra Neta (2012), o Tepequém apresenta um acentuado desnível altimétrico no topo da serra em razão de várias formas de relevo.

3.2 AMOSTRAGEM

Foi delimitada uma parcela de 1 hectare entre o platô da e a planície da Vila do Paiva na Serra do Tepequém. A pesquisa utilizou uma amostra composta da casca do caule e o delineamento foi inteiramente casualizado. Para garantir o enquadramento da variabilidade, foram realizadas dez coletas da casca dos caules dos indivíduos. Utilizou-se como critério de seleção dos organismos o DAP ≥ 30 cm. Foram submetidas ao processo de injúria o total de 50 árvores para que a estimativa do desvio padrão estivesse dentro do esperado (95% de confiança). Para cada cinco indivíduos foram retirados 1 Kg da casca do caule de *T. burserifolia* totalizando 200 g por indivíduo, facilitando nesse sentido o processo de cicatrização da injúria feita no vegetal (MARQUES, 1994).

3.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal de identificação botânica de *T. burserifolia*, foi coletado na Serra do Tepequém, município de Amajari-Roraima. Foram feitas exsiccatas de todas as árvores que sofreram injúria para esta pesquisa. As exsiccatas foram identificadas e depositadas no herbário da Universidade Federal de Roraima sob número de tombamento 3863 e 4873 a 4921.

Este estudo teve como determinador da espécie *T. burserifolia* o MSc. Ricardo de Oliveira Perdiz, responsável pela coleta e identificação das plantas presentes nas grades e módulos PPBio, no Estado de Roraima.

Após a identificação de todos os organismos que fizeram parte da amostragem, foram coletados 200g da casca do caule de *T. burserifolia* de cada organismo (cinquenta árvores) para extração do óleo essencial. Evitando o processo de oxidação, esse material (casca do caule) foi transportado em balão volumétrico (5000 mL). A vidraria foi coberta com papel alumínio e foi acondicionada em isopor com gelo (BONONI; FIDALGO, 1984). O material botânico foi coletado nos períodos seco e chuvoso (ALMEIDA, 2009).

3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

No Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Roraima. O material coletado (casca do caule) foi cortado com auxílio de faca, tesoura e tábua para apoio.

O material cortado foi depositado em um balão volumétrico de capacidade 5000 mL. Foi acrescentado 1L de água destilada na vidraria que foi acoplada a uma manta aquecedora. Durante o período de quatro horas o material foi exposto ao processo de extração do óleo essencial. Para extração do óleo foi empregada a hidrodestilação com arraste de vapor d'água com a utilização de aparelho cleverger.

O óleo essencial obtido foi retirado do recipiente contendo hidrolato e óleo com auxílio de micropipetador automático utilizando ponteira com capacidade 100 μ L. O óleo essencial foi acondicionado em frasco de vidro esterilizado que previamente foi identificado com etiqueta contendo a data da extração e o

rendimento do óleo. O frasco foi envolto com papel alumínio e mantido sobre refrigeração (CASTRO, 2006).

De posse das amostras de óleo essencial de *T. burserifolia* do período seco (OETbS) e chuvoso (OETbC), a pesquisa desenvolveu as seguintes etapas.

3.5 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *T. burserifolia*

Para o cálculo de rendimento de óleo essencial de cada período de coleta, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa de óleo essencial obtido (g)}}{\text{Massa do material vegetal (g)}} \times 100$$

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), tendo como tratamento os óleos essenciais obtidos nos períodos (seco e chuvoso) de coleta. A variável analisada foi o rendimento de óleo essencial. Calculou-se a média do rendimento entre os meses dos períodos seco e chuvoso e o desvio padrão (GONÇALVES; MANCINELLI; MORAIS, 2009).

3.6 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA (CG-MS)

A identificação da composição química do óleo essencial de *T. burserifolia* foi realizada no Centro de Biotecnologia da Amazônia- CBA, na cidade de Manaus. Foi empregada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa. As análises foram realizadas em equipamento CG-EM modelo QP 2010 da Shimadzu com detector para espectrometria em massa. Foi utilizado o hélio (He) como gás de arraste.

O fluxo foi de 3µL por minuto, a injeção modo Split 1:10 foi realizada com injetor a 250°C e a pressão da coluna foi de 57,5 KPa. As amostras foram injetadas no sistema CG-EM na concentração de 1mg/mL em hexano grau HPLC. O impacto de elétrons como fonte de ionização foi de 70 eV e a coluna utilizada foi VF-5ms (30m x 0.25 mm x 0.25mm). A determinação da composição química do óleo essencial de *T. burserifolia* foi realizada através da relação tempo de retenção das substâncias presentes no óleo essencial com o tempo de retenção de

hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C9-C22) que foram coinjetados com a amostra.

Foi calculado o índice de Kovats de cada constituinte químico dos períodos em estudo. Os índices de retenção e os espectros de massa foram comparados com os dados da espectrometria da tabela NIST e da literatura especializada no CBA.

Os constituintes químicos foram indicados em cromatogramas que exibiram dos componentes encontrados no óleo essencial de *T. burserifolia* nos obtidos nos períodos seco e chuvoso (DIAS, 2005).

3.7 TESTE DE TOXICIDADE

O teste de toxicidade foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Roraima. Seguiu-se o método utilizado por Peters et al. (1997) em que é utilizado o micro crustáceo *A. salina* como organismo teste.

O procedimento foi realizado em etapas. A primeira etapa foi o preparo do ambiente artificial com solução salina. Pesou-se 14g de sal marinho em balança analítica. Medido em proveta, 400 mL de água destilada que foram depositados em um aquário de vidro.

Para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação, utilizou-se pHmetro para ajustar o valor do pH no valor 8. Segundo Lewan et al., (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de náuplios de *A. salina*. Uma bomba de aeração foi ligada no aquário para oxigenar a água e otimizar o ambiente.

Em balança analítica, pesou-se 10 g de cistos de *A. salina* que foram introduzidos no aquário para eclodir em água salgada por um período de quarenta e oito horas sob aeração e luz contínua, mantendo a temperatura foi controlada entre 27° e 30°C.

Os cistos eclodiram com 48 horas e no intuito de elaborar as curvas de toxicidade e o cálculo da concentração eficiente (EC_{50}) foram feitas concentrações decrescentes. Em solução salina (2%), feita em becker, foi adicionado 1L de água destilada e 20 g de sal marinho previamente pesado em balança analítica e a solução de Tween (1%) feita com 10 g de Tween 80 e 10 mL da solução salina.

A solução de Tween 1% foi mexida com auxílio de bastão de vidro e feita para auxiliar na solubilização do óleo essencial. Pesou-se 0,01g do óleo essencial de *T. burserifolia* que foi acrescentado na solução de Tween 1% (solução de óleo essencial dissolvido- OED). A solução foi depositada em um balão volumétrico de 10 mL e reservada. Este procedimento foi realizado para os períodos seco e chuvoso.

Foram separados seis tubos de ensaio que foram etiquetados e identificados com as diluições (em triplicata) para o óleo obtido no período seco e chuvoso. Utilizou-se dezoito tubos de ensaio para o período seco, idem para o período chuvoso e um tubo de ensaio para o controle.

Utilizando pera e pipeta de 10 mL, foram feitas diluições das duas soluções preparadas. Para a realização do teste de toxicidade, foram realizadas seis diluições para obtenção de seis concentrações decrescentes (tabela 2).

Tabela 2 - Obtenção de concentrações para o teste de toxicidade.

Diluições	Solução salina (mL)		Solução de OE (mL)
D1	7,5 mL	+	2,5 mL
D2	5 mL	+	5 mL de D1
D3	5 mL	+	5 mL de D2
D4	5 mL	+	5 mL de D3
D5	5 mL	+	5 mL de D4
D6	5 mL	+	5 mL de D5

Na diluição D6 o volume final foi de 10 mL, por este motivo foi retirado 5mL para padronizar os volumes.

Foi utilizado como controle 10 mL da solução salina e Tween 80, acrescidos de dez náuplios de *A. salina*.

Após a eclosão dos cistos depois de 48 horas com auxílio de pipeta de Pasteur os náuplios foram separados e transferidos para os tubos de ensaio

contendo 5mL das soluções do óleo essencial obtido no período seco e chuvoso a serem testados.

Em cada tubo de ensaio foram depositadas dez náuplios de *A. salina* e vinte e quatro horas após a exposição às distintas concentrações do óleo essencial de *T. burserifolia* foram contados o número de organismos que estavam vivos, mortos ou imobilizados e assim calculados a sobrevivência.

Cada tubo contendo 5 mL ficou com as seguintes concentrações de óleo essencial de *T. burserifolia* (tabela 3).

Tabela 3 – Concentrações de óleo essencial utilizados para o teste de toxicidade.

Diluições	Concentrações (µg/mL)
D1	250
D2	125
D3	62,5
D4	31,25
D5	15,6
D6	7,8

Para cada concentração do óleo essencial de *T. burserifolia* foi calculado o valor médio da mortandade e o desvio padrão. Com estes dados foram construídas as curvas de toxicidade (mortalidade pela concentração) para os períodos seco e chuvoso.

Para o cálculo do percentual de toxicidade, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$M(\%) = \frac{\text{Número de organismos vivos}}{\text{Número total de organismos no tubo}} \times 100$$

O valor de EC₅₀ (concentração que provoca a morte de 50% dos animais testados) foi calculado utilizando o programa Origin 8.0.

3.8 TESTE ANTIOXIDANTE

Foi utilizada a técnica de captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) inicialmente descrita por Brand-Williams em 1995. O método é baseado em uma reação química que avalia a captura do DPPH por antioxidantes produzindo um decréscimo na absorbância a 515 nm no processo químico de reação antioxidante. Ocorre variação de cor violeta escura para violeta clara ocorrendo o monitoramento dos resultados em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS, 1995).

A atividade antioxidante do óleo essencial de *T. burserifolia* seguiu o método disponibilizado por Santos et al. (2011). O teste foi realizado no Laboratório de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Química- PPGQ da Universidade Federal de Roraima.

3.8.1 Preparo de soluções

Das amostras compostas de óleo essencial obtido nos períodos seco e chuvoso separadamente, foi retirado 0,125g do óleo essencial de *T. burserifolia* para a preparação da amostra a ser testada (solução mãe) em quatro concentrações (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Para o preparo de uma solução 5 mg/mL utilizou-se pipeta de Pasteur, balão volumétrico de 25 mL e álcool metílico. Foi acrescentado separadamente 0,125 mg do óleo essencial de *T. burserifolia* (obtido nos períodos seco e chuvoso) e adicionou-se metanol formando a solução de metanol e óleo essencial.

Foram separados frascos de vidro e identificados como período seco e período chuvoso que em triplicata indicaram quatro concentrações 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ partindo de uma concentração zero. As diluições foram reservadas para posterior utilização.

Pesou-se 0,0240 g de DPPH em balança analítica e foi usado uma placa de Petri para acondicionar o reagente. Adicionou-se álcool metílico na placa e com auxílio de pipeta de Pasteur o DPPH foi retirado da placa e colocado em balão volumétrico (1000 mL).

Na solução de DPPH, foi acrescentado álcool metílico até completar o volume do balão volumétrico (1000 mL). A solução de DPPH foi armazenada em frasco âmbar.

Para fazer a curva de calibração, foram separados os vidros já etiquetados em triplicata para cinco concentrações (10; 20; 30; 40 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), para esta etapa, utilizou-se a solução de DPPH.

As amostras foram colocadas nas cubetas do espectrofotômetro (UV- 1800 da Shimadzu) para leitura.

Para determinação da atividade antioxidante, foram separados os frascos etiquetados e identificados com os óleos essenciais de *T. burserifolia* obtidos nos períodos seco e chuvoso, sendo e as diluições realizadas em triplicata. Adicionou-se 3,9mL de DPPH em todos os frascos e acrescentou-se 0,1mL da solução mãe e álcool metílico.

No Laboratório de Química Analítica do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, utilizou-se um espectrofotômetro (UV- 1800 da Shimadzu) para fazer a leitura das amostras. Utilizou-se como controle 3,9mL do DPPH e 0,1mL de metanol (no lugar da amostra), sendo o branco o metanol.

Para limpeza das cubetas foi utilizada água destilada. Com monitoramento do decréscimo na absorvância em comprimento de onda (517nm), o cálculo da atividade antioxidante (AA) foi realizado a partir da equação abaixo.

$$\%AA = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{controle} - Abs_{branco}]$$

A atividade antioxidante foi avaliada perante o consumo do radical DPPH e a verificação da oxidação do óleo essencial de *T. burserifolia* obtido nos períodos seco e chuvoso. Cada ensaio foi realizado três vezes sendo calculada a média dos resultados o desvio padrão. O gráfico de absorvância pela concentração foi feito através do programa Origin 8.0.

3.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As avaliações das atividades antimicrobianas do óleo essencial de *T. burserifolia* foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-

graduação em Recursos Naturais (PRONAT), da Universidade Federal de Roraima (UFRR).

3.9.1 Micro-organismos utilizados

Foram utilizados micro-organismos de referência, cepas de origem padrão ATCC (American Type Culture Collection) e INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FioCruz) além de um fungo proveniente de contaminação do processo de micropropagação de orquídeas do Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT (figura 5).

Figura 5 - Micro-organismos utilizados para o teste com óleo essencial.

Micro-organismo	Origem	Identificação	Classificação
<i>Staphilococcus aureus</i>	ATCC	25923	Bactéria Gram-positiva (G +)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	INCQS	00440	Bactéria Gra-positiva (G +)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922	Bactéria Gram-negativa (G -)
<i>Proteus mirabilis</i>	INCQS	00557	Bactéria Gram-negativa (G -)
<i>Candida albicans</i>	ATCC	18804	Levedura
<i>Penicillium sp.</i>	Contaminante	-	Filamentoso

3.9.2 Preparo dos materiais para realização de atividade antimicrobiana

Todo o material utilizado na atividade antimicrobiana foi esterilizado em autoclave a temperatura de 121°C por 15 minutos (NEDER, 1992).

3.9.3 Reativação dos micro-organismos

As bactérias foram reativadas em caldo nutriente da Himedia[®], que é um meio de enriquecimento pela incorporação de 10% de sangue ou outros fluídos biológicos (digestão péptica: 5.0; extrato de carne bovina: 1.50; extrato de levedura:

1.50; cloreto de sódio: 5.0) adequado para o cultivo de micro-organismos mais exigentes.

Após inoculação em caldo nutriente, as bactérias foram encubadas em estufa de crescimento a uma temperatura de 36°C por um período de 48 horas.

A reativação da levedura foi realizada em caldo GYMP (glicose: 2,0%; extrato de levedura: 0.5%; extrato de malte: 1,0%; fosfato de sódio monobásico: 0,2%) foi adicionado Cloranfenicol (0,02%) incubadas 48 horas a uma temperatura de 25°C.

O fungo filamentososo utilizado na pesquisa foi isolado do processo de contaminação de microcultivo de orquídeas do Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT, mantido no meio ágar Sabouraud.

3.9.4 Obtenção de cultura pura

Para a obtenção de cultura pura de bactérias e fungos, foi utilizada a técnica de esgotamento em placa (HENRY, 1995). Com auxílio de alça bacteriológica estéreis os micro-organismos foram inoculados em placa de Petri contendo meio de cultura ágar Muller Hinton (MH) para bactérias e ágar Sabouraud (SB) para fungos. Contendo o inóculo, as placas foram colocadas para crescimento dos micro-organismos em estufa de crescimento (Nova Ética) a uma temperatura de 36°C para bactérias, estufa de crescimento de leveduras (incubadora B.O.D. Tecnal TE-371) a uma temperatura de 24°C e estufa de crescimento de filamentosos (incubadora B.O.D. 411D – Nova Ética) a uma temperatura de 25°C no período de 24 horas para bactérias e quatro dias para os fungos (OPLUSTIL et al., 2004).

3.9.5 Cálculo das concentrações de óleo essencial

Para realização dos cálculos, foi levada em consideração a quantidade do Tween 80. O teste antimicrobiano do OETb foi realizado em triplicata tanto para o óleo obtido no período seco quanto para o chuvoso. A capacidade de absorção de cada disco de papel (DME) é de 10 µL. Foram calculadas as seguintes concentrações (tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações de óleo essencial para atividade antimicrobiana.

Concentração	Óleo essencial		Tween 80
100%	180 µL	+	-
75%	135 µL	+	45 µL
50%	90 µL	+	90 µL
25%	45 µL	+	135 µL
10%	18 µL	+	162 µL
2%	3,6 µL	+	176,4 µL

As concentrações foram preparadas com auxílio de micropipetador automático de 100 e 1000µL, acondicionadas em frascos identificadas e protegidas da luminosidade.

3.9.6 Impregnação dos discos

Na câmara de fluxo laminar Classe II, utilizou-se placas de Petri identificadas com as seis concentrações (100%; 75%; 50%; 25%; 10% e 2%) de OETb obtido no período seco e chuvoso. Os antimicrobianos Gentamicina (30 mg/mL) e Itraconazol (30 mg/mL), juntamente com Tween 80 também foram identificados em placa de Petri. Em cada placa foram colocados os discos para impregnação (NCCL, 2003).

Com micropipetador automático de foram inoculados 10 µL das concentrações do óleo essencial de *T. burserifolia*, dos controles positivos (antimicrobianos comerciais) e negativo (tween 80) em cada disco. Foram utilizados discos de papel (DME) estéreis com 6 mm de diâmetro.

3.9.7 Padronização dos inóculos

Para padronização dos inóculos utilizou-se a Escala de MacFarland com grau de turbidez de 0,5 o que representa aproximadamente 10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia). Com auxílio de swab foram retiradas alíquotas das culturas isoladas em placas de Petri, as quais foram introduzidas em solução salina

previamente esterilizada e comparada com o grau de turbidez 0,5 da escala de McFarland.

Ao atingir o grau de turbidez 0,5 na Escala de McFarland (10^8 UFC/mL) os micro-organismos suspensos em solução salina, por meio de comparação, foram inoculados (1mL da solução microbiana) em placas de Petri contendo cerca de 15 ml do meio Mueller- Hinton (bactérias) e Agar Sabouraud (fungos), com uma espessura de aproximadamente 4 mm (SHADOMYS, 1980).

Com auxílio da alça de Drigalsky as soluções microbianas foram espalhadas uniformemente pelos meios de cultura nas placas de Petri. Todo o procedimento foi realizado em triplicata e feitas as identificações necessárias nas placas de Petri: período testado, meio de cultura, micro-organismo testado e data.

Cada placa em ágar Mueller Hinton e Sabouraud contendo o inóculo, bactérias e fungos respectivamente, recebeu 6 discos de papel (6mm), impregnados com óleo essencial em 6 concentrações distintas (100%, 75%, 50%, 25%, 10% e 2%), além dos discos de controle positivo (Gentamicina para bactérias e Itraconazol para fungos) e controle negativo (tween 80). Os discos foram inoculados com pinças esterilizadas em cada placa previamente identificada como período seco e chuvoso.

3.9.8 Incubação dos micro-organismos

Os micro-organismos foram colocados para crescimento nos seus respectivos meios, MH e SB (bactérias e fungos) e foi realizada observação de crescimento. As estufas de incubação foram as mesmas utilizadas no item 3.9.4 A temperatura para bactérias foi de 36 °C e 25°C para fungos (KONEMAN et al., 2008).

3.9.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Para esta etapa, foi realizado todo o procedimento descrito nos itens (3.9.4; 3.9.5; 3.9.6; 3.9.7; 3.9.8). As concentrações utilizadas para MIC foram determinadas conforme os resultados inibitórios mais significativos.

Para determinação de MIC, foram testadas as concentrações 1,5%; 1,0%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,05% do óleo essencial de *T. burserifolia* do óleo essencial obtido no período seco e chuvoso.

3.9.10 Preservação dos micro-organismos

Foram transferidos 800 µL do inóculo para tubo do tipo eppendorf e acrescidos 200 µL de glicerol. Os tubos foram fechados, identificados e armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C.

3.9.11 Análise da atividade antimicrobiana

Para a verificação da atividade antimicrobiana através da medição do halo de inibição microbiano, os diâmetros foram medidos com auxílio de régua milimetrada e obtida à média e o desvio padrão.

Os resultados foram observados nas triplicatas para cada micro-organismo testado com óleo essencial de *T. burserifolia* do período seco e chuvoso. Todos os resultados foram observados no período de vinte e quatro, quarenta e oito e setenta e duas horas. A observação dos resultados para o fungo filamentoso testado se deu depois de três dias com os mesmos intervalos de horas que as bactérias (devido ao tempo necessário para o crescimento).

Os dados obtidos foram utilizados para os cálculos estatísticos através do programa Bioestat versão 5.0 por meio do teste de Tukey ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

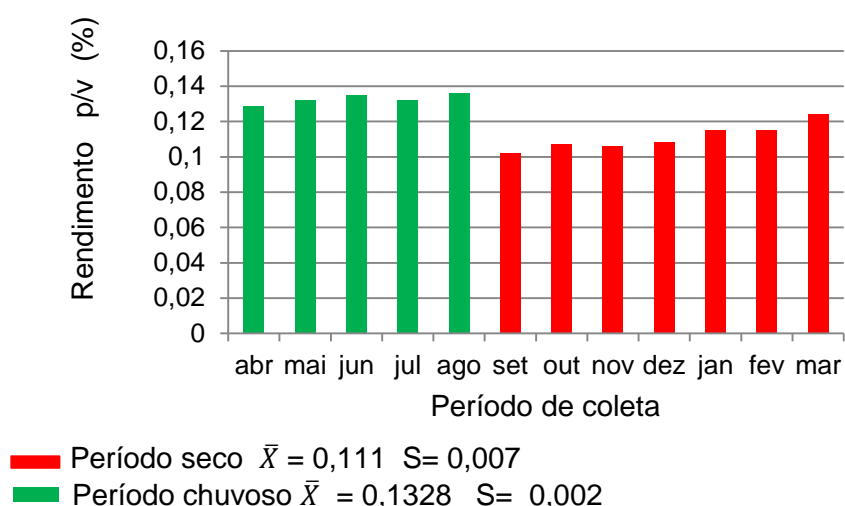
A pesquisa sobre os constituintes químicos e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. burserifolia* apresentou os seguintes resultados.

4.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *T. burserifolia* OBTIDO NOS PERÍODOS SECO E CHUVOSO

Foram obtidos rendimentos crescentes do óleo essencial retirado da casca do caule de *T. burserifolia*. No período seco o mês que apresentou maior percentual de rendimento foi março (0,127 p/v) e no período chuvoso agosto (0,136 p/v), conforme (gráfico 3).

Embora o período seco compreenda um período de tempo maior que o chuvoso (ALMEIDA et al., 2006), observou-se que a média do rendimento do óleo essencial de *T. burserifolia* da serra do Tepequém foi maior no período chuvoso.

Gráfico 3 – Rendimento do óleo essencial de *T. burserifolia*.



Para Gonçalves, Mancinelli e Morais (2009) o rendimento de óleo essencial está associado ao horário de coleta do material. As coletas das cascas do caule de *T. burserifolia* utilizadas nesta pesquisa, em ambos os períodos foram realizadas pela parte da manhã e a tarde, não sendo realizadas coletas entre 11 e 15 horas, horários ineficientes para rendimento de óleo essencial de algumas espécies (GONÇALVES; MANCINELLI; MORAIS, 2009).

O rendimento do óleo essencial do capim citronela se mostrou suscetível a época de corte do material (MARCO et al., 2006). O rendimento de óleo essencial de capim-limão mostrou diferença estatística significativa (Tukey 5%) para diferentes épocas de coleta (FIGUEREDO; DELLACHIAVE; MING, 2006).

Existem muitos estudos que levam em consideração o período da coleta do material, condições de secagem e o tempo de extração do óleo essencial a exemplo Agostini et al. (2005); Corrêa et al. (2004); Rodrigues et al. (2011).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Foram identificados 23 constituintes no óleo essencial de *T. burserifolia* obtido no período seco e 47 no óleo essencial obtido no período chuvoso. Os constituintes majoritários foram o limoneno (seco = 32,70%; chuvoso = 18,77%), δ -3-careno (seco = 28,85%; chuvoso = 11,23%) e α -pineno (seco = 16,35%; chuvoso = 12,01%).

Os resultados da identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *T. burserifolia* por CG-EM, corroboram com a conclusão de Maróstica e Pastore (2007) ao afirmarem que para óleos essenciais o limoneno se apresenta como constituinte majoritário.

Para o óleo essencial de *T. burserifolia* a quantidade de limoneno foi distinta nos períodos seco (32,70%) e chuvoso (18,77%). O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpene antimicrobiano natural em vegetais podendo ser utilizado em resinas, aplicações em borracha, síntese de outros compostos químicos e tintas, Maróstica e Pastore (2007).

Para Khalid (1983) a família Burseraceae acumula grandes quantidades de triterpenos da série oleano e ursano. Pontes et al. (2007) em um estudo químico feito com uma espécie da família Burseraceae verificou ação eficiente de α -terpineno contra ácaros. O α -terpineno (0,27%) no óleo essencial de *T. burserifolia* foi identificado somente no período chuvoso.

O constituinte *p*-cimeno foi identificado nos períodos seco e chuvoso com percentuais próximos (3,71% e 3,74% para os respectivos períodos), este constituinte químico, também foi identificado por Marquesi et al. (2010) em uma espécie estudada da família Burseraceae.

Do total de constituintes químicos no período seco (tabela 5), 4 constituintes aparecem como não identificados. Do total de constituintes no período chuvoso (tabela 6), 7 constituintes químicos aparecem como não identificados. Foram identificados 10 constituintes comuns entre os períodos seco e chuvoso. No processo de CG-MS, os cromatogramas do óleo essencial obtido no período seco

(figura 6). e chuvoso (figura 7). foram construídos a partir do índice de retenção dos componentes químicos analisados do OETb obtidos nos períodos estudados. Os picos mais altos identificam os constituintes de maior quantidade.

Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de *T. burserifolia* - período seco.

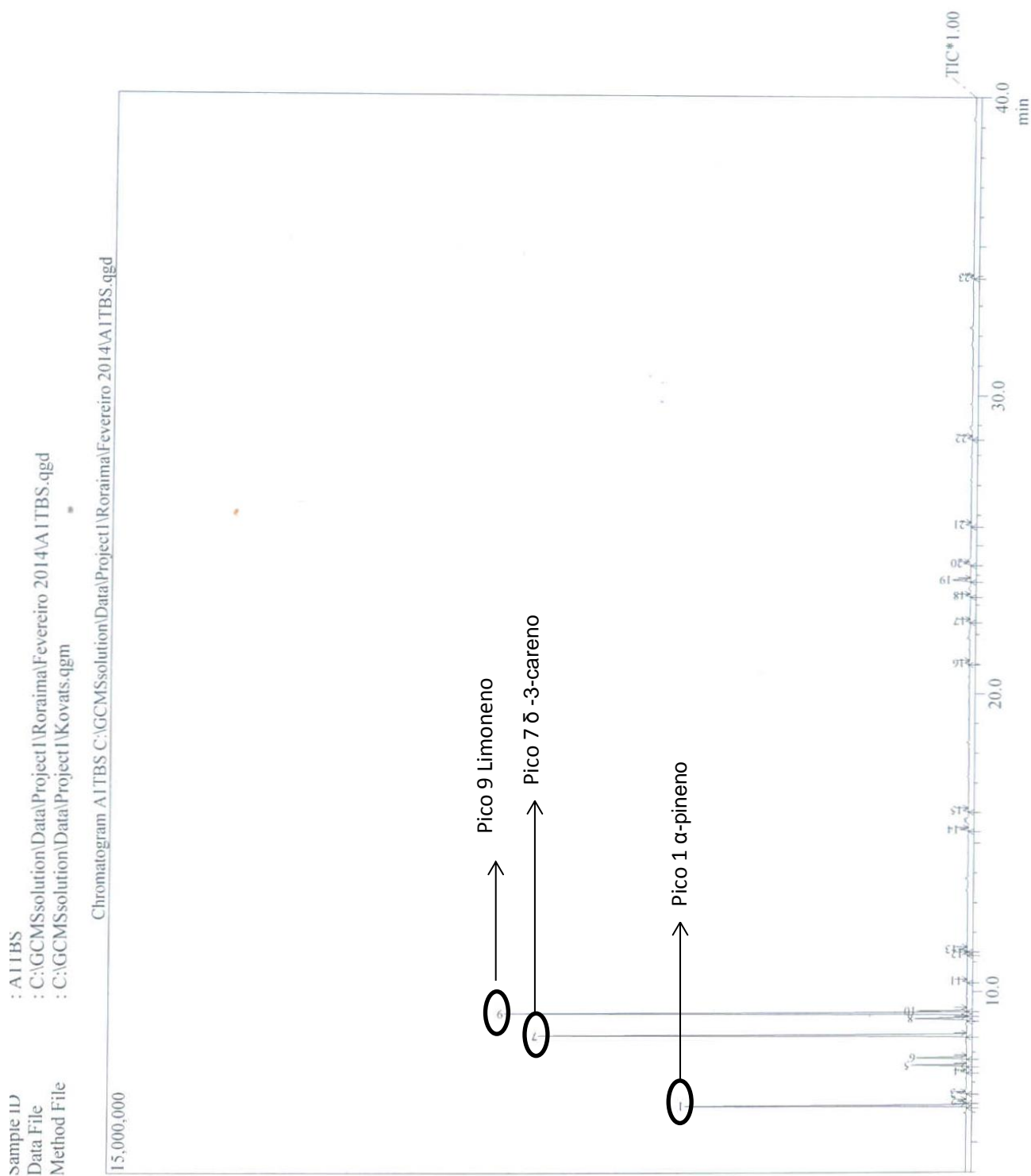


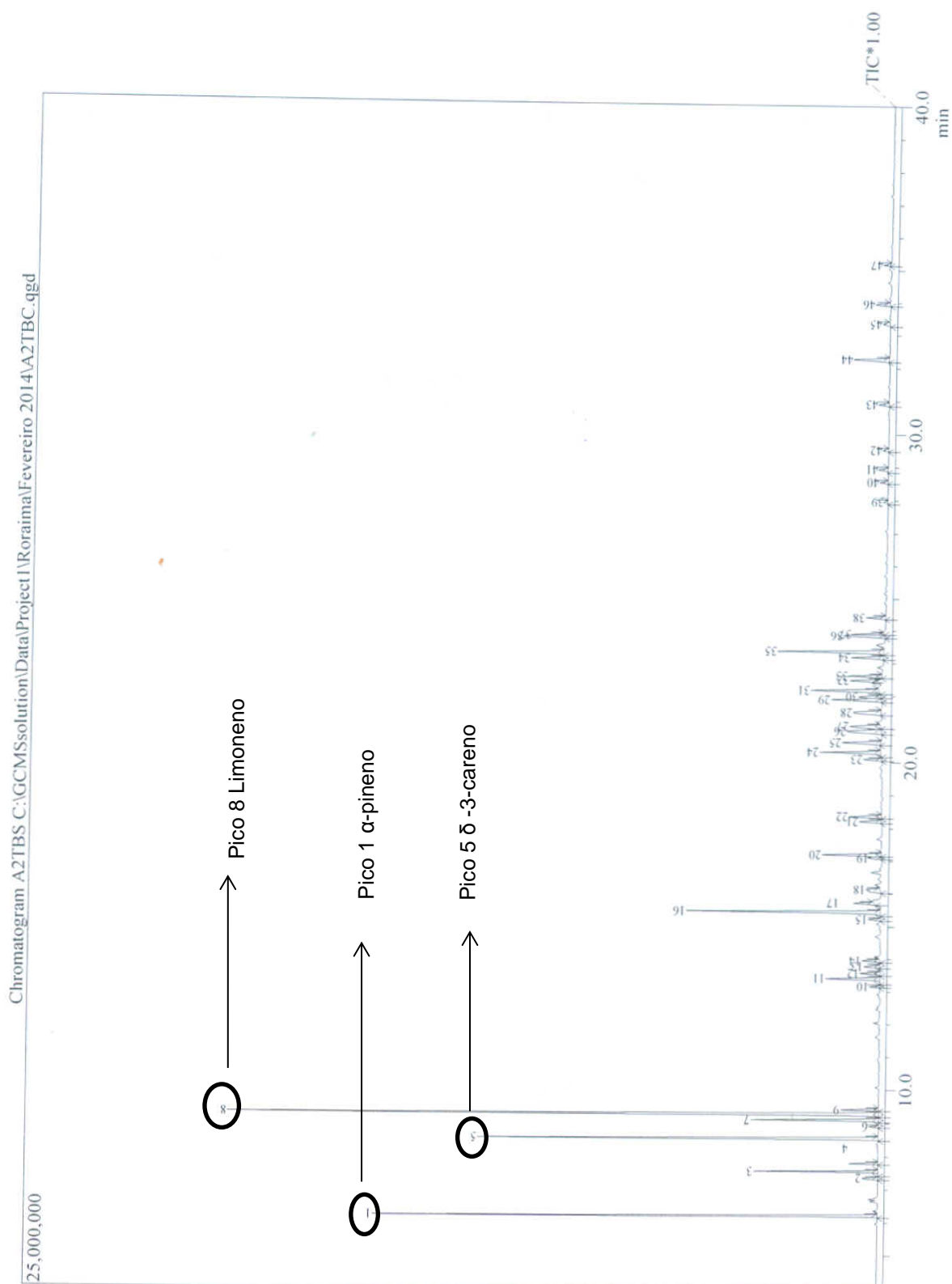
Figura 7 - Cromatograma do óleo essencial de *T. burserifolia* – período chuvoso.

Tabela 5 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *T. burserifolia* no período seco.

Pico PS	Const quím PS	IK	Área %
1	α -pineno	939	16,35
2	Ácido pentanóico	940	0,52
3	Não identificado		0,58
4	Sabineno	975	0,49
5	β -pineno	979	3,52
6	Mirceno	990	3,2
7	δ -3-careno	1011	28,85
8	ρ -cimeno	1024	3,71
9	Limoneno	1029	32,7
10	β -felandreno	1029	3,26
11	γ -terpineno	1059	0,32
12	Não identificado		0,23
13	Terpiloneno	1088	0,71
14	Terpinen-4-ol	1177	0,7
15	α -terpineol	1188	0,45
16	Guaiacol-p-vinil	1309	0,32
17	Verbanol acetato	1343	0,33
18	Não identificado		0,35
19	α -copaeno	1376	1,72
20	β -elemeno	1390	0,57
21	β -cariofileno	1419	0,48
22	Não identificado		0,37
23	Guariol	1600	0,28
Total de picos (%)			100
Total de picos identificados (%) IK			98
Total de picos não identificados (%)			1,53

PS: Período Seco; Const quim PS: constituintes químicos do período seco; IK: Índice de Kovats.

Marques e Ribeiro (1994) verificaram a presença de triterpenos no gênero *Trattinnickia* enfatizando que ele é bastante utilizado pela população indígena e ribeirinha da Região amazônica porque este gênero produz o “breu” que tem aplicações na medicina popular (inflamações em geral) ou outras aplicações como a calafetagem das embarcações e o uso como pesticida.

Por este motivo acredita-se que espécies do gênero *Trattinnickia* merecem uma atenção voltada para desenvolvimento financeiro para auxiliar as populações que dependem dos recursos naturais como fonte de aquisição monetária.

Tabela 6 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *T. burserifolia* no período chuvoso.

Pico PC	Const quími PC	IK	Área %
1	α -pineno	939	12,01
2	Sabineno	975	0,57
3	β -pineno	979	3,3
4	Mirceno	990	0,74
5	δ -3-careno	1011	11,23
6	α – terpineno	1017	0,27
7	ρ -cimeno	1024	3,74
8	Limoneno	1029	18,77
9	β –ocimeno	1037	1,07
10	α –camfolenol	1126	0,31
11	Não identificado		1,94
12	Limoneno óxido-	1136	0,76
13	Limoneno óxido-	1142	0,58
14	Isocitral	1147	0,61
15	ρ -metil-	1182	0,39
16	ρ -cimen-8-ol	1182	7,17
17	Não identificado	1182	0,7
18	Neo dehidro-	1194	0,91
19	Trans carveol	1216	0,47
20	Isofereno-4-	1217	2,23
21	Carvono	1243	0,79
22	Car-3-em-2-ono	1248	1,23
23	Não identificado		0,63
24	Thujanol acetato	1295	2,36
25	Não identificado		1,5
26	Acetato de	1307	1,89
27	Patchenol	1318	1,58
28	ρ -menta-1,4-dien-	1327	1,61
29	Linalool	1337	2,07
30	Verbanol acetato	1343	0,85
31	Trans-peripitol	1346	2,6
32	Não identificado		0,88
33	Não identificado		1,21
34	Undecenol-10	1363	1,35
35	Undecanol-n	1370	4,3
36	α –copaeno	1376	1,84
37	Não identificado		0,76
38	β –elemeno	1390	0,74
39	Trans-cardina-	1476	0,12
40	β –selineno	1490	0,3
41	α –muuroleno	1500	0,34
42	γ -cadineno	1513	0,2
43	Hediacariol	1548	0,4
44	Óxido de	1582	1,54
45	Epi-cedrol	1619	0,33

Continuação da tabela

Pico PC	Const quím PC	IK	Área %
46	1-epi-cubenol	1628	0,58
47	Allohimachalol	1622	0,24
Total de picos (%)			100
Total de picos identificados (%) IK			92,39
Total de picos não identificados (%)			7,62

PC: Período Chuvoso; Const. quím PC: Constituintes químicos do período chuvoso; IK: Índice de Kovats.

Maróstica e Pastore (2007) desenvolveram uma pesquisa para mostrar a biotransformação do limoneno para aquisição de compostos químicos não comumente encontrados na natureza, a exemplo α -terpineol e o carvono que foram identificados no óleo essencial de *T. burserifolia* (0,45% e 0,79% respectivamente). São encontradas muitas dificuldades nas metodologias em biologia molecular para melhorar os resultados alcançados por biocatálise, ressaltando que este é um ramo promissor na economia, pois os compostos produzidos na biotransformação tendem a substituir compostos obtidos sinteticamente.

O óleo essencial de *T. burserifolia*, além de possuir os compostos pouco encontrados na natureza (α -terpineol e o carvono) ou tentados a serem produzidos por biotransformação, possui ainda como constituinte majoritário o limoneno citado por Maróstica e Pastore (2007) como fonte de biotransformação para constituintes químicos de alto interesse comercial. O mirceno, encontrado no OETb no período seco e chuvoso possui atividades analgésicas (FERREIRA, FONTELES, 1989).

Alguns monoterpenos são utilizados para estudos com atividades farmacológicas relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). A hidroxidiidrocarvona é obtida através da hidratação da carvona (0,79% presente no óleo essencial do período chuvoso de *T. burserifolia*). Através de testes realizados em camundongos, concluiu-se que a hidroxidiidrocarvona possui atividade no SNC. (Oliveira, 2007)

Marquesi et al. (2010) em um estudo da composição química de duas subespécies do *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), identificaram em uma das subespécies o constituinte *p*-cimeno (4,75%), que apresentou valor próximo ao *p*-cimeno encontrado no óleo essencial do período seco e chuvoso (3,71% e 3,74%) de *T. burserifolia*.

Para a outra subespécie estudada, Marquesi et al. (2010) identificaram um valor de ρ -cimeno (39,93%) superior ao encontrado no óleo essencial de *T. burserifolia*. No mesmo estudo também se identificou o limoneno com percentual inferior (11,87%) ao encontrado no óleo essencial de *T. burserifolia* no período seco e chuvoso respectivamente (32,70% e 18,77%). Através do estudo realizado com *T. burserifolia* uma mistura de duas espécies do mesmo gênero, foi isolado um novo monoterpene além de triterpenos conhecidos (LIMA et al., 2004).

4.3 TESTE DE TOXICIDADE

Devido a carência de informações científicas sobre a espécie *T. burserifolia* frente a verificação da ação tóxica do óleo essencial, esta pesquisa buscou fazer comparação com outras famílias a título de mostrar a eficiência do método aplicado.

Os resultados do teste de toxicidade obtidos neste estudo corroboram com a alta toxicidade de uma espécie da família Burseraceae estudada por Camargo et al. (2010), sendo o estudo realizado com extratos da planta.

Silva et al. (2010) utilizaram o mesmo método para testar a ação tóxica de uma espécie da família Lamiaceae sendo considerado o óleo essencial estudado como tóxico. Outros pesquisadores também podem ser citados como adeptos do método para o teste de toxicidade (ARAÚJO et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2007; GARCIA-RODRIGUES et al., 2004).

Vale esclarecer que a leitura do resultado para o teste de toxicidade classifica-se como altamente tóxico resultados que apresentam valores entre 0-500; toxicidade média entre 500-1000 e baixa toxicidade ou atóxico valores acima de 1000 para o número de sobreviventes de *A. salina* (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2004).

Domingues et al. (2010) com estudo feito para família Myrtaceae, obtiveram valor de $DL_{50} = 84,91 \mu\text{g/mL}$, inferior ao valor de DL_{50} do óleo essencial de *T. burserifolia* (Burseraceae) no período chuvoso (tabela 7).

Tabela 7 - Valores de DL₅₀ para aplicação do óleo essencial dos períodos seco e chuvoso de *T. burserifolia* com o micro crustáceo *A. salina*.

Amostra	DL ₅₀ (µg/mL)
Período seco	86,072
Período chuvoso	45,286

O óleo essencial obtido no período chuvoso as distintas concentrações de *T. burserifolia* para matar os nauplios de *Artemia salina*, foi mais eficiente se comparada ao óleo essencial obtido no período seco, caracterizando portanto o óleo essencial obtido no período chuvoso como mais tóxico que o óleo essencial obtido no período seco (tabela 8).

Tabela 8 - Mortalidade das larvas de *Artemia salina* frente a ação do óleo essencial de *T. burserifolia*.

Concentração (µg/mL)	Período seco		Período chuvoso	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
250	73,33	0,057	100	0
125	66,66	15,28	96,66	5,77
62,5	30	10,00	40	0
31,25	26,66	5,77	33,33	5,77
15,62	23,33	5,77	26,66	11,55
7,81	16,66	5,77	23,33	5,77

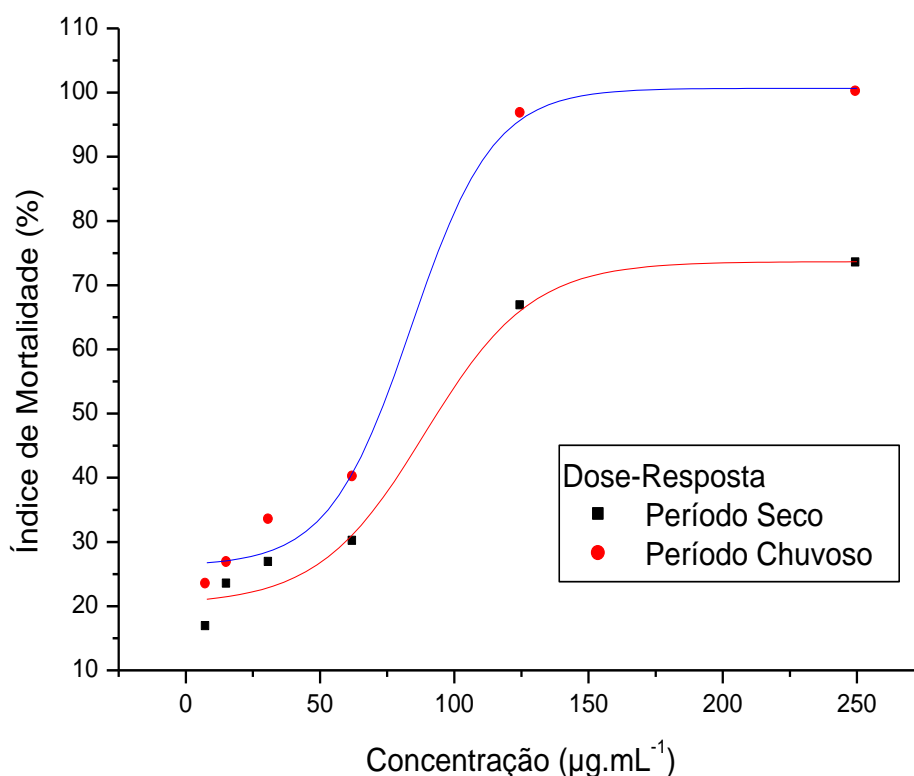
\bar{x} : média; S: Desvio padrão.

Segundo Rodriguez et al. (2009), para o teste de toxicidade utilizando *Artemia salina*, quanto menor o valor de DL₅₀ encontrado, maior será o efeito tóxico da substância correspondente. No caso do óleo essencial de *T. burserifolia*, a

toxicidade se manifesta conforme as concentrações do óleo essencial e exibe resultados distintos para os períodos seco e chuvoso.

O óleo essencial de *T. burserifolia* apresentou valor de Dose Letal para 50% dos náuplios eclodidos (DL_{50}) mais tóxico para o período chuvoso (45,28 mg/mL) em relação ao período seco (86,07 mg/mL). Para o efeito dose-resposta, houve aumento de mortalidade conforme o aumento da concentração do óleo essencial de *T. burserifolia* (gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito Dose-Resposta do Óleo Essencial de *T. burserifolia* no período seco e chuvoso.



Vale ressaltar que a leitura do resultado para o teste de toxicidade se classifica como altamente tóxico, média toxicidade e baixa toxicidade ou atóxico. Quanto menor EC_{50} mais tóxico será a substância correspondente (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2004).

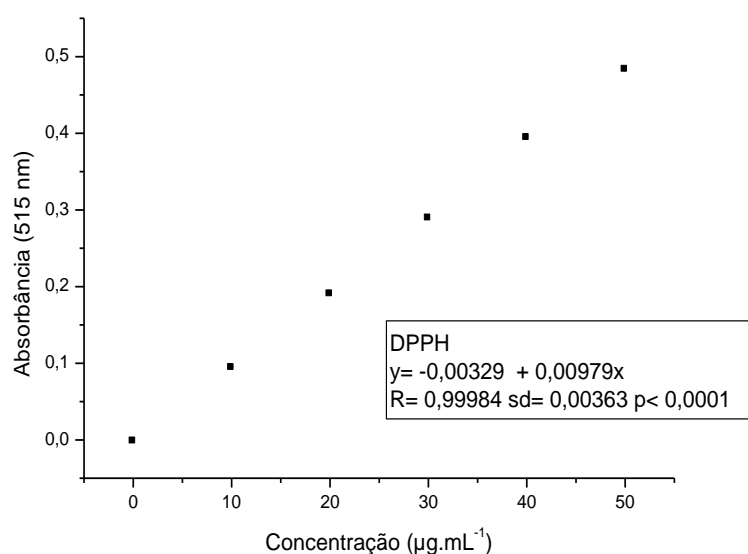
Observou-se nas curvas de toxicidade do período seco e chuvoso (gráfico 6), um comportamento sigmóide típico de curvas “dose-resposta”, o que permitiu o

ajuste das mesmas com o cálculo dos valores de Dose Letal – 50% (DL50) para ambos os períodos testados frente a ação do óleo essencial de *T. burserifolia*.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

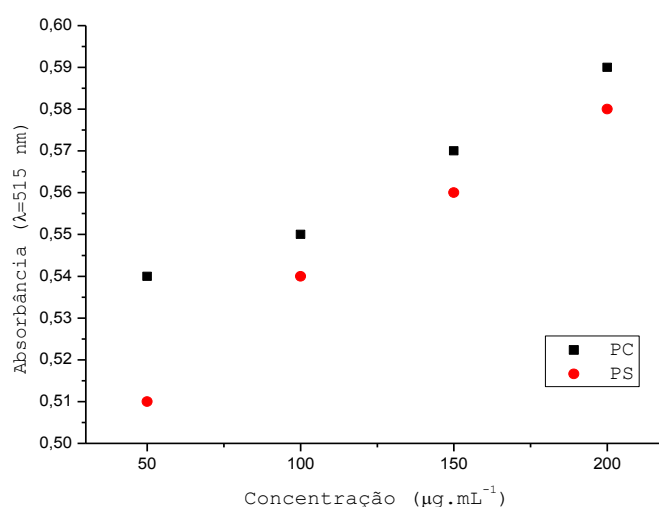
Foram obtidos bons resultados na construção da curva de calibração, que apresentou coeficiente de correlação $R= 0,99984$ o que possibilitou a verificação da atividade antioxidante de *T. burserifolia* através do sequestro do radical livre DPPH (gráfico 5).

Gráfico 5 - Curva de calibração para atividade antioxidante (DPPH).



Os resultados desta pesquisa foram discutidos em nível de potencial antioxidante de óleos essenciais, pois ainda existe considerada lacuna de conhecimentos científicos sobre atividade antioxidante do gênero *Trattinnickia*.

A absorbância do OETb foi aumentando conforme o aumento da concentração do OE do período seco e chuvoso (gráfico 6)

Gráfico 6 - Absorbância do óleo essencial de *T. burserifolia*.

Souza et al. (2011) não observou atividade antioxidante para o óleo essencial de *Braccharis tridentada*. Andrade et al. (2012) em estudo feito com *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nerdus* e *Zingiber officinale* observaram atividade antioxidante para somente para uma das 3 espécies estudadas. Guimarães et al. (2011), conseguiram identificar pequena atividade antioxidante do óleo essencial de capim-limão.

O óleo essencial de *T. burserifolia* apresentou absorbância com valores muito baixos para atividade antioxidante (tabela 9).

Tabela 9 - Redução do DPPH pelo óleo essencial de *T. burserifolia*

Amostra		% Atividade antioxidante										
		Concentração da amostra (μg.mL ⁻¹)										
		50			100			150			200	
UA	S	AA	UA	S	AA	UA	S	AA	UA	S	AA	
\bar{x}			\bar{x}			\bar{x}			\bar{x}			
OS	0,51	0,09	13,2	0,54	0,02	8,10	0,56	0,01	4,65	0,58	0,003	1,20
PC	0,54	0,07	8,10	0,55	0,02	6,37	0,57	0,002	2,93	0,59	0,005	0,58

(Absorbância do controle: 0,586 nm; Adsorbância do branco: 0,007 nm; A: amostras; PS: período seco; PC: período chuvoso; S: desvio padrão; AA: atividade antioxidante; UA: absorbância).

Os períodos seco e chuvoso apresentaram um valor abaixo de 14 µg/mL (tabela 10) caracterizando a ausência de atividade antioxidante. Por este motivo não foi calculado o EC₅₀.

De um modo geral, os estudos citados entre tantos outros disponíveis, mostram que os óleos essenciais apresentam baixa ou ausência de atividade antioxidante. É claro que a busca incessante de novas substâncias que combatam os radicais livres é fato inacabado e os óleos essenciais por sofrerem a ação de fatores ambientais podendo assim alterar sua constituição, estão presentes na extensa possibilidade de estudos dos antioxidantes.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O óleo essencial obtido no período seco, apresentou ação antimicrobiana somente para *Proteus mirabilis* e *Penicillium* sp., enquanto que o óleo essencial obtido no período chuvoso inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados (tabela 10).

Na literatura consultada, não foram encontrados registros para atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *T. burserifolia*. Nesse sentido, foi realizada a discussão dos resultados mediante óleo essencial de espécies da família Burceraceae e ação antimicrobiana de óleos essenciais de outras famílias, considerando resultados para os mesmos micro-organismos utilizados nessa pesquisa. Foram ainda considerados a ação antimicrobiana dos constituintes químicos encontrados no OETb obtidos no período seco e chuvoso.

Mariotti et al. (2014) testaram o óleo essencial de *Gunera manicata* (Gunneraceae) para atividade antimicrobiana. Entre os micro-organismos utilizados, dois foram os mesmos utilizados para os testes antimicrobianos realizados com o óleo essencial de *T. burserifolia* (Burseraceae). Os micro-organismos *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 apresentaram os respectivos diâmetros de halos (20 mm e 23mm) para o óleo essencial de *Gunera manicata* e para o óleo essencial de *T. burserifolia* (20mm e 10mm), mostrando assim similaridade nos resultados para *S. aureus* e um menor para o halo de inibição da espécie *E. coli*.

Tabela 10 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. burserifolia*.

Micro-organismo	Classificação	Atividade	
		PS	PC
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria Gram positiva (G +)	-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéria Gram positiva (G +)	-	+
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria Gram negativa (G -)	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Bactéria Gram negativa (G -)	+	+
<i>Candida albicans</i>	Levedura	-	+
<i>Penicillium sp.</i>	Filamentoso	+	+

PS: Período Seco; PC: Período chuvoso; (+): presença de atividade antimicrobiana; (-): ausência de atividade antimicrobiana.

Para Toigo et al. (2004) a ação antimicrobiana de OE de uma espécie da família Lameaceae mostrou-se eficiente contra micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus sp.* e *Candida sp.*, sendo ineficiente para o gênero *Escherichia sp.* O teor de limoneno encontrado (5,93%) na pesquisa, foi inferior ao teor de limoneno encontrado neste estudo (32,70% e 18,77%) para óleo essencial obtido no período seco e chuvoso respectivamente.

O limoneno é o principal constituinte dos óleos essenciais, é responsável pela inibição do crescimento microbiano em vegetais (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). Entre os constituintes químicos identificados no OETb o limoneno está presente em maior quantidade tanto no óleo essencial obtido no período seco quanto no chuvoso. Nakahara et al. (2003) afirmam que o mirceno, (encontrado no óleo essencial do período seco e chuvoso) só possui relato de atividade antimicrobiana quando em efeito sinérgico com outros componentes principais do OE estudado.

Estudos realizados por Leite et al. (2007), confirmam a ação antimicrobiana de α -pineno e β -pineno. Entre os constituintes químicos do óleo essencial de *T. burserifolia*, foram identificados α -pineno (16,65% no óleo essencial obtido no período seco e 12,01% no período chuvoso) e β -pineno (3,52% no óleo essencial obtido no período seco e 3,30% no período chuvoso).

As explicações para a ação de óleos essenciais como antimicrobianos são as mais diversas possíveis, a maioria apresenta uma relação com o rompimento da membrana ou da parede celular. Os OE's possuem a capacidade de coagular o citoplasma e danificar lipídeos e proteínas da membrana. A parede e a membrana

celular quando danificadas possibilitam o escape de macromoléculas, o que pode ocasionar uma lise celular (GUSTAFSON, 1998). A desestabilização da parede e da membrana celular pela ação de OE's é também aceita como explicação da atividade antimicrobiana por Denyer (1995); esta afirmação é confirmada por Aiemsaad et al. (2011).

Em estudo sobre a ação do OE de *Inula graveolens* e *Santolina corsica*, Guinoiseau et al. (2010) observaram que ocorreu lise celular na atividade bactericida e que algumas células bacterianas sofreram afinamento da parede, percebendo-se a perda da homogeneidade do conteúdo celular pela formação de grânulos citoplasmáticos.

Existem componentes dos óleos essenciais que são distintos em cada óleo essencial e apresentam habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente nas bactérias Gram-positivas (KOYAMA et al., 1997).

Para Kubo et al. (1993), a atividade antimicrobiana pode ser verificada frente aos terpenos encontrados em algumas plantas. Nesta pesquisa o óleo essencial obtido no período seco e no chuvoso foram identificados terpenos como constituintes químicos do OETb (tabela 11).

Segundo Greay; Hammer (2011), os monoterpenos interferem na integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial de membrana, perda do material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. Genes codificadores de fatores de virulência podem sofrer alteração frente a exposição de terpenos (QUIU et al., 2011).

O OETb apresentou em seus constituintes químicos hidrocarbonetos voláteis que para Sikkema; Bont; Poolman (1995) inibem o crescimento de bactérias.

Possivelmente os óleos essenciais atuam na parede celular de fungos, causando o vazamento do conteúdo celular (AMARAL; BORA, 2005). Essa informação é confirmada por Rasooli et al (2006) ao estudar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Thymus eriocalyx* ao observar através de microscopia eletrônica de transmissão que o óleo essencial causou danos severos na parede celular, membrana e organelas celulares de *Aspergillus niger*.

Para Sikkema; Bont; Poolman (1995), a acumulação de compostos lipofílicos na membrana celular das bactérias pode causar problemas de toxicidade, afirmação confirmada por Di Pasqua et al. (2006).

O óleo essencial de *T. burserifolia* obtido nos períodos seco e chuvoso foi caracterizado com alto nível de toxicidade e este fato pode estar relacionado com a capacidade de inibição do crescimento antimicrobiano. No período seco EC_{50} (86,07 $\mu\text{g/mL}$) apresentou um valor maior que o EC_{50} (45,28 $\mu\text{g/mL}$) do período chuvoso, confirmando nesse sentido a maior eficácia da ação antimicrobiana do OETb no período chuvoso.

Segundo Di Pasqua et al., (2006), a toxicidade pode estar relacionada com a capacidade de provocar danos a parede celular. Os compostos lipofílicos existentes nos OE's passam através da parede e membrana citoplasmática e podem afetar a estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos, fazendo a permeabilização que nas bactérias está associada com a perda de íons, a redução do potencial de membrana, ao colapso da bomba de prótons e ao esgotamento de ATP.

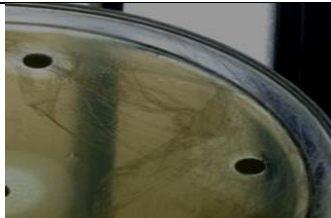




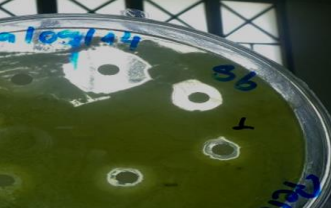
O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve principalmente efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular (SEIXAS et al., 2011).

O efeito do OETb pode ser potencializado se for combinado com outros constituintes químicos a exemplo a pesquisa feita por Garcia-Garcia et al. (2011) que obtiveram melhores resultados para ação antimicrobiana da associação entre cravacol e timol em concentrações distintas.

Para Alves et al. (2008) a espécie *S. aureus* ATCC 25923 obteve desvio padrão igual a 0,57 em suas médias do halo de inibição microbiano para o teste feito com 100% no óleo essencial estudado, enquanto que o OETb na mesma concentração apresentou um desvio padrão igual a zero frente a mesma cepa. Isto significa que estatisticamente o resultado das médias para o OET foi melhor porque não houve variação entre suas médias (tabela 11).

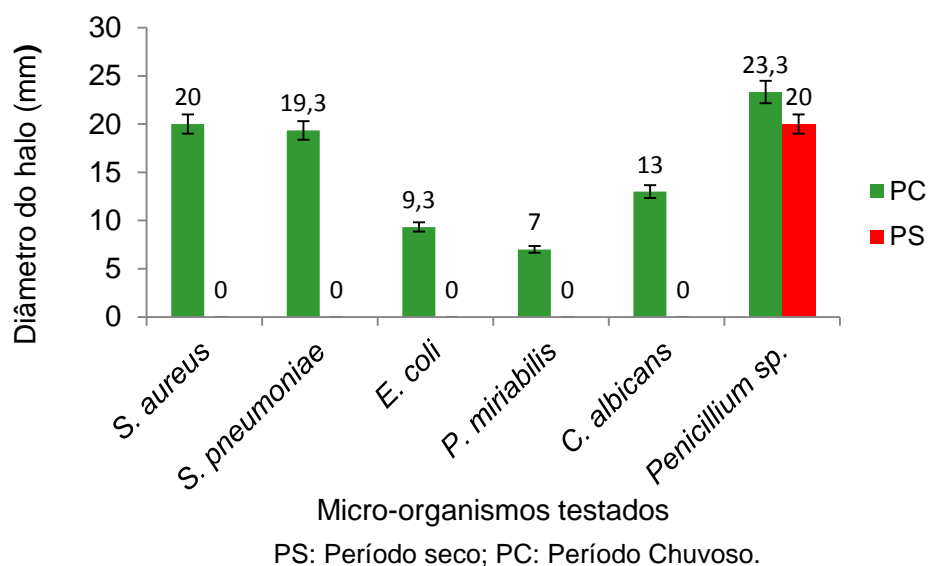
O diâmetro do halo de inibição do óleo essencial puro variou conforme o micro-organismo testado apresentando maior eficiência em números de micro-organismos afetados pelo OETb no período chuvoso que no seco.

Tabela 11 – Média do diâmetro do halo de inibição microbiana [100%] do óleo essencial de *T. burserifolia* obtido no período chuvoso.

Micro-organismos utilizados	Diâmetro do halo (mm)	
	\bar{x}	S
 <i>S. aureus</i> G (+)	20	0
 <i>S. pneumoniae</i> G (+)	19,33	1,2
 <i>E. coli</i> G (-)	9,33	1,2
 <i>P. miriabilis</i> G (-)	7	0
 <i>C. albicans</i>	13	0
 <i>Penicillium sp.</i>	23,33	5,7

O desvio padrão do halo de inibição do gênero *Penicillium sp.* foi maior com óleo essencial do período chuvoso que no seco; não foi observada atividade antimicrobiana para os demais micro-organismos no período seco com a concentração do óleo puro (gráfico 7)

Gráfico 7 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial puro.



A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. burserifolia*, na mesma concentração para todos os micro-organismos testados, ocorreu com concentração de 25% do óleo essencial obtido no período chuvoso apresentando resultados significativos (tabela 12).

Tabela 12 – Resultado do teste de Tukey ($p < 0.05$) para concentração de 25% do óleo essencial de *T. burserifolia* obtido no período chuvoso.

Micro-organismos testados	(p)
1 e 2	< 0.01
1 e 3	< 0.01
1 e 4	< 0.01
1 e 5	< 0.01
1 e 6	< 0.01
2 e 3	Ns
2 e 4	Ns
2 e 5	Ns
2 e 6	< 0.05
3 e 4	Ns
3 e 5	Ns
3 e 6	Ns
4 e 5	Ns
4 e 6	Ns
5 e 6	Ns

1- *S. aureus*; 2- *Penicillium sp.*; 3- *S. pneumoniae*; 4- *E. coli*; 5- *C. albicans*; 6- *P. mirabilis*; Ns: não significativo.

O micro-organismo *E. coli* ATCC 25922 também foi testado com o óleo essencial de *Lantana camara* (Verbenaceae) e apresentou resultado significativo no combate da bactéria (COSTA et al., 2009). Também foi alcançado resultado significativo para *E. coli* ATCC 25922 submetida a ação antimicrobiana do OETb do período chuvoso.

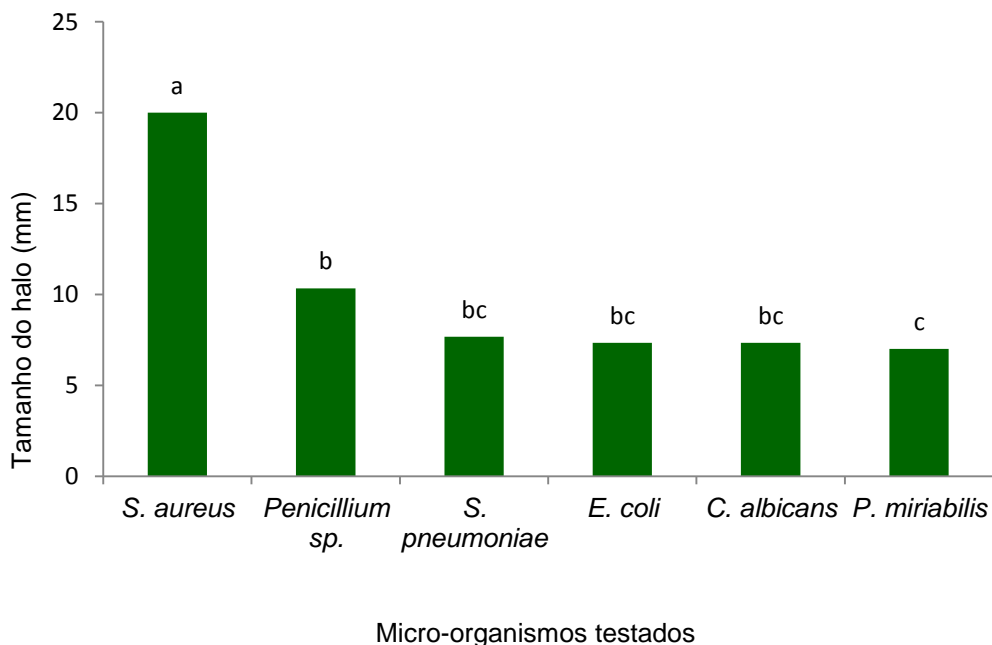
Para Bispo Junior et al. (2012) a espécie *S. aureus* ATCC 25923 apresentou MIC de 0,1% do extrato de teste de uma espécie estudada. Para o OETb o MIC foi de 0,05% do óleo no período chuvoso, verificou-se neste sentido uma eficácia melhor com a utilização de OETb do período chuvoso para *S. aureus* ATCC 25923 do que no trabalho realizado por Bispo Junior et al. (2012).

Para determinar o constituinte químico que de fato inibe a ação do crescimento dos micro-organismos testados, faz-se necessário um estudo mais aprofundado da ação antimicrobiana do OETb nos períodos seco e chuvoso. O efeito do óleo essencial de *T. burserifolia* obtido em ambos períodos pesquisados, pode ser potencializado se ele for combinado com outros constituintes químicos, a exemplo o trabalho realizado por García-García et al. (2011) que obtiveram melhores resultados para ação antimicrobiana da combinação entre dois constituintes com concentrações diferentes.

Segundo Novacosk; Torres (2006), os micro-organismos *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 quando submetidos a ação antimicrobiana do OE de cedro apresentam mesmo MIC (0,2%). Nesta pesquisa, o MIC para *S. aureus* foi em menor concentração (0,05%).

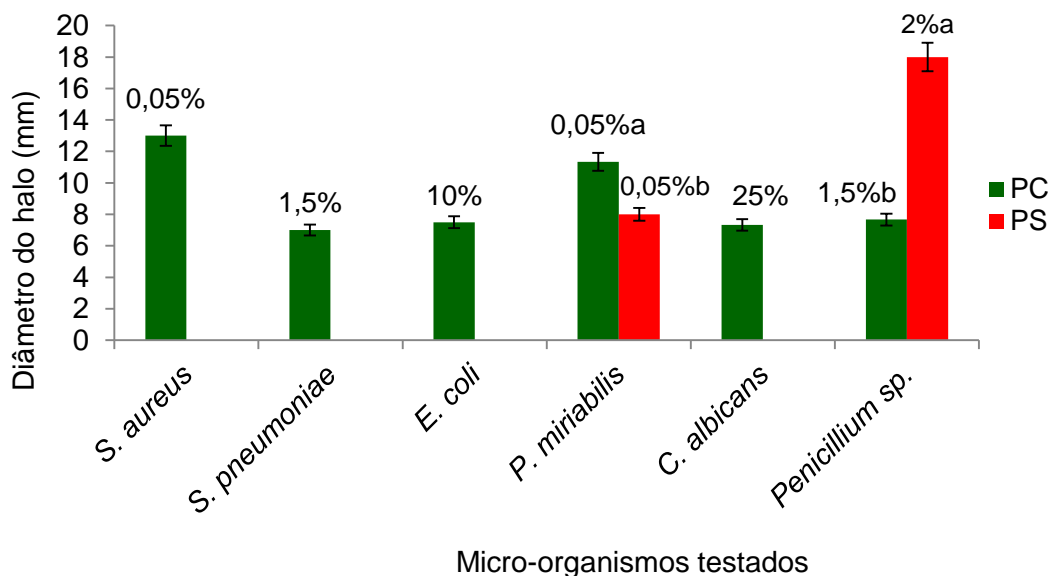
Entre os micro-organismos testados com OETb obtido no período seco e no chuvoso, *S. aureus* apresentou resultado mais significativo frente a ação de inibição do crescimento microbiano (na concentração de 25%), seguido de *Penicillium* sp., *P. miriabilis* foi o menos significativo; *S. pneumoniae*, *E. coli* e *C. albicans* apresentaram médias intermediárias (gráfico 8).

Gráfico 8 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. burserifolia* obtido no período chuvoso na concentração de 25%



Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), foram observados resultados significativos entre as médias dos halos de inibição para *P. miriabilis* e *Penicillium sp.* (gráfico 9) através do teste de Tukey ($p < 0.05$).

Gráfico 9 – Resultado das médias dos halos de inibição microbiana da Concentração Inibitória Mínima.



PC: Período Seco; PS: Período Chuvoso.

Outras pesquisas podem ser citadas como colaboração para averiguação e entendimento de como age os óleos essenciais no combate aos micro-organismos (ARAÚJO et al, 2011; BERTINI, 2005; BURT, 2004; CAL, 2006; COSTA, 2009; COX; MANN; MARKHAM, 2001; CUNHA et al, 2004; DI PASQUA et al., 2006; DOMINGUES et al., 2007; NASCIMENTO et al, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2008; SANTOS, 2005; SILVA et al, 2011; SILVA, 2011; SOUZA, et al., 2013; TEPE, et al., 2005; VIOLANTE, et al., 2012).

Segundo estudos realizados por Leite et al. (2007); Maróstica Júnior; Pastore (2007), o óleo essencial de *T. burserifolia* apresentou em seus constituintes químicos, componentes que agem contra a proliferação de micro-organismos patológicos à saúde humana (β -pineno, α -pineno, limoneno).

Pelo fato de ser uma espécie ainda pouco estudada, a pesquisa sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. burserifolia*, merece um estudo mais detalhado, para averiguar a ação individual ou sinérgica de seus constituintes químicos nos micro-organismos ou para realizar outros testes como por exemplo a verificação de ação antitumoral. O OE de *T. burserifolia* parece ter um futuro bem promissor se for pesquisado com o auxílio de novas tecnologias.

5 CONCLUSÕES

Os constituintes majoritários identificados no óleo essencial de *T. burserifolia* foram α -pineno, δ -3-careno e limoneno, os quais são considerados importantes para biotecnologia;

O óleo essencial de *T. burserifolia* não apresenta atividade antioxidante;

O período de obtenção do óleo essencial influenciou os resultados do teste de toxicidade, sendo mais eficiente aqueles obtidos no período chuvoso ocorrendo atividade tóxica na ordem direta das concentrações;

O óleo essencial obtido no período seco apresentou atividade antimicrobiana somente para *P. mirabilis* e *Penicillium* sp., enquanto que o óleo essencial obtido no período chuvoso apresentou atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos testados;

Os períodos seco e chuvoso do óleo essencial influenciaram diferentemente para a MIC frente aos micro-organismos;

O óleo essencial de *T. burserifolia* possui constituintes químicos de interesse biotecnológico, e atividade antimicrobiana confirmada para os micro-organismos testados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4. ed. USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v.15, n.3, p. 215-220, jul./set. 2005.

AIEMSAAD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus*. **Research in Veterinary Science**, Londres, v.91, n. 3, p. 31-37, dez. 2011.

ALMEIDA, D. A. et al. Erodibilidade do solo e erosividade da chuva na Serra do Tepequém: Roraima. **Revista Acta Geográfica**, Boa Vista, v. 3, n. 6, p. 39-46, jun./dez. 2009.

ALVES, G. E. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p.1224-1229, s./m. 2008.

ALVIM, N. A. T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v.14, n.3, p. 23-31, maio/jun. 2006.

AMARAL, M.F.Z.J.; BORA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.l.], v.2, n.2, p.5-8, s/m. 2005.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência. Agrônômica.**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.

ARAÚJO, F. M. et al, Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana* C. Müller (Papilionoideae-Leguminosae). **Journal of The Brazilian. Chemical. Society**. São Paulo, v.20, n.10, p. 1805-1810, s/m. 2009.

ARAÚJO, D. A. O. V. et al. Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 721-729, jul./ago. 2011.

AVATO, P. et al. Glandular hair and essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, [S.l.], v. 169, n. 1, p. 29-36, s./m. 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina moderna**. 12. ed. São Paulo: MVP, 2002. 915 p.

BALBINOT, S.; VALASQUEZ, P. G.; DUSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro – Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 632-638, s/m. 2013.

BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants people and culture. the science of ethnobotany**. New York: Scientific American Library, 1997. 229 p.

BARBOSA, R. I. Um tepui no ritmo da destruição em Roraima. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 81, p. 94-96, s/m. 1992.

BERTINI, L. M. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, s/m. 2005.

BISPO JUNIOR, W. et. al. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 3-10, jan./jun. 2012.

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

BONONI, V. L. R.; FIDALGO, O. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. 62 p.

BOTELHO, J. B. **História da medicina**. 3. ed. Manaus: Valer, 2013. 358 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zurique, v. 28, n.1, p. 25-30, s/m. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 123 da Secretaria de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a regulamentação de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 out. 1994.

BRASIL. Decreto n. 4339, de 22 de agosto de 2002. Institui princípios e diretrizes para a implementação da Política nacional de Biodiversidade. **Lex: MEDAUAR, O.** (Ed.) Coletânea de Legislação de Direito ambiental. 3. ed. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2006.

BROINIZI, P. R. B. et al. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p.773-781, out./dez. 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from oils and tropical vehicles. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 311-316, mar. 2006.

CAMARGO, J. E. R. et al. Efectos citotoxicos in vitro de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanos **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 588-593, ago./set. 2010.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 362-367, jun. 2008.

CARVALHO, J.S. B. et al. Uso popular das plantas medicinais na comunidade da várzea, Garanhuns-PE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.13, n. 2, p. 58-65, s/m. 2013.

CASTRO, D. P. et al. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, s/m. 2006.

CASTRO, J. P. et al., Characterization of woods known as pau-de-escora marketed in the city of Manaus, Amazonas. **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 557-563, out./dez. 2012.

CERQUEIRA, M. D. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 5, p.998-1003, s./m. 2007.

COMTRADE. Óleo essencial. Disponível em: <http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_I1Code%3a34>. Acesso em: 27 abr. 2013.

CORREA, R. M. et al. The essential oil yield and organoleptic leaves characteristics of “assa-peixe” under various dry methods. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 339-344, mar./abr., 2004.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, n.3, p.710-714, jul./set. 2009

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n.3, p. 492–497, set.. 2001.

COZZI, R. et al. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, London, v. 18, n. 1, p. 223-228, s/m. 1997.

CUNHA, R. M. et al. Cardiovascular effects induced in rats by the essential oil of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Biologia Geral Experimental**, Sergipe, v. 1, n. 5, p. 12-18, s/m. 2004.

DALY, D. C. Studies in neotropical Burseraceae. II. Generic limits in New World Protieae and Canarieae. **Brittonia**, New York, v. 2, n. 41, p. 17-27, s/m. 1989.

DALY, D. C. Notes on *Trattinnickia*, including a synopsis in eastern Brazil's Atlantic forest complex. Studies in neotropical Burseraceae. **Kew Bulletin**, Londres, v. 54, n. 9, p. 129-137, fev.1999.

DALY, D. C. **Burseraceae in lista espécies da flora do Brasil**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbr.gov.br/2012/FB000068>>. Acesso em: 10 maio 2013.

DEANS, S. G.; WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops**: their biology, biochemistry and production. Londres: John Willey & Sons, 1993. 185 p.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 36, n. 3-4, p. 227-245, out./dez. 1995.

DIAS, C. S. et al. Análise por CG-EM e atividade moluscicida do óleo essencial das folhas de *Ocotea gadneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 29, 2005, Recife. **Reunião...** Recife, Pernambuco, 2005.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced. **Journal Agricultural Food Chemistry**, London, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, abr. 2006.

DOMINGUES, A. E. et al. Phytochemical study and evaluation of toxicity against *Artemia salina* and antimicrobial activity of *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.1, p.23-27, jan./mar. 2010.

FERREIRA, M. S. C.; FONTELES, M. C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* (capim limão), **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, s/m. 1989.

FIGUEIREDO, R. O.; DELACHIAVE, M. E. A.; MING, L. C. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.3, p.31-35, s/m. 2006.

FUENTES, A. F. **Identidade taxonómica y aspactos sobre la historia natural y usos del copal de losynuncas em Bolivia**. 2. ed. Bolívia: Kempffiana, 2009. 104 p.

GARCIA-RODRIGUES, A. et al. Toxicidade por *Microcystis* sp. em Goiás: Estudo dos efeitos tóxicos em camundongos e *Artemia salina*. **Estudos**, Goiânia, v. 31, n. 9, p.1595-1606, s/m. 2004.

GARCÍA-GARCÍA, R, et al. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, California, v. 76, n. 2, p. 95-100, s/m. 2011.

GENTRY, H. A. **A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous**. Washington: Elsevier 1993. 894 p.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.l.], v.6, n.1, p. 8-14, s/m. 2003.

GONÇALVES, G. G.; MANCINELLI, R. C.; MORAIS, L. A. S. Influência do horário de corte no rendimento de óleo essencial de alfavaquinha e alecrim. **Horticultura Brasileira**, [S.l.], v. 27, n. 2, p.108-112, agosto. 2009.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R. et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 10, n. 8, p. 3400-19, s/m. 2009.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Potential interligation of Brazilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 196-215, s/m. 1980.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g3125722r4132346/>>. Acesso em 13 de jun. 2014.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**: history, origin in plants production and analysis. 4. ed. New York: Van Nostrand, 1977. 620 p.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 42, n.2, p. 464-472, s/m. 2011.

GUINOISEAU, E. et al. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.l.], v. 29, n. 7, p. 873-879, s/m. 2010.

GUSTAFSON, J. E. Effects of tea tree oil essential on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, s/m. 1998

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos por métodos laboratoriais**. 18. ed. São Paulo: Manole, 1995. 816 p.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 446 p.

HUANG, D. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, fev. 2005.

HUFF, G. F. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 1999. 821 p.

INTRACEN. ÓLEO essencial. Disponível em: <[http://www.intracen.org/tradstat/sitc3-3d/ip551 .htm](http://www.intracen.org/tradstat/sitc3-3d/ip551.htm)>. Acesso em: 27 abr. 2013.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 45-66, jan./ fev. 2006.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobials activities of essential oils. **Pharmacy Week Science**, [S.l.], v. 2, n. 9, p. 193-197, s/m. 1987.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia médica**. 24. ed. Rio de Janeiro: Paginarium, 2009. 820 p.

KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae. In: WALTERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (Ed.). **Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales**. 2. ed. London: Academic Press, 1983. p.281-297.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

KOYAMA, S. et al. New substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso-hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacol: The Vascular System**, [S.l.], v. 28, n.5; p.797-804, maio. 1997.

KNEUGER, M. R. O. et al. Influência do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na cicatrização de alveolite dental infectada: um estudo histológico em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p.349-355, jul./set. 2007.

KUBO, I., et al. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v.41, n.1, p.107-111, s/m. 1993.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de microbiologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LANGENHEIM, J. H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany**. 2. ed. Cambridge: Timber, 2003. 586 p.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 60-65, s/m. 2003.

LEITE, A. M. et al. Inibitory effect of β -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n.1, p.121-126, jan./mar. 2007.

LEWAN, L. et al. Use of *Artemia salina* in toxicity testing. **AGRIS**, [S.I.], v. 20, n. 2, p. 297-30, s/m.1992.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr./jun. 2006.

LIMA, M. P. et al. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodeshopkinsii*: Chemosystematic Implications **Journal of The Brazilian Chemical Society**,[S.I.], v. 15, n. 3, p. 385-394, s/m. 2004.

LIMA, S. C. S. et al. Representações e usos de plantas medicinais por homens idosos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 8-16, jul./ago. 2012.

LIMA, A. J. N. et al. Biomass stock and structural analysis of a secondary forest in Manaus (AM) region, ten years after clear cutting followed by fire **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 1, p.49-54, s/m. 2007.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 88-96, mar. 2001.

MALLAVARAPU, G. R.; RAMESH, S. Composition of essential oils of nutmeg and mace. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, India, v. 20, n. 3, p 746-748, s/m. 2000.

MARCO, C. A. et al. Influence of spacing, cut height and harvest time on biomass yield and essential oil content of citronella grass. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.37, n.1, p.32-36, s/m. 2006.

MARQUES, M. F. S.; RIBEIRO, M. N. S. Estudo dos constituintes químicos das cascas da madeira *Trattinnickia peruviana*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 24, n. 1/2, p. 49-52, s/m. 1994.

MARQUES-SOUZA, A. C.; KERR, W. E. Mel amargo de breu (*Protium* sp., Burseraceae). **ACTA AMAZONICA**, Manaus, v.33, n.2, p. 339-340, março. 2003.

MARQUESI, D. D. et al. Composição química do óleo essencial de duas subespécies do *Protium heptaphyllum*, **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, p.227-230, mar. 2010.

MARIOTTI, K. C. et al. Chemical constituents and pharmacological profile of *Gunnera manicata* L. extracts **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 147-154, jan./mar. 2014.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 382-387, s./m. 2007.

MARQUES, M. F. S.; RIBEIRO, M. N. S. Estudo dos constituintes químicos da casca da madeira de *Trattinnickia peruviana*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 24, n. 1/2, p. 49-52, s/m. 1994.

MELO, M. F. F.; MACEDO, S. T.; DALY, D. C. Fruit, seed and seedling morphology of nine species of *Protium* Burm.f. (Burseraceae) from Central Amazonia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p.503-520, jul./set. 2007.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Copenhagen, v. 129, n. 3, p. 391-397, s/m. 2010.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects and acute toxicity of the aqueous extract of *costus Spicatus* leaves (zingiberaceae). **Biologia Gera e Experimental**, Sergipe, v.1, n. 7, p.9-13, set. 2007.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 315-320, jan./mar. 2009.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos da composição química dos óleos essenciais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 27, 2009, Jaguariúna. **Anais...** Jaguariúna: Embrapa, 2009.

MOURA, F. M. L. Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – Uma revisão **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v.7, n.2, p.125-136, s/m. 2013.

NAKAHARA, K. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). **Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v.37, n.4, p. 249–252, jul. 2003.

NASCIMENTO, F. A.; TAVARES JÚNIOR, S. S.; BEZERRA NETA, L. C. Estudo dos compartimentos geomorfológicos na serra do Tepequém – RR, através de fotointerpretação em imagens de sensores remotos e produtos integrados via IHS. **Revista Geonorte**, Manaus, v. 2, n. 4, p.1464-1474, s/m. 2012.

NASCIMENTO, F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR LABORATORY STANDARDS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**. 8. ed. M2-A8, 2003.

NEDER, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138 p.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 4, p. 519-523, Abr. 2007.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, São Paulo, v. 21, n.21, p. 36-38, fev./mar. 2006.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, [S.l.], v.16, n. 1, p. 32-40, s/m. 2014.

OLIVEIRA, K. M. et al. Interações teciduais agudas induzidas em ratos Wistar por *Tripanosoma cruzi*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 86-94, s/m. 2007.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 21-34, s/m. 2004.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.l.], v.13, n.1, p.8-16, s/m. 2011.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340 p.

OTTOBELLI, I. et al. Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (Fabaceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 393-400, s/m. 2011.

PEREIRA, A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, N. F. et al. Novel santalene sesquiterpenoids from stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n.4, p. 512-516, jul./aug. 2003.

PETERS, E. C. et al. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 12-40, s/m. 1997.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 789-802, s/m. 2006.

PONTES, W. J. T. et al. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial das folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 1, p. 103-110, s/m. 2007.

PREVIATI, R. et al. Isolamento e quantificação das populações de bactérias em geral e de Actinomicetos presentes no solo. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 155-160, jul./dez. 2012.

QUIU, J. et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **Plos One**, v. 6, n. 1, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016160>>. Acesso em: 10 maio 2014.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausenadentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, n. 13, p. 107-109, 2010. Disponível em: <http://resolver.scholarsportal.info/resolve/12268615/v13i0002/107_ccalaocvac>. Acesso em: 28 abr. 2013.

RASOOLI, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, [S.l.], v.17, n.5, p.359-364, s/m. 2006.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA- DFID, 1999. 800 p.

RODRIGUES, A. G. et al. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. **Estudos**, Goiania, v. 36, n. 5/6, p. 795-808, maio/jun. 2009.

RODRIGUES, T.S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.587-590, s/m. 2011.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./mar. s/m. 2007.

RORAIMA. Secretaria de Planejamento. **Informações turísticas**. Boa Vista: SEPLAN, 2012.

ROWE, D. J. **Chemistry and technology of flavors and fragrances**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005. 336 p.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects on rats induced by the total alkaloid fraction of *Sida cordifolia*. **Biologia Geral e Experimental**, Sergipe, v. 5, n. 2, p. 5-9, s/m. 2005.

SANTOS, S. N. et al. **Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura do radical livre DPPH**. Jaguariúna: Embrapa, 2011. (Comunicado Técnico; 50). 5 p.

SEARS, C. The easy way to sell drugs. **New Scientist**, New York, v. 8, n. 73, p. 37-45, nov. 1995.

SHADOMYS, S. A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. **Manual of clinical microbiology**. 3. Washington: American Society for Microbiology, 1980. p. 647-653.

SEIXAS, P. T. L. et al., Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus*L.) e do composto citronela. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.523-526, s/m. 2011.

SHER, R. et al. Avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae) em ratos wistar. **Biologia Geral e Experimental**, Sergipe, v. 3, n. 2, p. 5-8, s/m. 2003.

SIANI, A. C. et al. Chemical composition of South American Burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. **Phytochemical Analysis**, [S.l.], v. 23, n.5, p.529-539, set/out. 2012.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, jun. 1995.

SILVA, F. et al. Coriander (*Coriandrum sativum*L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, ago. 2011. Disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/early/2011/08/23/jmm.0.034157-0>>. Acesso em: 20 maio 2014.

SILVA, N. C. C. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from plants. **Natural Product Research**, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.564582>>. Acesso em: 20 maio 2014.

SILVA, A.F. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.l.], v. 6, n.1, p.1-7, s/m. 2003.

SILVA, M. A. et al. Essential oil from Brazilian red pepper as an additive in broiler diet. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n. 4, p. 676-681, abr. 2011.

SILVA, N. C. B. et al. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II- Bahia, Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 11, n. 5, p. 435-453, set. 2012.

SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 700-705, out./nov. 2010.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004459672008000100012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 maio 2013.

SILVA, A. R. **Tudo sobre aromaterapia**. São Paulo: Roca, 1998. 624 p.

SILVA, A. M. O. et al. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Bauhinia cheilantha* (bong.) steud. (leguminosae: caesalpinioideae). **Biologia Geral e Experimental**, Sergipe, v. 5, n. 2, p. 10-15, s/m. 2005.

SIMAS, k. N. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, [S.l.], v. 27, n.1, p. 46-49, jul. 2004.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. p. 262-268.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2008. 1184 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jan. 2007.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**., São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, s/m. 2006.

SOUZA, C. A. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Tagetes Minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 1-9, dez. 2000.

SOUZA, S. P. et al. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n. 4, p. 456-466, s/m. 2011.

SOUZA, C. P. M. et al. Utilização de Plantas Mediciniais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande–Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 188-193, s/m. 2013.

STRATTON, C. W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. *Antimicrobics and Infectious Diseases. Newsletter*, Nashville, v. 18, n. 8, p. 57-64. abr./ago. 2000.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2005.

TEPE, B., et al.. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, May. 2005.

TEXEIRA, E. N. M. et al. Óleo essencial de erva-doce na ração de frangos de corte alojados em cama nova e reciclada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecologia*, Belo Horizonte v. 65, n. 3, p.874-884, jun. 2013.

TOIGO, L. et al. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 85, n. 2, p. 49-55, s/m. 2004.

TORRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 14, n. 4, p. 373-380, out./dez. 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 939 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Ateneu, 2008. 760 p.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandulartrichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiology*, Rockville, v. 124, n. 2, p. 655–663, s/m. 2000.

TYRREL, M. H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Food Technology*, Nova York, v. 1, n. 4, p. 68-72, jan. 1990.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.38, n.2, p. 369-380, fev. 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 308-313, abr./jun. 2008.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 384-387, jul./set. 2007.

VILAR, C. J.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. Effects of the aqueous extracts of plants of the Genera *apodanthera* (Cucurbitaceae) and *Jatropha* (Euphorbiaceae) on the lethality of the venom of *Bothrops jararaca* (serpentes, viperidae). **Biologia Geral e Experimental**, Aracajú, v. 2, n. 7, p. 32-39, s/m. 2007.

VILAR, J. C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**, Aracajú, v. 6, n. 1, p. 3-36, s/m. 2005.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, out./dez. 2012.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510001511>>. Acesso em: 10 maio 2013.