



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

REGILDO MAX GOMES MARTINS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Siparuna guianensis AUBLET (SIPARUNACEAE)**

Boa Vista, RR

2016

REGILDO MAX GOMES MARTINS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Siparuna guianensis **AUBLET (SIPARUNACEAE)**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Química Orgânica de Produtos Naturais.

Orientador: Professor Dr. Habel Nasser Rocha da Costa

Co-orientador: Professor Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior.

Boa Vista, RR

2016

REGILDO MAX GOMES MARTINS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Siparuna guianensis **AUBLET (SIPARUNACEAE)**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Química Orgânica de Produtos Naturais. Defendida em 05 de julho de 2016 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Orientador/Departamento de Química - UFRR

Prof. Dr. André Camargo de Oliveira
Departamento de Química – UERR

Profa. Cléria Mendonça de Moraes
Departamento de Química - UERR

BOA VISTA-RR

2016

A Yahweh,
meu querido amigo
que sempre esteve tão perto
mais do que eu pude imaginar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que tem sido e sempre será meu maior pilar, minha fonte de força e meu companheiro de estrada.

Aos meus pais, Sr. Jesus e Maria Laudicéia, que são o meu porto seguro, meus amigos e sábios conselheiros.

Aos professores: Prof. Dr. Habel Nasser e Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior, pela instrução, ensinamentos valiosos e o precioso tempo investido no objetivo de me ajudarem a alcançar o título de mestre em Química, muito obrigado.

Ao professor Dr. Antônio Alves que contribui significativamente no desenvolvimento dessa pesquisa, grato pelos conselhos e grande apoio.

Aos meus colegas Francisco, Sandra, Andreína, Paulo, Márcia, Cassandra, Diana, Sirley e Gilmar minha caminhada e aprendizado se tornou mais leve e cômico com vocês.

Aos amigos irmãos que escolhi Silvio, Antônio Lisboa, Elizabeth, Emersom, Raimunda Cavalcante, Mario Mancini, Maria Clarisnete, Kely Pinto, por ouvirem minhas lamentações, pelos conselhos e incentivo nos momentos difíceis de cansaço, obrigado!

Aos colegas de Laboratório Pedro, Cris, Graciliano e Ismael que nos momentos complicados sempre me auxiliaram nas extrações e ensaios biológicos.

Aos colegas de trabalho Josimeire, Jacqueline, Francilane, Eliel, Arlete, Erasmo e Francisca pelo apoio e companheirismo de todas as vezes que precisei me ausentar e me substituíram, grato.

Aos senhores Antônio e Dona Lia que gentilmente me ajudaram na busca do objeto deste trabalho, a espécie *Siparuna guianensis* Aublet, vocês tiveram papel fundamental no desenvolvimento desta pesquisa, muito obrigado por sua hospitalidade e bondade!

Um obrigado especial a Maria Cecília, minha querida você foi um anjo que Deus enviou para aliviar meu fardo nos dias de coleta, extração e solidão nas pernoites do laboratório, nunca me esquecerei disso.

As queridas Prof.^a Dra. Jacqueline Takarrachi, Prof.^a Dra. Vannir Ferraz, Amanda e Larissa da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), que me acolheram e não mediram esforços em ajudar em importantes testes desta dissertação, sempre serei grato.

A esta inestimável instituição, Universidade Federal de Roraima, por ter me tornado o profissional que sou hoje.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste projeto, Obrigado!

Os grandes espíritos sempre tiveram
que lutar contra a oposição feroz de
mentes medíocres.
(Albert Einstein)

RESUMO

A planta medicinal negramina (*Siparuna guianensis* Aublet) pertence à família Siparunaceae, é um arbusto monóico, com folhas simples, alongadas elípticas e membranáceas, de margens lisas, com flores unissexuais, e frutos deiscentes. A variação do rendimento de seus óleos essenciais bem como sua composição química pode ser observada em diferentes trabalhos realizados em várias regiões do país em função de sua fenologia e interações com o meio ambiente. Ela também é conhecida como capitú, fedegoso, erva-santa, entre outros. É utilizada principalmente na forma de decoctos e banhos contra resfriados, sinusites, dores no corpo, doenças inflamatórias e “malina”. O objetivo deste trabalho consistiu em coletar e extrair os óleos essenciais das folhas frescas da espécie *Siparuna guianensis* Aublet durante o período chuvoso e seco na região do município do Cantá localizado no norte de Roraima, pertencente à Amazônia, e realizar um estudo sobre as possíveis variações sazonais a respeito da composição química e atividade biológica, cujos óleos foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana, inibição da enzima acetilcolinesterase, captura pelo menos 50% do radical livre estável DPPH e toxicidade frente a *Artemia salina*. Os óleos essenciais extraídos via hidrodestilação obtiveram rendimentos divergentes, os teores do período seco foram superiores aos do período chuvoso. As amostras foram caracterizadas através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas CG-EM. Nas amostras do período chuvoso foram identificados os compostos: iso-shyobunona (21,45%) e shyobunona (19%) e no período seco foram o a iso-shyobunona (16,2%) e o T-muurolol (11,7%). Os valores de inibição média das amostras extraídas no período chuvoso dos óleos essenciais da *S. guianensis* frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (50,81% - 69,84%) esta sendo Gram-positiva, e *Citrobacter freundii* (52,77% - 80,93%) Gram-negativa e no período seco as amostras testadas apresentaram inibições médias acima de 50% para a bactéria *Listeria monocitogenes* de 52,1% a 79,1% e para a bactéria *Citrobacter freundii* de 50,6 a 66,9%, com potencial inibitório mínimo para bactérias Gram positivas e negativas, apresentando potencial biológico referente aos padrões adotados. No teste de acetilcolinesterase, as amostras apresentaram melhores inibições nos meses de junho e julho, 76,57 % e 51,82%, respectivamente, sendo consideradas inibitórias. Os resultados da atividade da enzima acetilcolinesterase das amostras dos óleos essenciais de *S. guianensis* obtiveram percentuais de 56,4 % à 82,5% sendo consideradas inibidores da enzima acetilcolinesterase e potenciais agentes contra o Alzheimer. O teste de atividade antioxidante pela captura do radical livre estável DPPH de uma das amostras óleos essenciais extraídos no período chuvoso e seco não demonstram potencial para serem usados como antioxidante, os percentuais das concentrações testadas foram relativamente baixos. O teste frente à *Artemia salina*, determinou-se um DL50 de 392,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo considerada moderadamente tóxica.

Palavras-Chave: *Siparuna guianensis* Aublet; Amazônia; Iso-shyobunona; Alzheimer; Toxicidade.

ABSTRACT

The neogramina medicinal plant (*Siparuna guianensis* Aublet) belongs to the Siparunaceae family; it is a monoecious shrub with simple leaves, elliptic and elongated membranous, smooth edges, with unisexual flowers and dehiscent fruit. The change in the producement of their essential oils as well as their chemical composition can be observed in different studies conducted in various regions of the country due to its phenology and interactions with the environment. It is also known as capitiú, fedegoso, erva santa, among others. It is mainly used in the form of decoctions and showers against colds, sinusitis, body pain, inflammatory diseases and “malina”. The objective of this study was to collect and extract the essential oils from fresh leaves of the species *Siparuna guianensis* Aublet during the rainy and dry season in the region of Cantá localized on north of Roraima, belong to Amazon, and conduct a study on the possible seasonal variations concerning to the chemical composition and biological activity, whose oils were subjected to antimicrobial activity tests, inhibition of enzyme acetilcolinasterase, capturing stable free radical DPPH and toxicity against *Artemia salina*. Essential oils extracted via hidrodeseñtilation obtained divergent results for the periods, and the proportion of oil extracted in the dry period was higher than the rainy season. The samples were characterized by gas chromatography coupled to a spectrophotometer GC-MS mass. Samples of the rainy season compounds were identified: iso- shyobunona (21,45%) and shyobunona (19%) and in the dry season were the the iso- shyobunona (16,2%) and T- muurolol (11,7%). The average inhibition values of the samples taken during the rainy season of the essential oils of *S. guianensis* on the bacteria *Staphylococcus aureus* (50,81% - 69,84%) is being Gram- positive , and *Citrobacter freundii* (52,77% - 80,93 %) Gram - negative and during the dry period the test samples had average inhibition above 50 % for *Listeria monocytogenes* 52,1% and 79,1% for *Citrobacter freundi* from 50,6% to 66,9%, with potential inhibitory minimum to positive and Gram negative bacteria, with biological potential regarding the adopted standards. In acetylcholinesterase test, the samples showed better inhibitions in June and July, 76.57 % and 51,82%, respectively, considered inhibitory. The results of the enzyme activity acetilcolinasterase of samples of essential oils obtained *S.guianensis* percentage of 56,4% to 82,5% being considered inhibitors acetilcolinasterase enzyme and potential agents against Alzheimer. The test for the antioxidant activity resulted by the capturing of the stable free radical DPPH one of essential oils extracted from samples in wet and dry period does not show the potential to be used as an antioxidant, the percentages of concentrations tested were relatively low. The front testing *Artemia salina*, determined a LD50 392.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ being considered moderately toxic.

Keywords: *Siparuna guianensis* Aublet; Amazon; Iso-shyobunone; Alzheimer; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da ocorrência das espécies do Gênero Siparuna e Glossicalyx.....	18
Figura 2 -	Arbusto da <i>S. guianensis</i> Aublet encontrada na região do Cantá-RR.....	19
Figura 3 -	Flores e frutos maduros da <i>S. guianensis</i> Aublet.....	19
Figura 4 -	Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais	21
Figura 5 -	Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais	22
Figura 6 -	Membranas Plasmáticas de Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	25
Figura 7 -	Mecanismos de ação dos antibióticos sobre as bactérias.....	26
Figura 8 -	Ação da acetilcolina (ACh) na passagem dos impulsos nervosos entre as células neurais.....	30
Figura 9 -	Estrutura do radical livre DPPH•.....	31
Figura 10 -	Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	31
Figura 11 -	Estabilização do radical DPPH• pelo deslocamento do elétron desemparelhado..	32
Figura 12 -	Náuplio do crustáceo <i>Artemia salina</i>	33
Figura 13 -	Folhas frescas de <i>S. guianensis</i> coletadas para extração.....	35
Figura 14 -	Hidrodestilação das folhas frescas de <i>S. guianensis</i>	36
Figura 15 -	Modelo e distribuição das amostras e controles nas placas utilizadas para o teste de sensibilidade antibacteriana.....	39
Figura 16 -	Modelo e distribuição das amostras e controles nas placas utilizadas para o Teste de atividade anticolinesterásica.....	40
Figura 17 -	Estruturas Químicas dos componentes majoritários dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> Aublet (Período Chuvoso).....	45
Figura 18 -	Estruturas Químicas dos componentes majoritários dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> Aublet (Período Seco).....	48
Figura 19 -	Curva de atividade frente á <i>A. salina</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de terpenos quanto ao número de isoprenos.....	22
Tabela 2 -	Codificação das amostras do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	42
Tabela 3 -	Rendimento dos componentes voláteis da <i>Siparuna guianensis</i> Aublet nos períodos de junho de 2015 a janeiro de 2016.....	42
Tabela 4 -	Rendimento dos componentes voláteis dos principais trabalhos realizados sobre a <i>S. guianensis</i> Aublet.....	43
Tabela 5 -	Constituintes químicos identificados nos componentes voláteis da <i>S. guianensis</i> Aublet (Período chuvoso).....	44
Tabelas 6 -	Constituintes químicos identificados óleo essencial de <i>S. guianensis</i> Aublet (Período Seco).....	46
Tabela 7-	Constituintes majoritários voláteis de <i>S. guianensis</i> encontrados na literatura.....	48
Tabela 8 -	Bioensaio de MIC para a avaliação da inibição do crescimento de bactérias.....	49
Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima (IC ₅₀) do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aublet sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	51
Tabela 10 -	Inibição média dos óleos essenciais extraídos nos meses de junho, julho e agosto.....	53
Tabela 11 -	Inibição Média dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> Aublet.....	54
Tabela 12 -	Número de náuplios mortos.....	54
Tabela 13 -	Dados de atividade frente à <i>Artemia salina</i> para <i>S. guianensis</i> Aublet.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
%	Porcentagem
°	Graus
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitro
AA	Atividade Antioxidante
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATCI	Acetylthiocholine iodide
BF ₃	Trifloureto de boro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDCI ₃	Clorofórmio <i>deuterado</i>
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CG-FID	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cm	Centímetro
d	Densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
g	Gramas
$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	Gramas por centímetros cúbicos
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INS	Insaturações por triglicerídeos.
K	Kelvin
Kg	Quilograma

KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
M	Molar
m	Metro
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Milílitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
OH·	Radical hidroxila
ONU	Organização das Nações Unidas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPGQ	Programa de Pós-graduação em Química
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
s	Segundo
ssp	Espécies
UFAM	Universidade Federal de Amazonas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.2.1	Fitoterapia.....	15
1.2.2	Importância da biodiversidade no desenvolvimento de novos fármacos.....	16
1.2.3	Família Siparunaceae.....	17
1.2.4	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	18
1.2.5	Composição química dos óleos essenciais.....	20
1.2.6	Atividade Biológica dos óleos essenciais.....	23
1.2.6.1	Atividade Antimicrobiana.....	23
1.2.6.2	Classificação Gram das Bactérias.....	24
1.2.6.3	Antibióticos: mecanismos de ação e resistência de micro-organismos.....	26
1.2.6.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	28
1.2.7	Doença de Alzheimer.....	29
1.2.8	Atividade antioxidante.....	30
1.2.9	Teste de toxicidade dos óleos essenciais.....	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Geral.....	34
2.2	Específicos.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Material Vegetal.....	35
3.2	Extração dos Óleos Essenciais.....	35
3.3	Composição Química.....	36
3.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM).....	36
3.2	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-FID).....	37
3.4	Avaliação do potencial biológico.....	37
3.4.1	Determinação da atividade antioxidante do óleo da <i>S. guianensis</i> Aublet.....	37
3.4.2	Bioensaio de Concentração Mínima de Inibição (MIC)	38
3.4.3	Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase (ELLMAN).....	39
3.4.5	Determinação da toxidade frente à <i>Artemia Salina</i>	40
3.4.5.1	Metodologia empregada.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Rendimento dos Óleos Essenciais.....	42
4.2	Composição química.....	43
4.3	Teste de atividade Antimicrobiana.....	48
4.3.1	Inibições médias.....	48
4.3.2	Concentração Inibitória Mínima.....	50
4.4	Teste de atividade aceticolinasterasica.....	52
4.5	Teste Antioxidante (DPPH).....	53
4.6	Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	54
5	CONCLUSÕES	56
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7	APÊNDICE	67
8	ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

Para aliviar as dores causadas por enfermidades, o homem há muito tempo tem usado o poder terapêutico das plantas medicinais desde os tempos mais remotos. Existem relatos da prática fitoterapêutica na história de todas as civilizações há mais de 3000 mil anos a.C. (ALVINO et al., 2005). A prática medicinal como prevenção e cura de doenças persiste devido à falta de recursos dos mais diversos povos do mundo e são passados de geração em geração. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para atenção primária, cerca de 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos à saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações para tratamentos de problemas de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta além de possuir a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Este grande potencial torna interessante o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapias apropriadas. Para a produção de novas alternativas terapêuticas devido a esta rica flora é explorado o vasto conhecimento a respeito do uso de plantas medicinais dos vários grupos étnicos brasileiros. Tais conhecimentos são transmitidos para seus descendentes e cultivados para utilização alternativa de cura, uma vez que infelizmente a maior parte da população brasileira, com poucos recursos, muitas vezes não tem acesso aos medicamentos alopáticos (SOUZA; FELFILI, 2006).

Neste contexto, o conhecimento etnobotânico tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos e incentivado pesquisas a respeito do potencial biológico que estas ervas medicinais possuem. Portanto seus constituintes químicos desempenham papel biológico importante como princípios ativos podendo ser utilizados na cura de doenças, inibição de micro-organismos, agentes antioxidantes, antibióticos dentre outros (FOGLIO et al., 2009).

A *Siparuna guianensis* Aublet é apontada por pesquisadores como uma espécie importante para a conservação da região do cerrado brasileiro, pertencente à família Siparunaceae, popularmente conhecida como negramina e capitú é encontrada apenas na América Central e do Sul, possuindo ampla aplicação fitoterápica no combate de doenças inflamatórias, gripe e malina (VALENTINI et al., 2010a).

Na Amazônia *Siparuna guianensis* é conhecida como capitú e é utilizada por índios e ribeirinhos como ansiolítico e sua composição química ainda é pouco conhecida devido a sua

fenologia que pode ser influenciada por fatores externos como interações planta-micro-organismos, planta-animais, planta-planta e diferenças genéticas das populações, podendo ainda estar diretamente ligados às variações sazonais dos componentes voláteis desta espécie, uma vez que diversos trabalhos já realizados no Brasil e em outros países como Panamá revelaram divergências em relação ao teor dos óleos essenciais e a seus constituintes químicos (NEGRI et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi quantificar e qualificar os principais componentes químicos dos óleos essenciais da *S. guianensis*, durante os meses mais intensos dos períodos chuvoso e seco dos indivíduos desta espécie encontrados no município do Cantá-RR, pertencente a Amazônia, e avaliar a importância de estudar a atividade biológica dos óleos vegetais com foco na atividade antimicrobiana, antioxidante, anticolinesterásica e sua citotoxicidade verificando ainda uma possível variação dos resultados, contribuindo para o conhecimento científico desta espécie.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Fitoterapia

Estudos recentes demonstram um número crescente em relação ao uso de remédios fitoterápicos o qual pesquisadores do mundo inteiro têm voltado suas pesquisas para esta área. Nesse campo das pesquisas etnofarmacológicas e etnobotânicas, encontramos países como a China e Índia, as quais têm encontrado meios de legalizar e reconhecer o uso tradicional das plantas. A cultura chinesa utiliza o conhecimento popular das ervas há cinco séculos, com mais de cinco mil espécies utilizadas (FLOGIO et al., 2009).

Harshberger em 1895 apresentou termo etnobotânico pela primeira vez, embora não tenha dado uma definição para a palavra, apontando maneiras pelas quais poderiam ser úteis para à investigação científica (SCHULTES, 1962). A etnobotânica quando aplicada ao estudo de plantas medicinais trabalha em estreita cumplicidade com a etnofarmacologia, que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, os quais são estudados por seres humanos quando são empregados em testes de atividade terapêutica (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Os chineses foram os pioneiros quanto ao estudo e utilização do conhecimento popular sobre as ervas medicinais. Destaca-se em sua história o Shen-Nong, reconhecido como o fundador da medicina chinesa, pois a ele são atribuídas as virtudes da descoberta das plantas medicinais e a capacidade de experimentar venenos, estabelecendo a arte de criar a medicina sobre as ervas medicinais. No entanto, desde as mais antigas civilizações, as plantas são utilizadas como fitoterápicos (CALDERON et al., 2010)

É cada vez mais evidente o uso de plantas medicinais das medicinas tradicionais indú e chinesa, completamente desconhecidas dos povos ocidentais (VEIGA JR; PINTO, 2005). Ao longo do tempo têm sido registrados vários procedimentos clínicos tradicionais nos quais, são utilizadas plantas medicinais. Vale lembrar que o conhecimento popular passado de geração para geração, simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No Brasil não tem sido diferente, pois é comum essa prática dentro das comunidades brasileiras e localidades afastadas de atendimentos básicos de saúde. Esse conhecimento em relação ao uso de plantas medicinais tem chegado as capitais e estabelecendo até pontos comerciais (VEIGA JR et al., 2002).

1.2.2 Importância da biodiversidade no desenvolvimento de novos fármacos

Muitos ecossistemas encontrados no planeta possuem um número maior de seres vivos em relação a outros e quanto maior for esse número, mais biodiverso é determinado ambiente. Os biosistemas que possuem uma grande biodiversidade são as florestas tropicais subdivididas em neotrópicas (América Central e Sul), africanas (África Ocidental e Madagascar Oriental) e Indo-Malaia (Costa Oriental da Índia, Assam, Sudeste da Ásia, Nova Guiné e Queensland na Austrália) (MARTINS, 2006). As florestas tropicais localizadas nas Americas são mais ricas em fauna e flora que as florestas africanas e asiáticas (CALDERON et al., 2010). A pesquisa científica aponta a Amazônia como o ecossistema mais biodiverso do mundo, possui uma área de aproximadamente 665 milhões de hectares e detentor de uma flora riquíssima na qual tem contribuído para o desenvolvimento de muitos estudos e novas alternativas terapêuticas pela indústria farmacêutica (FOGLIO et al., 2009).

A mega biodiversidade amazônica contribui significativamente no desenvolvimento de novas terapias alternativas devido ao crescimento e fomentação de novas pesquisas, com o passar dos anos novas moléculas e princípios ativos são descobertos e utilizados na indústria farmacêutica. A medicina tradicional construída pelo conhecimento popular que foi transmitido através das gerações passadas, originária das antigas civilizações e também uma prática utilizada pelos indígenas como principal meio de tratamento de doenças corriqueiras como inflamações até as mais complexas como até mesmo o câncer, torna-se uma fonte de informações de trabalhos científicos que foram, estão e serão desenvolvidos (CALDERON et al., 2010). Atualmente, existem algumas farmácias comunitárias espalhadas por todo o Brasil que realizam venda de produtos fitoterápicos. Devido à comercialização de tais produtos fitoterápicos, ao uso correto e a fabricação do produto de forma adequada que surgiu uma legislação, tendo em vista a existência desse comércio. A legislação em vigor no país entende-se como fitoterápico “aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais”. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2010).

A presença de compostos biologicamente ativos presentes nas plantas medicinais proporcionam uma fonte inesgotável de novos compostos que podem ser utilizados no tratamento de diversas enfermidades e o fomento de novas pesquisas científicas são de vital importância para o surgimento de alternativas terapêuticas mais viáveis a população mundial,

uma vez que 80% da mesma dependem de medicamentos tradicionais como fonte primária ou até mesmo única de saúde. Um exemplo clássico do uso popular em trabalhos científicos é o estudo da erva medicinal papoula (*Papaver somniferum* L.) pertencente à família Papaveraceae, na qual a planta é usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina, princípio ativo empregado para combater a dor desde 1803 (FOGLIO et al., 2009). Muitos outros compostos importantes foram descobertos e sintetizados de origem vegetal como a digoxina e taxol assim como os medicamentos fitoterápicos a base de extratos de grande circulação popular: *Panax ginseng*, *Valeriana officinalis* e *Ginkgo biloba*. Há ainda os medicamentos tradicionais de origem animal recentemente descobertos: *Pelargonium sidoides*, *Hedera helix*, *Petasites hybridus*, entre outros (MARQUES; SOUZA, 2012).

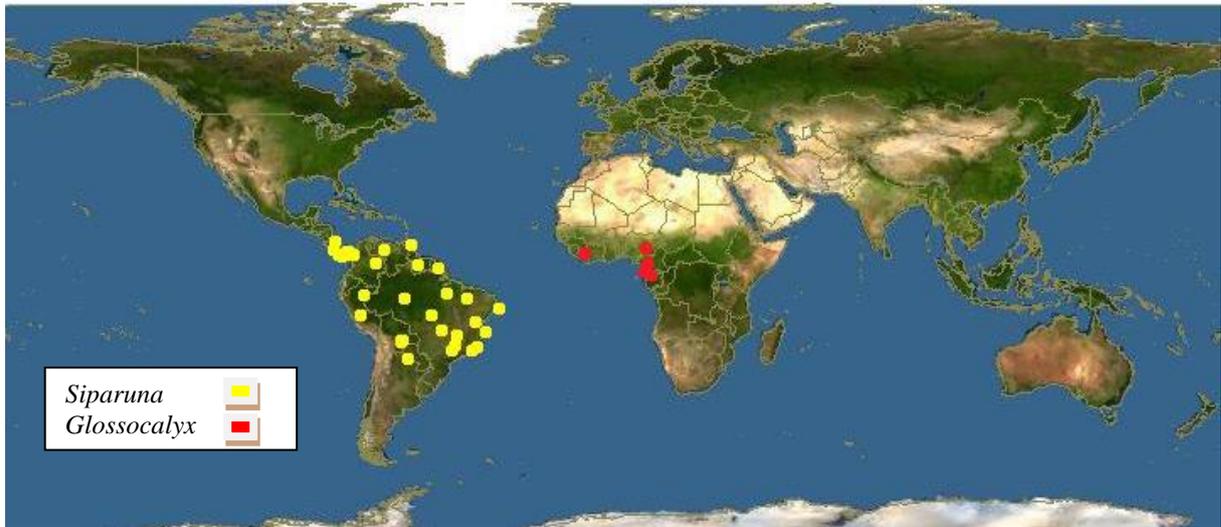
1.2.3 Família Siparunaceae

A família Siparunaceae, segundo a taxionomia, ocorre em dois continentes distintos: a América, sendo esta apenas nas partes sul e latina, e na África sob dois gêneros específicos: Siparuna e Glossocalyx conforme mostra a Figura 1. (VALENTINI et al., 2010a). O gênero Glossocalyx é monoespecífico ocorrendo apenas no oeste da África e o gênero Siparuna é nativo da América Latina, desde a Nicarágua até o Paraguai, possuindo cerca de 90 espécies (APÊNDICE A) identificadas nos neotrópicos, e na maior parte nos Andes podendo ser encontradas em várias regiões do Brasil (REBOUÇAS, 1984).

Os estudos mostram que o gênero Siparuna era erroneamente atribuído a subdivisão da família Monimiaceae, onde Jussieu em 1809 denominou esse termo em alusão ao gênero Monímia de Trouars considerando gênero e tipo o qual homenageou a esposa de Matridades chamada Monímia (FREIRE, 1943).

Fischer (1997), assim como outros autores, também correlacionou o gênero Siparuna à família Monimiaceae Jussieu, porém pesquisas atuais mostram que na realidade o gênero Siparuna pertence de fato à família Siparunaceae. As espécies das Famílias Monimiaceae e Siparunaceae podem ser facilmente diferenciadas pelo modo de placentação. Os arbustos dos indivíduos da família Siparunaceae são eretos e os da Monimiaceae são pêndulos (MONTANARI, 2010). O sistema APG II (Grupo para a Filogenia das Angiospermas), de 2003, segregou o gênero Siparuna Aublet, reconhecendo-o como pertencente à família Siparunaceae (VALENTINI et al., 2010a).

Figura1 - Mapa da Ocorrência das espécies do Gênero Siparuna e Glossocalyx



Fonte: adaptado de www.discoverlife.org.

No Brasil 32 espécies do gênero Siparuna, inclusive a *S. guianensis*, são encontradas em todos os biomas brasileiros, 21 são exclusivas da Amazônia, 27 ocorrem no Sudeste e 2 na Bahia, podendo ser encontradas nas bordas das florestas distribuídos no Apêndice A (FISCHER, 2005).

1.2.4 *Siparuna guianensis* Aublet

Uma espécie destacada da família Siparunaceae é a *Siparuna guianensis* Aublet devido a sua incidência em todo território brasileiro e a sua fenologia marcante, motivo pelo qual há uma grande variação no rendimento dos seus óleos essenciais e composição química, podendo apresentar substâncias distintas em cada região onde é encontrada bem como sua importância prioritária na conservação do cerrado brasileiro e o encorajamento de mais pesquisas sobre esta espécie para o enriquecimento sobre seu conhecimento, pois é apontada pelos estudiosos como espécie genética de preservação do cerrado mato-grossense (VALENTINI et al., 2010a).

A espécie *Siparuna guianensis* Aublet possui diferentes nomes populares como capitú no Pará (RODRIGUES et al., 2008); negramina no Mato-Grosso e Goiás (VALENTINI et al., 2010a); no cerrado de Minas Gerais além de negramina também é conhecida como folha santa (HERRMANN et al., 1998); no Paraná é conhecida como limão-bravo e cicatrizante-das-guianas (FURTADO, 2006); em Brasília é chamada também de limão-bravo e erva-santa (PEREIRA; SILVA, 2008); em Pernambuco os populares a identificam como jaqueira e catingueira-de-paca (COSTA JR. et al., 2007). No interior de São Paulo, é chamada amescla-de-cheiro e mata-cachorro (CIELOFILHO; SANTIN, 2002); no município do Cantá-RR, é do

mesmo modo conhecida como negramina, entre outros.

A planta *Siparuna guianensis* foi à primeira espécie do gênero *Siparuna* catalogada por Aublet na *Histoire des plantes de La Guiane Française* (1775). Suas características gerais são: arbusto ereto ou arvoreta de 3-5 m de altura (Figura 2).

Figura 2 – Arbusto da *Siparuna guianensis* Aublet na região do Cantá-RR



Fonte: Autor.

As cascas dessas arvoretas quando jovens são esverdeadas e quando mais velhas ficam acinzentadas, aromáticas, com râmulos jovens rufo-pubescentes, nativa de quase todo Brasil com folhas simples, alongadas a elípticas, membranáceas, de margens lisas, com flores unissexuais, e frutos elipsoides deiscentes verdes quando jovens e vinho quando maduro, quando abrem expõem um interior róseo-avermelhado com sementes afixadas mostradas na Figura 3. Multiplicam-se apenas por sementes (LORENZI, 2002; MONTANARI, 2010).

Figura 3 – Flores e frutos maduros da *Siparuna guianensis* Aublet



Fonte: Valentini et al., 2010a.

Trata-se de uma planta medicinal e aromática. Esta espécie é utilizada nos neotrópicos, com indicações etnobotânicas muito abrangentes e que vem sendo apontada por estudiosos como uma espécie prioritária de conservação para este bioma (ALVES; VIEIRA, 2003). Segundo relatos registrados por meio de pesquisas com moradores da comunidade ribeirinha do Coxipó do Ouro, as folhas desta planta são utilizadas em banho para dores no corpo (SOUZA, 1992). Já no Alto Coité, em Poxoréo, as pessoas usam um semonte (folhas secas junto ao fogo, moídas e misturadas ao fumo ou puras, para cheirar e uso tópico) para curar malina, a qual é descrita como um tipo de dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol que provoca corrimento de sangue nasal (SOMAVILLA, 1998).

Dentro do Vale do Aricá, município de Cuiabá, as folhas são utilizadas na forma de chá e banhos para fraqueza e também para malina (PASA, 1999), e na Aldeia Pakueran, em Paranatinga, as folhas são fervidas, e utilizadas em banho para febre e “quentura” na cabeça, espécie de enxaqueca (SCHIMOLLER, 1997). Em Nova Xavantina, o sumo de suas folhas com mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) é relatado como medicinal para pós-operatório, suas folhas são utilizadas como repelentes nos galinheiros para piolho de galinha, e também é utilizado em rituais espirituais (DUARTE, 2001).

Existem relatos em pesquisa sobre as indicações de raizeiros, que recomendam o uso da folha na forma de decocto e infuso para enxaquecas, resfriado, e banho de descarrego para mau olhado, podendo para isso ser associada à quina, assim como para hipertermia e hemoptise (FONTELLE, 1997).

1.2.5 Composição química dos óleos essenciais

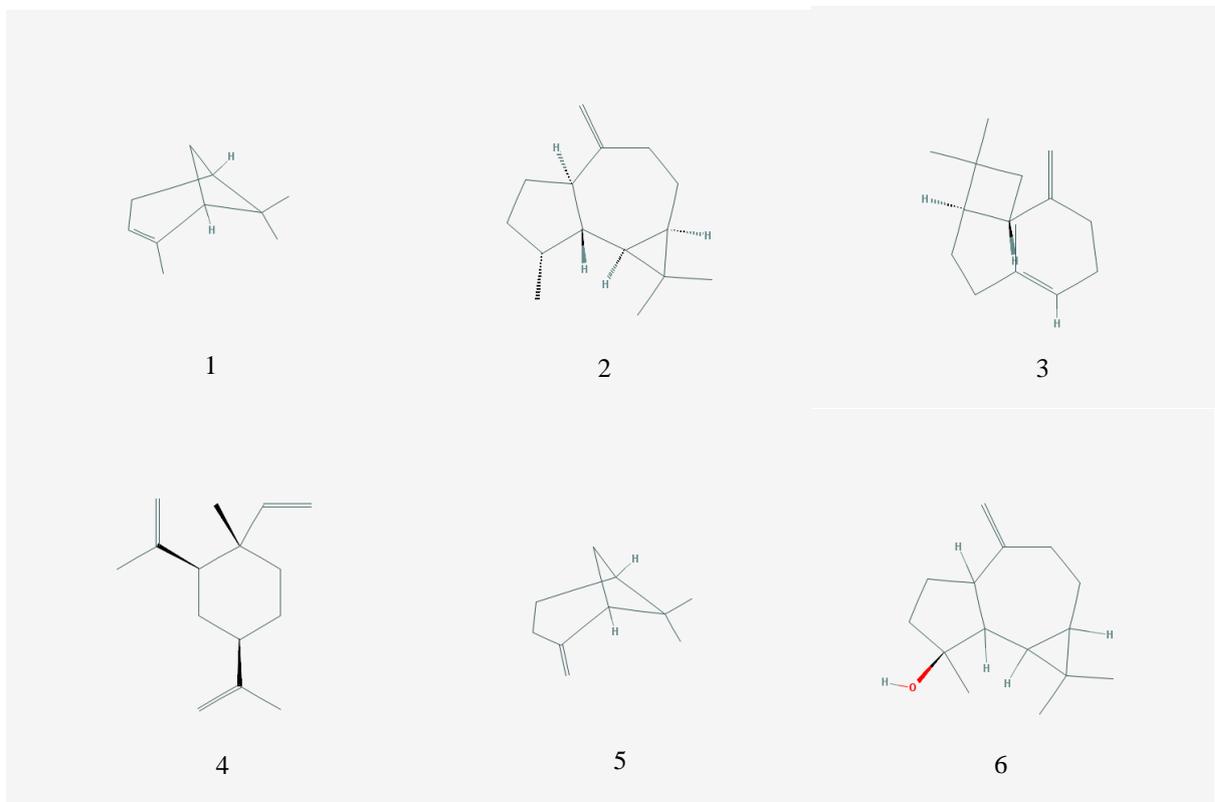
Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. São constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, dentre elas os fenilpropanóides e terpenóides, pertencentes ao metabolismo secundário das plantas (MORAIS, 2009).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários, os quais são fundamentais na matéria-viva, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo e, secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, podendo ser interpretados como a interface química entre o organismo e os outros seres vivos (ARAÚJO, 2011 apud BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001, p. 68). O metabolismo secundário por sua vez pode ser influenciado por fatores genéticos, fenológicos,

edáficos e ainda interações da planta e o meio ambiente com a finalidade de manutenção da planta e adaptação garantindo assim sua sobrevivência (MORAIS, 2009).

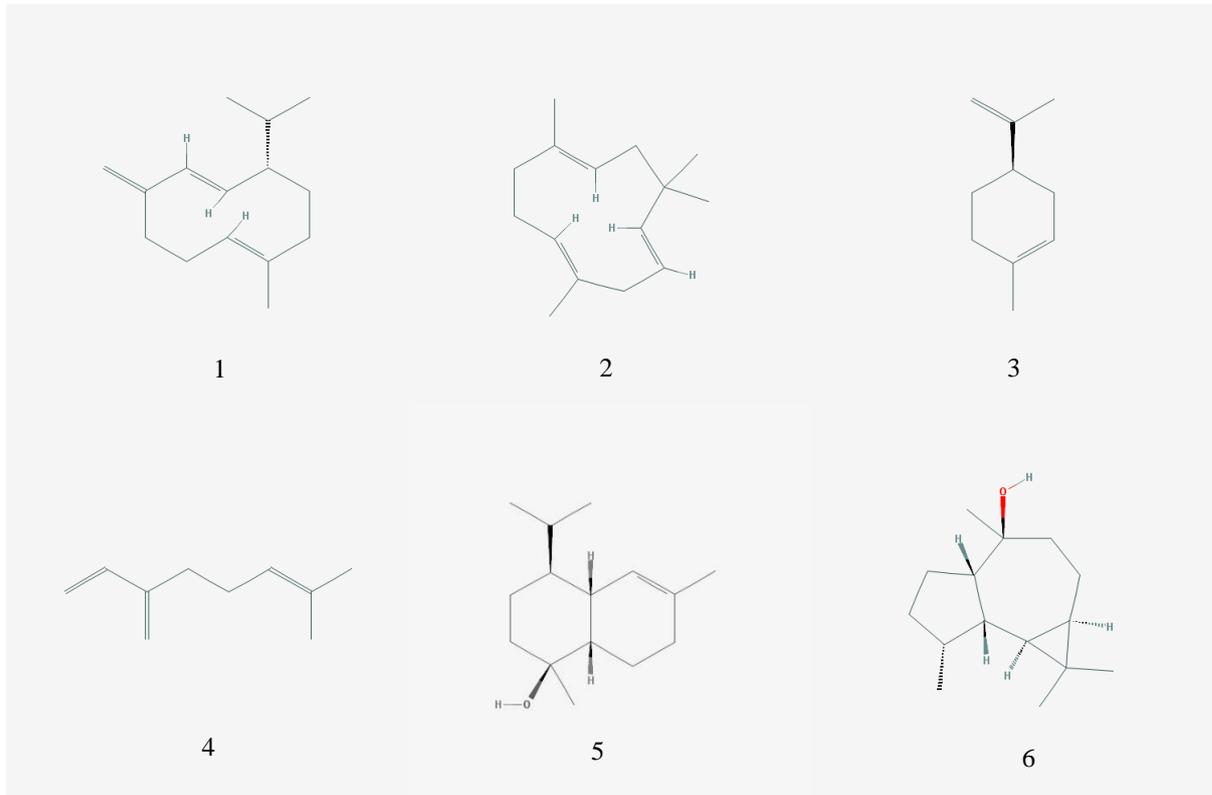
Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos majoritariamente por moléculas de natureza terpênica. Frequentemente apresentam odor agradável e marcante. São inconstantes em temperaturas altas, fator pelo qual é chamado também de composição volátil, apresenta aspecto oleoso e sua coloração em geral é incolor ou amarelada. Possui sabor acido-picante, são instáveis na presença de luz, calor e ar e pouco solúveis em água (LOBO; LOURENÇO, 2007). Os componentes químicos com maiores teores geralmente identificados nos óleos essenciais são uma classe de metabólitos secundários conhecidos como terpenos. Na Figura 4 e 5 estão sumarizados os principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais em geral.

Figura 4 - Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais



Legenda: 1- α -pineno, 2- Aromadendreno, 3 - β - cariofileno, 4 - β - elemeno, 5 - β -pineno, 6 – Espatuleno.

Figura 5 - Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais



Legenda: 1- Germacreno-D, 2 - Humuleno, 3 - Limoneno, 4 - Mirceno, 5 – T - muurolool, 6 – Viridiflorol.

Os terpenos (isoprenóides ou terpenóides) representam o grupo mais antigo de produtos produzidos por vegetais e certamente a classe de metabólitos secundários mais difundidos dos produtos naturais. São hidrocarbonetos de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, são classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas em sua estrutura (metil – buta-1-3-dieno com cinco átomos de carbono) conforme mostra a tabela 1:

Tabela 1 – Classificação de terpenos quanto ao número de isoprenos

Número de Carbonos	Unidades Isoprênicas	Classificação
10	2	Monoterpeno
15	3	Sesquiterpeno
20	4	Diterpeno
25	5	Sesterpeno
30	6	Triterpeno
40	8	Tetraterpeno

Fonte: Bergamaschi, 2016.

Os Mono e sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, enquanto os outros terpenos são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas. São encontradas unidades isoprênicas dentro de estruturas de outras moléculas naturais. Assim, alcalóides

indólicos, várias quinonas (vitamina K, E), vitamina A obtida a partir do β -caroteno, fenóis, álcoois (também conhecidos como terpenóis ou poliprenóis), também contém fragmentos terpênicos. O mais conhecido dos terpenos é o d-limoneno, de base cítrica, presente no suco e casca da laranja, extraído por destilação do óleo da laranja, sendo Brasil, México e EUA os principais produtores (MARIO JR; PASTORE, 2006). Há mais de 1.000 monoterpenos, mais de 7.000 sesquiterpenos e mais de 3.000 diterpenos.

As vias metabólicas secundárias vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenóides e poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas. A maioria desses metabólitos secundários que, ao menos, 12.000 foram isolados e essa quantidade ainda parecem ser inferiores a 10% do total. Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa do vegetal contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros. Algumas substâncias fornecem odor para a planta, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento e muitos compostos são responsáveis pelo sabor da planta (ANDRADE et al., 2013). Os compostos de origem vegetal demonstram uma grande importância na medicina moderna, pois entre 1984 e 1994, dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais e 9% foram desenvolvidos através da modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que serviram como protótipos, sendo que, atualmente metade dos 25 medicamentos de maior utilização no mundo foi originada de metabólitos secundários dos vegetais (ARAÚJO, 2011).

1.2.6 Atividade Biológica dos óleos essenciais

1.2.6.1 Atividade Antimicrobiana

Em geral, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muuroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (ANDRADE, 2013). Apesar dos mecanismos de ação estar incipientemente caracterizados, provavelmente a atividade terapêutica está associado ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (SILVA et al., 2009). As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe também um consenso sobre os

níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

Como as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (AHMAD; BEG, 2001). Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006).

Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001).

1.2.6.2 Classificação Gram das Bactérias

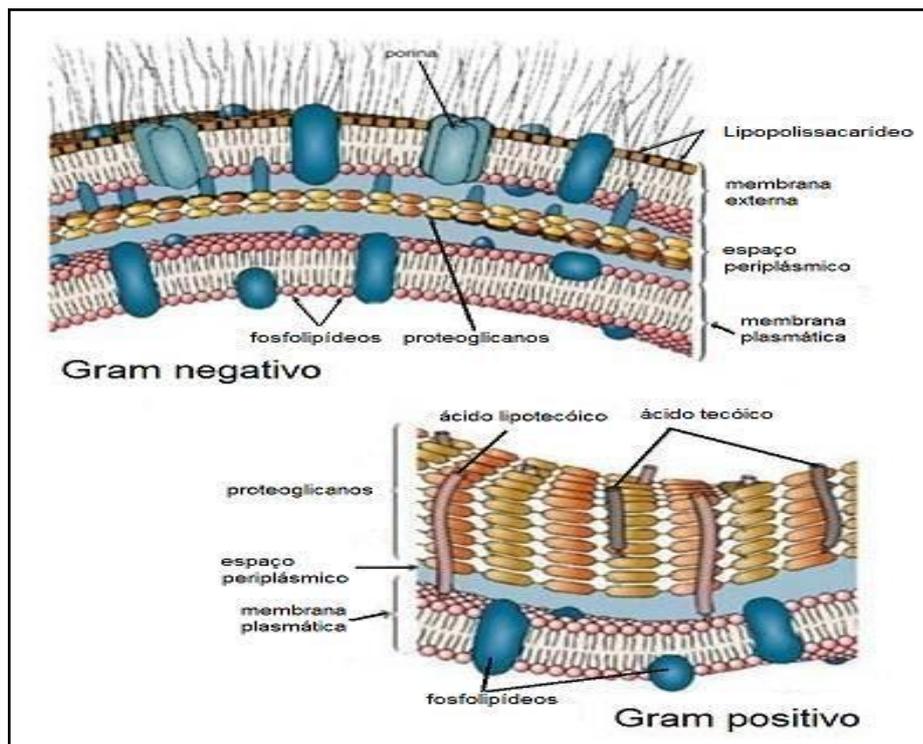
Quanto à estrutura da membrana plasmática das bactérias, podemos classificá-las como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essa classificação Gram possui esse nome por causa de seu inventor o microbiologista dinamarquês Hans Christian Gram o qual desenvolveu uma técnica que consiste na aplicação de uma coloração. As Gram-positivas possuem parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicanos. Quando este tipo bacteriano entra em contato com a coloração de Gram adquirem a cor púrpura ou azul quando fixada com cristal violeta. Isto se explica porque estas bactérias retêm o corante presente nestas substâncias. As Gram-negativas possuem parede celular mais delgada e apresentam uma segunda membrana lipídica, deferente da membrana plasmática. Quando em contato com a coloração Gram o lipídio da membrana mais externa é dissolvido no álcool e libera o primeiro corante, o cristal violeta.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre preferencialmente em relação às bactérias Gram-positivas, sendo as bactérias Gram-negativas sempre mais resistentes. Este fenômeno ocorre pelo fato de as bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa hidrofílica devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeos (Figura 6). Dessa maneira

considera-se que a membrana externa sirva como uma espécie de barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, razão esta que as bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas hidrofóbicas como os óleos essenciais. Porém pequenos solutos hidrofóbicos podem penetrar por essa membrana externa através de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas, justificando a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas apresentadas por compostos voláteis (HELANDER, 1998; ARAÚJO, 2011).

Devido à característica lipofílica dos terpenóides encontrados nos óleos essenciais eles possuem maior afinidade com a membrana interna das bactérias Gram-negativas do que com sua fase aquosa que as envolve (membrana hidrofílica externa), explicando assim a sua expansão, aumentando sua fluidez e alterando a atividade de proteínas que as compõe. Os óleos essenciais tornam essa membrana permeável a compostos que normalmente não são capazes de passar por membranas normais, promovendo a perda de material eletro-denso, alteração na densidade citoplasmática e acoagulação de alguns constituintes do citoplasma. Esses danos levam ao comprometimento das suas funções, o que pode ocasionar a morte da célula bacteriana (ANDRADE, 2013; ARAÚJO, 2011).

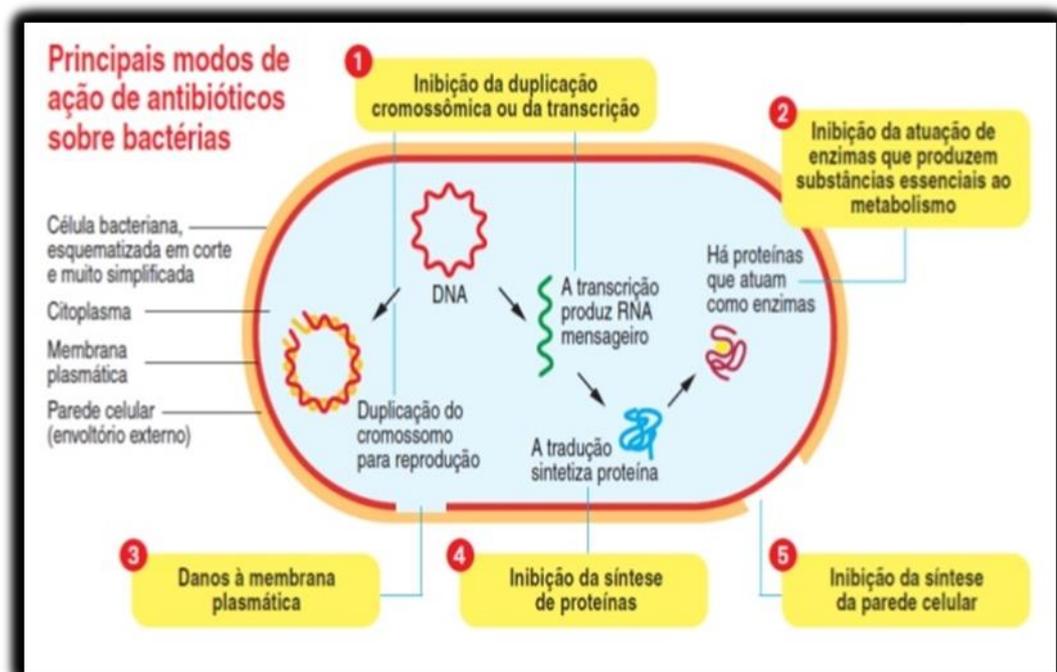
Figura 6 - Membranas Plasmáticas de Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas



1.2.6.3 Antibióticos: mecanismos de ação e resistência de micro-organismos

Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos, actinobactérias e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem micro-organismos (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2010). Esta definição exclui os compostos sintéticos que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados antimicrobianos (GOODMAN et al., 2003). Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade ao paciente (BROOKS et al., 2008; SOFIATI, 2009). Os antibióticos podem agir sobre as bactérias susceptíveis afetando seu crescimento e reprodução, causando um efeito bacteriostático, e/ou induzindo sua morte, causando um efeito bactericida (Figura 7) (FERREIRA, 2007). O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente elucidado, mas, podem ser divididos em cinco categorias: (1) Inibição da duplicação cromossômica; (2) inibição da atuação de enzimas que produzem substâncias essenciais ao metabolismo; (3) danos à membrana plasmática; (4) inibição da síntese de proteínas; (5) inibição da síntese da parede celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2010).

Figura 7 - Mecanismos de ação dos antibióticos sobre as bactérias



Fonte: pt_slideshare_net

As bactérias adotam mecanismos, a fim de sobreviverem à ação letal dos antibióticos e quimioterápicos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência. No caso da resistência, a bactéria continua proliferando, isto é, mantém a mesma velocidade de crescimento mesmo ao ser tratada com o antibiótico. Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período. De fato, a bactéria desenvolve defesa apenas contra o efeito bactericida do antibiótico onde, o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibiótico alcançar o valor da concentração mínima bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antibiótico capaz de matar 99,9% das bactérias presentes. Finalmente, na persistência, uma pequena fração da população bacteriana, submetida ao tratamento, não sofre o efeito bactericida do antibiótico, independentemente de seu mecanismo de ação (JACOBY, 2005; ANDERSON, 2005; ANDRADE, 2013).

As bactérias também podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006; MIN et al., 2007). Os mecanismos incluem:

- a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibiótico;
- c) substituição do sítio de ligação da droga;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete;
- f) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Os fatores que contribuem para a ocorrência e persistência da resistência bacteriana são: o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos (CRISAN et al., 1995; VARGAS et al., 2004), a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de infecções em animais e no controle de infecção bacteriana em frutas e legumes que aumentam a transmissão de organismos multirresistentes para seres humanos (COHEN, 1992; HOEFEL et al., 2006).

A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses micro-organismos representam um desafio no tratamento de infecções (CATÃO et al., 2005). Nesse sentido, as plantas constituem-se importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, servindo para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos (SANDES; DIBLASI, 2000; HAIDA et al., 2007).

1.2.6.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM corresponde à menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste. O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou Minimum Inhibitory Concentration (MIC), é obtido através do macro ou micro diluição de compostos que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólida ou líquida, semear o micro-organismo e após a incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do micro-organismo (CLSI, 2002; 2003a).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o micro-organismo teste (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). No método de diluição em caldo podem ser empregadas as metodologias: macro ou micro diluição; esse teste considera a relação entre a densidade da turbidez de crescimento do micro-organismo testado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada; a avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Após incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009), assim como, pode-se mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxirredução como Alamar blue e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (DUARTE et al., 2006).

As vantagens deste método é proporcionar mais informações quantitativas, poder ser aplicado a uma variedade mais ampla de isolados do que os testes de difusão (KONEMAN et al., 2001), além de requerer uma pequena quantidade de amostra, ser barato, ter reprodutibilidade, ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura e possibilitar um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008).

As variações referentes à determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a concentração de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

1.2.7 Doença de Alzheimer

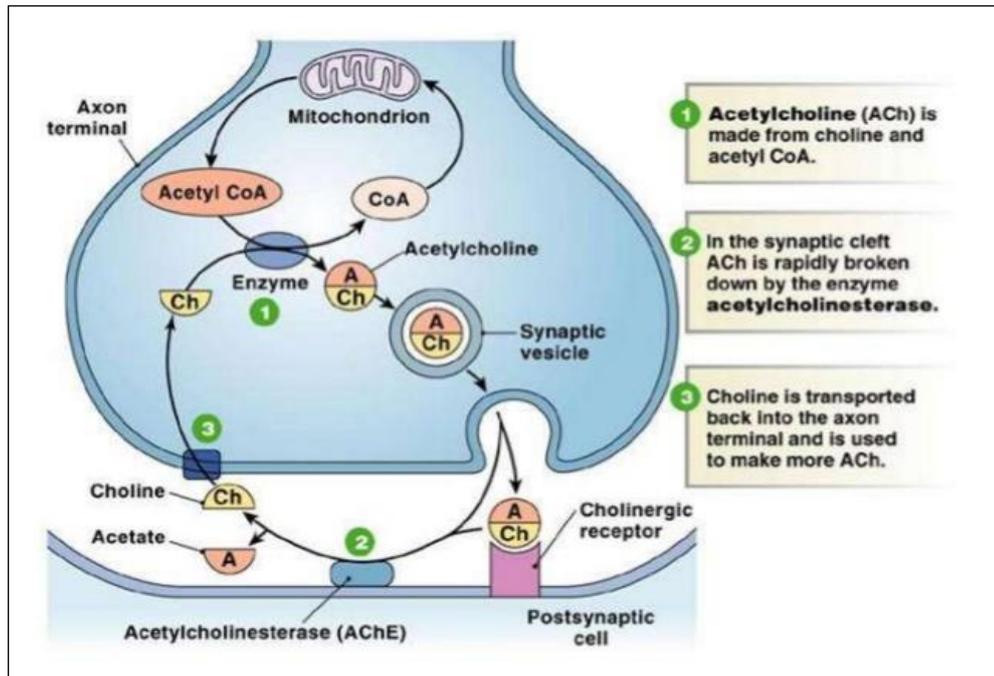
A farmacoterapia para a doença de Alzheimer (DA) inclui a utilização de inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Os óleos essenciais são capazes de proteger os sistemas biológicos devido a sua atividade anti-radical livre contra radicais alquila, e em menor grau, contra o ânion superóxido. Este efeito é observado especialmente nas membranas lipídicas, protegendo-as dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerado a principal causa do envelhecimento, das doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e das células tumorais (ALCANTARA; YAMAGUCHI; SILVA; VEIGA JR, 2010).

Entre as doenças neurodegenerativas, o Mal de Alzheimer atinge inicialmente a memória e em seguida a capacidade de raciocínio e a comunicação. Os sintomas dessa doença estão associados à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina (ACh), noradrenalina e serotonina (BRYNE, 1998). O tratamento para o Mal de Alzheimer é sintomático e consiste basicamente na tentativa de restauração da função colinérgica, sendo amplamente utilizados para este fim os inibidores de acetilcolinesterase (AChE). Os medicamentos disponíveis no mercado são relativamente caros, o que torna a busca de novos inibidores de origem vegetal uma alternativa interessante, na medida em que estes seriam economicamente mais viáveis (ANDRADE et al., 2013).

A acetilcolina (ACh) é encontrada em vertebrados e alguns artrópodes e é um dos principais compostos cujos impulsos elétricos são conduzidos por células nervosas, transmitidos para outras células nervosas ou para músculos voluntários ou involuntários. ACh é armazenada no terminais nervosos em estruturas chamadas vesículas sinépticas, quando o terminal do nervo é despolarizado a vesícula libera essas substâncias a partir das terminações nervosas e em seguida a ACh entra na sinapse e se liga ao receptor conforme demonstra a Figura 8. A enzima acetilcolinesterase (AChE) hidroliza a ligação éster na molécula do ACh tornando seu período curto e levando a perda de sua atividade estimuladora. Portanto a inibição da AChE prolonga o tempo de vida da ACh e permite o funcionamento dos impulsos nervosos conduzidos pelas células nervosas e conseqüentemente melhoras significativas no tratamento DA. (SOUZA et al., 2012).

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que afeta principalmente a pessoas com idade avançada e raramente ocorre em pessoas mais jovens. A DA é caracterizada por demência, perda de memória, distúrbios de linguagem e comportamentais, disfunção cognitiva e estes sintomas com o passar do tempo vão se tornando mais graves. (VIEIRA et al., 2008).

Figura 8 - Ação da acetilcolina (ACh) na passagem dos impulsos nervosos entre as células neurais



Fonte: www.es.slideshare.net

As atividades psicoativas dos óleos essenciais obtidos da extração de plantas medicinais são bastante promissoras, pois possuem alcalóides e terpenos que atuam como neurotransmissores e inibidores da enzima AChE, como por exemplo os óleos extraídos de *Acorus calamus* L. (CHEN et al., 2015); *Cymbopogon schoenanthus* Spreng. (Khadri et al., 2008) e diversos óleos da família Lamiaceae. Nesse contexto, a pesquisa por novos óleos essenciais, nunca antes descritos, especialmente da Amazônia, tem particular interesse na busca por substâncias inibidoras de acetilcolinesterase e de radicais livres (DOIH et al., 2009).

1.2.8 Atividade antioxidante

Existe um grande acervo de trabalhos científicos na literatura a respeito da capacidade antioxidante de várias substâncias afim de encontrar alternativas para o tratamento de doenças causadas pelo estresse oxidativo (EO) dos radicais livres como: aterosclerose, artrite reumática, enfermidades cardiovasculares, hipertrofia muscular e neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer. A produção de radicais livres se deve a ação catalítica das enzimas, no metabolismo celular ou a exposição a fatores exógenos (NASCIMENTO, 2011).

Nos últimos anos muitas pesquisas foram desenvolvidas a respeito da ação antioxidante dos produtos naturais utilizando um método baseado na eliminação do radical estável 1,1-difenil- 2-picrilhidrazil (**DPPH•**) (Figura 9). O DPPH• é uma molécula conhecida pelos seus

benefícios, tais como estabilidade na ausência de luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (OLIVEIRA, 2015).

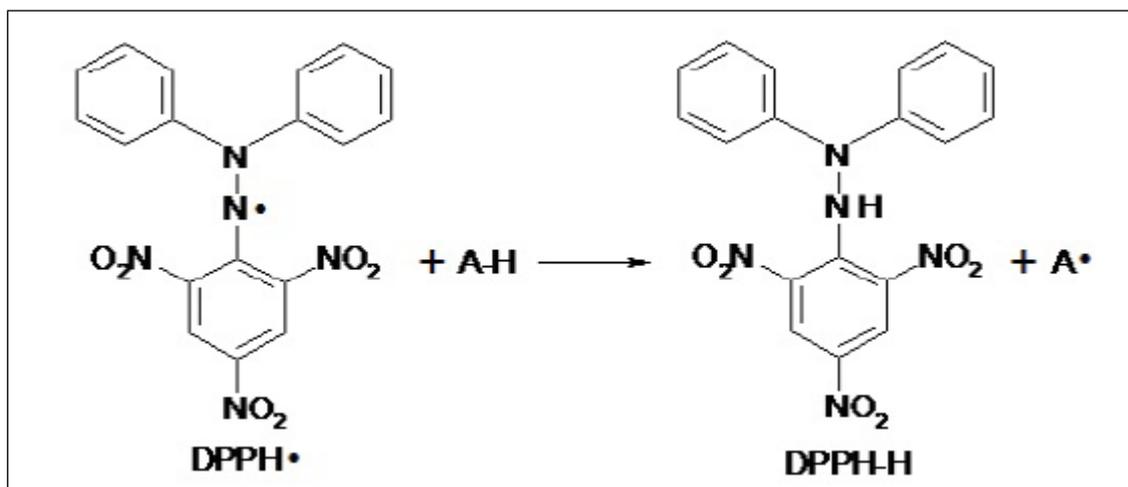
Figura 9 – Estrutura do radical livre DPPH•



Fonte: Oliveira, 2015.

O método de avaliação potencial antioxidante DPPH• é bastante utilizado, porém, deve ser empregado outras metodologias para a determinação de um composto como sendo efetivamente antioxidante. O principal mecanismo DPPH• ocorre através da transferência de elétrons em que a transferência do hidrogênio seja uma reação marginal conforme a Figura 10. O mecanismo de reação de transferência de hidrogênio entre o radical DPPH• e o antioxidante (AH) pode ser reversível, sendo que o DPPH-H poderá se converter na forma de DPPH• (ANDRADE et al, 2013).

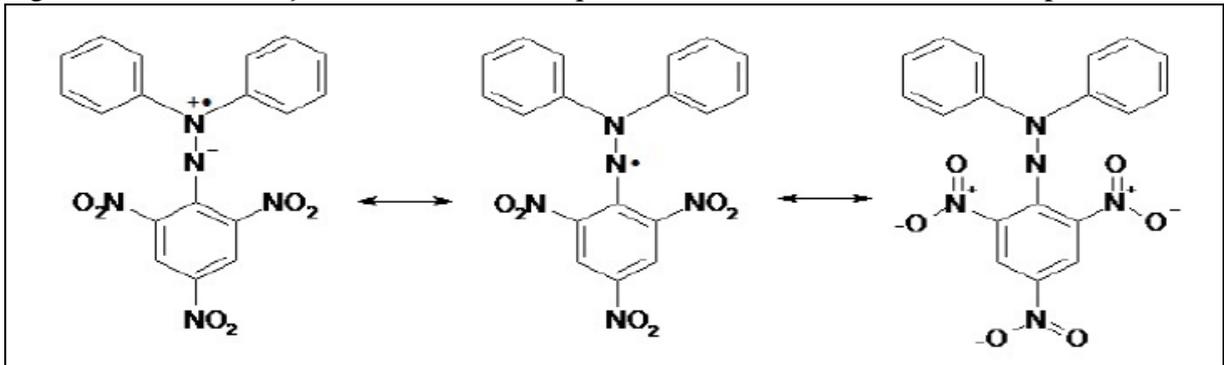
Figura 10 - Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio



Fonte: Oliveira, 2015.

A metodologia empregada na determinação de substâncias como agentes antioxidantes DPPH• é um procedimento fácil, viável, rápido e simples, porém, continua sofrendo modificações ou adaptações devido aos diferentes solventes, concentrações, alíquotas, tempos de reação e absorvâncias empregados neste método. A estabilização do radical DPPH• é atribuído também ao deslocamento do elétron desemparelhado sobre o radical DPPH•, nos três grupos de NO₂ e nos dois átomos de nitrogênio, que são grupos que permitem o deslocamento de elétrons (Figura 11) (MARTINEZ et al., 2006).

Figura 11 – Estabilização do radical DPPH• pelo deslocamento do elétron desemparelhado



Fonte: Oliveira, 2015.

Por causa da localização do elétron livre ao longo da molécula de DPPH• (Figura 7 e 8), o radical possui à cor púrpura ou violeta com uma absorção em solução de etanol ou metanol a 515-520 nm (DENG et al., 2011). Uma substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH•, que aceita para se tornar uma molécula estável diamagnético originando a forma reduzida DPPH-H com a perda da cor violeta de acordo com o tempo para amarelo pálido ou violeta claro (CIEŚLA et al., 2012; KEDARE; SINGH, 2011; AMATATONGCHAI et al., 2012; MUSA et al., 2013). A mudança da cor violeta escuro para violeta claro, que resulta na diminuição da absorbância do radical DPPH•, pode ser monitorada por um espectrofotômetro UV/visível para a determinação capacidade antioxidante. Esse monitoramento tem que ser realizado sempre no escuro, por que a luz é um fator que interfere diretamente na reação do radical DPPH• com uma substância, acelerando a diminuição da absorbância e consequente alterando os resultados finais (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

1.2.9 Teste de toxicidade contra a *Artemia salina*

Diante do aumento no número de pesquisas realizadas sobre produtos naturais e sua aplicação e eficiência em relação ao seu potencial biológico, antisséptico e cosmético, dentre

outros, torna-se necessário além destes estudos, testes que avaliem a toxicidade dessas substâncias, uma vez que não são apenas estes presentes em compostos biologicamente ativos e promissores para as indústrias, há também compostos que causam malefícios, efeitos colaterais e indesejáveis (ANDRADE, 2013). O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Assim, encontrar uma concentração segura e não letal para o uso terapêutico constitui-se uma etapa de grande importância (HOCAYEN, 2012).

O teste de toxicidade contra as larvas do crustáceo *Artemia salina* (Figura 12) é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade citotóxica de produtos naturais com a finalidade uso humano como fármaco, cosmético ou inseticida fornecendo segurança em relação ao seu uso sem causar danos letais na utilização de ensaios pré-clínicos ou clínicos (AMARANTE et al, 2011). *A. salina* tem sido utilizada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas, a toxicidade para este crustáceo tem demonstrado uma boa correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos e atividade contra o *Trypanossoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (Mclaughlin *et al.* 1991; (HOCAYEN, 2012).

Figura 12 – Náuplio do crustáceo *Artemia salina*



Fontes: www.thinglink.com

O uso do micro crustáceo de *Artemia salina* estende-se a investigações de toxicologia aplicada dada sua disponibilidade comercial, útil como material vivo de prova. A investigação sobre *Artemia salina* tem um amplo aspecto que vai desde a avaliação de compostos tóxicos ou essenciais nos náuplios até a exposição tóxica aguda a diversos produtos químicos, a detecção de tóxicos em produtos comestíveis e farmacêuticos, estudos de modelos de ação tóxica de substâncias e de transferência tóxica de contaminantes (FAIRCHILD et al., 2010; GONZÁLEZ-LOZANO, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar os constituintes químicos e avaliar o potencial biológico do óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet.

2.2 Específicos

- ❖ Coletar durante os períodos chuvoso e seco as folhas frescas da *Siparuna guianensis* Aublet e extrair seus óleos essenciais;
- ❖ Caracterizar os componentes voláteis de *S. guianensis* Aublet.
- ❖ Realizar testes para avaliar seu potencial biológico.
- ❖ Determinar sua Concentração Inibitória Mínima (MIC) e verificar sua atividade antimicrobiana.
- ❖ Testar a ação antioxidante pelo método de captura do radical livre estável DPPH.
- ❖ Avaliar o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).
- ❖ Averiguar a toxicidade dos óleos essenciais através do teste frente à *Artemia salina*.
- ❖ Comparar os resultados obtidos sobre o rendimento, composição química e atividade antimicrobiana dos períodos seco e chuvoso e constatar sua variação sazonal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As folhas frescas (Figura 13) da *S. guianensis* foram coletadas manualmente de aproximadamente 10 indivíduos, entre 8:00 e 9:00 hrs, durante os períodos mais intensos da estação chuvosa (junho, julho e agosto) e estação seca (novembro, dezembro e janeiro), georreferenciados para a análise fenológica na localização 2°44'05.2"N 60°33'17.0"W, nas proximidades da sede do município do Cantá - RR. Posteriormente foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório de Produtos Naturais de Química Orgânica do PPGQ na Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde foram realizadas as extrações dos óleos essenciais. Espécimes-testemunhas foram encaminhadas ao Herbário da UFRR as quais foram depositadas sob o número de tombo 7812.

Figura 13 – Folhas frescas de *S. guianensis* coletadas para extração.



Fonte: Autor.

3.2 Extração dos Óleos Essenciais

As amostras dos óleos essenciais de *S. guianensis* foram obtidas através da coleta de folhas frescas conservadas em triplicata e de método randômico entre os indivíduos da população estudada. Cada amostra contendo 300 g foram cortadas em tamanho de aproximadamente 1 cm e colocadas em um balão de 500 ml adicionando 500 ml de água destilada que foi aquecido em uma manta térmica e posteriormente submetido a 4 horas de

hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (Figura 14).

Figura 14 – Hidrodestilação das folhas frescas de *S. guianensis*



Fonte: Autor.

A massa de cada óleo foi mensurada em balança analítica e acondicionados em frascos de vidro o qual ficaram sob refrigeração em uma atmosfera de -4°C até o momento das análises químicas e testes biológicos. Seus rendimentos foram calculados através da razão entre a massa do óleo e a massa do material vegetal conforme a equação 1 a seguir (SANTOS et al., 2004):

Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do óleo extraído}}{\text{Massa do material vegetal}} \times 100\%$$

As amostras obtidas foram identificadas como: R061, R062, R063, R071, R072, R073, R081, R082, R083 para os óleos essenciais obtidos nos meses junho, julho e agosto respectivamente, pertencentes ao período chuvoso. As amostras do período seco dos meses novembro, dezembro e janeiro foram identificadas como: R111, R112, R113, R121, R122, R123, R011, R012, R013.

3.3 Composição Química dos Componentes Voláteis

3.3.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM)

A análise foi realizada utilizando um GC-MS (QP2010) sistema ULTRA (Shimadzu) com uma Rxi - 1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μM (Restek) a temperaturas que variam de 50°C (2min), aumentando em intervalos de $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 230°C . A injeção temperatura foi de 250°C numa razão de divisão de 1:10, o gás espectrometria de massa de cromatografia (GC-MS)

temperatura de interface era de 250°C , e o detector de MS operado a um impacto de electrónico 70eV a 250°C . Hélio foi utilizado como gás transportador, a um caudal de 2,0 ml/min e um volume de injeção de 1 ml . A aquisição de dados GCMS solução de software (Shimadzu) foi usada para avaliar a componentes, e os índices foram comparados com aqueles do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) espectral biblioteca NIST11 com base no índice de Kovats, uma linear índice de retenção usado para identificar componentes do óleo com os cálculos incluindo o tempo de retenção de uma série de n-alcenos.

3.3.2 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-FID)

Um cromatógrafo a gás HP 7820A (Agilent) foi usado para o gás detecção de ionização de cromatografia de chama (GC-FID), colunas HP5 ocupadas com dimensões de 30 m x 0,32 milímetros x 0,25 µM (Agilent), temperaturas que variam de 50°C (2min), com aumentos de 3°C/min, até 230°C. A temperatura de injeção foi de 250°C em uma divisão proporção de 1:10 , e a temperatura foi FID 250 ° C . O hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás transportador, a 3 ml/min e um volume de injeção de 1 µl . O software de aquisição de dados foi EZChrom Elite Compact (Agilent). As análises foram realizadas em triplicado e dados quantitativos obtidos por integração eletrônica da área do pico em relação à área total do cromatograma, o que resultou na concentração (%) de cada fitocomponente presente no óleo essencial.

3.4 Avaliação do potencial biológico

3.4.1 Determinação da atividade antioxidante do óleo da *S. guianensis* Aublet

A determinação do Fator antioxidante foi realizada no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Amazonas, sob a orientação do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada medindo a capacidade de sequestro de radicais livres do radical Fe³⁺ e do DPPH, ao adicionar o provável antioxidante presente nos extratos vegetais, ocorre a perda do radical, que é evidenciada pela redução de absorbância em determinado comprimento de onda, onde as diminuições são correlacionadas em uma curva com o antioxidante padrão, que pode ser o ácido ascórbico por ser biologicamente ativo participando das reações no organismo. Para esta avaliação será utilizado o espectrofotômetro UV-Visível.

A solução de DPPH foi preparada com concentração de 0,3 mM em etanol em um frasco

ambar, na qual foi mantida no escuro e refrigerada 10 °C. A solução padrão foi preparada com 2 mg de reagente DPPH dissolvidos em 10 mL de etanol.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da avaliação da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH, segundo metodologia utilizada por Molyneux (2004) com modificações, no aparelho leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) em comprimento de onda de 492 nm até obtenção de absorbância de 1,00 ($\pm 0,1$).

Na microplaca de 96 poços, foram aplicados 270 μ L de DPPH (1 mg/mL) e 30 μ L das soluções das amostras na concentração de 100 μ g/mL. Como controle positivo utilizou-se o ácido gálico e, para o controle negativo, foram utilizados 270 μ L de DPPH e 30 μ L de DMSO. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente no escuro e realizou-se a leitura da absorbância em 492 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH. A porcentagem de inibição foi obtida a través da Equação 2:

$$\text{Equação 2: \% de inibição} = x100 \frac{\text{abs amostra}}{\text{abs controle}}$$

3.4.2 Bioensaio de Concentração Mínima de Inibição (MIC) para micro-organismos

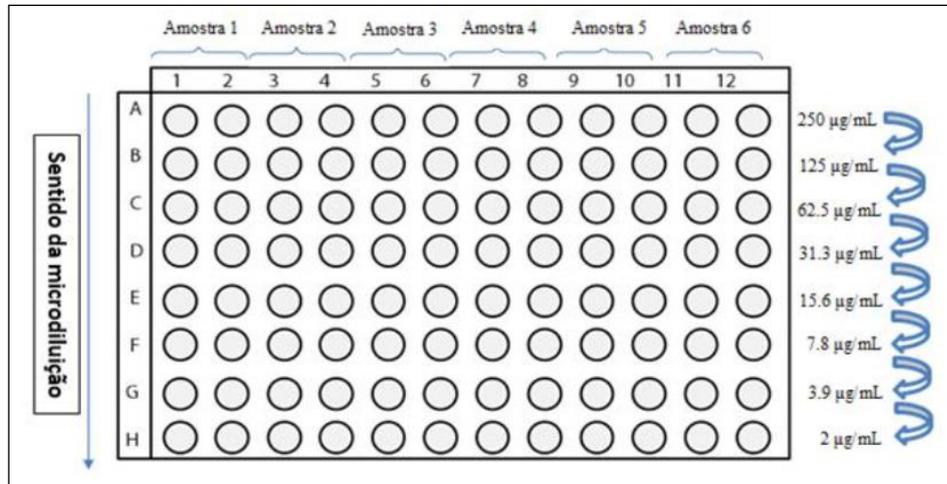
Para a execução do MIC, no qual os microorganismos estocados em tubos de ensaio foram transferidos com alça de platina para tubos de ensaios contendo 3,0 mL de caldo Agar Sabouraud. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa à 37 °C por 36 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 μ L deste pré-inóculo foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada a 600 nm até atingir uma transmitância entre 74-76% (correspondente à escala 0,5 de McFarland de turbidez padrão, ou seja, 10⁸ células/mL), obtendo-se assim, os inóculos utilizados no bioensaio.

As amostras dos óleos essenciais de *S guianensis* Aublet foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (12,5 mg/mL). Uma alíquota de 40 μ L desta solução foi adicionada a 960 μ L do caldo de Agar Sabouraud para o preparo da solução de trabalho.

Os bioensaios foram realizados em placas de 96 micropoços (Figura 15), contendo 100 μ L de meio de cultura por poço (exceto no primeiro; ver adiante), em duplicata. No primeiro poço foram adicionados 200 μ L da solução de trabalho e, em seguida, foi realizada a diluição desta solução para os poços seguintes, transferindo-se 100 μ L da solução do poço 1 para o poço 2. A solução resultante foi homogeneizada e 100 μ L desta foi transferida para o poço 3 e assim sucessivamente. No último poço, após homogeneização, 100 μ L foram retirados e desprezados,

de modo que todos os poços tivessem o mesmo volume. Em seguida, foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado em cada poço.

Figura 15 - Modelo e distribuição das amostras e controles nas placas utilizadas para o teste de sensibilidade antibacteriana



Fonte: Autor.

Quatro controles foram feitos, um de crescimento do micro-organismo (para verificar a viabilidade celular); o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano (para se eliminar o efeito da coloração da solução da substância teste), o controle positivo (substituindo a solução-trabalho por um antibiótico padrão) e o controle de esterilidade do meio de cultura, contendo 100 μL de meio de cultura e 100 μL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ e após 24 h foi realizada a leitura em leitor tipo Elisa (490 nm).

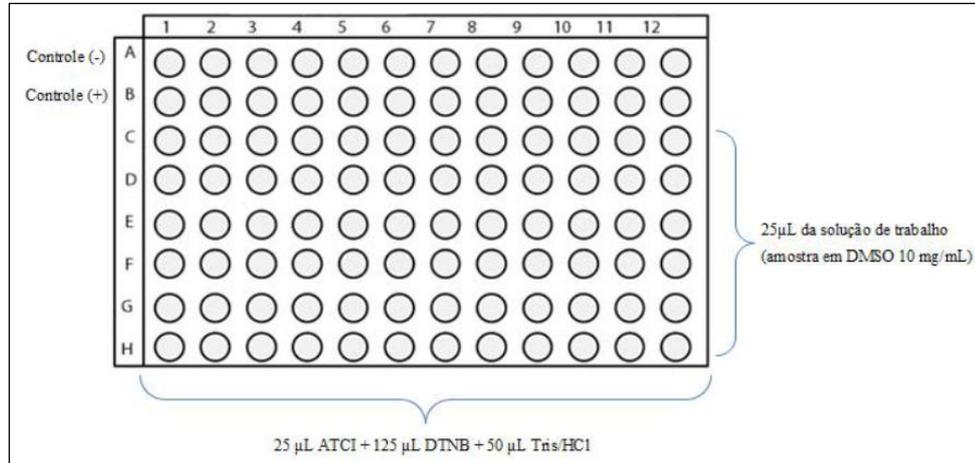
O antibiótico utilizado para o controle de qualidade do ensaio foi a ampicilina e as soluções de trabalho contendo estes padrões foram preparadas conforme descrito anteriormente.

3.4.3 Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase *in vitro* (ELLMAN)

Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho (amostra em DMSO 10 mg/mL) aos poços da placa de Elisa (Figura 16) do teste e dos controles negativo e positivo. Nos cinco primeiros poços da coluna do controle positivo, adicionou-se 25 μL da solução de Galantamina (10mg/mL em tampão Tris/HCl pH 8,0), nos poços do controle positivo adicionou-se 25 μL de DMSO, solvente que foi usado para a diluição da amostra. A cada poço, 25 μL de solução de Iodeto de Acetilcolina (Acetylthiocholine iodide, ATCI), 125 μL da solução de DTNB (5',5-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) e 50 μL de Tris/HCl (50mM) com albumina sérica bovina foram adicionados. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 min por 8 vezes (8 min no total). Adicionou-se 25 μL da solução de AChE (0,222 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância a 405 nm

por 10 vezes (10 min no total) em leitora de microplacas (ELLMAN, 1961).

Figura 16 - Modelo e distribuição das amostras e controles nas placas utilizadas para o Teste de atividade anticolinesterásica



Fonte: Autor.

3.4.4 Determinação da toxicidade em *Artemia Salina*

3.4.4.1 Metodologia empregada

A toxicidade frente à *A. salina* foi testada utilizando a metodologia segundo Mayer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993).

Os náuplios *A. salina* foram incubados em uma solução salina artificial 0,04 g/L. O pH foi ajustado entre 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 10%). A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente em aeração. Em um dos lados da incubadora foram adicionados 100 mg de ovos de *Artemia salina*. Parte do sistema foi protegido da luz para que os organismos ao nascessem e permanecessem isolados em um dos lados do aquário devido à diferença de iluminação. Os náuplios foram atraídos pela iluminação depois da eclosão dos ovos. Durante a incubação, a temperatura foi mantida em torno de 25°C e a eclosão dos ovos foram monitoradas a cada 12 horas sendo verificada no período de 48 horas.

A solução trabalho contendo 25 mL utilizada foi preparada diluindo 100mg de uma amostra do óleo essencial de *S. guianensis* extraída no período seco em erlenmeyer obtendo 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra, solubilizada em Tween 80 a 1% e completados com água salina.

A partir da primeira solução, pipetou-se volumes de 11 mL a tubos contendo 1 mL de uma solução de Tween 80 a 1% em solução salina e completados com 10 mL de solução salina, para obter a concentração de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. As demais soluções de concentração inferior (250 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram obtidas conforme já descrito, e utilizando a equação 3 respectivamente:

$$\text{Equação 3: } C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Em meio contendo diferentes concentrações de uma amostra do período seco do óleo essencial de *S. guianensis*, após o período de incubação de 24 horas, 10 organismos (náuplios de *A. salina*), foram selecionados e transferidos para os tubos de ensaios. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Utilizou-se uma solução salina sem extrato como controle positivo também em triplicata os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental que os grupos tratados com as amostras em estudo para efeitos comparativos da influência do veículo utilizado sobre a resposta das larvas de *A. salina*. Após o período de 24 horas de incubação foi contado o número de larvas mortas e vivas em cada tubo de ensaio, através da visualização macroscópica e os valores registrados em formulário.

Decorrido o tempo de 24 horas, realizou-se a contagem do número de náuplios vivos e mortos/imobilizados. A mortalidade foi calculada utilizando a Equação 4:

Equação 4:

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

Os valores da mortalidade foram corrigidos, utilizou-se a Equação 5 de Abbott (LUCENA, 2012):

Equação 5:

$$MC = \frac{(\text{Mortalidade nos frascos } [\%] - \text{Mortalidade no frasco controle } [\%])}{(100\% - \text{Mortalidade no frasco controle } [\%])} \times 100$$

MC= Mortalidade corrigida.

Para a obtenção da CL_{50} no teste de avaliação de toxicidade utilizou-se uma curva de calibração. Considerou-se após os cálculos, baixa toxicidade quando a CL_{50} for superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; moderada para CL_{50} entre 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e muito tóxico quando a CL_{50} foi inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (AMARANTE, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos Óleos Essenciais

As amostras, em triplicata, obtidas através do procedimento de hidrodestilação ao qual as folhas frescas de *Siparuna guianensis* Aublet foram submetidas estão codificadas conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Codificação das amostras do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet

Período Chuvoso			Período Seco		
Junho	Julho	Agosto	Novembro	Dezembro	Janeiro
R061	R071	R081	R111	R121	R011
R062	R072	R082	R112	R122	R012
R063	R073	R083	R113	R123	R013

Os teores dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet obtidos durante os períodos mais intensos da estação chuvosa (junho, julho e agosto) e estação seca (novembro, dezembro e janeiro) estão representados na Tabela 3. Pode-se destacar que o mês de maior rendimento foi em novembro de 2015 divergindo dos valores alcançados por Valentini et al (2010b) devido à diferença de estação entre as regiões onde as pesquisas foram realizadas.

Tabela 3 - Rendimento dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet nos períodos de junho de 2015 a janeiro de 2016

Mês/Ano	Massa do Vegetal Utilizada (g)	Massa do óleo Obtido (g)	Rendimento (%)/ \pm Desvio Padrão
jun/15	900	1,002	0,113 \pm 0,01
jul/15	900	0,8131	0,09 \pm 0,03
ago/15	900	1,535	0,17 \pm 0,04
nov/15	900	3,8538	0,428 \pm 0,04
dez/15	900	2,3158	0,257 \pm 0,09
jan/16	900	2,9291	0,325 \pm 0,11

Roraima apresenta duas estações distintas e bem definidas: Verão e Inverno e segundo a classificação de Köppen,, na área Centro/Leste de Roraima (Local onde está inserido o município do Cantá-RR) encontramos um clima Tropical chuvoso (AW), apresentando déficits hídricos em torno de 3 a 5 meses com reduzida pluviosidade. Nesta porção do Estado predomina a vegetação de Savanas (NETA; SILVA, 2002). Neste cenário, as extrações realizadas na estação chuvosa coincidiram com o período reprodutivo da planta oferecendo o menor valor de rendimento (0,09 \pm 0,03%) em contraste com a estação seca que forneceu o maior rendimento (0,428 \pm 0,04) sendo este o período fenológico vegetativo da planta. Levando em consideração

que os meses de novembro, dezembro e janeiro foram os mais intensos em relação à seca na região, este fator contribui também com o estresse hídrico sofrido pela espécie, o que pode estar relacionado com os altos índices de rendimento de óleos essenciais já sugeridos por outras pesquisas (CASTELLANI, 2006; DORAN, 1991; VALENTINI et al., 2010b).

Concernente ao rendimento obtido por Valentini et al (2010b) foi observado que os maiores teores se deram no período reprodutivo, momento este que as plantas estão emitindo botões florais e frutos. Enquanto que em sua época vegetativa apresentou os menores teores em seus componentes voláteis bem como os principais trabalhos a respeito do rendimento da *Siparuna guianensis* Aublet encontrados na literatura como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento dos componentes voláteis dos principais trabalhos realizados sobre a *S. guianensis* Aublet

Trabalhos	Rendimento (%)	
	Período Vegetativo	Período Reprodutivo
Aguiar et al., (2014)	0,9	1,75
Barros (2015)	0,09	0,48
Castellani (2006)	0,13	0,24
Diniz (2014)	2,07	4,5
Montanari (2010)	4,75	6,8
Valentini (2010)	0,1	0,61

Observando os rendimentos obtidos nos trabalhos citados na Tabela 4 com óleos essenciais da *S. guianensis* Aublet pôde-se constatar divergências concernentes aos teores dos óleos essenciais ocorrendo tanto sua diminuição no período vegetativo da planta quanto seu aumento no período reprodutivo acompanhado de períodos de alta e baixa pluviosidade respectivamente. Pode-se sugerir que os períodos fenológicos da planta e interações da planta com o meio ambiente, podem estar diretamente ligados ao aumento ou diminuição no teor dos componentes voláteis (CASTELLANI, 2006; VALENTINI et al., 2010b).

Valentini et al (2010b) ainda sugeriu uma relação entre o período seco e produção de botões florais pela espécie *S. guianensis* como fator principal do aumento no rendimento dos óleos essenciais, porém, no presente estudo a relação encontrada foi o estresse hídrico causado pelo período seco na região e o período vegetativo da planta, uma vez que novembro de 2015 apresentou o maior teor de óleo extraído e naquela época a planta não apresentava botões florais, flores e frutos.

4.2 Composição química

A variação da composição química dos óleos essenciais da *S. guianensis* Aublet durante os meses de julho e agosto, períodos mais intensos da estação chuvosa roraimense e coincidentes com época reprodutiva da espécie na região encontram-se sumarizados na Tabela 5. A *S. guianensis* Aublet apresentou uma composição química 16,18% correspondente a monoterpenos, 32,36% de sesquiterpenos e as maiores frações dos componentes voláteis foram os sesquiterpenos oxigenados com 40,45% dos constituintes das amostras.

Tabelas 5 – Constituintes químicos identificados nos componentes voláteis da *S. guianensis* Aublet (Período chuvoso)

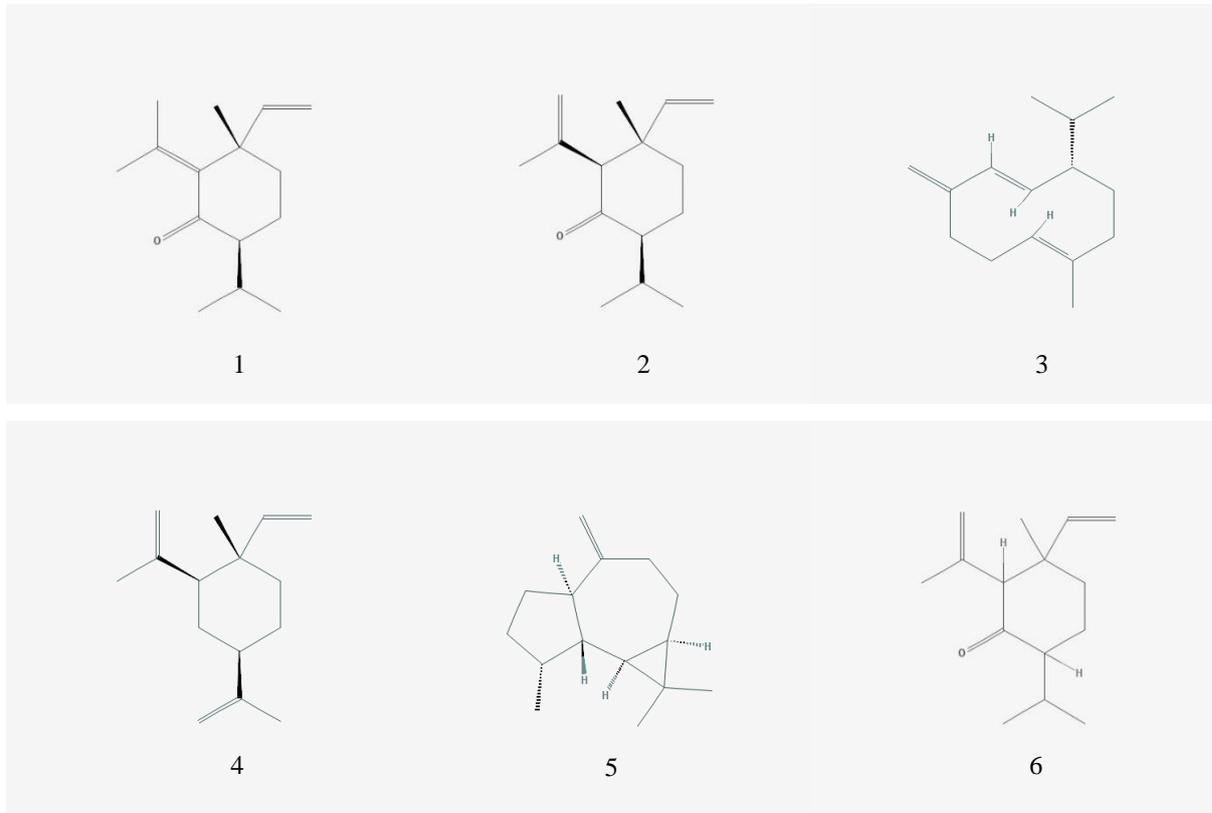
Nº	Constituintes	RT min	Kovats IK	R071 %	R072 %	R073 %	R081 %	R082 %	R083 %
1	α -pineno	3,96	967	1,5	1	1	2,6	1,8	2,3
2	β -pineno	4,92	992	0,5	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3
3	mirreno	5,35	1004	1	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6
4	limoneno	6,35	1030	0,4	0,2	0,2	0,5	0,3	0,3
5	β-elemeno	19,99	1389	3,9	6,6	5,5	6,3	6,7	6,7
6	β -cariofileno	20,88	1413	0,4	0,6	0,5	0,8	0,8	0,8
7	humuleno	22,19	1447	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6
8	aromadendreno	23,29	1476	1,5	1,6	1,5	6,5	4,9	6
9	γ -muuroloeno	23,69	1487	0,9	1	0,8	1,1	1	1
10	germacreno D	23,90	1492	11	10,8	10,3	11,9	10,7	11,8
11	α -muuroloeno	24,18	1500	2,5	2,2	2,1	4	3,2	2,9
12	shyobunona	24,76	1515	22,5	20,1	20,3	17,5	16,3	16,3
13	β -guaiano	25,04	1522	1,1	1	0,7	2	1,5	1,8
14	epi-shyobunona	26,12	1551	3	3,1	3,2	3	3,2	3,3
15	óxido de cariofileno	27,16	1578	0,7	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8
16	espatulenol	27,40	1584	1,5	1,6	2,7	1,9	2,9	2,4
17	iso-shyobunona	27,98	1600	24,7	23,4	25,8	17,8	19,2	17,8
18	viridiflorol	28,76	1620	2,2	1,3	2,4	1,6	2,2	1,5
19	epi-shyobunol	29,08	1629	2,5	2,6	2,2	2,7	2	2,2
20	T-cadinol	29,86	1649	0,9	1,3	1,1	0,5	1,3	1,2
21	T-muurolol	30,15	1657	1,8	2,9	2,5	2	2,9	2,7
22	farnesol	32,62	1722	1,3	1,3	0,9	1,2	0,8	1,1
23	outros			10,3	11,6	11,3	10,1	12,2	11,5
Identificados				89,7	88,4	88,7	89,9	87,8	88,5
Total				100	100	100	100	100	100

*RT = Tempo de Retenção (minutos), **IK = Índice de Kovats, ***% = concentração em porcentagem

A partir deste pode-se destacar a presença de dois componentes majoritários até então não identificados nos principais trabalhos e pesquisas encontrados na literatura, com um

percentual de 40% do teor das amostras analisadas: a iso-shyobunona (21,5%) e shyobunona (19%). Também foi possível observar alta concentração dos compostos germacreno-D (11%), β -elemeno (5,95%), adromadendreno (3,7%) e epi-shyobunona (3,1%) onde suas respectivas estruturas estão representadas na figura 17.

Figura 17 – Estruturas Químicas dos componentes majoritários dos óleos essenciais de *S guianensis* Aublet (Período Chuvoso)



Legenda: 1- Iso-shyobunona; 2- Shyobunona; 3- Germacreno-D; 4- β -Elemeno; 5- Aromadendreno; 6 – Epi-Shyobunona.

Em estudos realizados na China com os óleos essenciais de *Acorus calamus*, os compostos shyobunona e iso-shyobunona foram identificados e apresentaram ótima atividade inseticida, sendo altamente tóxica contra algumas espécies de pragas de grãos e cereais, sendo ainda potenciais inibidores da enzima acetilcolinesterase (CHEN et al., 2015). Em outro estudo, foi relatado que os constituintes shyobunona e iso-shyobunona foram identificados nos óleos essenciais de uma mistura de ervas hepatoprotetoras, contendo *Acorus calamus*, revelando potencial antioxidante (LUBSANDORZHIEVA; BOLDANOVA; DASHINAMZHILAV, 2013). Os óleos essenciais das folhas frescas de *Daucus carota* (cenoura), coletadas em Akar região norte do Líbano, apresentou cetonas monocíclicas shyobunonas como constituintes majoritários (SAAD; EL-SHARKAWY; HALIM, 1995).

A composição química dos óleos essenciais da *S. guianensis* Aublet durante os meses de novembro, dezembro e janeiro, períodos mais intensos da estação seca roraimense e coincidentes com época vegetativa da espécie na região, encontram-se sumarizados na Tabela 6. As amostras dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet apresentaram uma pequena variação dos constituintes químicos em relação período chuvoso, porém o componente majoritário do óleo essencial de *S. guianensis* Aublet também foi a iso-shyobunona sugerindo desta forma uma nova fonte deste composto caracterizado nesta espécie encontrada no município do Cantá-RR, pertencente a região Amazônica.

A porcentagem dos terpenos identificados foi: 14,8% correspondente a monoterpenos, 29,6% de sesquiterpenos e as maiores frações dos componentes voláteis foram os sesquiterpenos oxigenados com 37% dos constituintes das amostras.

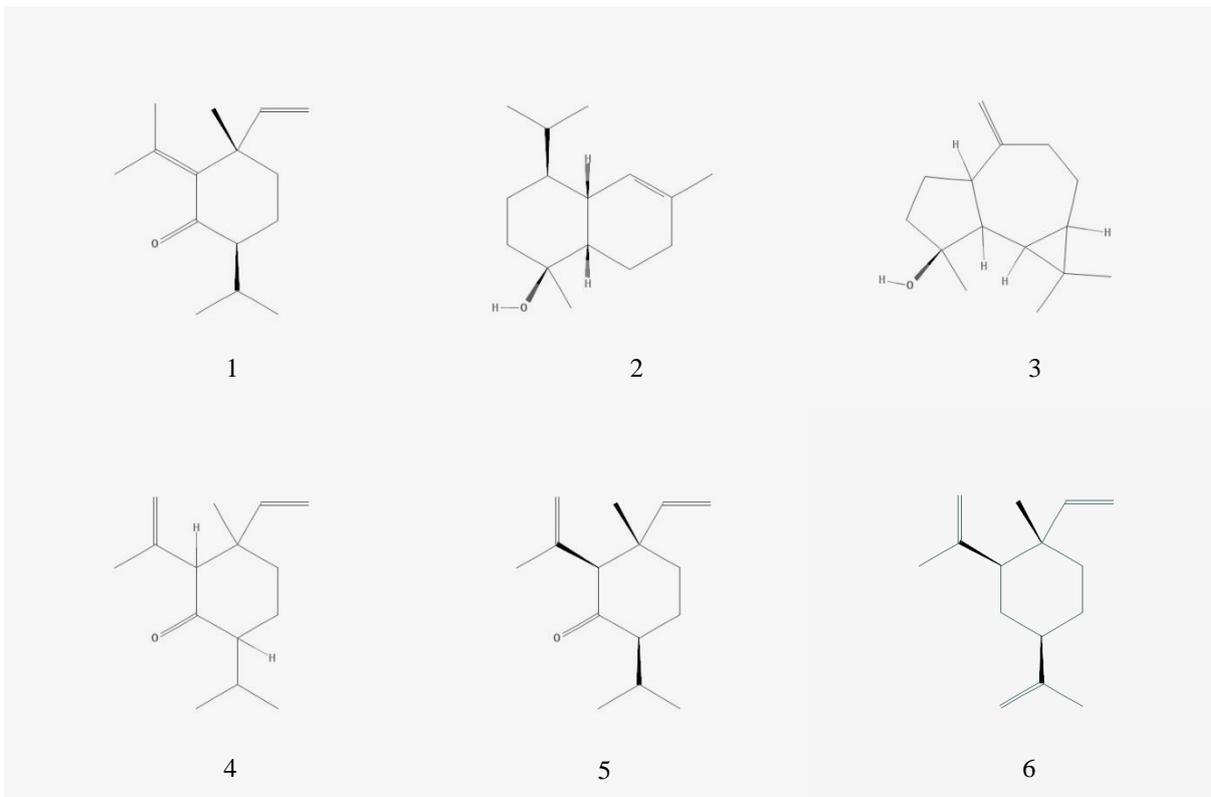
Tabelas 6 – Constituintes químicos identificados nos componentes voláteis da *S. guianensis* Aublet (Período seco)

Nº	Constituintes	RT min	Kovats IK	R111 %	R112 %	R113 %	R121 %	R122 %	R123 %	R011 %	R012 %	R013 %
1	α -pineno	3,96	972	0,5	0,6	0,6	0,1	0,5	0,8	0,4	0,4	1
2	β -pineno	4,92	996	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1
3	Mirceno	5,35	1007	0	0,2	0,3	0,1	0,6	0,4	0,2	0	0
4	Limoneno	6,35	1033	0,2	0,2	0,2	0,2	0,7	0,7	0,2	0,1	0,1
5	β-elemeno	22,19	1389	4	3,1	3,8	7,2	8,7	9,1	3,5	3,1	3
6	β -cariofileno	23,29	1412	0,4	0,4	0,4	1,3	1,7	1,4	0,3	1,1	1,4
7	Humuleno	23,69	1447	0,4	0,3	0,4	0,7	0,8	0,7	0,3	0,5	0,5
8	germacreno D	23,90	1476	0,3	1,1	0,8	6,2	7,5	4,9	0,4	4,3	10,8
9	γ -muuroleno	24,18	1486	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6	0,5	0,6	0,3	0,4
10	Shyobunona	24,76	1491	6,2	5,5	6,8	5,2	5,9	4,2	5,7	4	6
11	α -muuroleno	25,04	1499	1,4	1,7	1,5	3,1	3,1	2,6	1	0,9	1,3
12	epi-shyobunona	26,12	1513	15,1	12,7	16,9	0,6	1	0,9	11,3	3,3	3,8
13	β -guaiano	27,16	1532	1,4	0,8	0,6	2,6	2,4	2,6	0,6	0,7	1,7
14	Selinadieno	27,40	1550	2,8	2,8	3,2	0,4	0,6	0,7	3,4	2,3	3,7
15	óxido de cariofileno	27,98	1574	0,6	0,7	0,4	1,1	1,2	1,4	0,3	1,1	0,9
16	Espatulenol	28,76	1589	4	3,8	3,1	14	12,3	12,3	2,3	20,8	13,1
17	Iso-shyobunona	29,08	1599	22,9	24,5	28,1	4,1	4,7	4,7	36,1	8,6	11,7
18	Viridiflorol	29,86	1620	1,8	1,6	1,9	2,6	0,5	0,5	3,6	0,6	0,9
19	epi-shyobunol	30,15	1628	4,3	3,8	4,3	1,5	1,6	1,5	3,9	1,4	1,7
20	T-cadinol	29,86	1649	1,6	1,3	1,7	0,3	0,5	0,3	1,5	0,6	0,4
21	T-muurolol	30,15	1665	11,8	8,8	9,1	17	14,2	16,8	7,2	11,1	9,7
22	Farnesol	32,62	1722	1,3	0,5	0,6	1	0,8	0,7	0,6	1,2	0,8
23	Outros			12	17	10,6	25,9	22	27,1	11,2	27,5	21,9
Identificados				93,6	92,1	96	95,6	92	92	94,9	93,9	94,9
Total				100								

*RT = Tempo de Retenção (minutos), **IK = Índice de Kovats, ***% = concentração em porcentagem

Os componentes majoritários das amostras extraídas no período seco no município do Cantá-RR identificados foram: a iso-shyobunona (16,2%) e o T-muurolol (11,7%). Também foi possível observar alta concentração dos compostos espatulenol (9,5%), epi-shyobunona (7,2%), shyobunona (5,5%) e β -elemeno (5,0%) e suas estruturas estão representadas na figura 18.

Figura 18 – Estruturas Químicas dos componentes majoritários dos óleos essenciais de *S guianensis* Aublet (Período Seco)



Legenda: 1- Iso-shyobunona; 2-T-muurolol; 3- Espatulenol; 4- Epi - shyobunona; 5- Shyobunona; 6 – β - elemeno.

Os constituintes químicos caracterizados nas amostras extraídas dos óleos essenciais de *S guianensis* Aublet durante o período seco e chuvoso obtiveram praticamente os mesmos resultados variando apenas nas quantidades em cada amostra e em relação aos componentes majoritários ressaltando a predominância do composto iso-shyobunona com as maiores porcentagens dos teores da composição volátil sugerindo assim uma fonte alternativa não só desta substância mas como os demais derivados da shyobunona os quais encontra-se comprovados com seus respectivos espectros de massas de cada amostra caracterizada no Anexo A. No período chuvoso houve a presença do aromadendreno como um dos constituintes majoritários e ausência da substância selinadieno que ocorreu apenas no período seco e este não foi identificado na estação chuvosa. Em relação aos componentes voláteis majoritários da

Siparuna guianensis Aublet encontrados na literatura estão apresentados na Tabela 7 ocorreram em todas as amostras à presença de substâncias também identificadas nos trabalhos citados como espatulenol e germacreno-D, ambos com altas concentrações percentuais da composição química dos componentes voláteis de *S. guianensis* Aublet.

Tabela 7 - Constituintes majoritários dos principais trabalhos encontrados na literatura

Componentes Majoritários	Andrade (2013)	Barros (2015)	Diniz (2014)	Montanari (2010)	Valentini (2010)
Ácido Decanóico		3,93%			
Biclogermacreno	16,71%				
α -bisabolol			76,20%	47,31%	
β -mirceno	13,14%				
Elemol		1,14%			
Espatulenol		22%			7,50%
Germacreno-D	8,68%				
Ledol		2,54%			6,40%
p-cimen-8-ol					
Siparunona		57%			41,64%
α -terpinoleno			23,50%	27,64%	
2-undecanona		8,90%			

É importante relatar que a variação da composição química em todos os trabalhos revisados é um fato constatado bem como a presença de alguns deles como o alfa-bisabolol nos trabalhos de Diniz (2014) e Montanari (2010), comprovando também que pode-se encontrar substâncias iguais em óleos essenciais da mesma espécie em diferentes regiões geográficas.

4.3 Teste de atividade Antimicrobiana

4.3.1 Inibições médias

Ensaio biológico segundo a ANVISA (1988), “são procedimentos destinados a avaliar o potencial de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopéias, através do uso de reagentes biológicos tais como: Micro-organismos, Animais, Fluidos e órgãos isolados de animais”.

As amostras dos óleos essenciais da *Siparuna guianensis* Aublet coletadas durante os meses mais intensos da estação chuvosa e seca da região do município do Canta-RR, foram avaliadas *in vitro* quanto ao seu potencial de inibição frente aos seguintes micro-organismos: *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313); *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Citrobacter freundii* (ATCC 8090). Os dois primeiros micro-organismos são bactérias Gram-positivas e as duas segundas bactérias Gram-negativas

respectivamente e suas porcentagens das inibições médias das amostras sobre os micro-organismos utilizados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Bioensaio de MIC para a avaliação da inibição do crescimento de bactérias

Amostras Período chuvoso	Inibição média (%)/DP na concentração de 250 µg.mL ⁻¹			
	Gram-positivas		Gram-negativas	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
R061	51,4±0,28	59,23±22,27	56,71±0,73	80,93±3,70
R062	24,6±9,25	60,79±1,07	45,72±0,15	76,02±0,09
R063	42,3±5,64	60,41±2,26	52,67±6,8	79,23±1,29
R071	18,67±0,57	50,81±5,36	0,48±0,003	63,77±1,11
R072	32,27±9,98	65,04±4,28	43,14±0,31	69,47±3,61
R073	16,72±1,59	44,99±9,76	28,45±0,15	64,49±3,05
R081	11,91±5,2	69,84±2,26	45,05±0,15	57,36±5,18
R082	29,82±2,74	24,23±2,38	14,55±0,47	52,77±8,33
R083	44,75±2,45	36,40±9,76	43,03±0,47	71,57±1,17
Ampicilina	96,8±0,3	95,2±2	90,1±0,5	87,2±0,8
Amostras Período seco	Inibição média (%)/DP na concentração de 250 µg.mL ⁻¹			
	Gram-positivas		Gram-negativas	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
R111	55,4±2,3	35,3±0,0	12,35±11,	66,9±3,4
R112	52,1±2,6	38,2±5,5	18,2±4,2	47,5±2,5
R113	55,3±1,3	34,1±4,7	13,5±2,3	40,1±0,5
R121	64,9±1,3	53,5±0,7	62,5±3,7	45,4±1,6
R122	72,6±2,8	62,0±7,4	32,3±9,4	41,4±3,9
R123	75,4±2,3	50,5±2,0	32,6±7,9	36,07±5,2
R011	63,2±3,4	43,2±1,9	37,3±8,8	32,4±0,7
R012	79,1±2,9	39,3±3,8	45,1±2,7	48,09±5,7
R013	75,6±1,0	39,3±2,8	26,7±21,1	50,6±3,6
Ampicilina	95,3±0,5	99,1±0,2	100±1	96,5±0,5

Montanari (2010) avaliou a atividade antibacteriana da *S. guianensis* Aublet frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cerus* e *Escherichia Coli*. O autor observou que o óleo essencial inibiu o crescimento das bactérias testadas em concentrações relativamente baixas (8-63µg.mL⁻¹). Do mesmo modo Andrade (2013) verificou também uma atividade inibitória relativamente baixa (125-500 µg.mL⁻¹).

Em relação ao presente estudo obtiveram-se resultados acima dos apresentados por Montanari (2010) e Andrade (2013) uma vez que antes destes não havia praticamente pesquisas a respeito do potencial antimicrobiano da *Siparuna guianensis* Aublet. Os valores de inibição média considerada satisfatória segundo Ferreira (2014) é de 50% e a inibição média dos óleos

essenciais da *Siparuna guianensis* frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (50,81% - 69,84%) esta sendo Gram-positiva, e *Citrobacter freundii* (52,77% - 80,93%) Gram-negativa, mostram que as amostras do período chuvoso dos óleos essenciais da *Siparuna guianensis* testados frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentaram potencial biológico com ótimos percentuais comparados aos padrões. No período seco, as amostras testadas apresentaram inibições médias acima de 50% para a bactéria *Listeria monocitogenes* de 52,1% a 79,1% e para a bactéria *Citrobacter freundii* de 50,6 a 66,9%, com potencial inibitório mínimo para bactérias Gram positivas e negativas.

Vale a pena ressaltar que a maior susceptibilidade das bactérias Gram-positivas frente aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas têm sido observadas em vários estudos como os desenvolvidos por Tepe et al., (2005) que avaliou o potencial biológico do óleo essencial da *Salvia tomentosa*, observou a ausência de atividade desse óleo para microorganismos Gram-negativos: EC, PM e *Pseudomas aeruginosa*. Guimarães (2010) avaliando cinco amostras de óleos essenciais observou que as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis. Lima et al., (2012) analisando duas amostras de óleos observou o mesmo efeito para bactérias Gram-positivas assim como Andrade et al. (2013) que teve que utilizar doses mais elevadas para atingir alguma atividade frente a bactérias Gram-positivas.

4.3.2 Concentração Inibitória Mínima

A identificação química dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial foi realizada pelo método de cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM), onde os principais constituintes do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet foram iso-shyobunona (21,5%) e shyobunona (19%) e germacreno-D (11%) para o período chuvoso e iso-shyobunona (16,2%), T-muurolol (11,7%) e espatulenol (9,5%) para o período seco. Segundo os estudos de Scherer e colaboradores (2009) a composição e a concentração dos componentes dos óleos essenciais podem variar, visto que essas diferenças químicas existentes podem refletir diretamente nas propriedades funcionais, como a atividade antimicrobiana. Alguns compostos identificados no óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet apresentam atividade antimicrobiana, como o limoneno (MAZZANTI; BATTINELLI; SALVATORE, 1998) e germacreno-D (NGASSAPA et al., 2003), ambos compostos encontrados majoritariamente presentes no óleo essencial do período seco e chuvoso.

1 Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima (IC₅₀) do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet sobre bactérias Gram-positivas e Gram-
 2 negativas.
 3

Microorganismos testados	Concentração Inibitória Mínima (µg.mL ⁻¹) período seco								
	R111	R112	R113	R121	R122	R123	R011	R012	R013
Bactérias Gram-positivas									
<i>S. aureus</i>	-	-	145,74	149,42	259,66	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	141,33	142,41	129,16	101,57	114,13	101,66	100,15	130,84	125,39
Bactérias Gram-negativas									
<i>C. freundii</i>	6,62	-	-	-	-	-	-	-	-
	Concentração Inibitória Mínima (µg.mL ⁻¹) período chuvoso								
	R061	R062	R063	R071	R072	R073	R081	R082	R083
Bactérias Gram-positivas									
<i>S. aureus</i>	112,25	160,17	127,20	249,67	105,33		173,09	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	261,23	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactérias Gram-negativas									
<i>C. freundii</i>	32,45	35,01	13,91	43,16	38,66	50,54	74,82	191,04	29,95
<i>P. aeruginosa</i>	214,01	-	245,18	-	-	-	-	-	-

4 Legenda: - não foi possível calcular o IC₅₀.

O nível de resistência ou susceptibilidade das bactérias estudadas para as amostras do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet foi determinada pela presença ou ausência de crescimento, onde as amostras do óleo essencial estudado que apresentou inibição maior que 50% sendo possível calcular a concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados obtidos nessa pesquisa revelam que o óleo essencial *Siparuna guianensis* Aublet demonstra atividade antimicrobiana em variadas magnitudes, visto que às vezes apresenta atividade o óleo essencial do período seco, ora às vezes apresenta atividade o essencial no período chuvoso. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de MIC das amostras e dos antibióticos.

Os valores de IC_{50} para as espécies bacterianas estudadas são apresentados na Tabela 9, onde podemos observar que as bactérias *L. monocytogenes* e *C. freundii* apresentaram maior susceptibilidade frente à ação do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet, sendo que todas as amostras atividade antibacteriana. Para o período seco obteve-se melhor atividade sobre a bactéria gram-positiva *L. monocytogenes*, e no período chuvoso apresentou melhor atividade sobre a bactéria gram-negativa *C. freundii*. As bactérias gram-positivas apresentam maior sensibilidade frente à ação de substâncias com atividade antimicrobiana, essa sensibilidade pode estar relacionada à estrutura e composição da parede celular das bactérias (SILVA et al, 2009). Para as bactérias *S. aureus* (período seco) e *C. freundii* (período seco) teve menor susceptibilidade ao óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet, não sendo possível calcular o valor de IC_{50} .

Andrade (2013) testou a atividade do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet sobre algumas bactérias, entre elas a *S. aureus*, apresentando concentração inibitória mínima $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para esta pesquisa foi encontrado concentrações inibitórias mínimas entre $145,74 - 259,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o período seco e $105,33 - 249,67 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo evidenciado nesta pesquisa maiores as concentrações de óleo essencial necessário para efeito inibitório. Andrade (2013) também testou a atividade do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet sobre a bactéria *L. monocytogenes*, apresentando concentração inibitória mínima de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para esta pesquisa foi encontrado concentrações inibitórias mínimas de $261,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o período chuvoso, sendo maior a concentração de óleo essencial nesta pesquisa necessário para efeito inibitório.

4.4 Teste de Atividade Aceticolinesterasica

A inibição *in-vitro* da enzima acetilcolinesterase das amostras dos óleos essenciais da *Siparuna guianensis* Aublet extraídos estão representados na tabela 10. As amostras R061, R062, R063, R071, R073, R081, R082 foram testadas e obtiveram os melhores resultados frente

à inibição da enzima acetilcolinesterase, com percentuais correspondente que vão de 56,4 % à 82,5%. As únicas amostras que obtiveram valores abaixo dos considerados não inibitórios foram a R072 e R083 com 16,6% e 8,2% respectivamente. O fármaco padrão utilizado, a Galantamina, apresentou $93,57\% \pm 0,7\%$ de inibição da AChE. Estudos realizados por Ping e colaboradores (2015) relatando atividade biológica dos óleos essenciais de *Acorus calamus*, rico em shyobunona e iso-shyobunona, apresentaram ótimos resultados em relação a inibição da enzima acetilcolinesterase. Desta forma, pode-se sugerir que a presença de shyobunona e iso-shyobunona nos óleos essenciais da *Siparuna guianensis* podem estar envolvidos na inibição da enzima acetilcolinesterase possuindo um ótimo potencial biológico contra o Alzheimer.

Tabela 10 – Inibição média dos óleos essenciais extraídos no período chuvoso.

Amostras	R061	R062	R063	R071	R072	R073	R081	R082	R083
Inibição Média	78,9	68,23	82,5	82,5	16,6	56,4	67,2	72,35	8,2
Desvio Padrão	2,1	2,12	3,6	1,6	2,63	1,72	3,2	2,83	3,41
Coefficiente de Variação	0,03	0,03	0,04	0,02	0,15	0,03	0,05	0,04	0,41

A inibição da AChE possui um papel importante nas pesquisas feitas até a presente data, pois demonstraram a maior eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer, que está associada com “déficits” dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. O tratamento sintomático da doença envolve primariamente a restauração da função colinérgica. Sugere-se, portanto, que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar a qualidade de vida do paciente possuidor da doença. (SOUZA, 2012).

4.5 Teste Antioxidante (DPPH)

O método utilizado é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (ALVES et al., 2010). Na tabela 11 pode-se observar os resultados em relação à porcentagem de inibição do DPPH das amostras do período chuvoso e seco dos óleos essenciais de *Siparuna guianensis* Aublet.

Tabela 11 – Inibição Média dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet

Amostras (100 µg.mL ⁻¹)	DPPH	
	Inibição (%)	
	Média	Desvio Padrão
Período chuvoso	3,1	2,1
Período seco	0,96	0,76

Como pôde-se observar os óleos essenciais de *S. guianensis* apresentaram um 3,1% e 0,96% de inibição do DPPH das amostras no período chuvoso e seco respectivamente, em concentração de 100 µg/mL, fato que determinou não minimizar as concentrações por ser considerado um valor baixo. Logo, não foi possível calcular o EC50, que é a quantidade de antioxidantes presentes nos óleos essenciais capaz de sequestrar 50 % dos radicais livres DPPH da solução. Quanto menor o valor desta medida, menor será a quantidade das amostras exigidas para reduzir 50 % do radical livre DPPH e conseqüentemente maior sua atividade antioxidante (ANDRADE et al., 2013a).

4.6 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Para averiguar a toxicidade sobre *A. salina* a metodologia mais adequada e utilizada neste estudo foi o procedimento segundo Mayer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993). Uma amostra dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet foi testada nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 µg.mL⁻¹ em volume de 10 mL, e utilizou-se o branco chamado de controle. A contagem dos sobreviventes foi realizada após 24 horas com auxílio de uma lupa. A Tabela 12 mostra o resultado obtido:

Tabela 12 - Número de náuplios mortos

	1000 µg.mL ⁻¹		500 µg.mL ⁻¹		250µg.mL ⁻¹		125µg.mL ⁻¹		C	
	V*	M*	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M
A*	0	10	0	10	6	4	10	0	10	0
D*	0	10	0	10	7	3	10	0	10	0
T*	0	10	0	10	7	3	10	0	10	0
X*	0	10	0	10	6,7	3,3	10	0	10	0

*A = amostra; *D = Duplicata; *T = triplicata; *X = media; *V = vivos; *M = mortos

Os resultados mostram que nas concentrações de 1000 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹ de uma amostra dos óleos essenciais coletados e extraídos no verão todos os náuplios da *Artemia salina*

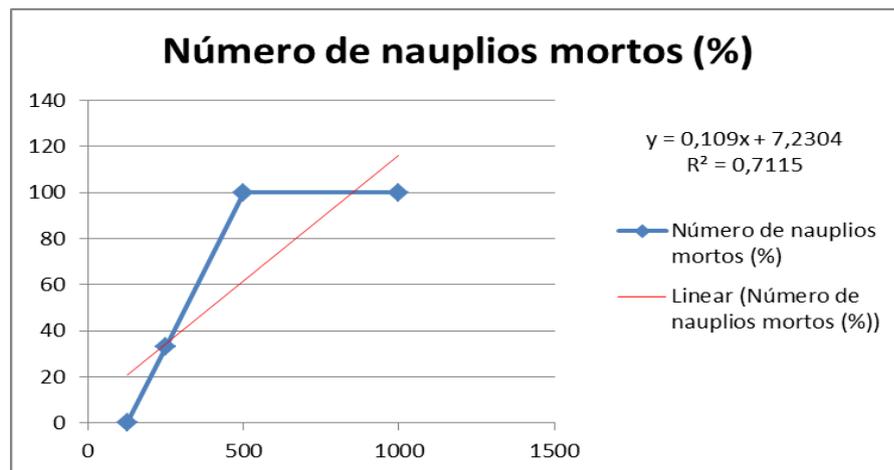
morreram, na concentração $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quase 7% dos náuplios viveram e na concentração mínima testada todos os náuplios sobreviveram, os quais são comparados com o controle, e representados em porcentagem de mortalidade conforme a Tabela 13:

Tabela 13 – Dados de atividade frente à *Artemia salina* para *S. guianensis* Aublet

Concentração	Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100%
500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100%
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	33%
125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0%
Controle	0%

Como não houve mortalidade nos tubos controle não foi necessário aplicar a fórmula Abbott, pois os resultados não são alterados. Calculando a média dos valores obtidos do óleo essencial da *Siparuna guianensis*, foram encontrados os resultados de 100% de mortalidade para a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 100% para a concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 33% para a concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 0% e para a concentração de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Figura 19.

Figura 19 – Curva de atividade frente à *A. salina*



Utilizando a fórmula da regressão linear $Y = A + BX$ (Figura 25), podemos calcular a DL50 ($Y = 50$), onde 42,76 e 7,23 são os valores de A e B, respectivamente, encontrando X igual a $392,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pela análise dos dados, pode-se verificar que o óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet, não apresentou completa letalidade frente à *Artemia salina*, sendo considerado moderadamente tóxico (DL 50% de 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo sido encontrado o valor de DL50 de $392,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os controles feitos com o solvente DMSO não apresentou influência sobre os resultados.

5 CONCLUSÕES

A espécie *Siparuna guianensis* Aublet possui uma vasta indicação fito-terapêutica verificada em várias regiões do país podendo ser comprovada pela grande quantidade de metabólitos secundários encontrados nos óleos essenciais extraídos dos indivíduos desta planta o qual possuem um grande potencial biológico os quais foram observados neste trabalho.

Diante dos resultados obtidos no cálculo dos teores dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet extraídos no período chuvoso e seco apresentaram rendimentos divergentes com as pesquisas encontradas na literatura. Os menores valores ocorreram no período reprodutivo da planta que coincidiram com a estação chuvosa na região, já os maiores valores se deram no período vegetativo ocorrendo na estação seca e sendo ainda atribuído a estes resultados mais um fator que foi o alto estresse hídrico na região.

Em relação à composição química, os constituintes químicos caracterizados nas amostras extraídas dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet durante o período seco e chuvoso obtiveram praticamente os mesmos resultados variando apenas nas quantidades em cada amostra e em relação aos componentes majoritários ressaltando a predominância do composto iso-shyobunona com as maiores porcentagens dos teores da composição volátil sugerindo assim uma fonte alternativa não só desta substância mas como os demais derivados da shyobunona como a iso-shyobunona, epi-shyobunona e o epi-shyobunol. No período chuvoso houve a presença do aromadendreno como um dos constituintes majoritários e ausência da substância selinadieno que ocorreu apenas no período seco e este não foi identificado na estação chuvosa. Em relação aos componentes voláteis majoritários da *Siparuna guianensis* Aublet encontrados na literatura, ocorreram em todas as amostras a presença de substâncias também identificadas nos trabalhos citados como espatulenol e germacreno-D, ambos com altas concentrações percentuais da composição química dos componentes voláteis de *S. guianensis* Aublet.

Quanto à atividade biológica dos óleos essenciais da *Siparuna guianensis* também foram alcançados bons resultados. Em relação à inibição média de micro-organismos como a bactéria Gram-negativa *Citrobacter freundii*, para todas as amostras extraídas no período chuvoso e testadas, suas inibições médias corresponderam aos percentuais de 52,77% a 80,93%, um ótimo potencial antibacteriano se tratando de uma bactéria Gram-negativa que possuem duas camadas em sua membrana plasmática sendo a mais externa hidrofílica e a interna lipofílica. A membrana mais externa uma barreira contra compostos lipofílicos como os óleos

essenciais dificultando sua ação biológica. Quando a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* as porcentagens médias inibitórias foram de 50,81% a 69,84% e frente às bactérias *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* os resultados foram relativamente baixos. Os resultados do período seco da atividade antimicrobiana das amostras testadas apresentaram inibições médias acima de 50% para a bactéria *Listeria monocytogenes* de 52,1% a 79,1% e para a bactéria *Citrobacter freundii* de 50,6 a 66,9%, com potencial inibitório mínimo para bactérias Gram positivas e negativas.

Em relação às amostras R061, R062, R063, R071, R073, R081, R082 testadas obtiveram os melhores resultados frente à inibição da enzima acetilcolinesterase, com percentuais correspondentes que vão de 56,4 % a 82,5%. As únicas amostras que obtiveram valores abaixo dos considerados não inibitórios foram a R072 e R083 com 16,6% e 8,2% respectivamente. O fármaco padrão utilizado, a Galantamina, apresentou 93,57% \pm 0,7 % de inibição da AChE. A atividade biológica dos óleos essenciais de *Acorus calamus*, rico em shyobunona e iso-shyobunona, apresentaram ótimos resultados em relação a inibição da enzima acetilcolinesterase. Devido à presença desses mesmos compostos e ainda levando em consideração a sua majoritariedade nos teores dos óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet caracterizados nesta pesquisa, sugerem-se que a inibição da enzima acetilcolinesterase pode ser a eles atribuído, possuindo potencial biológico contra o Alzheimer.

Analisando os resultados obtidos em relação à inibição do DPPH das amostras no período chuvoso e seco, pôde-se observar os óleos essenciais de *S. guianensis* Aublet apresentaram percentuais de 3,1% e 0,96% respectivamente, fato que determinou não minimizar as concentrações por ser considerado um valor baixo. Logo, não foi possível calcular o EC50, que é a quantidade de antioxidantes presentes nos óleos essenciais capaz de seqüestrar 50 % dos radicais livres DPPH da solução. Quanto menor o valor desta medida, menor será a quantidade das amostras exigidas para reduzir 50 % do radical livre DPPH e conseqüentemente maior sua atividade antioxidante.

Referente ao teste de toxicidade frente à *Artemia salina* os resultados alcançados pelas concentrações utilizadas em meio aos náuplios deste crustáceo não apresentou completa letalidade frente à *Artemia salina*, sendo considerado moderadamente tóxico (DL 50% de 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo sido encontrado o valor de DL50 de 392,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os controles feitos com o solvente DMSO não apresentou influência sobre os resultados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **J. Etnopharmacol.** V. 74, p.113-125, 2001.

ALCÂNTARA, J.M.; YAMAGUCHI, K.K.L.; SILVA, J.R.A.; VEIGA JUNIOR, V.F, 2010. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). *Acta Amazônia* vol.40, nº. 3, Manaus Sept. 2010.

AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431 – 434, may./set. 2010.

AMATATONGCHAI, M. et al. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 97, n. 0, p. 267-272, 2012.

ANDRADE, M.A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, V.2, 384-397, 2013.

ANDRADE, M.A. Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, Caracterização das Estruturas Secretoras e Avaliação do Potencial Biológico. 2013. 227 p. Tese (Pós-Graduação em Agroquímica, doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.

ANGELY, J. Flora analítica e fitogeográfica do estado de São Paulo. São Paulo: Phytton, 1969. P. 117-122.

APPROBATO, A.U.; GODOY, S.A.P. Levantamento de diásporos em áreas de cerrado no Município de Luiz Antônio, SP. *Hoehnea*, v.33, n.3, p.385-401, 2006.

ARAÚJO, I.S. Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará. 2011. 103 p. Dissertação para a obtenção de título de mestre em biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. 2011.

AUBLET, Jean Baptiste Christophe Fusée. Histoire des Plantes de la Guiane Française. 1775, 4 vols. RARE BOOK QK243.A82. London and Paris.

BARROS, W.M., VALENTINI, C.M.A., SILVA, L.E. *Siparuna guianensis*: obtenção do óleo essencial e avaliação do potencial farmacológico. 2015. Universidade Federal do Paraná-Setor Litoral, PR, Brasil e Instituto Federal do Mato Grosso, MT, Brasil-Multi-Science Journal 2015; 1(2): 59-65.

BERGAMASCHI, J. M. Terpenos. Terpenoil – Tecnologia Orgânica. Jundiaí, p. 1–7, 2014. Disponível em: <http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf>. Acesso em: 20 junho de 2016.

BLACK, J.G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.829, 2002.

BOMONO R.A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin. Infect. Dis.** v. 43, p. 49-56, 2006.

BRAZ-FILHO, R., Gabriel, S.J., GOMES, C.M.R., GOTTLIEB, O.R., BICHARA, M. G.A., MAIA, J.G.S. Oxoporphine Alkaloids from *Fusea Longifolia* and *Siparuna Guanensis*. *Phytochemistry*, 15, 1187-1188, (1976).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 2010. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d15359461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 04. Nov.2010.

BROOKS, G. F. et al. Microbiologia Médica. 24 ed. São Paulo. Mcgraw Hill Interamericana do Brasil. 2008. 653p.

CALDERON, L.A. et al. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da amazônica legal. *ResarchGate. REU, Sorocaba, SP*, v. 36, n. 3, p. 15-41, dez. 2010.

CARBONARI, K.A. **Avalidação do Poetencial Antioxidante** (In vitro e In vivo) e **Antiinflamatório de** *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CASTELLANI, D.C. et al. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catiguá* A. Juss) e negrmina (*Siparuna guianensis* Aublet) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 62-65, 2006.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CHEN, H.P. YANG, K. ZHENG, L.S. YOU, C.X. Cai, Q. WANG, C.F. Repellant and insecticidal activities of shyobunone and isoshyobunone derived from the essential oil of *Acorus calamus* rhizomes. *Pharmacognosy magazine* [0973-1296] Chen, Hai-Ping yr:2015 vol:11 iss:44 pg:675.

CIELO FILHO, R.; SANTIN, D.A. Estudo florístico e fitossociológico de um fragmento florestal urbano- Bosque dos Alemães, Campinas, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, v.25, n.3, p.291-301, 2002.

CIÉSLA, L. et al. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, n. 0, p. 126-135, 2012.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada – Segunda Edição. 2000.

CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002. CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003a.

COSTA JÚNIOR, R.F. et al. Florística arbórea de um fragmento de Floresta Atlântica em Catende, Pernambuco - Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.2, n.4, p.297-302, 2007.

CRISAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom. J. Virol.**, v. 46, n. 3-4, p. 115-33, 1995.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011. ISSN 0308-8146.

DINIZ, J.A. *Siparuna guianensis* Aublet Como Nova Fonte de α -Bisabolol para o Controle de *Rhipicephalus microplus*. 2014. 94 p. Dissertação (Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

DORAN, J.C. *Eucalyptus* leaf oil: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Inkata, p.11- 28, 1991.

DUARTE, M.C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Revista MultiCiência*, v.07, 2006.

DUARTE, T. G. Um estudo etnoecológico sobre o uso de recursos vegetais em Nova Xavantina, Mato Grosso. 2001. 135p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

FAIRCHILD, W. L. et al. Toxicidad aguda y crónica de dos formulaciones del plaguicida Piretroide Deltametrina ante anfípodos, camarones y larvas de langosta. Los océanos y Subdivisión de Ciencia Pesca y Océanos de Canadá. Informe Técnico Pesca y Ciencias Acuáticas 2876. 2010.

FERREIRA, B.L.A. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Fischer, D.C.H.; Limberger, R.P.; Henriques, A.T.; Moreno, P.R.H. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from southeastern Brazil. *J. Essent. Oil Res*, v.17, p.101–102, 2005.

FENNEL, C.W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FOGLIO M. A. et al. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multiciência. UNICAMP. SP, 2009.

FONTELLE, M. G. L. C. **Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no conteúdo da saúde e da doença.** 1997. 141p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

FURTADO, S.K. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo*. 2006.127p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GONZÁLEZ-LOZANO, M. C. et al. Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, México. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, n. 45, p. 121-127, 2010.

GOODMAN, G. A. et al. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2003. 2148 p.

HERRMANN, G. et al. Meio Biótico. Apa Carste de Lagoa Santa - MG. Belo Horizonte: IBAMA, CPRM e GERIDE, 1998. v.2, 92p.

HOEFEL, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Bol. Farmacot.**, v. 11, p. 1-4, 2006.

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1895. V.2, p. 915.

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1906. Suppl. 1, p. 400

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1908. Suppl. 3, p. 166

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1913. Suppl. 4, p. 221

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1921. Suppl. 5, p. 243

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1929. Suppl. 8, p. 225

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1938. Suppl. 9, p. 261

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1947. Suppl. 10, p. 215

INDEX, Kewensis. Plantarum Phanerogamarum. Oxford: Clarendon, 1966. Suppl. 13, p. 127

INVENTÁRIO de plantas medicinais do estado da Bahia. Salvador: SEPLANTEC, 1979. P 636-637.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. 120-26, 2005.

- JANGOUX, J. New species of Monimiaceae (Bracteantus & Siparuna) from Brazil and adjacent areas of Bolívia, Colombia and Peru. *Bol. Mus. Para Emílio Goeldi Ser.Bot. Belém*, V. 7, n.1,p.115-152, 1991.
- KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.
- KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 1465.
- LEITÃO, G.G., EL-ADJI, S.S., DE MELO, W.A.L., LEITÃO, S.G., Brown, L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, n.28, v.12, p.2041-2051, 2005.
- LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*, 4th ed.; Editora Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brasil, Volume 2, p.175–177, 2002.
- LUCENA, H. F. S. **Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmanni* (Benth.) Harley (Lamiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba/UFPB – João Pessoa, 2012.
- MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12ª ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1128 p.
- MARTINEZ, S. et al. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 588, n. 1, p. 68-73, 2006.
- MATTOS, J. R. Monimiáceas do estado de São Paulo. *Arq. Bot. Est. São Paulo*. São Paulo, v. 4, n 4-6, p. 247-258, 1969.
- MAZZANTI, G., BATTINELLI, L., SALVATORE, G. (1998). Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Journal Flavour and Fragrance*, v.13, p.289-294, 1998.
- MEYER, B. N. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*, New York, v. 45, p. 31 – 34, 1982.
- MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M. Atividade Sequestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Geneva: IUPAC, 2006.
- MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of

antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MONTANARI, R.M. Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais de Espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, dezembro, 2010.

MUSA, K. H. et al. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4102-4106, 2013.

NEGRI, G., SANTI, D., TABACH R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 5, p.1024-1034, 2012.

NGASSAPA, O., RUNYORO, D.K.B., HARVALA, E., CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm.f.) Spreng. (Verbenaceae). **Journal Flavour and Fragrance**, v.18, p.221-224, 2003.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, B.A.S.; SILVA, M.A. Lista de nomes populares de plantas nativas da região geoeconômica de Brasília, DF. Brasília: RECOR (reserva Ecológica do IBGE), 2002. Disponível em:<<http://www.recor.org.br/publicacoes/artigos.html>>. Acesso em: 5 mai. 2008.

PEREIRA, M. V. L. Nova espécie de *Siparuna* (Monimiaceae, Siparunoidae). *Bradea*, Rio de Janeiro , V. 4, n. 36, p.291-294, 1987.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu. 325p, 2003

REBOUÇAS, L.M.C. Terpenos de *Siparuna guianensis*: Aldeídos via Epoxidação de Duplas terminais. Master's Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, 17 February, 1984.

RENNER E HAUSNER, G. New species of *Siparuna* (Monimiaceae) I. Four new species from Ecuador and Colombia. *Novon*, St. Louis, v. 5, n. 1, p. 61-70, 1995.

RODRIGUES, L.A. et al. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias-MG. *Boletim Agropecuário*, n.52, p.1-34, 2002.

RODRIGUES, R.R. A vegetação de Piracicaba e municípios do entorno. Circular Técnica IPEF, n.189, p.1-17, 1999.

PASA, M. C.; **A utilização dos recursos vegetais no Vale do Aricá, Mato Grosso: um**

estudo etnoecológico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p.150, 1999.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia**, n.13. p. 28-32, 2000.

SANTOS, M. Qualidade e potencial funcional da porção comestível e do óleo de frutos de palmeiras nativas oriundas do Amapá. 2012. 170p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Paraíba, Areia, 2012.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. Bras. Plan. Med.** v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHIMOLLER, E. **Levantamento preliminar das plantas medicinais utilizadas pelos índios Bakairi, Aldeia Pakueran (Paranatinga, Mato Grosso).** Monografia de Graduação. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p: 55 1997.

SCHULTES, R. E. The role of the ethnobotanist the search for new medicinal plants. *Lloydia* n.25, p: 257 – 266,1962.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M.L. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. Bras. Plan. Med.** v.11, n.3, p: 257-262, 2009.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p:124-128, 2009.

SOMAVILLA, N. V. **Utilização de plantas medicinais por uma comunidade garimpeira do Sudeste mato-grossense, Alto Coité - Poxoréo / Mato Grosso.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p. 93, 1998.

SOUZA, C.D. FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142, 2006.

SOUZA, L. F. de.; **Levantamento etnobotânico na localidade de São Gonçalo, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** 41p. Monografia de Graduação. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 1992.

SOUZA, S.P.; VALVERDE, S.S.; SILVA, R.L.N.R.; LIMA, K. S.C.; LIMA, A. L.S.; Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. *Revista Fitos* Vol. 7 - nº 04, 2012.

SOUZA, V.C. LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.* Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.

Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidante activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem*, n.90, p.333–340, 2005.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de Plantas com Atividade Antiacetilcolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, Fortaleza, v. 26, n. 3, p. 301-304, dez./nov. 2003.

VALENTINI, C.M.A.; COELHO, M.F.B.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E. *Siparuna guianensis* aublet (negramina): uma revisão, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.1, p.96-104, 2010a.

VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E.; MACIEL, E. N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA Jr. P. T.; DALL’OGLIO, E. L. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. *Química Nova*, v. 33, p.1506-150, 2010b.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, p. 47-69, 1991.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana —*in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VIEIRA et al., 2008. **Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures**. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*. vol.80, V.3. Rio de Janeiro - RJ. 2008.

VIEIRA, F. R.; ALVES, R. B. N.; Desafios para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil. In: Coelho, M. F. B.; Costa Junior, P.; Dombroski, J. L. D. (Org.). **Diversos Olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Mediciniais**. 1ª ed. CUIABÁ: UNICEN PUBLICAÇÕES, p. 157-181, 2003.

VINUTHA, B. et al. Screening of Selected Indian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359-363, jan. 2007.

APÊNDICE A - Espécies do gênero *Siparuna* e sua distribuição no território brasileiro

Nome científico	Região onde ocorre	Referência
<i>Siparuna alternifolia</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna amazônica</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna aspérula</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna bifida</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna brasiliensis</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna camporum</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna chlorantha</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1908
<i>Siparuna cristata</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna discolor</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna foetida</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna foliosa</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna globra</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna guianensis</i>	Todos os Biomas Brasileiros	ANGELY, 1969; MATTOS, 1969
<i>Siparuna hylophila</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1908
<i>Siparuna krukovii</i>	Todos os Biomas Brasileiros	GLEASON, 1935
<i>Siparuna lanceolata</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna lindeni</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna lipidantha</i>	Todos os Biomas Brasileiros	LOIZEAU; SPICHTIGER, 1987
<i>Siparuna micranta</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna minutiflora</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1908
<i>Siparuna mollicoma</i>	Todos os Biomas Brasileiros	(INDEX, 1895
<i>Siparuna mourae</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1908
<i>Siparuna obvata</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna oligandra</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna oligocarpa</i>	Todos os Biomas Brasileiros	MATTOS, 1969
<i>Siparuna poeppigii</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna reginae</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna ruficeps</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna paniculata</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna sprucei</i>	Todos os Biomas Brasileiros	RENNER; HAUSNER, 2005
<i>Siparuna thea</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1895
<i>Siparuna velutina</i>	Todos os Biomas Brasileiros	INDEX, 1947
<i>Siparuna cavalcantei</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna camporium</i>	Amazônia	VALENTINI, 2010a
<i>Siparuna depressa</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna duckeana</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna energinata</i>	Amazônia	INDEX, 1966
<i>Siparuna espinhacensis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna heteropoda</i>	Amazônia	INDEX, 1923
<i>Siparuna insculpta</i>	Amazônia	INDEX, 1913
<i>Siparuna itacaiunensis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna manaoensis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna microphylla</i>	Amazônia	INDEX, 1908
<i>Siparuna monogyna</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991

Continuação da Tabela 1

Nome científico	Região onde ocorre	Referência
<i>Siparuna obconica</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna pachiantha</i>	Amazônia	SMITH, 1940
<i>Siparuna patasiformis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna rionegrensis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna sarmentosa</i>	Amazônia	INDEX, 1908
<i>Siparuna savanicola</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna servicornis</i>	Amazônia	INDEX, 1908
<i>Siparuna solimonensis</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna tubinambarum</i>	Amazônia	JANGOUX, 1991
<i>Siparuna apiosyce</i>	Sudeste	FISCHER, 1997
<i>Siparuna arianae</i>	Sudeste	PEREIRA, 1936
<i>Siparuna chiridota</i>	Sudeste	INDEX, 1895)
<i>Siparuna chordata</i>	Sudeste	INDEX, 1926
<i>Siparuna cujabana</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna echinata</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna erythrocarpa</i>	Sudeste	MATTOS, 1969
<i>Siparuna estrellensis</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna gesnerioides</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna glossostyla</i> (Sudeste	MATTOS, 1969
<i>Siparuna goudotiana</i>	Sudeste	INDEX, 1908
<i>Siparuna grandiflora</i>	Sudeste	RENNER; HAUSNER,2005
<i>Siparuna holtooi</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna kunthii</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna lagopus</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna langsdorfii</i>	Sudeste	INDEX, 1926
<i>Siparuna laurifolia</i>	Sudeste	RENNER; HAUSNER,2005
<i>Siparuna lepidota</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna macrophylla</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna mollis</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna mutsii</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna patiolaris</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna sessiliflora</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna steleandra</i>	Sudeste	INDEX, 1908
<i>Siparuna tenuipes</i>	Sudeste	MATTOS, 1969
<i>Siparuna ternata</i>	Sudeste	RENNER; HAUSNER,2005
<i>Siparuna trianaei</i>	Sudeste	INDEX, 1895
<i>Siparuna bahiensis</i>	Bahia	INDEX, 1926
<i>Siparuna cymosa</i>	Bahia	INDEX, 1926

APÊNDICE B – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *L. monocytogenes*.

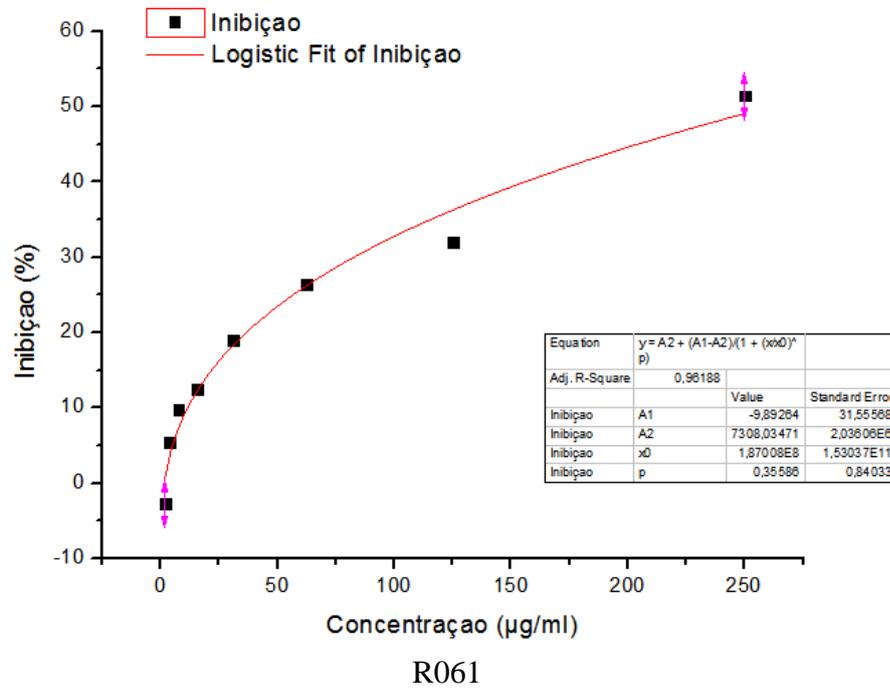


Figura 2 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *P. aureginosa*.

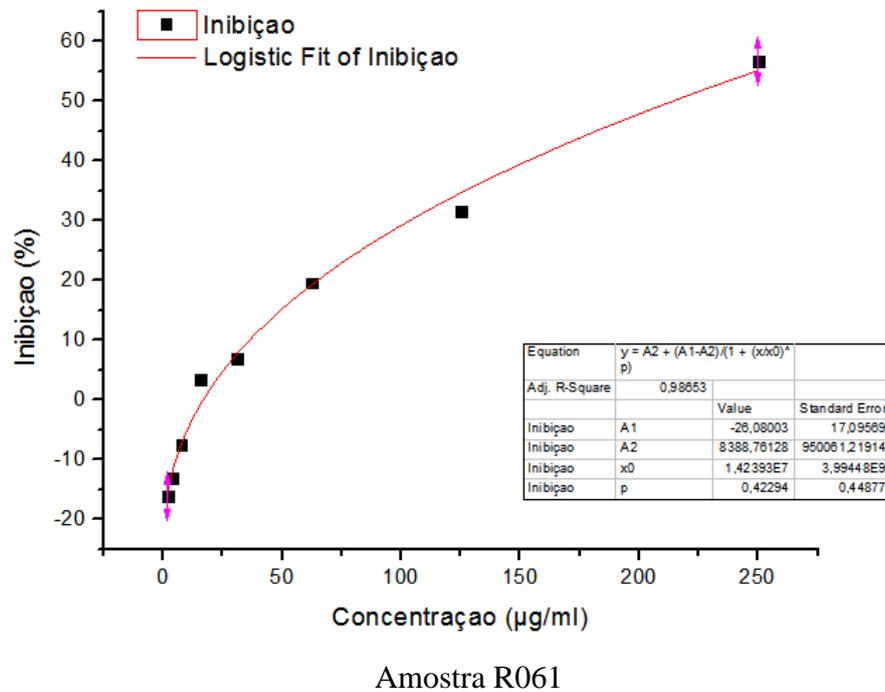
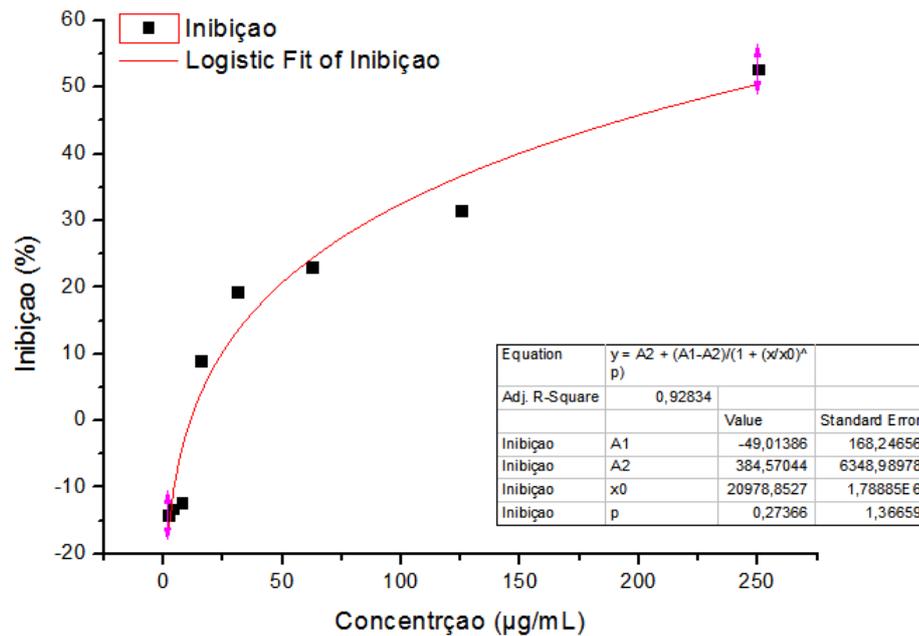
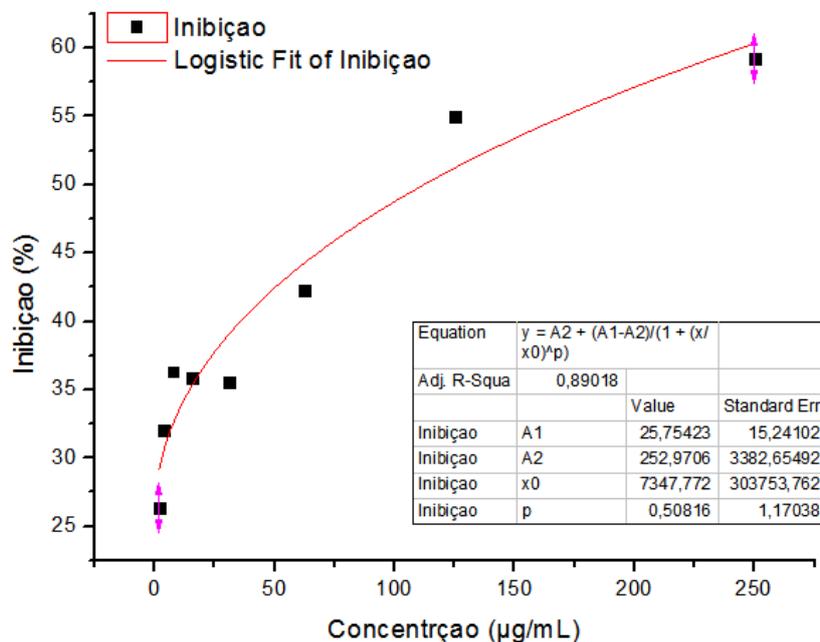


Figura 3 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *P. aureginosa*.



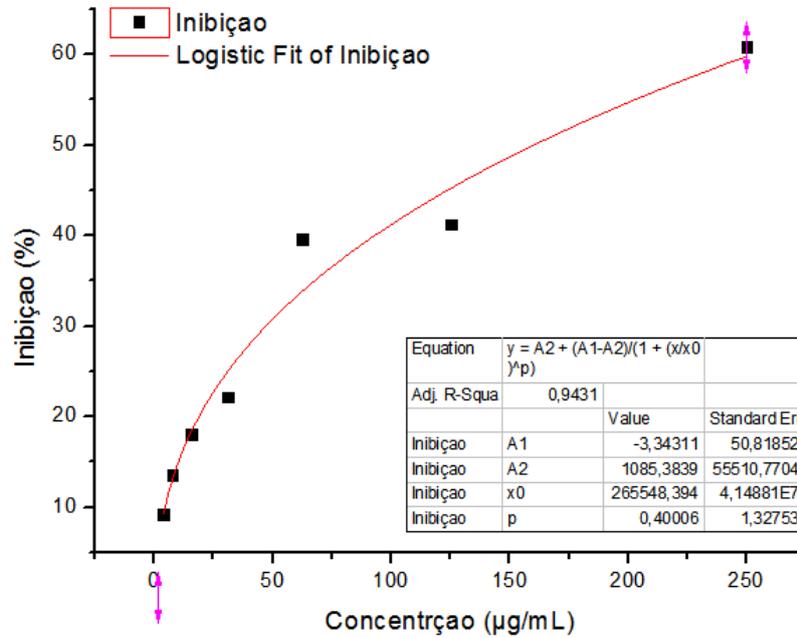
Amostra R063

Figura 4 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *S. aureus*.

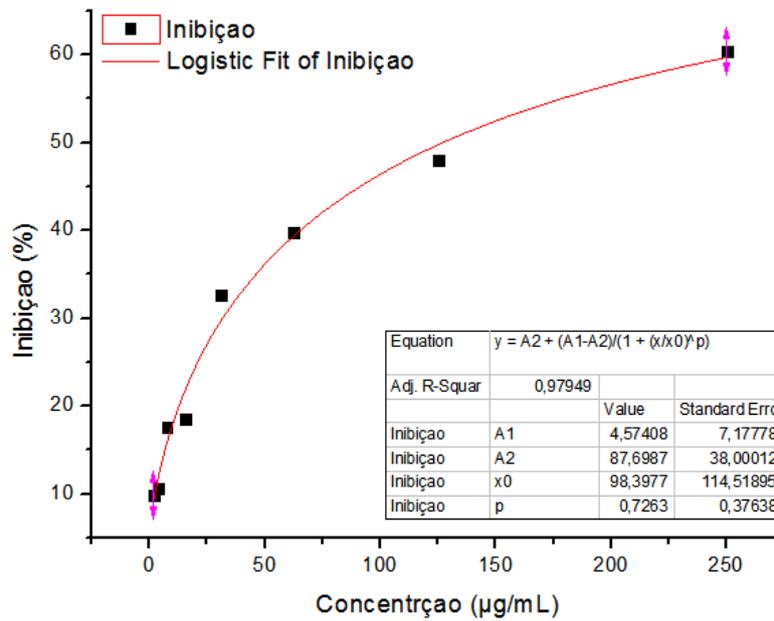


Amostra R061

Figura 5 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *S. aureus*.

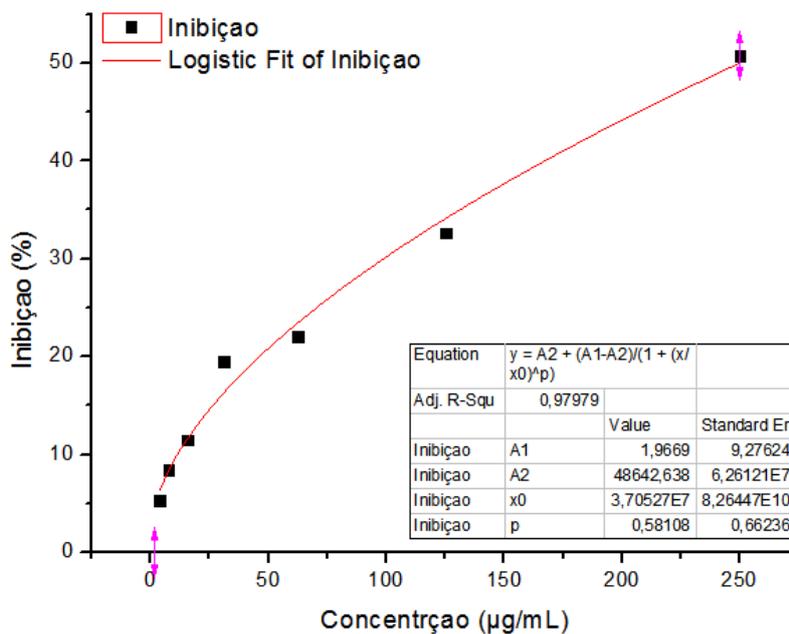


Amostra R062

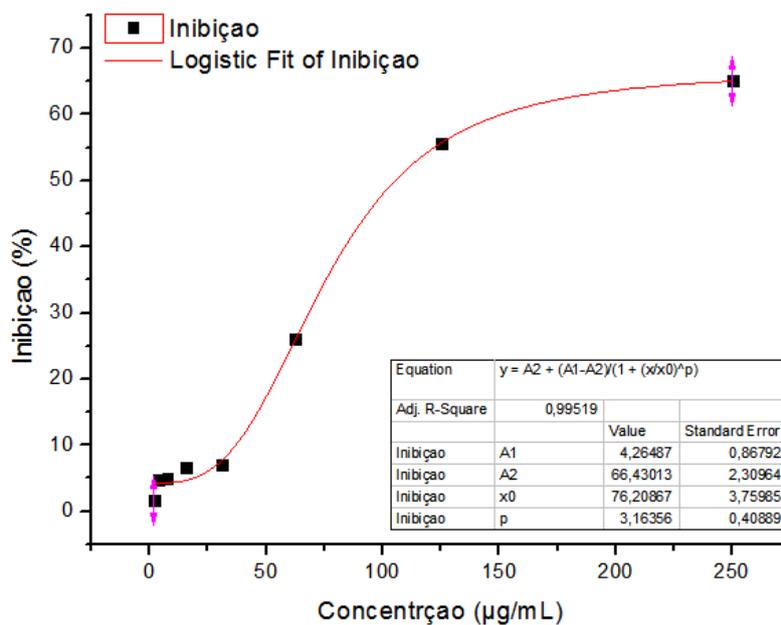


Amostra R063

Figura 6 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *S. aureus*.



Amostra R071



Amostra R072

Figura 7 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *S. aureus*.

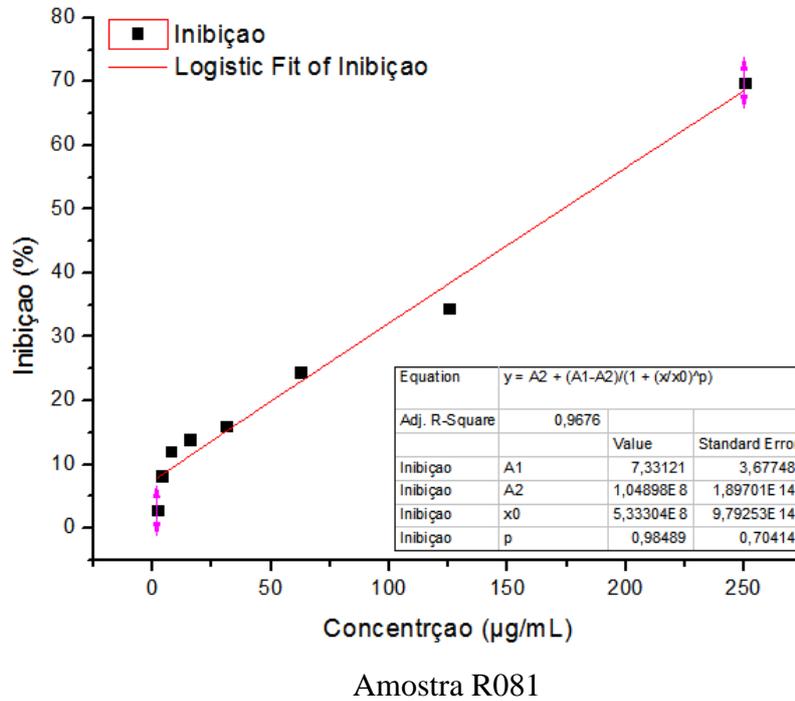


Figura 8 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *C. freundii*.

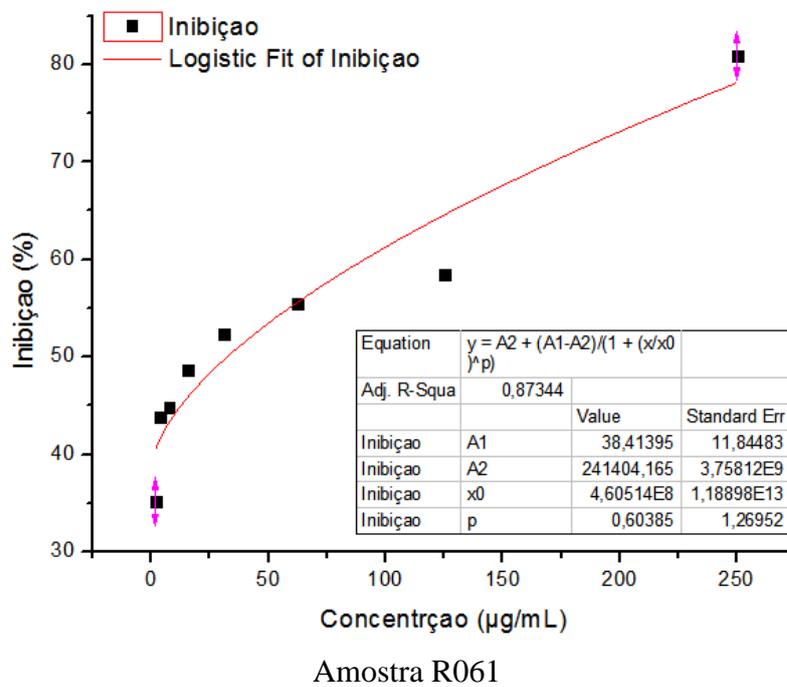
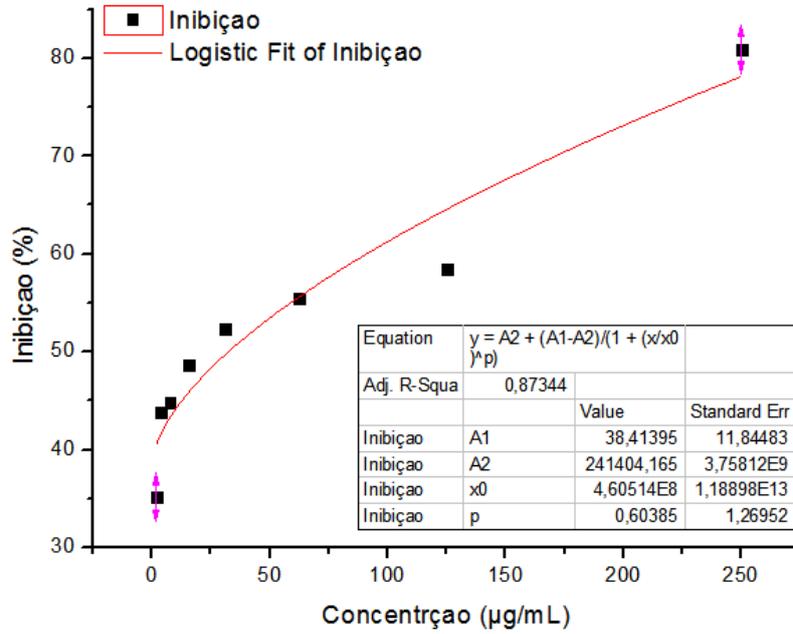
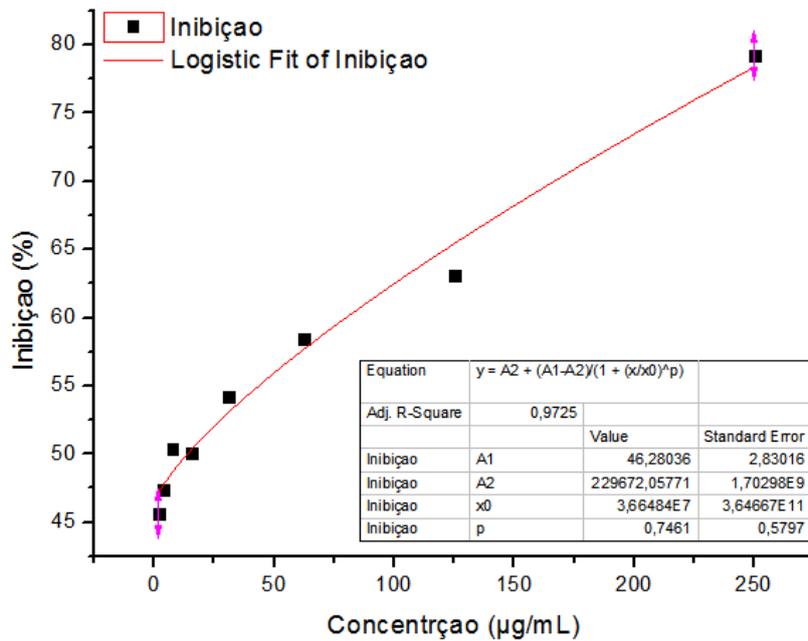


Figura 9 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *C. freundii*.



Amostra R062



Amostra R063

Figura 10 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *C. freundii*.

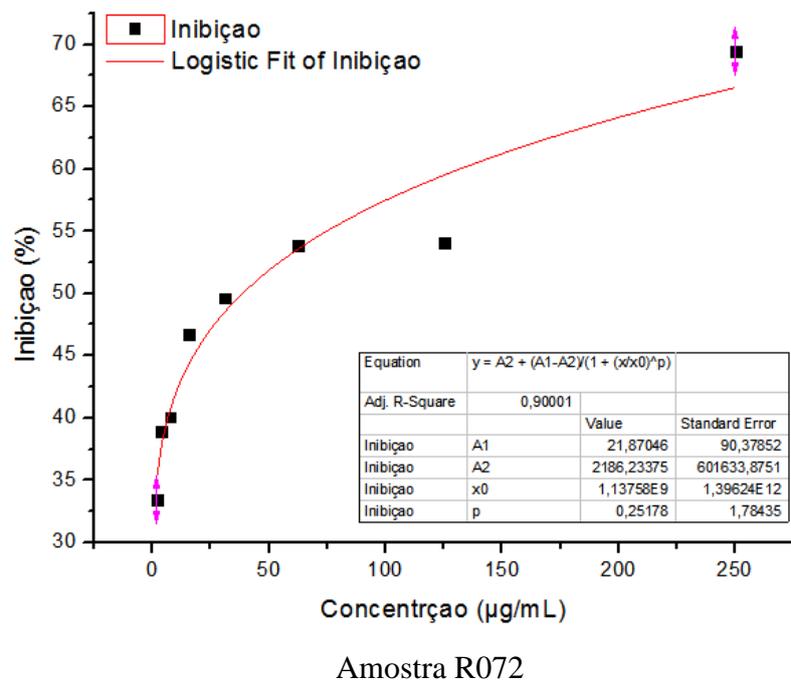
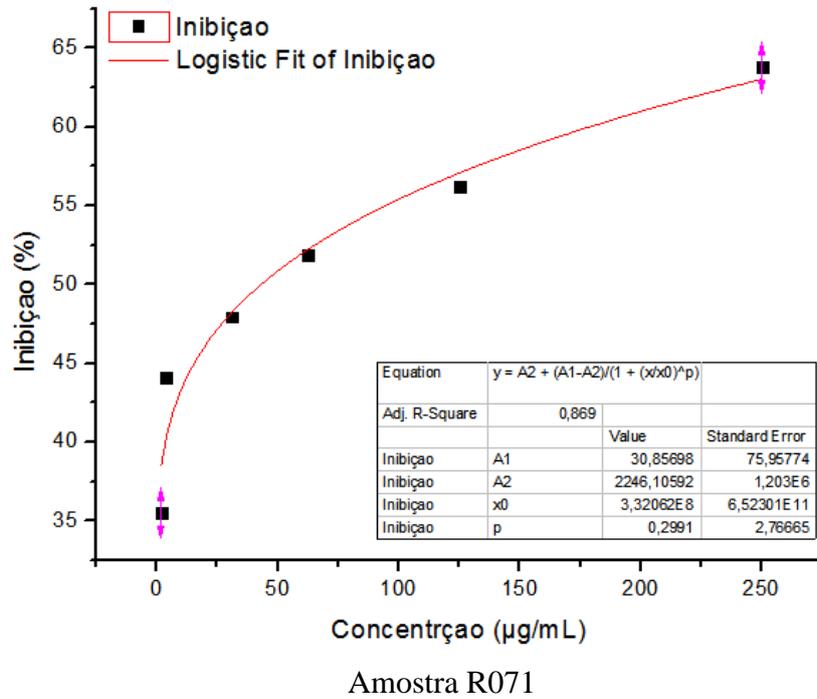
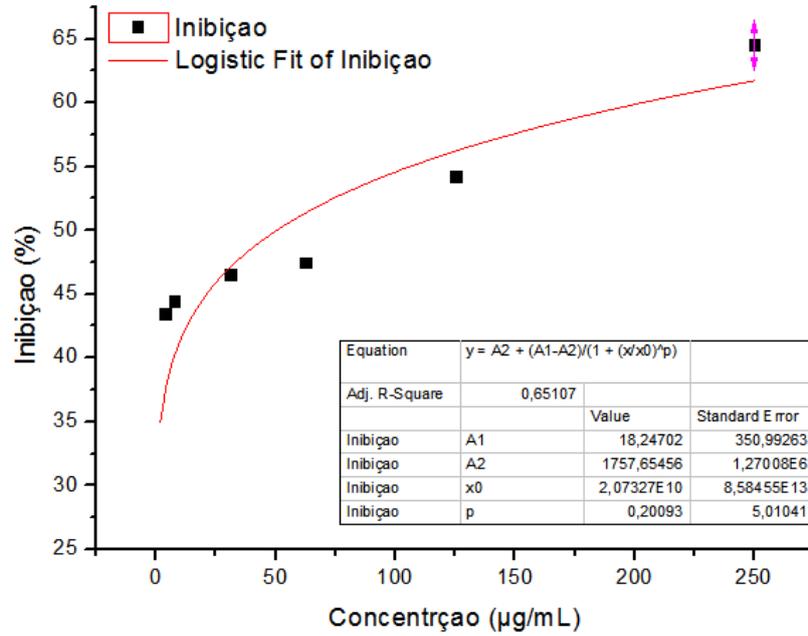
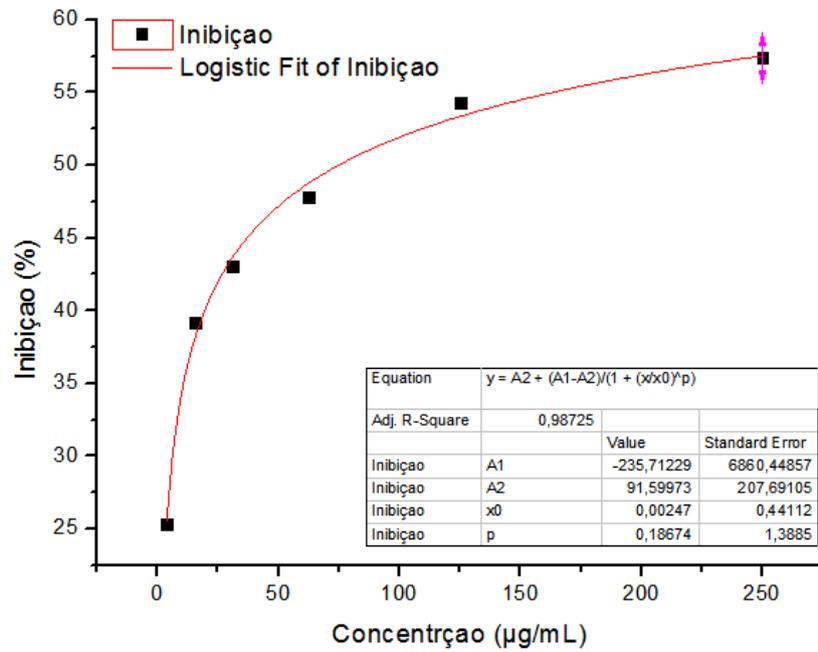


Figura 11 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *C. freundii*.

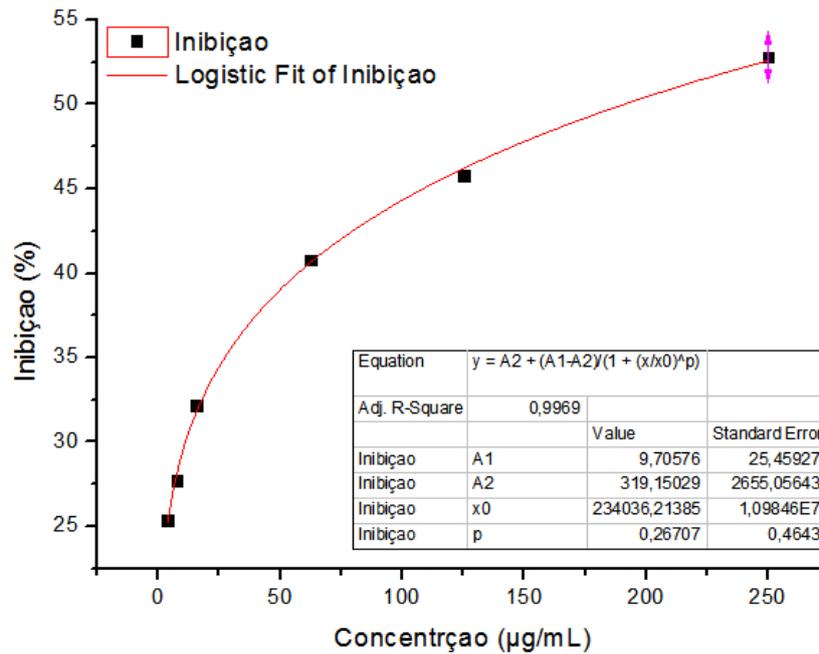


Amostra R073

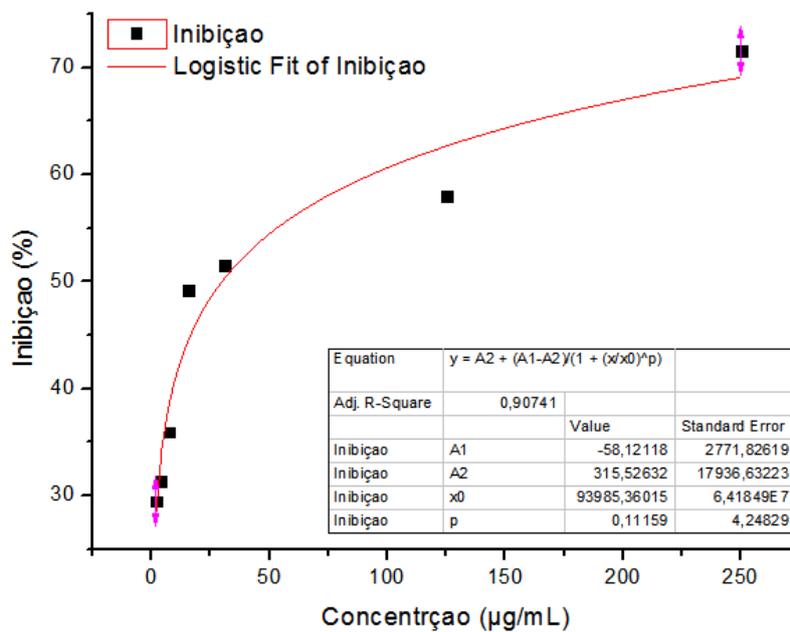


Amostra R081

Figura 12 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período chuvoso sobre a bactéria *C. freundii*.

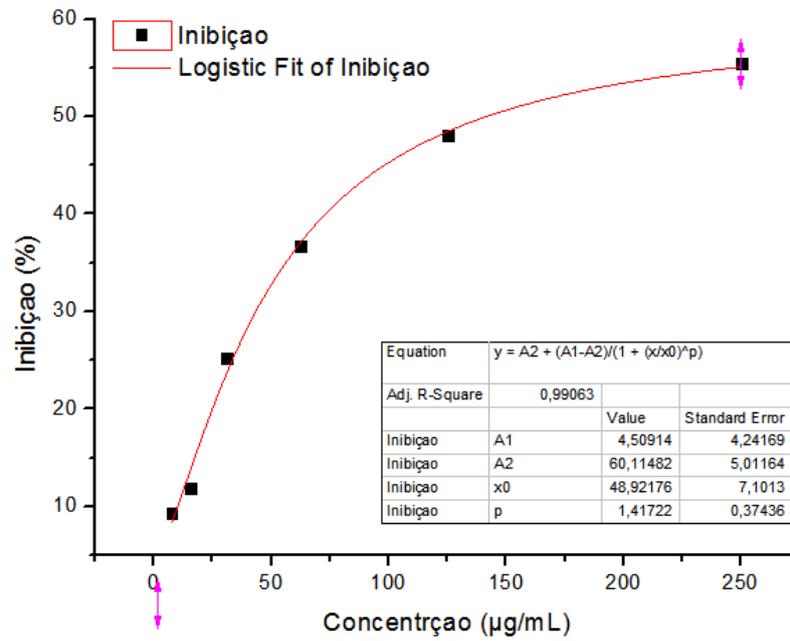


Amostra R082

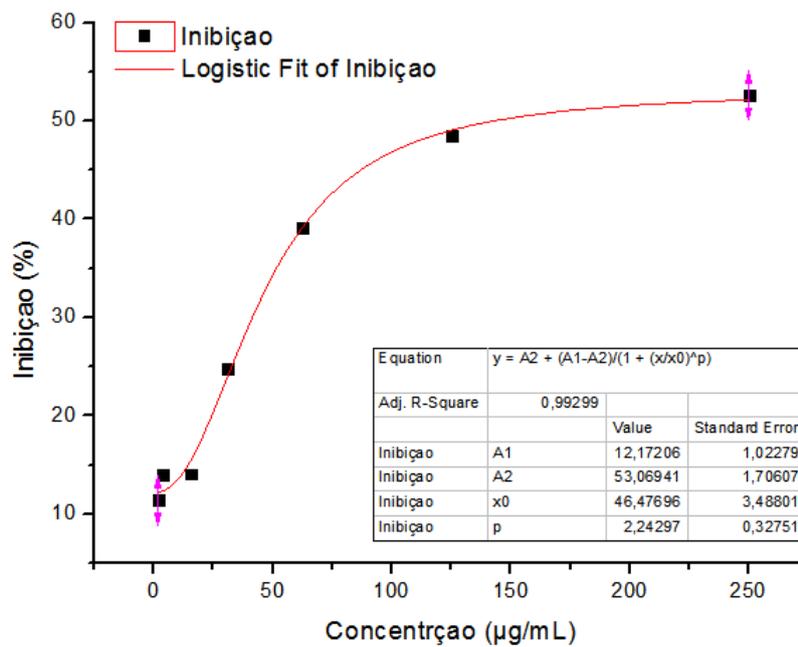


Amostra R083

Figura 13 – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *L. monocitogenes*.

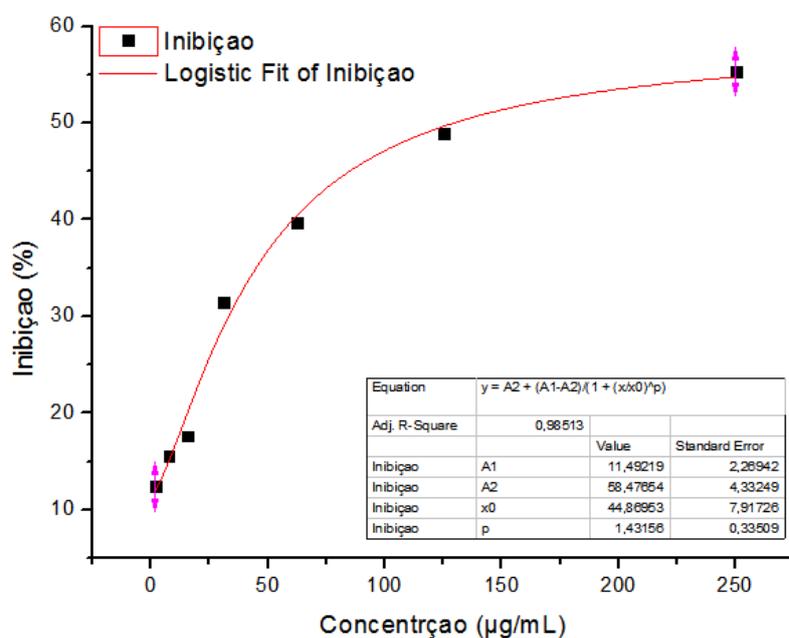


Amostra R111

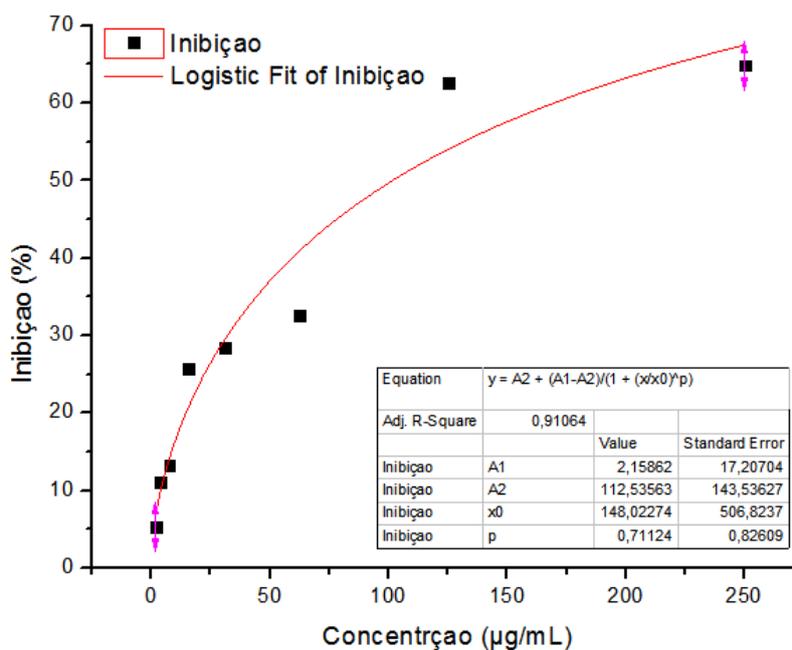


Amostra R112

Figura 14 – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *L. monocitogenes*.

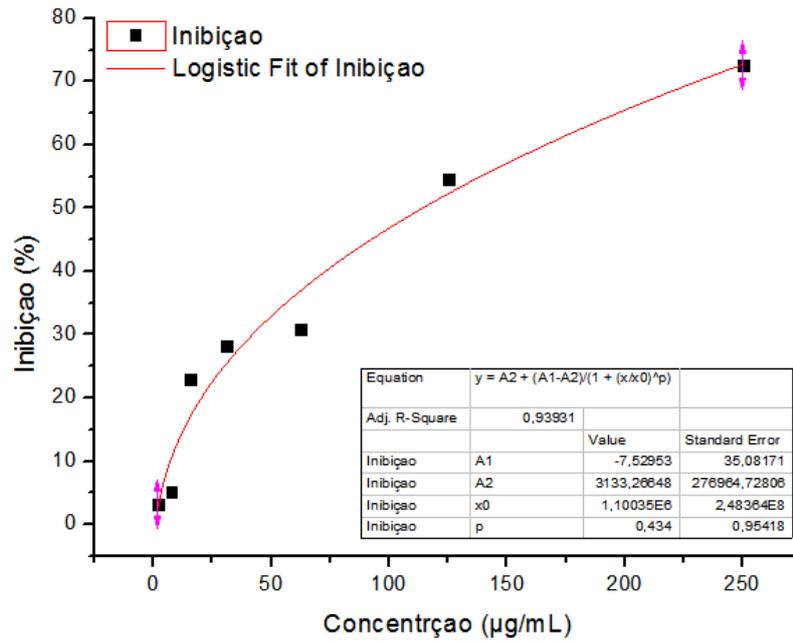


Amostra R113

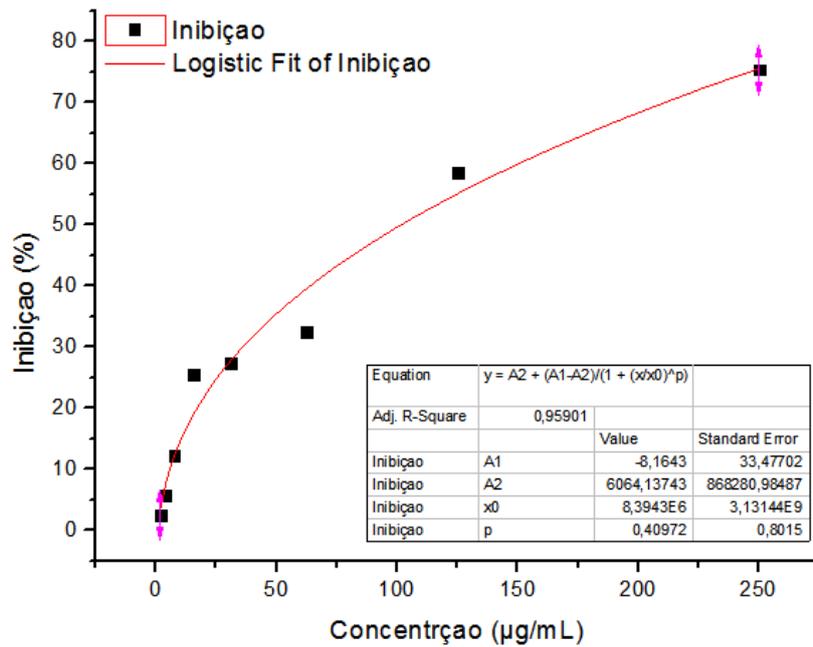


Amostra R121

Figura 15 – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *L. monocitogenes*.

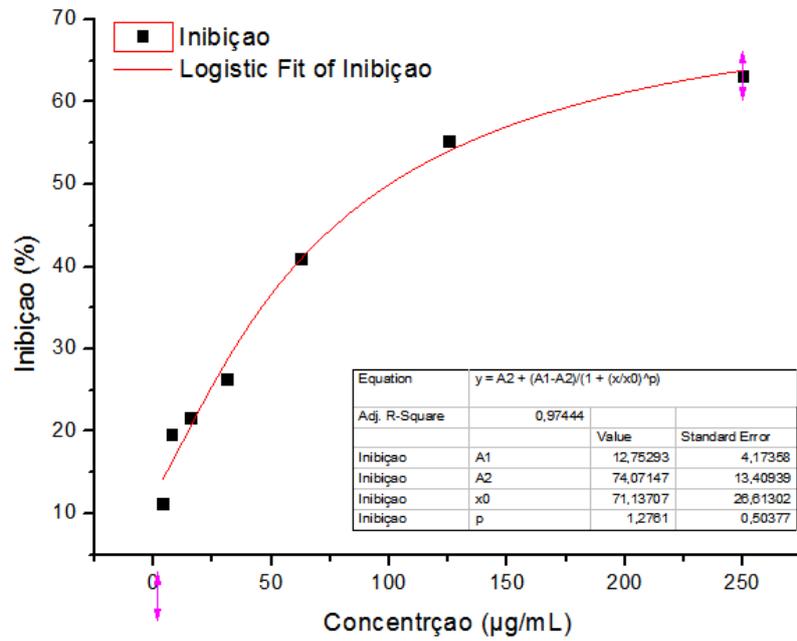


Amostra R122

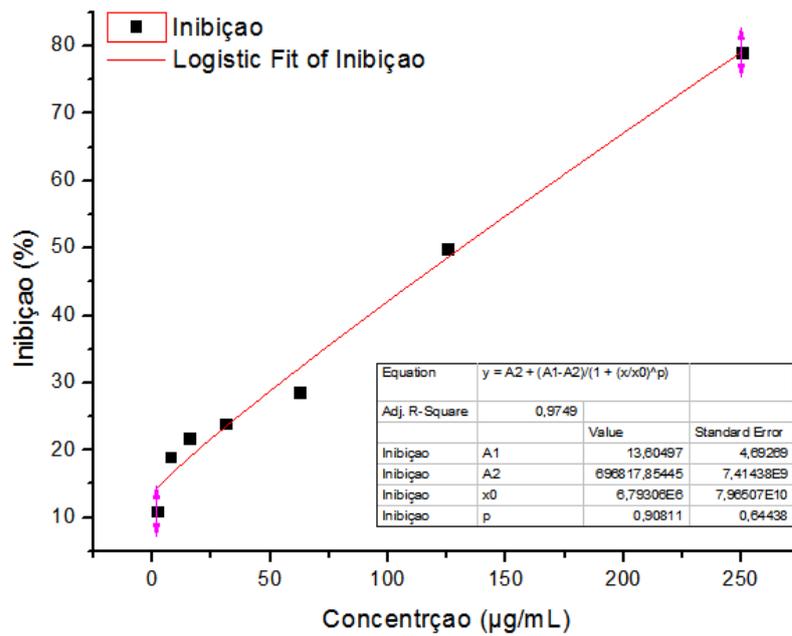


Amostra R123

Figura 16 – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *L. monocitogenes*.

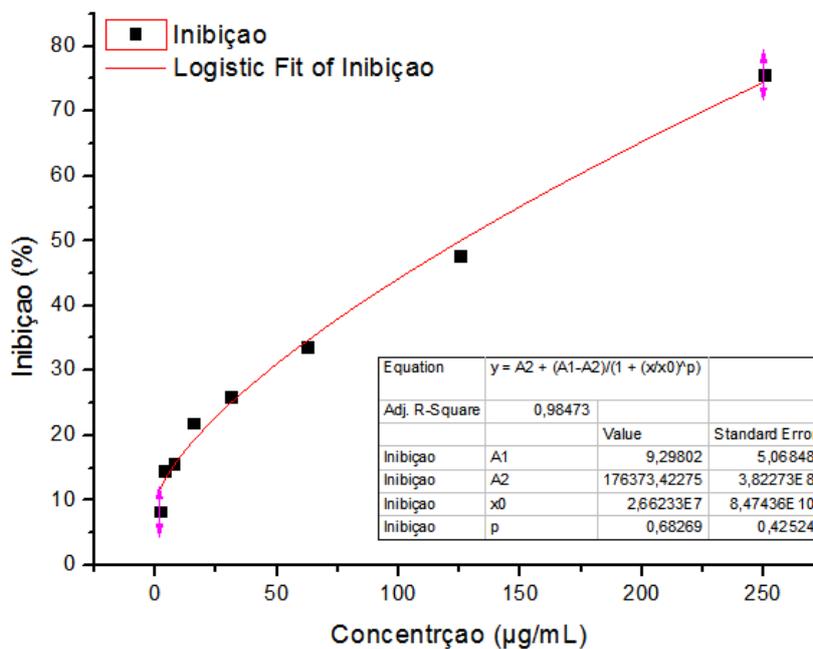


Amostra R011



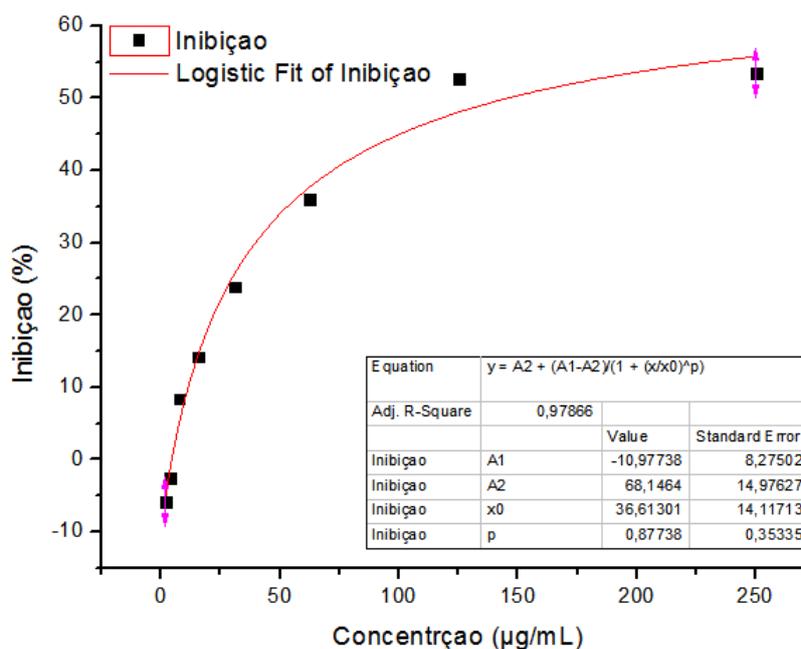
Amostra R012

Figura 17 – Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *L. monocitogenes*.



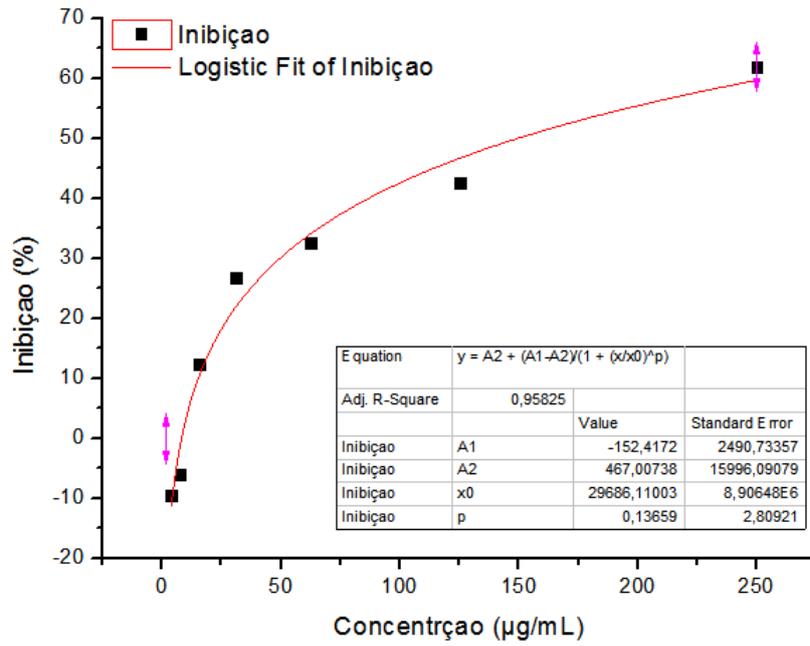
Amostra R013

Figura 18 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *S. aureus*.

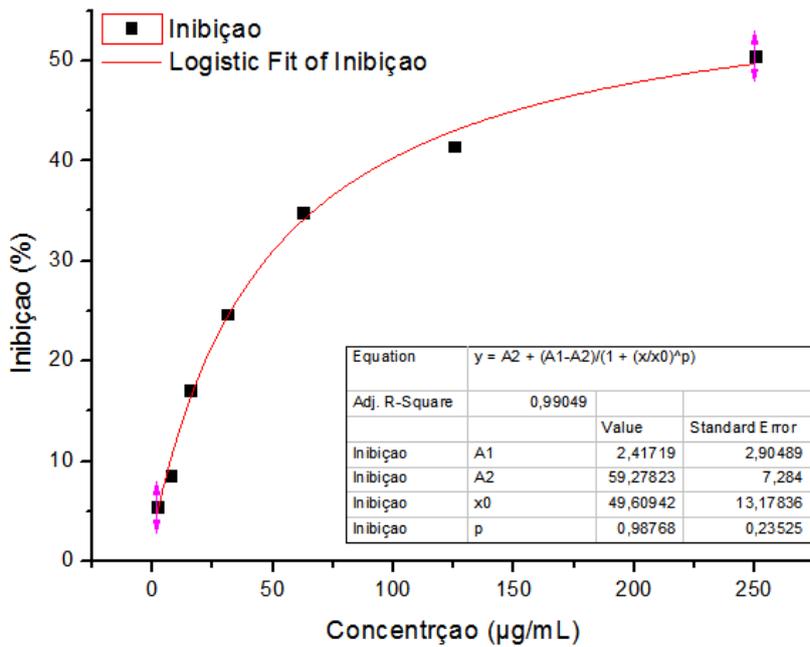


Amostra R121

Figura 19 - Gráficos representativos da concentração inibitória mínima óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet no período seco sobre a bactéria *S. aureus*.

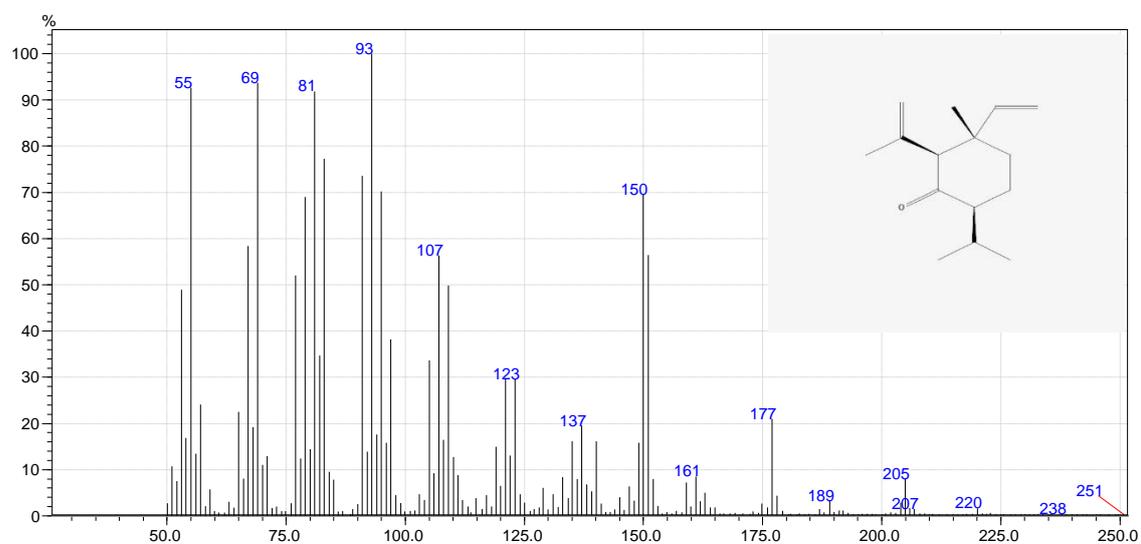


Amostra R122

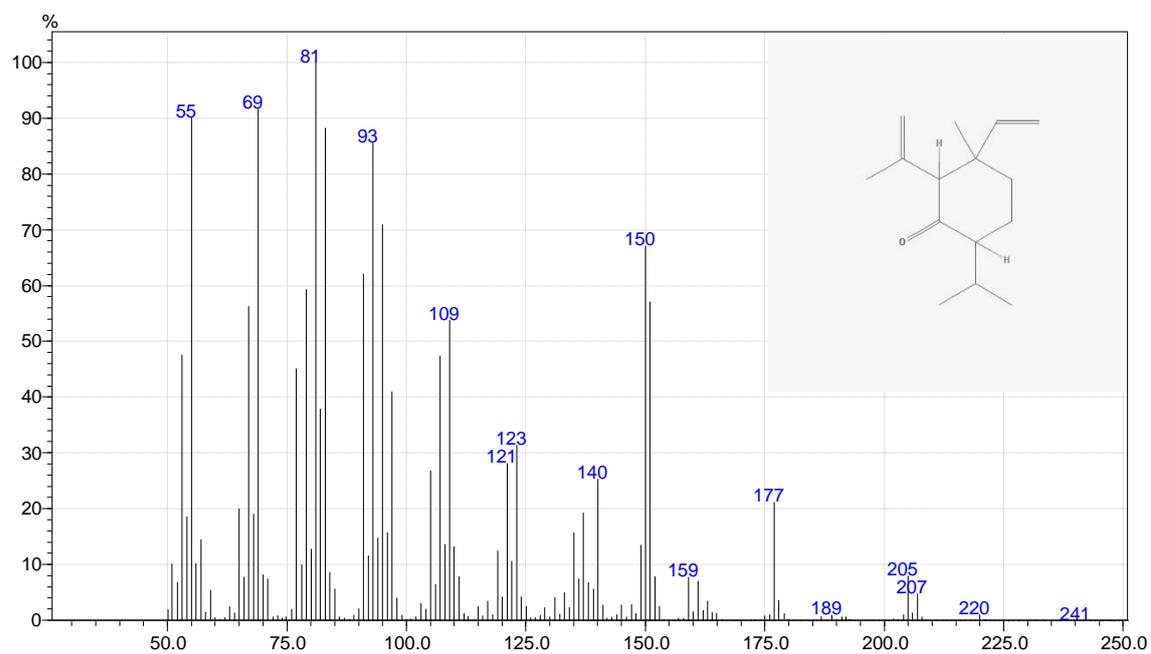


Amostra R123

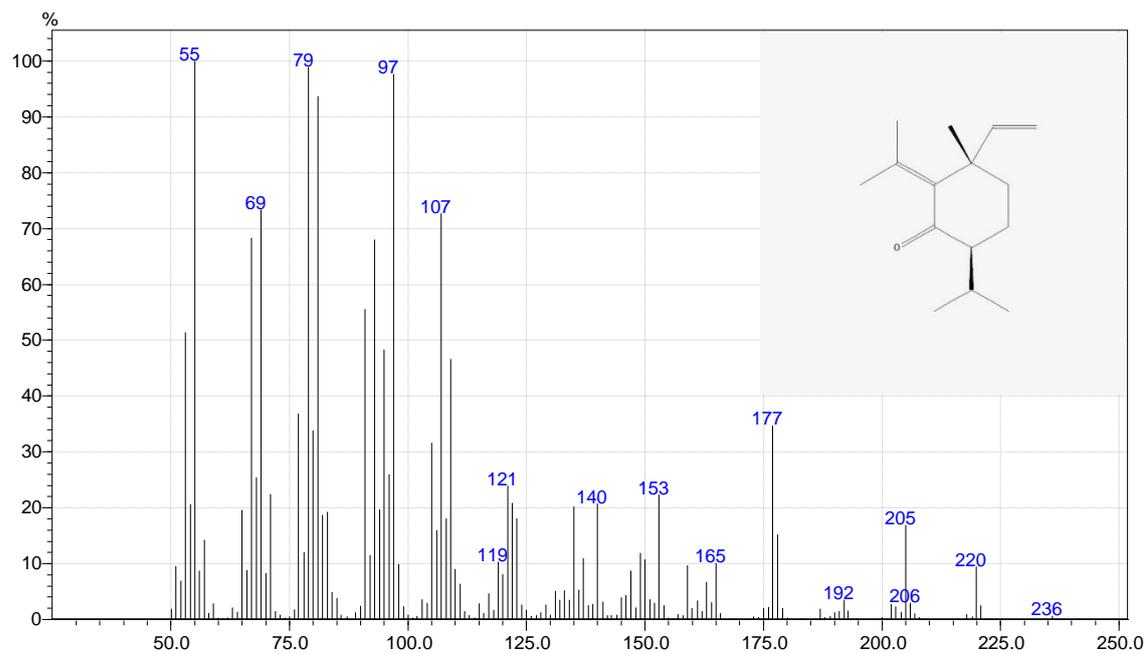
ANEXO A – Espectros de massas das amostras dos óleos essenciais de *Siparuna guianensis* Aublet



Shyobunona



Epi-Shyobunona



Iso-shyobunona