



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

FRANCISCO DOS SANTOS SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
FRESCAS E SECAS DE *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake  
(MYRTACEAE)**

Boa Vista, RR  
2016

FRANCISCO DOS SANTOS SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
FRESCAS E SECAS DE *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake  
(MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa.

Boa Vista, RR

2016

FRANCISCO DOS SANTOS SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
FRESCAS E SECAS DE *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake  
(MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada como Pré-requisito para conclusão do Curso de mestrado em Química da Universidade Federal de Roraima - UFRR, defendida em 18 de agosto de 2016, às 08:00 horas e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa  
Orientador / Programa de Pós-graduação em Química

Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho  
Programa de Pós-graduação em Química

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

À minha mãe, meu pai e a minha irmã, Rosangela, pelo amor, orientação, confiança e exemplo que foram e sempre serão em minha vida, à todos meus familiares, pela ajuda, dedicação, compreensão e incentivo nessa fase de pós-graduação e em tantas outras.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus familiares, tios, primos e em especial minha mãe Julia, meu pai Raimundo, meus irmãos Rosângela, Renato, Regiane, Lidiane, minha avó Enedina, meus sobrinhos Rodrigo, Thamirys, Lohanna, Victor, Vínicius, Geovana, Tabatta, Hagatta, Kaic e Julia, que me inspiram e fazem minha vida mais completa todos os dias e que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa muito importante de minha vida, de crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas de mestrado, que ao longo destes dois anos tanto estudamos e passamos momentos nos laboratórios sempre somando conhecimentos e superando as dificuldades, em busca de uma melhor formação.

Aos meus amigos de sempre Nailon, Thayanne, Joelson, Bento, Dheilanir, David, Dalhas, Edineide, Larissa, Luis, Leandro, Iara, Flávio, Diego, Jhonatha, Jesuíto, Kerlison, Evandro, Adhemar, Eduardo que acompanharam todas as lutas, souberam compreender meu afastamento durante o período do mestrado, sempre me apoiaram e não deixaram que desistisse e me proporcionam momentos de distração que foram essenciais para a conclusão deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa, pela orientação, dedicação, conselhos, trocas de experiências e paciência durante todas as etapas do mestrado.

Ao Dr. Ricardo Carvalho dos Santos, pela oportunidade de desenvolver este estudo e esforço para a conclusão do mesmo.

Aos alunos de iniciação científica Zedequias e Cecília, pela ajuda com trabalho de campo, braçal e laboratorial e a companhia durante o estudo.

Aos meus professores doutores, Habel Nasser Rocha da Costa, Henrique Eduardo Bezerra da Silva, Antônio Alves de Melo Filho, Francisco das Chagas do Nascimento, Luiz Antônio, Carlos Ramón Franco e Simone Rodrigues Silva que me mostraram e orientaram como ser profissional de qualidade e sobre a realidade dentro e fora das salas de aula e laboratórios.

Ao Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial a Dra. Vany Ferraz, pelas análises químicas.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da UFMG, em especial a Professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, pelo desenvolvimento dos bioensaios.

Ao bibliotecário Francisco Laurenilson Sousa Silva, pelo apoio intelectual, por todos os artigos que conseguimos e pela amizade que muito contribuiu para qualidade das referências contidas neste trabalho.

Aos profissionais de serviços gerais do Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia, pela contribuição.

A Universidade Federal de Roraima por ter contribuído para a minha formação acadêmica na graduação e no mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de crescimento intelectual.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu  
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,  
participar da responsabilidade coletiva por  
toda a humanidade" (MARIE CURIE).

## RESUMO

O estado de Roraima apresenta uma flora com grande variedade de espécies em sua composição, onde também são inseridas espécies de outros estados e países, onde estas apresentam grande facilidade de adaptação. Sabe-se que a composição química dos metabólitos encontrados em plantas podem variar com a forma de cultivo, clima e solo. Verificou-se a existência da espécie *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake no *Campus* Paricarana, Universidade Federal de Roraima. Esta espécie pertence a família Myrtaceae, gênero *Melaleuca*, sua ocorrência é predominantemente na Austrália, sendo importante fonte de óleos essenciais, porém verifica-se a existência de *M. quinquenervia* no sudeste do Brasil. Um estudo realizado com o óleo essencial apresentou variações na composição comparando com a espécie natural da Austrália, podendo haver uma variação em Roraima. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência diurna no rendimento, composição química e bioatividades para o óleo essencial de *M. quinquenervia* encontrada em Boa Vista-RR. Foram coletadas folhas durante dois períodos do ano (chuvoso e seco) em quatro horários durante o dia (06:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas). As extrações com material vegetal fresco e seco ocorreu durante o ano de 2015. O método de extração utilizado para a obtenção do óleo essencial foi a hidrodestilação. Foi verificada uma variação significativa no rendimento, sendo que o óleo extraído no período de estiagem e às 18:00 horas apresentou o maior rendimento ( $2,05 \pm 0,17$  %) superior ao encontrado na literatura. Dentre todas as extrações realizadas não verificou-se variação qualitativa dos constituintes, somente quantitativa, sendo identificados 24 constituintes, encontrando-se 9 constituintes majoritários, dentre eles o 1,8 cineol, viridiflorol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pineno, guaiol, óxido de cariofileno, limoneno, mirceno, terpinen-4-ol, respectivamente. O óleo apresentou 60% de 1,8 cineol indicando que o quimiótipo desta espécie encontrada em Boa Vista-RR pertence ao quimiótipo Viridiflorol conforme apresentado na literatura, contudo foi biossintetizado o 1,8 cineol. Os óleos extraídos em maio e outubro apresentaram alta toxicidade  $375,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $359,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente para o teste com *A. salina*. A atividade antioxidante (DPPH) foi apresentada pelos dois óleos (maio e outubro), porém a  $CE_{50}$  foi bem inferior ao comparar com o padrão de quercetina. Os óleos conseguiram inibir o crescimento de *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*. Conclui-se que o óleo essencial de *M. quinquenervia* obtido em Boa Vista-RR apresenta bons percentuais para inibição de atividades biológicas, indicando que esse óleo possa ser utilizado para outros bioensaios.

**Palavras chaves:** 1,8 cineol. Myrtaceae. Atividade biológica. Citotoxicidade. DPPH.

## ABSTRACT

The state of Roraima has a flora with a variety of species in its composition, which are also inserted species from other states and countries where they have great ease of adaptation. It is known that the chemical composition of the metabolites in plants may vary with the form of cultivation, weather and soil. It was the existence of the species *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake on *Campus* Paricarana, Federal University of Roraima. This species belongs to Myrtaceae *Melaleuca* genus, its occurrence is predominantly in Australia, being an important source of essential oils, but there is the existence of *M. quinquenervia* in southeastern Brazil. A study of the essential oil showed variations in the composition compared to natural species in Australia, and there may be a variation in Roraima. The aim of this study was to investigate the diurnal influence on yield, chemical composition and bioactivities to the essential oil of *M. quinquenervia* found in Boa Vista-RR. They leave for two periods of the year were collected (wet and dry) at four different times during the day (06:00, 12:00, 18:00 and 00:00). Extractions with fresh and dried plant material occurred during the year 2015. The extraction method used to obtain the essential oil was the hydrodistillation. A significant change was recorded in the income, and the oil extracted in the dry season and at 18:00 had the highest yield ( $2.05 \pm 0.17\%$ ) higher than that found in the literature. Of all the extractions performed not there was a qualitative change in the constituents, only quantitative and identified 24 constituents, meeting 9 major constituents, including the 1.8 cineol, viridiflorol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pinene, guaiol, oxide caryophyllene, limonene, myrcene, terpinen-4-ol, respectively. The oil showed 60% of 1.8 cineole chemotype indicating that this species found in Boa Vista-RR belongs to Viridiflorol chemotype as shown in the literature, but was biosynthesized 1,8 cineole. The oils extracted in May and October showed high toxicity  $375.74 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $359.58 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively to the test with *A. salina*. The antioxidant activity (DPPH) was presented by the two oils (May and October), but the  $\text{EC}_{50}$  was much lower when comparing with the standard of quercetin. The oils were able to inhibit the growth of *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*. It is concluded that the essential oil of *M. quinquenervia* obtained in Boa Vista-RR has good percentage for inhibiting biological activity, indicating that this oil can be used for other bioassays.

Key words: 1.8 cineole. Myrtaceae. Biological activity. Cytotoxicity. DPPH.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa de distribuição da família Myrtaceae .....	19
Figura 2 -	Distribuição natural da espécie <i>M. quinquenervia</i> .....	23
Figura 3 -	Distribuição de <i>M. quinquenervia</i> .....	24
Figura 4 -	Árvore de <i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake .....	25
Figura 5 -	A) Folhas de <i>M. quinquenervia</i> ; B) Flores de <i>M. quinquenervia</i> ; C) Frutas <i>M. quinquenervia</i> ; D) Caule de <i>M. quinquenervia</i> .....	26
Figura 6 -	Estrutura química dos terpenos .....	30
Figura 7 -	Estrutura química do isopreno .....	30
Figura 8 -	Exsicata de <i>Melaleuca quinquenervia</i> .....	35
Figura 9 -	Aparelho extrator tipo Clevenger .....	36
Figura 10 -	Rendimento do óleo essencial de <i>M. quinquenervia</i> em maio e outubro .....	45
Figura 11 -	Relação rendimento médio do óleo essencial e pluviosidade mensal durante os períodos de extração .....	47
Figura 12 -	Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M.</i> <i>quinquenervia</i> MQF01 por CG-DIC .....	50
Figura 13 -	Constituintes de maior porcentagem encontrados em cada um dos óleos essenciais de <i>M. quinquenervia</i> coletados nos diferentes períodos e horários de 2015 .....	51
Figura 14 -	Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por (CG/EM) presentes no óleo essencial de <i>M. quinquenervia</i> ..	52
Figura 15 -	Espectro de massas do óleo essencial de <i>M. quinquenervia</i> obtido por CG-EM para o constituinte viridiflorol .....	53
Figura 16 -	Espectro de massas do óleo essencial de <i>M. quinquenervia</i> obtido por CG-EM para o 1,8 cineol .....	54
Figura 17 -	Curva da atividade frente á <i>A. salina</i> de maio .....	58
Figura 18 -	Curva da atividade frente á <i>A. salina</i> de outubro .....	59
Figura 19 -	Curva de calibração para o padrão de quercetina .....	61
Figura 20 -	A) Ensaio de cada concentração após a reação com DPPH, em $\mu\text{g/mL}$ mês de maio; B) Ensaio de cada concentração após a reação com DPPH, em $\mu\text{g/mL}$ mês de outubro .....	62

Figura 21 - Curva de redução de DPPH do óleo essencial de <i>M. quinquenervia</i> .....	63
Figura 22 - Curva de atividade frente a <i>Bacillus cereus</i> para o óleo essencial das folhas da espécie <i>M. quinquenervia</i> A) MQI01: Folhas Frescas Inverno; B) MQI02: Folhas Secas Inverno; C) MQV01: Folhas Frescas Verão D) MQV02: Folhas Secas Verão .....	65
Figura 23 - Curva de atividade frente a <i>Salmonella typhimurium</i> para o óleo essencial das folhas da espécie <i>M. quinquenervia</i> A) MQI01: Folhas Frescas Inverno; B) MQV02: Folhas Secas Verão .....	66
Figura 24 - Curva de atividade frente a <i>Staphylococcus aureus</i> para o óleo essencial das folhas da espécie <i>M. quinquenervia</i> para MQV01: Folhas Frescas Verão .....	67
Figura 25 - Cromatograma de C <sub>11</sub> a C <sub>18</sub> por CG-DIC .....	82
Figura 26 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF01 por CG-DIC .....	82
Figura 27 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF02 por CG-DIC .....	83
Figura 28 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF03 por CG-DIC .....	83
Figura 29 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF04 por CG-DIC .....	84
Figura 30 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> o MQS01 por CG-DIC .....	84
Figura 31 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQS02 por CG-DIC .....	85
Figura 32 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQS03 por CG-DIC .....	85
Figura 33 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQS04 por CG-DIC .....	86
Figura 34 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF05 por CG-DIC .....	86
Figura 35 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF06 por CG-DIC .....	87

Figura 36 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF07 por CG-DIC .....	88
Figura 37 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da <i>M. quinquenervia</i> MQF08 por CG-DIC .....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de Terpenos .....	31
Tabela 2 -	Precipitação pluviométrica de Boa Vista Roraima .....	43
Tabela 3 -	Rendimento do óleo essencial da espécie <i>M. quinquenervia</i> extraído nos meses de maio e outubro.....	45
Tabela 4 -	Rendimentos para espécies de <i>Melaleucas</i> de acordo com Silva (2007) .....	47
Tabela 5 -	Siglas das extrações .....	48
Tabela 6 -	Constituintes químicos identificados por (CG/EM e CG/DIC) nos óleos essenciais das folhas de <i>M. quinquenervia</i> .....	49
Tabela 7 -	Composição química do óleo essencial da espécie <i>M. quinquenervia</i> .....	56
Tabela 8 -	Número de náuplios vivos e mortos de maio .....	57
Tabela 9 -	Número de náuplios vivos e mortos de outubro .....	57
Tabela 10 -	Dados de atividade frente à <i>A. salina</i> para <i>M. quinquenervia</i> de maio e outubro .....	58
Tabela 11 -	Preparo das soluções para a curva de quercetina .....	60
Tabela 12 -	Preparo das soluções para a curva de <i>M. quinquenervia</i> maio e outubro .....	61
Tabela 13 -	Bioensaio para o óleo essencial das folhas da espécie <i>M. quinquenervia</i> .....	64

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infuso de cérebro e coração)
CE <sub>50</sub>	Concentração Eficiente 50%
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal 50%
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-2-picril-hidrazila
FEMARH-RR	Fundação Estadual de Meio Ambiente e Recurso Hídricos de Roraima
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
KI	índice de Kovats
<i>M. quinquenervia</i>	<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake
MIC	Mínima Concentração Inibitória
mL	Mililitro
MQF	<i>Melaleuca quinquenervia</i> folhas Frescas
MQI01	<i>Melaleuca quinquenervia</i> Folhas Frescas Inverno
MQI02	<i>Melaleuca quinquenervia</i> Folhas Secas Inverno
MQS	<i>Melaleuca quinquenervia</i> folhas Secas
MQV01	<i>Melaleuca quinquenervia</i> Folhas Frescas Verão
MQV01	<i>Melaleuca quinquenervia</i> Folhas Secas Verão.
nm	Nanômetro
NPPGCT	Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação Ciência e Tecnologia
OE's	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde

PPGQ	Programa de Pós-graduação em Química
RT	Tempo de Retenção
S	Desvio Padrão
UV-Visível	Ultra Violeta Visível
$\lambda$	Comprimento de Onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE .....	19
1.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Melaleuca</i> .....	21
1.3	ESPÉCIE <i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake .....	22
1.3.1	<b>Distribuição geográfica de <i>M. quinquenervia</i></b> .....	22
1.3.2	<b>Descrição Botânica da <i>M. quinquenervia</i></b> .....	24
1.3.3	<b>Utilidades da <i>M. quinquenervia</i></b> .....	26
1.3.4	<b>Óleo Essencial de <i>M. quinquenervia</i></b> .....	27
1.4	ÓLEOS ESSENCIAIS .....	28
1.4.1	<b>Terpenos</b> .....	29
1.4.2	<b>Extração de óleos essenciais</b> .....	31
1.4.2.1	Extração por hidrodestilação .....	31
1.5	CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA .....	32
1.5.1	<b>Cromatografia em Fase Gasosa</b> .....	32
1.5.2	<b>Espectrômetro de massas</b> .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	OBJETIVO GERAL .....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	35
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	35
3.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	36
3.3	ANÁLISES POR CG-EM E CG-DIC.....	37
3.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	38
<b>3.4.1</b>	<b>Determinações da Citotoxicidade Frente à <i>Artemia salina</i></b> .....	38
<b>3.4.1.1</b>	<b>Preparação da Solução Salina</b> .....	38
<b>3.4.1.2</b>	<b>Preparação de Soluções para o Bioensaio</b> .....	38
<b>3.4.1.3</b>	<b>Realização dos testes</b> .....	39
<b>3.4.1.4</b>	<b>Avaliação da Citotoxicidade</b> .....	39
<b>3.4.1.5</b>	<b>Cálculo da CL<sub>50</sub></b> .....	40
<b>3.4.2</b>	<b>Determinação da Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de</b> .....	40

	<i>M. quinquenervia</i> .....	
<b>3.4.3</b>	<b>3.4.3 Bioensaio Antibacteriano</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
4.1	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	43
4.2	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. quinquenervia</i> .....	49
4.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	56
<b>4.3.1</b>	<b>Determinação da Toxidade Frente à <i>A. salina</i></b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de <i>M. quinquenervia</i></b> ...	<b>60</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Atividade Antibacteriana</b> .....	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>79</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza sempre forneceu recursos fundamentais para a sobrevivência do homem, dentre estes recursos as plantas possuem um destaque principal sendo utilizadas como: fonte de alimentos, bebidas, pigmentos, fibras têxteis, materiais para a construção de moradias, medicamentos, dentre outros (BATISTA, CORRÊA e QUINTAS, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

Muitas plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente na medicina popular, sendo repassada de geração a geração, com finalidade terapêutica no tratamento de diversas enfermidades. Sendo administradas por via oral como chás, infusões, elixires e extratos ou em formas de banhos e inalações (FOGLIO et al., 2006).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que cerca 80% da população mundial vêm utilizando a medicina dita não convencional, baseada em produtos de fontes naturais, a fim de suprir a ausência de atendimento médico primário. Verifica-se que na África, esse percentual da população que dependem destes medicamentos é ainda maior, sendo muitas das vezes a única fonte terapêutica existente devido o fácil acesso e ao alto custo dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001).

Analisando o consumo de produtos naturais no Brasil, verifica-se que cerca de 20% da população total, consomem um total de 63% dos medicamentos alopáticos e 27% utilizam produtos de origem natural, especialmente os obtidos a partir das plantas como fonte alternativa de medicação (FLOGIO et al., 2006).

A ocorrência de novos mecanismos microbianos cada vez mais resistentes frente as fontes terapêuticas já existentes vem sendo a causa de grande preocupação para os laboratórios de pesquisas e da indústria farmacêutica, dessa forma há uma busca continua da produção e o lançamento de agentes antimicrobianos que sejam mais eficazes e que garantam menos riscos de toxicidade e efeitos colaterais adversos (SIMÕES e SPITZER, 2004; FLOGIO et al., 2006).

Materiais vegetais são fontes para obtenção de moléculas eficazes no controle desses mecanismos microbianos. Verifica-se ainda que muitos medicamentos são provenientes de plantas como, por exemplo, os glicosídeos

cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca (FLOGIO et al., 2006).

Muitas classes de compostos químicos que são produzidos pelas plantas vêm sendo alvo de estudo no combate dos microrganismos que causam vários prejuízos à saúde. Da classe de metabólitos secundários, pode-se destacar os compostos fenólicos, como o eugenol, que possui uma boa atividade antimicrobiana (AFONSO et al., 2012).

Extratos de plantas medicinais podem apresentar ótimas atividades biológicas, tais como apresenta os estudos de Montero et al. (2014) que identificou por prospecção fitoquímica classes de metabólitos: flavonoides, taninos, esteróides, terpenóides e saponinas e apresentou atividade biológica contra *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* e Acetilcolinesterase (Alzheimer).

Além das plantas medicinais, os produtos obtidos delas também possuem uma vasta aplicabilidade e eficiência no tratamento de algumas enfermidades. Como por exemplo os óleos essenciais são constituídos por substâncias de baixo peso molecular geralmente lipofílicas, características que permitem uma penetração eficiente na membrana celular. Estudos comprovaram que os óleos essenciais penetram nos tecidos cerca de 100 vezes mais rapidamente que a água (PAWAR; THAKER, 2006; KNAAK; FIUZA, 2010).

Os óleos essenciais de várias espécies pertencente à família Myrtaceae, vem apresentando resultados satisfatórios ao inibir microrganismos. Para a extração dos óleos geralmente são utilizados o caule e as folhas. Os óleos apresentam rendimento significativo quando comparado com outras espécies pertencentes ao gênero, possui aplicação medicinal, atividade fungicida; acaricida; no tratamento de picadas de insetos; tratamento de Herpes simples; antisséptico; expectorante no tratamento de distúrbios gastrointestinais e com aplicação na indústria na produção de perfumes; inseticidas e germicidas (BOLAND et al., 1984; DORAN; TURNBULL, 1997; IRELAND et al., 2002; DRAY JR et al., 2004; FLOGIO et al., 2006).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. quinquenervia* e outras espécies do gênero *Melaleuca* pode estar relacionada aos constituintes majoritários ou ao sinergismo dos constituintes. Pode-se verificar que a atividade do óleo essencial de *M. quinquenervia* nos estudos de Quintão (2013) inibiu o crescimento

de bactérias Gram-positivas. Para o gênero pode-se verificar nos estudos de Pawar e Thaker, (2006) a atividade biológica contra *Aspergillus niger*.

Desta forma, a atual pesquisa foi direcionada ao estudo do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* cultivada no estado de Roraima, no município de Boa Vista, analisando o seu rendimento, composição química, e atividade biológica, desses óleos em dois períodos (chuvoso e seco) de um ano e em quatro horários (06:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas) durante o dia.

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae compreende cerca de 130 gêneros e com aproximadamente 4.000 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais, com predominância na região neotropical e na Austrália, sendo uma importante fonte de óleos essenciais. No Brasil é considerada uma das maiores famílias, composta por 23 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008), Figura 1.

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Myrtaceae.



Fonte: Tropicos (2016).

Os pesquisadores Vieira et al. (2004) e Boland et al. (1984) apresentam que as espécies pertencentes a família Myrtaceae são divididas em duas subfamílias:

Myrtoideae, a qual tem ampla ocorrência na América tropical e subtropical e Leptospermoideae, que ocorre, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia.

O grupo mais presente e característico de árvores australianas, pertencem a família Myrtaceae, e a subfamília Leptospermoideae podemos encontrar o *Eucalyptu*, *Angophora*, *Syncarpia*, *Lophostemon* e *Melaleuca*. Estes gêneros possuem folhas inteiras, geralmente com glândulas de óleo (BOLAND et al., 1984).

Espécies mais comuns que pertencem a esta família, são: *Eucalyptus globulus* Labill. (Eucalipto), *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), *Myrciaria dubai* (Kunth) Mc Vaugh (camu-camu), *Psidium guajava* L. (araçá-goiaba), *Syzygium aromatum* (L.) Merril. & Perry (Cravo-da-índia), *Syzygium cumini* (L.) Skeels (azeitona roxa), que possuem uma ampla aplicação na farmacologia devido a existências de vários compostos químicos (LORENZI; MATOS, 2002; JOLY, 1998).

Família composta por plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alternada ou oposta. Folhas com pontuações (glândulas oleíferas), flores geralmente brancas ou as vezes vermelhas (JOLY, 1998).

Considerada uma característica fundamental da família Myrtaceae é a presença de cavidades secretoras de óleo com uma grande importância taxonômica. Assim, espécies pertencentes a esta família são consideradas importantes fontes de óleos essenciais para a indústria e a composição destes óleos possuem substâncias aromáticas, monoterpenos, triterpenos, polifenóis e lipofílica (KEATING, 1984).

De acordo com Vieira et al. (2004), as espécies de Myrtaceae comumente são empregadas nos tratamentos de distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos, doenças infecciosas, e sua ação pode estar relacionada às propriedades adstringentes da planta. Em geral as partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos.

Entre as espécies cultivadas no Brasil, destacam-se as que foram introduzidas da Austrália, geralmente, possuem folhas alternadas e frutos secos. O *Eucalyptus* (Eucalipto) fonte de madeira e de essências importantes, também utilizado como espécie ornamental devido a beleza de suas flores vermelhas; *Callistemon*, de belo efeito ornamental por possuir longos estames vermelhos em sua floração e *Melaleuca*, também introduzida como árvore florestal ou ornamental (JOLY, 1998).

## 1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Melaleuca*

O gênero *Melaleuca*, pertencente à subfamília Leptospermoideae, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico (VIEIRA et al., 2004). De acordo com Boland et al. (1984), o gênero pertencente à subfamília Leptospermoideae, predominante na Austrália e compreendendo cerca de 150 a 230 espécies em todo o mundo.

As folhas e caule de várias espécies do gênero *Melaleuca* produzem óleos essenciais, que possuem aromas fortes e com ampla aplicação medicinal (BOLAND et al., 1984). Os óleos essenciais de espécies do gênero *Melaleuca* apresentam considerável atividade biológica e podem ser utilizadas na medicina, perfumaria e na indústria farmacêutica (SILVA, 2007).

Boland et al. (1984) apresentam dados de que a espécie *M. alternifolia* pertencente ao gênero estudado, sendo uma das mais importantes espécies, pois produz óleo essencial não tóxico e nem irritante, levando em consideração sua eficiente atividade de penetração cutânea.

Yoshida et al. (1996) afirma que o óleo essencial da espécie *M. leucadendra* na Malásia e Indonésia, já é utilizado para no tratamento da dor de dente, cólicas e doenças de pele. Boland et al. (1984) mostra ainda que o óleo essencial de *M. linariifolia*, apresentou alta concentração do constituinte químico 1,8-cineol sendo este responsável pela atividade germicida e em formulação de sabões.

Como o óleo extraído de plantas do gênero *Melaleuca* possuem uma grande importância comercial e medicinal e a Austrália a principal produtora, verifica-se um elevado valor comercial para importação para o Brasil que utiliza o óleo para a formulação de cosméticos, produtos farmacêuticos e higiene pessoal (CASTRO et al., 2005).

Os gêneros desta família são muito comuns na maioria das formações vegetais do Brasil, dentre eles os gêneros mais comuns são *Algrizea*, *Eugenia*, *Marlierea*, *Gomidesia*, *Melaleuca* e *Myrcia*. O gênero *Melaleuca* é caracterizado como um gênero introduzido (BOLAND et al., 2006; DORAN; TURNBULL, 1997; SOUZA; LORENZI, 2008). No Brasil, o gênero está representado pelas espécies cultivadas *M. alternifolia*, *M. armillaris* (Sol. ex Gaertn.) Sm., *M. ericifolia*, *M. cajuputi*

subsp. *cajuputi*, *M. cajuputi* subsp. *platyphylla*, *M. leucadendra* e *M. quinquenervia* (SILVA, 2007).

Em um trabalho recente, os óleos de *Melaleucas* apresentaram atividades bacteriostáticas e fungistática frente aos microrganismos pesquisados *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (PACKER, LUZ, 2007).

### 1.3 ESPÉCIE *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake

A espécie possui nome botânico *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake pertence a família Myrtaceae, subfamília Leptospermoides e gênero *Melaleuca* (BOLAND et al., 1984). O nome específico é do Latim *quinque* - cinco, e *nervis* - nervos, que refere-se ao número de veias longitudinais presentes em suas folhas (DORAN; TURNBULL, 1997).

A espécie é popularmente conhecida como: “broad-leaf tea-tree”, “cajeput”, “cajeput-tree”, “paper-bark-tree”, “punk-tree”, “swamp tea-tree” (inglês, Estados Unidos da América) (Brako, Rossman e Farr, 1995). Ainda é chamada de: Five-veined paperbark, broad-leaved paperbark, paperbark tea-tree, broad-leaved tea-tree, numbah, belbowrie (Austrália), Niaouli (Nova Caledônia), kaya putih (Indonésia) (DORAN e TURNBULL, 1997).

#### 1.3.1 Distribuição geográfica de *M. quinquenervia*

A espécie *M. quinquenervia* é natural da Austrália, ao sul da Nova Guiné, na Nova Caledônia e no sudeste dos Estados Unidos da América. Podemos verificar no mapa da Figura 2, os países onde a espécie é natural e onde foi plantada. Sendo esta espécie considerada invasiva, deve-se seguir os procedimentos de biossegurança que se aplicam ao seu local de plantação (ORWA et al., 2009).

Nativa da Austrália, Indonésia, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné. Cultivada em Bahamas, Barbados, Cuba, Dominica, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Haiti, Índia, Jamaica, Malásia, Martinica, Montserrat, Antilhas Holandesas, Filipinas, Porto Rico, St. Kitts e Nevis, Santa Lúcia, São Vicente e

Granadinas, Tailândia, Trinidad e Tobago, Estados Unidos da América, Ilhas Virgens (US) (ORWA et al., 2009).

Figura 2 - Distribuição natural da espécie *M. quinquenervia*.



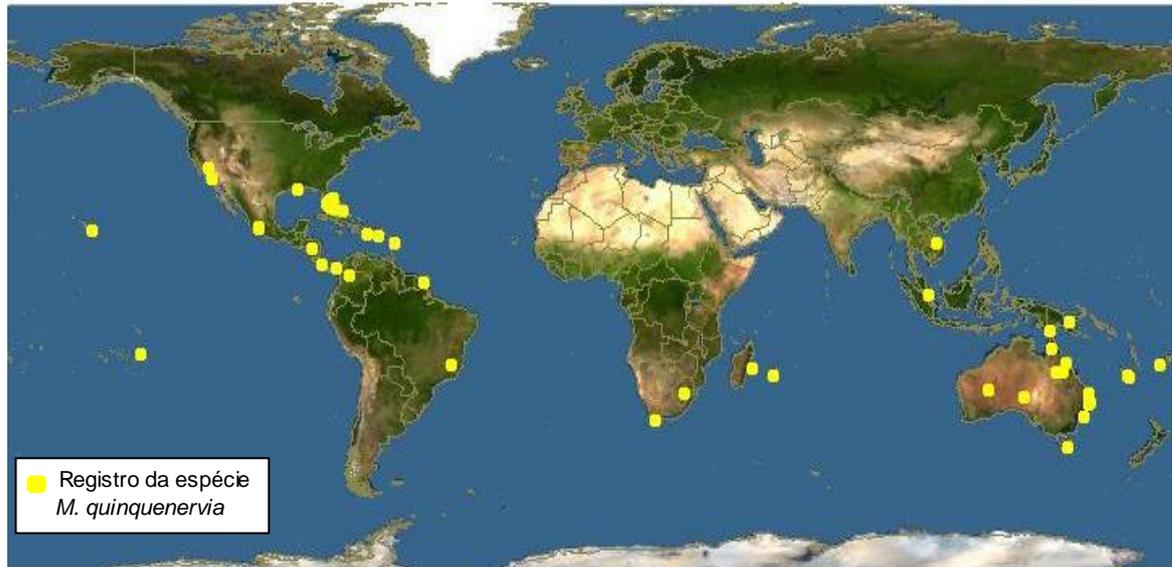
Fonte: ORWA et al. (2009).

Observa-se que ao sul, em escala natural, *M. quinquenervia* ocorre nas zonas quentes sub-úmidas e úmidas e ao norte é encontrado na zona quente e úmido. A espécie tolera estação seca de até sete meses por ano. Também pode se desenvolver bem em solos salinos e secos. Na Austrália e Papua Nova Guiné, esta espécie é geralmente limitada às planícies abaixo de 100 m, mas em Nova Caledonia desenvolvem-se a uma altitude de 900-1000 m (DORAN; TURNBULL, 1997).

Na Austrália são encontradas ao longo dos córregos, em pântanos de água doce e perto da praia, pois tolera o sal soprado pelo vento, o alagamento prolongado e um lençol freático flutuante (DORAN; TURNBULL, 1997).

A *M. quinquenervia* possui seu cultivo voltado para a produção de óleos (BROPHY, 1999). E, recentemente esta espécie vem sendo cultivado no Brasil em especial no estado de Minas Gerais conforme apresentado na Figura 3 (SILVA, 2007).

Figura 3 – Distribuição de *M. quinquenervia*.



Fonte: Discover-life, 2016.

### 1.3.2 Descrição Botânica da *M. quinquenervia*

*M. quinquenervia* é uma árvore de pequeno a médio porte, com aproximadamente 8 a 12m, podendo atingir até 25 m de altura dependendo das condições de crescimento locais (Figura 4), folhas elípticas-lanceoladas, coriáceas e casca esbranquiçada ou acinzentada (DORAN, TURNBULL, 1997; BROPHY, 1999).

Possuem folhas inteiras verde-escuro (Figura 5), duras, estreitas com medidas de 4-9 cm de comprimento e 2-3,5 cm de largura e 5 cm (raramente 3 ou 7 cm) veias paralelas da base à ponta, possuem um cheiros quando esmagadas, geralmente com glândulas de óleo, mas sem estípulas e bissexuais (BOLAND et al., 1984; DORAN, TURNBULL, 1997).

As flores (Figura 5) são produzidas em forma de cachos de 5 a 3,5 cm, geralmente branco ou branco-creme, raramente esverdeada ou avermelhada. A parte visível de cada flor é formado por 5 pacotes de estames 10-20 mm de comprimento. O tempo de floração de costume na Austrália é entre março e julho, mas pode ocorrer em outras vezes ou durante todo o ano (DORAN; TURNBULL, 1997).

Figura 4 – Árvore de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake

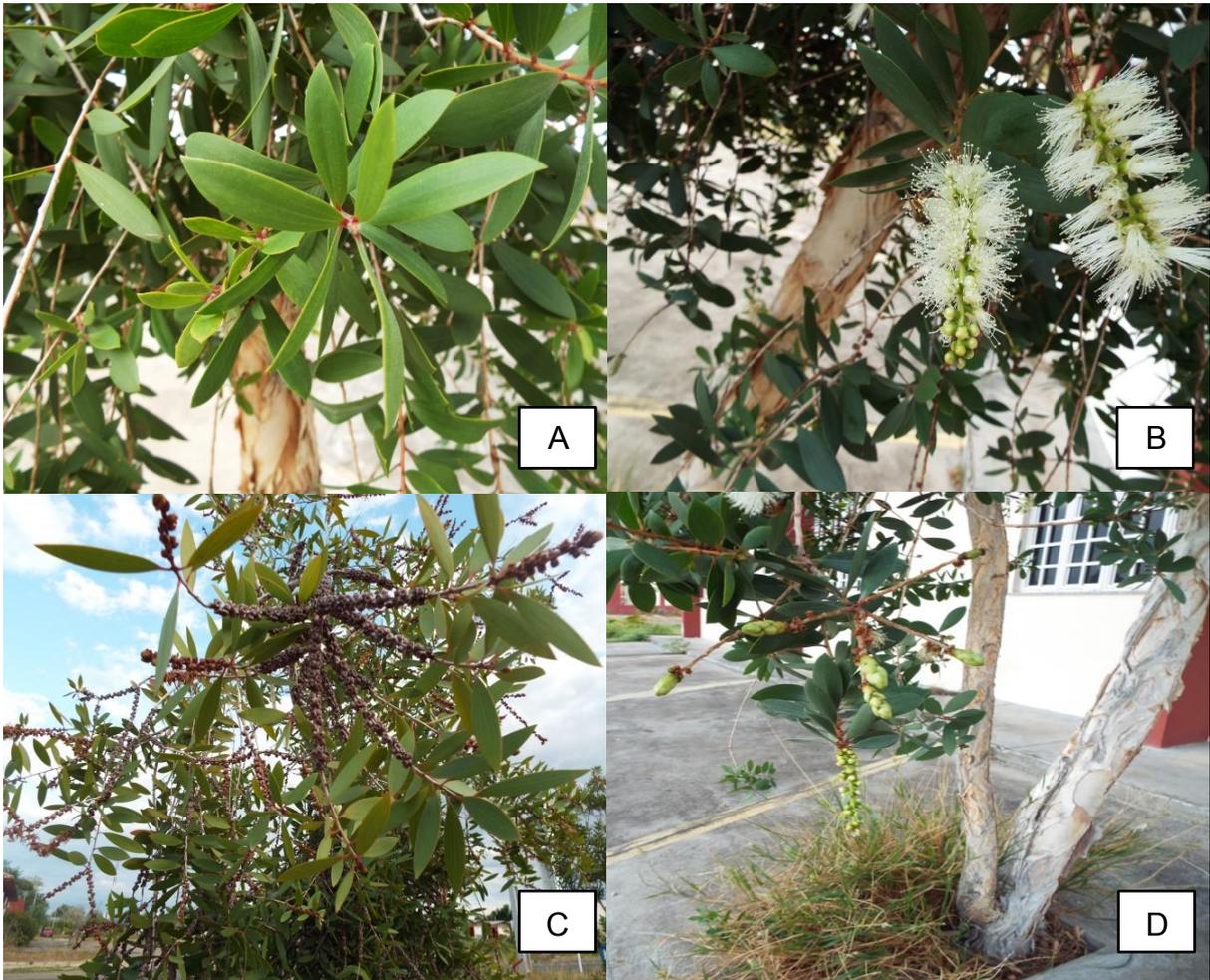


Fonte: Autor

Em suas inflorescências são produzidos entre 30 e 70 frutos (Figura 5), estes apresentam aspecto lenhoso e coloração marrom, cilíndricos e medem 3 a 5 mm, coloração castanho-acinzentado, duro e persistente, possui uma abertura em forma de fenda de 3-4 mm. Suas sementes são produzidas quando as árvores atingem entre 3-4 anos de idade (DORAN; TURNBULL, 1997).

O caule (Figura 5) é moderadamente reto para o torto, a casca grossa de cor pálida é composta de muitas camadas sempre com aparência de descascar, e em grandes troncos torna-se áspero e desganhado (DORAN; TURNBULL, 1997).

Figura 5 – A) Folhas de *M. quinquenervia*; B) Flores de *M. quinquenervia*; C) Frutas *M. quinquenervia*; D) Caule de *M. quinquenervia*



Fonte: Autor

### 1.3.3 Utilidades da *M. quinquenervia*

A sua madeira tem sido utilizada para vários fins, incluindo madeiras fina, postes de cercas, grades, pisos, madeiras de casas e celulose. A casca tem uma variedade de usos potenciais, tais como um aditivo em adubos e produção de carvão. Também são obtidas fibras da madeira para serem utilizadas como uma fonte de polpa (DORAN; TURNBULL, 1997).

As árvores são utilizadas no controle de erosão, além de serem consideradas ornamentais, produzem sombra ou abrigo e podem ser usados para quebra-ventos. Para apicultura, a *M. quinquenervia* é uma boa fonte de néctar e pólen para as

abelhas e torna-se mais valiosa pelo seu período de floração prolongado. O mel tem um sabor forte e de baixa densidade (DORAN; TURNBULL, 1997).

No Brasil verifica-se alguns projetos paisagísticos para a introdução da *M. quinquenervia*, porém, sabe-se da agressividade da espécie e a existência de regiões ecologicamente favoráveis ao seu desenvolvimento, com grandes extensões alagadas de água doce e salobra (SILVA, 2007).

#### 1.3.4 Óleo Essencial de *M. quinquenervia*

Os quimiótipos de plantas aromáticas podem ser diferenciados ao analisar sua composição química. De acordo com os estudos de Wheeler (2007) e Wheeler et al. (2003) para a espécie *M. quinquenervia* existem dois quimiótipos, o quimiótipo I (composto majoritário é o sesquiterpeno *E*-nerolidol) e para o quimiótipo II (composto majoritário é o sesquiterpeno viridiflorol) que são identificados por CG-EM.

Os componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Melaleucas* no Brasil, estudadas no estado Minas Gerais apresentam uma alta porcentagem de monoterpenos e alguns sesquiterpenos dentre eles terpinen-4-ol (53,7% *M. alternifolia* Cheel), 1,8-cineol (80,2%, em *M. armillaris* Sm., 79,5%, em *M. ericifolia* Sm., 43,7%, em *M. cajuputi* Roxb), viridiflorol (71,0%, em *M. quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake) e metileugenol (96,6%, em *M. leucadendra* (L.) L) (SILVA, 2007). A espécie *M. quinquenervia* apresentou em Madagascar 1,8-cineole (23%), viridiflorol (20%), terpinolene (5%), (*E*)-nerolidol(87%) (PANJA et al., 1994). Na Austrália o *E*-nerolidol (74–95%), linalool (14–30%) (IRELAND et al.,2002). Nos Estados Unidos (*E*)-nerolidol (DRAY JR et al., 2004).

Segundo Seri-Kouassi et al. (2004), o óleo essencial de *Melaleuca quinquenervia* foi efetivo no controle de adultos de *C. maculatus*, via fumigação, com DL<sub>50</sub> de 3,09 µL/L de ar, sendo os compostos majoritários eucaliptol (52%) e limonene (13%), considerados os principais responsáveis pela ação inseticida. Várias espécies de *Melaleuca* exerceram ação fumigante contra adultos de *Sitophilus oryzae* L., com valores de DL<sub>50</sub> variando entre 28,6 e 50 µL/L de ar (LEE et al., 2004).

Ainda sobre a ação da espécie *M. quinquenervia* verifica-se ação contra a secreção do trato respiratório superior (Blumenthal et al., 1998), tratamento de tosses e bronquite (Gruenwald; Brendler; Jaenicke, 2000). Entre os usos não comprovados, tem-se a utilização do óleo para reumatismo, neuralgia e cistite. No que se refere às interações medicamentosas, o óleo de niaouli (*M. quinquenervia*) pode reduzir o efeito de outras drogas em função do conteúdo de 1,8-cineol, 35-60%, que induz a detoxificação de enzimas hepáticas (Blumenthal et al., 1998).

#### 1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes das plantas através da destilação por arraste a vapor d'água. De forma geral são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Apresentam características físico-químicas, líquidas e de aparência oleosa à temperatura ambiente, mistura-se com metabólitos secundários, possui aroma agradável, são solúveis em solventes orgânicos apolares, tais como éter, ao entrarem em contato com a água dissolvem-se em parte, formando assim, os hidrolatos. Apresentam sabor geralmente acre (ácido) e coloração incolor ou meio amarelada, raramente, apresentam coloração mais intensa (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais (OE's) são produtos originados do metabolismo secundário das plantas e, geralmente, possuem composição química complexa. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações, porém verifica-se que a maioria dos constituintes derivam de terpenóides. Entre esses compostos destacam-se os fenilpropanóides, preponderando os terpenóides (DABAGUE, 2008; SIMÕES; SPITZER, 2004; SANTOS et al., 2004).

As espécies produzem óleos essenciais que as protegem de herbívoros e microrganismos patogênicos, que também exercem, outras funções ecológicas, bem como atração de polinizadores, dispersores de sementes, etc. (KANAAK; FIUZA, 2010). Essas substâncias são formadas durante o desenvolvimento, as espécies aromáticas sintetizam tais compostos (ARAUJO et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os óleos essenciais, sem alterações químicas, também são utilizados, diretamente, com agentes protetores de culturas e produtos estocados. Essa atividade está relacionada com os constituintes majoritários presentes no óleo essencial (MONTANARI, 2010).

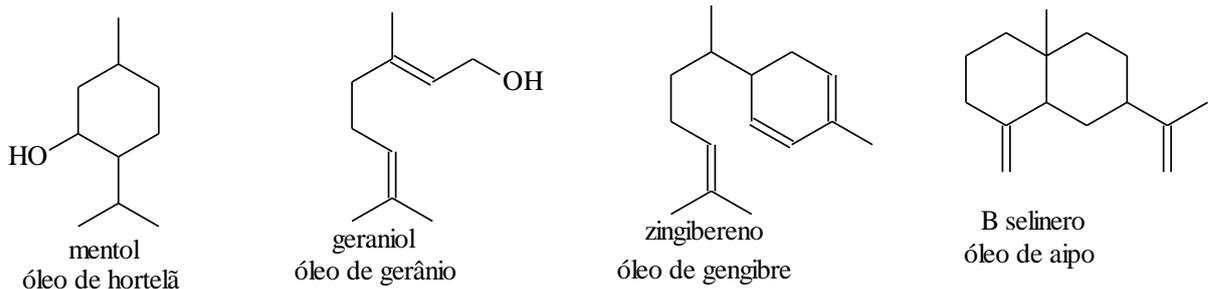
De acordo com Piper et al. (2001 apud KANAAK; FIUZA, 2010), determinados terpenos presentes nos óleos essenciais são capazes de tornarem a membrana celular do fungo permeável, causando o vazamento de seu conteúdo.

Na produção de OE's, o Brasil possui lugar de destaque, junto com a Índia, China e Indonésia, sendo estes países considerados os 4 grandes produtores mundiais. O Brasil leva esse título decorrente da extração de óleos cítricos, obtidos de subprodutos da indústria de sucos. Historicamente, o óleo de pau-rosa, sassafrás e menta tiveram destaque na exportação (BIZZO et al., 2009).

#### **1.4.1 Terpenos**

Os terpenos compõem uma classe diversa de metabólitos secundários. Mais de 20 mil terpenos são conhecidos. Eles podem ser hidrogenados ou podem conter oxigênio e ser álcoois, cetonas ou aldeídos. Os terpenos (Figura 6) que contêm oxigênio são algumas vezes chamados terpenóides. Certos terpenóides são usados como temperos, perfumes e remédios há centenas de anos (BRUICE, 2006; HANSON, 2003).

Figura 6 – Estrutura química dos terpenos



Fonte: (BRUICE, 2006).

Os terpenos possuem átomos de carbono em um número múltiplo de 5. Essas substâncias de ocorrência natural contêm 10, 15, 20, 25, 30 e 40 átomos de carbono, o que sugere que há uma substância com cinco átomos de carbono que serve como unidade de estrutura básica de unidades de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno), usualmente de forma cabeça-cauda (a terminação ramificada de isopreno é chamada cabeça e a terminação não ramificada é chamada de cauda), forma-se assim o esqueleto de carbono de duas unidades de isopreno com uma ligação entre a cauda de uma e a cabeça de outra unidade como pode-se observa na Figura 7 (BRUICE, 2006).

Figura 7 – Estrutura química do isopreno



Fonte: (BRUICE, 2006).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de carbonos que contem. Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno, tendo, portanto, dez carbonos. Os sesquiterpenos, com 15 carbonos, são formados por três unidades de isopreno. Muitas fragrâncias e sabores encontrados em plantas são

monoterpenos e sesquiterpenos apresentados na Tabela 1 (BRUICE, 2006; HANSON, 2003).

Tabela 1 – Classificação de Terpenos.

<b>Átomo de carbono</b>	<b>Classificação</b>	<b>Átomos de carbono</b>	<b>Classificação</b>
10	monoterpenos	25	sestertepenos
15	sesquiterpenos	30	triterpenos
20	diterpenos	40	tetraterpenos

Fonte: Bruice (2006).

#### 1.4.2 Extração de óleos essenciais

Há milhares de anos, os óleos essenciais vêm sendo extraídos de plantas e usados nas indústrias de perfumes, cosméticos e fármacos de uso medicinal. A importância econômica que as plantas aromáticas representam à Região Amazônica está associada à aplicação de seus óleos essenciais e uso de seus aromas em processos tecnológicos (SANTOS et al., 2004).

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleurage, gases supercríticos e micro-ondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (CRAVEIRO et al., 1981).

##### 1.4.2.1 Extração por hidrodestilação

A destilação por arraste a vapor é um processo muito parecido com a destilação simples, mas deve-se ter uma maneira de colocar água quente dentro da aparelhagem sem a interrupção da destilação. Faz a destilação por arraste a vapor quando o material é pouco solúvel em água, podendo se decompor se seu ponto de ebulição, e a ebulição é extremamente turbulenta em uma destilação a vácuo. O aquecimento de uma substância na presença de vapor faz com que a substância entre em ebulição com baixas temperaturas. Esse fato deve-se a fatores tais como

as pressões parciais da água e dos óleos orgânicos (ZUBRICK, 2005; SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

## 1.5 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA

### 1.5.1 Cromatografia em Fase Gasosa

A técnica de cromatografia gasosa (CG), trata-se de um método físico onde os componentes de uma mistura são separados por meio de fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário amostra. Analisa-se muitos compostos voláteis por esta técnica (CIOLA, 1985).

A fase móvel um gás entra no cromatógrafo e passa pelo injetor, este já se encontra aquecido induzindo uma rápida vaporização da fase estacionária (a amostra), que chega à uma coluna arrastando consigo a amostra, onde ocorre a separação dos componentes. Após separados, os componentes passam por um detector, e os sinais enviados são registrados em um cromatograma (NETO; NUNES, 2003).

### 1.5.2 Espectrômetro de massas

O método de espectrômetro de massas, possui os princípios fundamentais que datam do fim dos anos de 1890, quando J. J. Thompson determinou a razão massa/carga do elétron, e Wien estudou a deflexão magnética de raios anódicos e determinou que os raios eram carregados positivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

O composto é ionizado (método de ionização), os íons são separados na base da razão massa/carga (método de separação dos íons) e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de espectro. No impacto de elétrons (EI), o espectrômetro de massas bombardeia com um feixe de elétrons de alta energia moléculas que estão na fase de vapor e registra o espectro dos íons positivos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A amostra pode ser um gás, um líquido ou um sólido. Deve-se converter uma quantidade suficiente da amostra em vapor para se obter um fluxo de moléculas, o qual deve fluir para dentro da câmara de ionização (PAIVA et al., 2010; NETO; NUNES, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência da variação diurna na composição química e bioatividade do óleo essencial das folhas frescas e secas de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake em dois períodos do ano de 2015.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o óleo essencial das folhas frescas e secas de *M. quinquenervia* por hidrodestilação, em diferentes épocas e horários durante o ano.
- ✓ Avaliar o rendimento dos óleos essenciais de *M. quinquenervia* obtidos neste mesmo período do ano;
- ✓ Analisar por CG-EM e CG-DIC os constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *M. quinquenervia*;
- ✓ Testar a citotoxicidade do óleo essencial pelo teste de *Artemia salina*;
- ✓ Verificar o potencial antioxidante do óleo essencial por DPPH;
- ✓ Realizar bioensaios para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O estado de Roraima possui duas estações climáticas bem definidas, chuvosa e não chuvosa (ARAÚJO et al., 2001). Desta forma foram realizadas duas coletas, sendo uma no mês de maio e outra em outubro, cada coleta foi composta por aproximadamente 1200 g das folhas da espécie *M. quinquenervia*.

As folhas da espécie *M. quinquenervia* foram coletadas no *Campus* Paricarana da Universidade Federal de Roraima (UFRR), autorizada pelo comprovante de registro e coleta expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (ANEXO 1), onde foram selecionadas as que apresentaram um bom aspecto físico, as mesmas foram levadas ao laboratório de Química de Produtos Naturais do NPPGCT.

A planta foi identificada por José Ramos do Instituto Nacional de Pesquisa Amazônica (INPA). Após a identificação, montou-se uma exsicata da planta contendo suas partes e foi depositada no herbário do INPA com registro 268127 (Figura 8).

Figura 8 – Exsicata de *Melaleuca quinquenervia*.



Fonte: Autor

As folhas foram higienizadas, sendo 600 g destinadas a extração com folhas frescas e 600g foram destinadas a extração com folhas secas. A secagem das folhas foi realizada por meio de uma estufa de circulação de ar, com temperatura controlada entre 60 a 70 °C, durante 5 dias. As folhas secas foram trituradas em um moinho de facas e com o auxílio de um tãmis 20-40 mesh da marca Ber Tel, obtendo assim um pó fino e homogêneo. A massa foi obtida com auxílio de uma balança.

### 3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada, por meio da técnica de hidrodestilação (arraste a vapor d'água) (Figura 9), com o auxílio do aparelho extrator tipo Clevenger, marca Spell, com circuito fechado de água (SANTOS, 2011).

Figura 9 – Aparelho extrator tipo Clevenger



Fonte: Autor

Todas as extrações foram realizadas em triplicatas. Foi adicionado em cada balão de fundo redondo de 5000 mL, 200 g de folhas (fresca e seca de acordo com cada extração) de *M. quinquerveia*, o solvente utilizado foi água destilada. Uma manta aquecedora foi utilizada como fonte de calor e resfriador (banho termostaticador). Como os óleos essenciais possuem ponto de ebulição inferiores ao da água, assim a água (100°C), a mesma arrasta o óleo essencial. Após decorridas

3 horas de extração, o óleo obtido foi recolhido em um frasco de vidro âmbar devidamente tarado. Para a obtenção do rendimento do óleo essencial, foi obtida uma média entre os rendimentos das três extrações e seus respectivos desvios padrões (OLIVEIRA et al., 2012; SANTOS, 2011).

O óleo essencial foi tratado com o sulfato de sódio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidrido, para remover a umidade presente (ESTANISLAU et al., 2001).

### 3.3 ANÁLISES POR CG-EM E CG-DIC

Após a obtenção dos óleos essenciais da *M. quinquenervia*, deu-se início à análise da composição química, utilizando Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa (CG-EM) e Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização de Chama (CG-DIC), analisando os aspectos qualitativo e quantitativo dos constituintes químicos presentes no óleo. As análises por CG-EM e CG-DIC foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As análises foram realizadas em um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Equipado com uma Coluna: Rxi-1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Restek). A temperatura da coluna foi de 50 °C (3 min), sendo 3 °C.min<sup>-1</sup>, até 230 °C. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de amostras do óleo essencial diluídas a 1% em clorofórmio, o injetor com temperatura inicial de 250 °C, com razão em modo Split (1:10), Interface CG-EM a 250 °C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70 eV) a 250 °C. A vazão do gás de arraste (Hélio) foi de 2,0 mL.min<sup>-1</sup>. O espectro de massa de cada componente do óleo essencial da *M. quinquenervia* foi criteriosamente analisado em comparação aos espectros do acervo das bibliotecas espectral (NIST11), utilizando Software GCMS Solution (Shimadzu).

A quantificação dos componentes do óleo essencial da *M. quinquenervia* foi realizada por meio da cromatografia gasosa, utilizando como equipamento o Cromatógrafo a Gás HP 7820A (Agilent). Equipado com uma coluna capilar com dimensões 30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Agilent), com temperatura de 50°C (0 min), 3 °C /min, até 230 °C. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de amostras do óleo essencial diluídas a 1% em clorofórmio, com temperatura inicial de 250 °C em razão Split (1:30). O detector

DIC, com temperatura de 250 °C. O gás de arraste, H<sub>2</sub> a 3 mL.min<sup>-1</sup>. Software de aquisição de dados: EZChrom Elite Compact (Agilent).

### 3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As atividades biológicas foram realizadas na Universidade Federal de Roraima e Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 3.4.1 Determinações da Citotoxicidade Frente à *Artemia salina*

A metodologia utilizada para avaliar a toxicidade foi a *Artemia salina*, seguindo a metodologia descrita por Mayer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993).

##### 3.4.1.1 Preparação da Solução Salina

Foi adicionada uma solução salina artificial (40g de sal marinho em 1 L de água destilada), em um aquário (incubadora). O pH desta solução foi ajustado 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10%). A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente e com aeração durante todo o experimento. Foram colocados aproximadamente 100 mg de ovos de *A. salina*. O sistema foi coberto com papel alumínio para a diferença de iluminação. Os náuplios foram atraídos pela iluminação após a eclosão, facilitando a separação destes e das cascas dos cistos. Durante a incubação, a temperatura foi mantida em torno de 25 °C e a eclosão dos ovos foram monitoradas a cada 12 horas, a mesma ocorreu no período de 48 horas.

##### 3.4.1.2 Preparação de Soluções para o Bioensaio

As soluções partiram de uma solução de 25 mL contendo 1000 µL.mL<sup>-1</sup> de óleo essencial de *M. quinquenervia*, solubilizada em DMSO a 1% como emulsificante e o volume restante completado com água salina.

Partindo da primeira solução, pipetou-se volumes de 12,5 mL a outros balões contendo 1 mL de uma solução de DMSO a 1% em solução salina e completados com solução salina, para obter a concentração de 500  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram realizadas 12 diluições para obter as concentrações inferiores, utilizando a seguinte equação:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

#### 3.4.1.3 Realização dos testes

Após o período de incubação de 48 horas, 10 microrganismos (náuplios de *A. salina*), foram selecionados e expostos nos tubos de ensaios com as diferentes concentrações diluídas.

Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Utilizando uma solução salina sem extrato como controle positivo, que foi submetido ao mesmo procedimento experimental que os óleos testados para efeitos comparativos da influência do veículo utilizado sobre a resposta das larvas de *A. salina*. E como testemunha solução salina e DMSO a 1% em solução salina.

Este sistema foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas, sem aeração sendo os frascos mantidos sob iluminação.

Após o período de 24 horas de incubação foram contabilizados o número de larvas mortas ou imobilizadas e vivas em cada frasco, através da visualização macroscópica e os valores registrados em formulário.

#### 3.4.1.4 Avaliação da Citotoxicidade

Após a contagem do número de náuplios vivos e mortos/imobilizados. Foi calculada a probabilidade de mortalidade de acordo com a fórmula

$$\text{Probabilidade de Mortalidade (\%)} = \frac{r}{n} \times 100$$

Onde: r = número de artemias mortas; n = número de artemias totais no tubo de ensaio.

Os valores em porcentagem da probabilidade de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a porcentagem de mortalidade no teste controle negativo de acordo com a Fórmula de Abbot.

Fórmula de Abbot

$$\% \text{ Probabilidade de Mortalidade} = \frac{100 \times (\%T - \%C)}{100\% - \%C}$$

Onde: %T representa a mortalidade de artemias testadas com a amostra de interesse; %C, a mortalidade de artemias utilizadas no controle positivo.

Na interpretação dos resultados foi determinada a Concentração Letal 50% CL<sub>50</sub>.

#### 3.4.1.5 Cálculo da CL<sub>50</sub>

Para a obtenção da CL<sub>50</sub> no teste de avaliação de toxicidade utilizou-se o programa estatístico Microsoft Excel 2010. O CL<sub>50</sub> foi calculado por meio da equação da reta obtida com o gráfico.

#### 3.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de *M. quinquenervia*

A metodologia consiste na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-2-picril-hidrazila (DDPH) em  $\lambda = 515 \text{ nm}$  (MIRANDA; FRAGA, 2006). A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata por método de

espectrofotometria de absorção molecular UV-visível. A técnica consistiu na incubação por 30 minutos de 1500 µL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 1500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de óleo essencial de *M. quinquenervia* (500; 1500; 2500; 5000; 10000 µg.mL<sup>-1</sup>) em metanol.

A solução controle foi preparada seguindo a mesma metodologia, porém substituindo-se 1500 µL do óleo essencial em 1500 µL de solvente metanol por quercetina. Para a solução denominada “branco”, foi utilizado solvente metanol. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA %)

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

Obtidas as absorbâncias, calculou-se as Concentrações Eficientes (CE<sub>50</sub>) do óleo essencial necessária para capturar 50% do radical livre DPPH, por meio da equação da regra obtida graficamente (CARBONARI, 2005).

### 3.4.3 Bioensaio Antibacteriano

As atividades Biológicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram avaliadas as atividades dos óleos essenciais frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Para a realização destes bioensaios, os óleos essenciais foram reunidos, formando quatro grupos, haja visto que a variação da composição química foi mínima.

O Ensaio antibacteriano foi desenvolvido com duas bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e *Citobacter freundii* (ATCC8090), duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). As concentrações testadas foram de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 3,9 e 1,95 µg.mL<sup>-1</sup> (ZACCHINO; GUPTA, 2007). As amostras foram pesadas e dissolvidas em DMSO a 500 mg.mL<sup>-1</sup>. 124 µL desta solução foi adicionado a um

balão contendo 2976 µL de BHI (Brain Heart Infusion) caldo (solução de trabalho) para bactéria. Um pré-inóculo foi preparado em que as bactérias foram armazenadas sob refrigeração, e transferidas com auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C durante 24 h. Em seguida, o pré-inóculo (500 µL) foi transferido para tubos contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração foi ajustada a 0,5 de padrão de turbidez McFarland (108 UFC ml<sup>-1</sup>), obtendo-se assim os inóculos utilizados nos bioensaios.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 micropoços em triplicadas. Onde 100 mL de caldo BHI foi adicionado a cada poço. No primeiro poço, 200 µL de solução de trabalho também foram adicionados. A solução foi homogeneizada e 100 µL transferida para o poço seguinte e assim por diante até que o último poço, de onde 100 µL foi descartado. Em seguida, 100 µL os inóculos contendo os microrganismos foram adicionados aos poços. Oito diferentes concentrações de cada amostra foram testadas. Um controle positivo desprovido de solução de trabalho nos permitiu examinar o crescimento dos microrganismos. Um controle negativo, sem o inóculo dos microrganismos nos permitiu padronizar a cor proveniente da solução de trabalho. Uma placa de controle, contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada esterilizada foram adicionados à experiência como controle de caldo BHI estéril.

Um controle foi preparado, contendo antibiótico Ampicilina (padrão antibacteriano), para observar a atividade destes antibióticos sobre os microrganismos. O crescimento dos microrganismos foram medidos em leitor de placas de ELISA (492 nm), imediatamente após o término do experimento (0 h). Foram incubadas a 37°C e lidos novamente após 24 h do experimento. Os resultados do percentual de inibição foram calculados por meio da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{AC1 - AC2}{AH - AM} \times 100$$

AC1 = absorvância da amostra; AC2 = absorvância da amostra de controle; AH = absorção de microrganismos no controle de controle e AM = absorvância do controle do meio de cultura.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. quinquenervia*

Os dois períodos de coleta foram determinados a partir dos estudos de Araújo et al. (2001) analisando dados de 1997, onde definiu que o período de maior precipitação pluviométrica em Boa Vista - RR, que inicia-se no mês de abril prolongando-se até setembro, sendo junho e julho os meses de maior precipitação. Os meses de outubro a março são compreendidos como os de menor precipitação pluviométrica.

Visto os dados obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (Tabela 2), no ano de 2014 ocorreu uma precipitação total de 1215,1 mm, desse total 911,1 mm trata-se de período chuvoso. Para o ano de 2015 ocorreu uma precipitação total de 1316,2 mm, desse total 1214,3 mm trata-se de período chuvoso.

Tabela 2 – Precipitação pluviométrica de Boa Vista, Roraima.

ANO	*NORMAL		2015			2014		
	mm	dias	mm	dias	°C	mm	dias	°C
JAN	29,3	4	9,7	5	29,4	3,6	2	29,3
FEV	24,7	3	1	2	30	19,2	5	29,4
MAR	47,8	5	7,7	2	29,8	22	6	29,7
ABR	122,2	10	50,9	7	29,5	72,3	10	29
<b>MAI</b>	<b>291,2</b>	<b>19</b>	<b>334,3</b>	<b>18</b>	<b>27,3</b>	<b>67,5</b>	<b>7</b>	<b>29,8</b>
JUN	352,9	23	248,2	21	27,3	372,1	24	27,9
JUL	335,1	19	301,5	21	29,4	215	18	27,3
AGO	209,7	17	263,7	16	28,5	174,9	16	28,6
SET	97,1	8	15,7	4	30,3	9,3	4	30,3
<b>OUT</b>	<b>67,6</b>	<b>5</b>	<b>44,4</b>	<b>5</b>	<b>30,7</b>	<b>117,8</b>	<b>8</b>	<b>30</b>
NOV	56,8	5	19	7	30,5	110,9	7	30,1
DEZ	44,2	5	20,1	10	29,9	30,5	7	29,7
TOTAL	1678,6	123	1316,2	118	29,4	1215,1	114	29,3
CHUVOSO	1408,2	96	1214,3	87	28,7	911,1	79	28,8

\*Normal= Média esperada para cada mês  
 Fonte: INMET, 2015.

Sabe-se que com esta variação do índice pluviométrico, geralmente, podem ocorrer interferência no rendimento e na composição química dos óleos essenciais e extratos obtidos de plantas (FIGUEIREDO et al., 2008). De acordo com Simões e Spitzer (2004), o ambiente onde o vegetal se desenvolve e tipo de cultivo, influem na composição e rendimentos dos óleos essenciais. Outros fatores que podem interferir são, a temperatura, a umidade relativa, duração total de exposição ao sol, regime de ventos.

Analisando os meses de maio e outubro de 2014 e 2015, verificou-se que em maio de 2015 a precipitação pluviométrica foi superior à de 2014, sendo o mês com maior índice pluviométrico do ano, confirmando o que foi observado no período da coleta de um clima chuvoso e umidade do solo. Em outubro o índice pluviométrico foi de 44,4 mm, verifica-se que nesse mês inicia-se o período seco, comparando com o mesmo mês de 2014, a pluviosidade foi bem inferior, confirmando o observado no período da coleta, onde verificava-se um clima seco, quente e com bastante incidência de sol.

Verificada essa possível variação, o óleo essencial de *M. quinquenervia* foi extraído em dois períodos durante um ano com objetivo de verificar o seu rendimento e avaliar as variações na sua constituição química nestes períodos. Foram extraídos óleos essenciais das folhas frescas e secas em quatro horários durante um dia nestes dois períodos do ano de 2015.

Assim, realizou-se uma extração no mês de maio e outra em outubro, a fim de se obter o óleo essencial em período de alto índice pluviométrico e outro com baixo índice pluviométrico, respectivamente.

O rendimento da extração do óleo essencial de *M. quinquenervia* por hidrodestilação, foi obtido por meio da seguinte equação:

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

Os valores dos rendimentos médios das extrações encontram-se dispostos na Tabela 3 e na Figura 10 para melhor visualização.

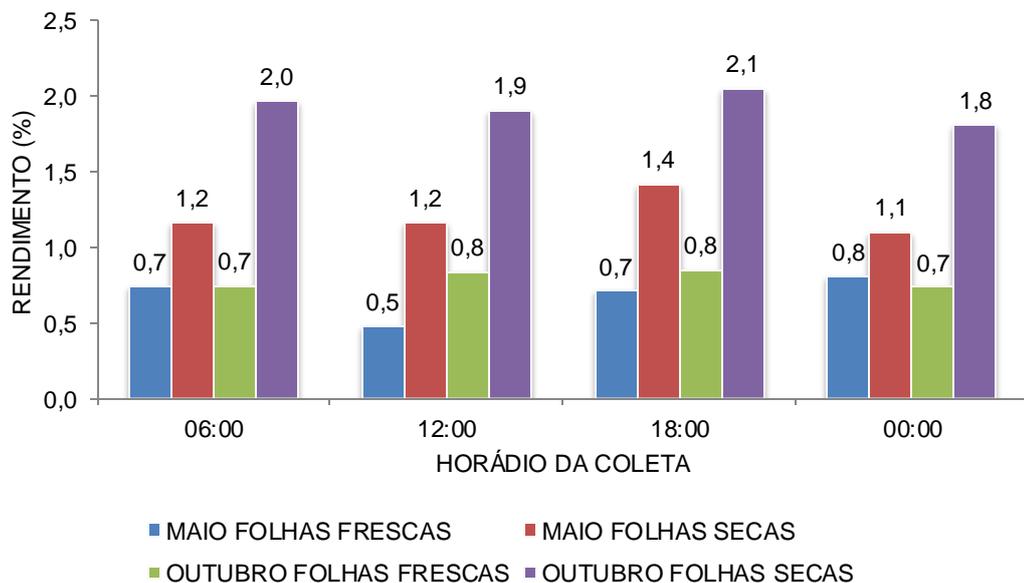
Tabela 3 - Rendimento do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* extraído nos meses de maio e outubro.

	Coleta	P.M. (mm)*	Óleo Essencial (g)	Rendimento Médio (%) ± S
Maio Folhas Frescas	06:00	334,3	3,2651	0,7381 ± 0,92
	12:00		2,7037	0,4760 ± 0,26
	18:00		4,1377	0,7087 ± 0,40
	00:00		4,6796	0,8061 ± 0,27
Maio Folhas Secas	06:00	334,3	5,9560	1,1612 ± 0,59
	12:00		6,4509	1,1621 ± 0,58
	18:00		4,2627	1,4161 ± 0,11
	00:00		4,1984	1,1035 ± 0,13
Outubro Folhas Frescas	06:00	44,4	4,4824	0,7471 ± 0,30
	12:00		5,0202	0,8367 ± 0,33
	18:00		5,0984	0,8497 ± 0,13
	00:00		4,4201	0,7367 ± 0,10
Outubro Folhas Secas	06:00	44,4	11,7904	1,9651 ± 0,28
	12:00		11,4197	1,9033 ± 0,41
	18:00		12,3020	2,0503 ± 0,17
	00:00		10,8370	1,8061 ± 0,44

\*PM= Pluviosidade Mensal em milímetros por metro quadrado.

S= Desvio Padrão

Figura 10 - Rendimentos dos óleos essenciais da espécie *M. quinquenervia* coletados em maio e outubro.



Para as extrações do mês de maio (período chuvoso) verificou-se um maior rendimento para o óleo essencial obtido a partir das folhas secas, tendo maior destaque para a extração das 18:00 horas com rendimento de  $1,42 \pm 0,11$  % e o menor rendimento foi no horário das 12:00 horas com rendimento de  $0,47 \pm 0,26$  % com as folhas frescas.

Em outubro (período seco) o rendimento de  $2,05 \pm 0,17$  % corresponde ao maior rendimento, obtido com o material vegetal seco e as 18:00 horas e o menor rendimento foi obtido com as folhas frescas, na extração de 00:00 horas, correspondente a  $0,74 \pm 0,10$  %.

Comparando os valores dos rendimentos obtidos em maio e outubro, pode-se sugerir o horário das 18:00 horas apresentou melhor potencial de rendimento para o óleo essencial para a espécie *M. quinquenervia*. Vale ressaltar que estes dois maiores rendimentos foram obtidos com as folhas secas.

Ambas as extrações realizadas em maio e em outubro com as folhas frescas apresentaram os menores rendimentos. O período chuvoso, o rendimento foi de  $0,4760 \pm 0,26$  % e no período seco o menor rendimento foi de  $0,74 \pm 0,10$  %.

Simões e Spitzer (2004) indicam que as coletas para extração de óleos essenciais sejam preferencialmente realizadas nas primeiras horas da manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa dos constituintes voláteis importante do óleo existente no vegetal.

Analisando a Figura 10 e a Tabela 3, verifica-se que os rendimentos para os óleos essenciais de *M. quinquenervia* variam entre  $0,47 \pm 0,26$  a  $2,05 \pm 0,17$  %. Essa faixa de rendimento encontra-se acima do valor encontrado na literatura para família Myrtaceae, gênero *Melaleuca* e para esta espécie.

Silva (2007) desenvolveu estudo com várias espécies de *Melaleucas*, os resultados dos rendimentos obtidos encontram-se na Tabela 4. Como já citado anteriormente a família Myrtaceae possui destaque devido ao ótimo rendimento do óleo essencial apresentado na literatura.

Tabela 4 – Rendimentos dos óleos essenciais para espécies de *Melaleucas* de acordo com Silva (2007)

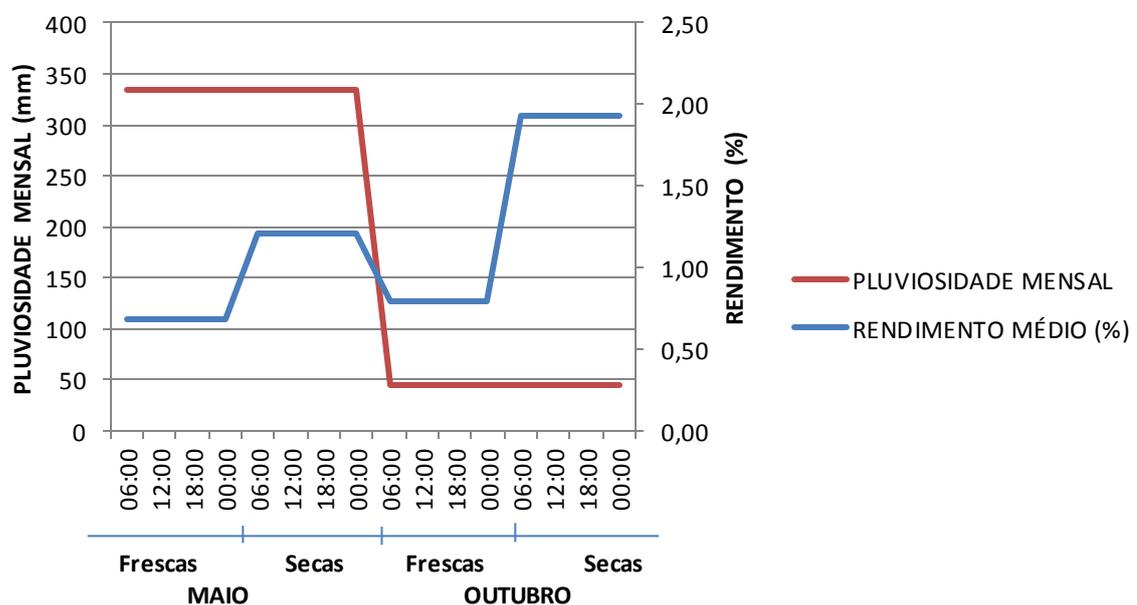
Espécies	Rendimentos (%)
<i>M. alternifolia</i>	4
<i>M. cajuputi</i>	4
<i>M. armillaris</i>	3,9
<i>M. platyphylla</i>	3,4
<i>M. leucadendra</i>	1,5
<i>M. quinquenervia</i>	<b>1,5</b>
<i>M. ericifolia</i>	0,7

Fonte: Silva (2007)

O óleo essencial extraído da espécie *M. quinquenervia*, apresentou rendimento superior às demais espécies citadas em Silva (2007) em Minas Gerais, sendo que o rendimento para a espécie pode-se considerar como equivalente para as extrações de outubro com folhas frescas e bem superior para as folhas secas.

Analisando os dados pode-se considerar que é possível obter os melhores rendimentos dos óleos essenciais em período de estresse hídrico, a Figura 11 apresenta graficamente a relação do rendimento médio para cada período das extrações com a pluviosidade mensal dos dados fornecidos pelo (INMET, 2015) e FEMARH-RR, 2015.

Figura 11 – Relação rendimento médio do óleo essencial e pluviosidade mensal durante os períodos de extração.



Analisando a Figura 11, pode-se verificar que o rendimento do óleo essencial e a pluviosidade mensal, são inversamente proporcionais, podendo assim, considerar que nos períodos de estiagem são mais propícios para a extração do óleo desta espécie, pois sua produção é intensificada, corroborado por estudos realizados por Figueiredo et al, (2008), Andrade e Gomes (2000), Valentini et al. (2010) e Quintão (2013) onde obtiveram um maior rendimento em suas análises com outras espécies. Em estudos de Silva (2014) em que obteve maiores rendimentos em seus óleos essenciais em Boa Vista, RR, com baixos índices pluviométricos, corroborando com o presente trabalho.

#### 4.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. quinquenervia*

A composição química dos óleos essenciais das folhas de *M. quinquenervia* coletadas em diferentes períodos e horários durante um ano foi obtida após análises por CG-EM e CG-DIC empregando padrões de hidrocarbonetos, o índice de Kovats (KI) e a comparação dos espectros de massas de cada constituinte com dados da literatura, nos aspectos qualitativo e quantitativo.

Para melhor organização as extrações receberam siglas, que estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Siglas das extrações

MÊS	EXTRAÇÃO	SIGLA	MÊS	EXTRAÇÃO	SIGLA
<b>MAIO FRESCA</b>	06:00	MQF01	<b>OUTUBRO FRESCA</b>	06:00	MQF05
	12:00	MQF02		12:00	MQF06
	18:00	MQF03		18:00	MQF07
	00:00	MQF04		00:00	MQF08
<b>MAIO SECA</b>	06:00	MQS01	<b>OUTUBRO SECA</b>	06:00	MQS05
	12:00	MQS02		12:00	MQS06
	18:00	MQS03		18:00	MQS07
	00:00	MQS04		00:00	MQS08

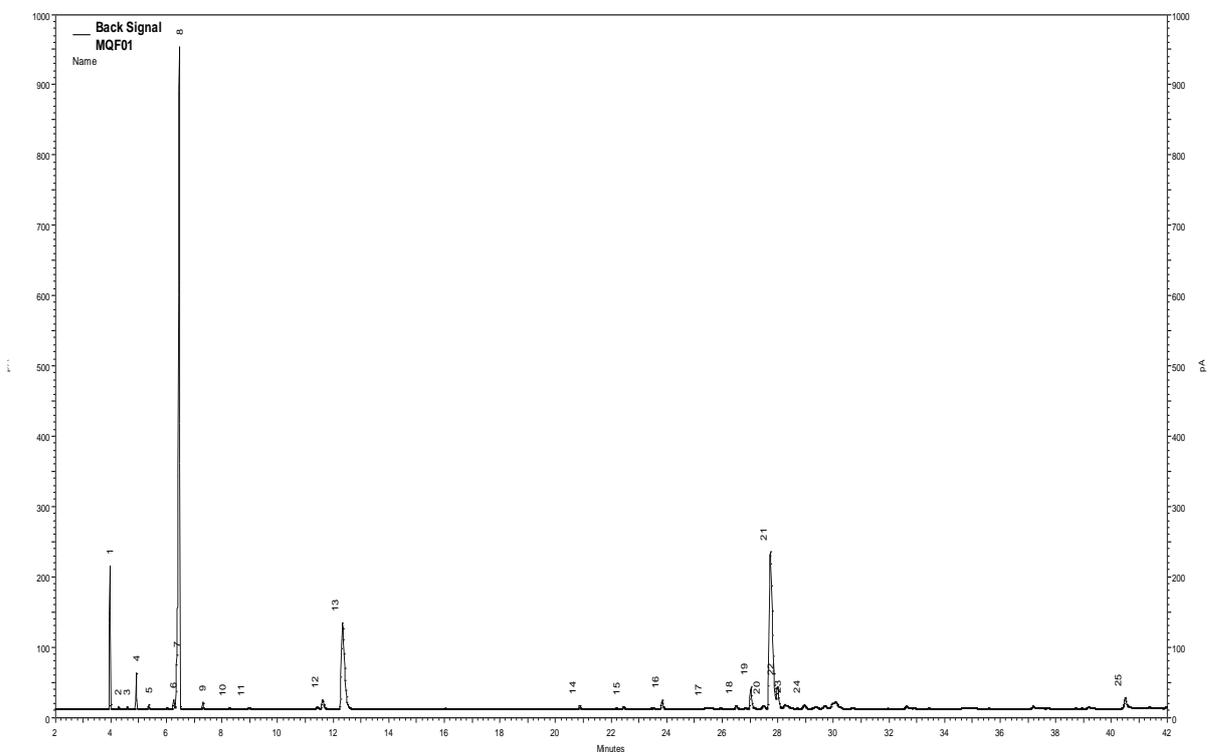
A Tabela 6 apresenta todos os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *M. quinquenervia*, por CG-EM e CG-DIC.

Tabela 6 - Constituintes químicos identificados por (CG/EM e CG/DIC) nos óleos essenciais das folhas de *M. quinquenervia*.

Pico	RT	MQF01	MQF02	MQF03	MQF04	MQS01	MQS02	MQS03	MQS04	MQF05	MQF06	MQF07	MQF08	MQS09	MQS10	MQS11	MQS12	Índice	
	min	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Kovats	Constituintes
<b>1</b>	<b>3.970</b>	<b>4.5</b>	<b>3.9</b>	<b>7.2</b>	<b>4.6</b>	<b>5.3</b>	<b>5.8</b>	<b>3.1</b>	<b>4.6</b>	<b>5.9</b>	<b>6.1</b>	<b>4.2</b>	<b>5.2</b>	<b>2.9</b>	<b>3.5</b>	<b>4.3</b>	<b>3.7</b>	<b>967</b>	<b>α-pineno</b>
2	4.273	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	975	benzaldeído
3	4.593	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	984	β-pineno
<b>4</b>	<b>4.921</b>	<b>1.4</b>	<b>1.0</b>	<b>1.7</b>	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>	<b>1.1</b>	<b>1.3</b>	<b>1.9</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>0.7</b>	<b>0.9</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>993</b>	<b>mirceno</b>
5	5.355	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.4	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	1004	α-terpineno
6	6.261	0.5	0.4	0.6	0.7	0.5	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	1028	p-cimeno
<b>7</b>	<b>6.371</b>	<b>1.6</b>	<b>1.3</b>	<b>0.4</b>	<b>0.6</b>	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	<b>0.7</b>	<b>1.0</b>	<b>1.4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.6</b>	<b>0.1</b>	<b>1.5</b>	<b>1.7</b>	<b>1.9</b>	<b>2.2</b>	<b>1031</b>	<b>limoneno</b>
<b>8</b>	<b>6.466</b>	<b>38.2</b>	<b>29.4</b>	<b>43.8</b>	<b>60.0</b>	<b>35.7</b>	<b>45.1</b>	<b>32.2</b>	<b>44.3</b>	<b>36.2</b>	<b>49.2</b>	<b>43.0</b>	<b>36.7</b>	<b>23.9</b>	<b>27.4</b>	<b>33.3</b>	<b>35.1</b>	<b>1033</b>	<b>1,8 cineol</b>
9	7.309	0.4	0.3	0.4	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.7	0.7	0.5	0.6	0.2	0.2	0.3	0.3	1055	E-β-ocimeno
10	8.270	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	1081	g-terpineno
11	8.961	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	1099	linalool
<b>12</b>	<b>11.615</b>	<b>1.1</b>	<b>0.9</b>	<b>0.9</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.2</b>	<b>1.0</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>	<b>1.0</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>1169</b>	<b>terpinen-4ol</b>
<b>13</b>	<b>12.337</b>	<b>13.3</b>	<b>10.4</b>	<b>10.1</b>	<b>11.4</b>	<b>11.3</b>	<b>12.8</b>	<b>14.2</b>	<b>12.6</b>	<b>13.9</b>	<b>11.0</b>	<b>13.1</b>	<b>13.1</b>	<b>10.3</b>	<b>11.9</b>	<b>11.3</b>	<b>12.0</b>	<b>1188</b>	<b>α-terpineol</b>
14	20.867	0.3	0.3	0.3	0.1	2.6	1.7	2.1	1.8	0.4	0.3	0.3	0.4	1.5	2.2	2.4	1.8	1412	β-cariofileno
15	22.448	0.2	0.1	0.1	0.1	1.0	0.7	0.9	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.9	0.8	0.7	1454	α-humuleno
16	23.837	0.7	0.6	0.6	0.2	1.4	1.1	1.4	1.1	0.4	0.4	0.4	0.4	2.3	1.5	1.3	1.1	1491	ledeno
17	25.416	0.2	0.7	0.8	0.0	0.5	0.4	0.5	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	3.9	0.1	0.1	0.0	1532	δ-cadineno
18	26.498	0.4	0.4	0.4	0.1	0.5	0.3	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.9	0.1	0.1	0.1	1561	palustrol
<b>19</b>	<b>27.033</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>0.9</b>	<b>2.0</b>	<b>1.4</b>	<b>2.2</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.3</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	<b>1575</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
20	27.482	0.5	0.5	0.4	0.2	0.4	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4	2.0	0.8	0.4	0.4	1587	
<b>21</b>	<b>27.731</b>	<b>24.4</b>	<b>19.8</b>	<b>19.6</b>	<b>9.4</b>	<b>23.0</b>	<b>16.2</b>	<b>26.1</b>	<b>15.7</b>	<b>20.6</b>	<b>17.3</b>	<b>22.0</b>	<b>25.7</b>	<b>28.9</b>	<b>33.1</b>	<b>27.3</b>	<b>30.0</b>	<b>1593</b>	<b>viridiflorol</b>
<b>22</b>	<b>27.993</b>	<b>2.5</b>	<b>2.0</b>	<b>1.9</b>	<b>1.1</b>	<b>2.2</b>	<b>1.6</b>	<b>2.6</b>	<b>1.6</b>	<b>3.2</b>	<b>2.1</b>	<b>2.6</b>	<b>3.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.9</b>	<b>0.9</b>	<b>0.7</b>	<b>1600</b>	<b>guaiol</b>
23	28.262	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.5	0.3	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	0.3	0.3	0.2	1607	ledol
24	28.943	0.6	0.5	0.5	0.2	0.5	0.4	0.6	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	1.3	0.4	0.3	0.3	1625	10-epi-eudesmol
25	40.509	1.8	8.5	2.1	0.5	0.8	0.6	0.5	0.7	0.8	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4	0.2	0.3	1929	
outros		4.6	16.3	5.6	5.7	8.0	6.6	8.6	8.7	9.3	4.9	5.6	7.0	14.4	9.9	10.0	5.9	863	

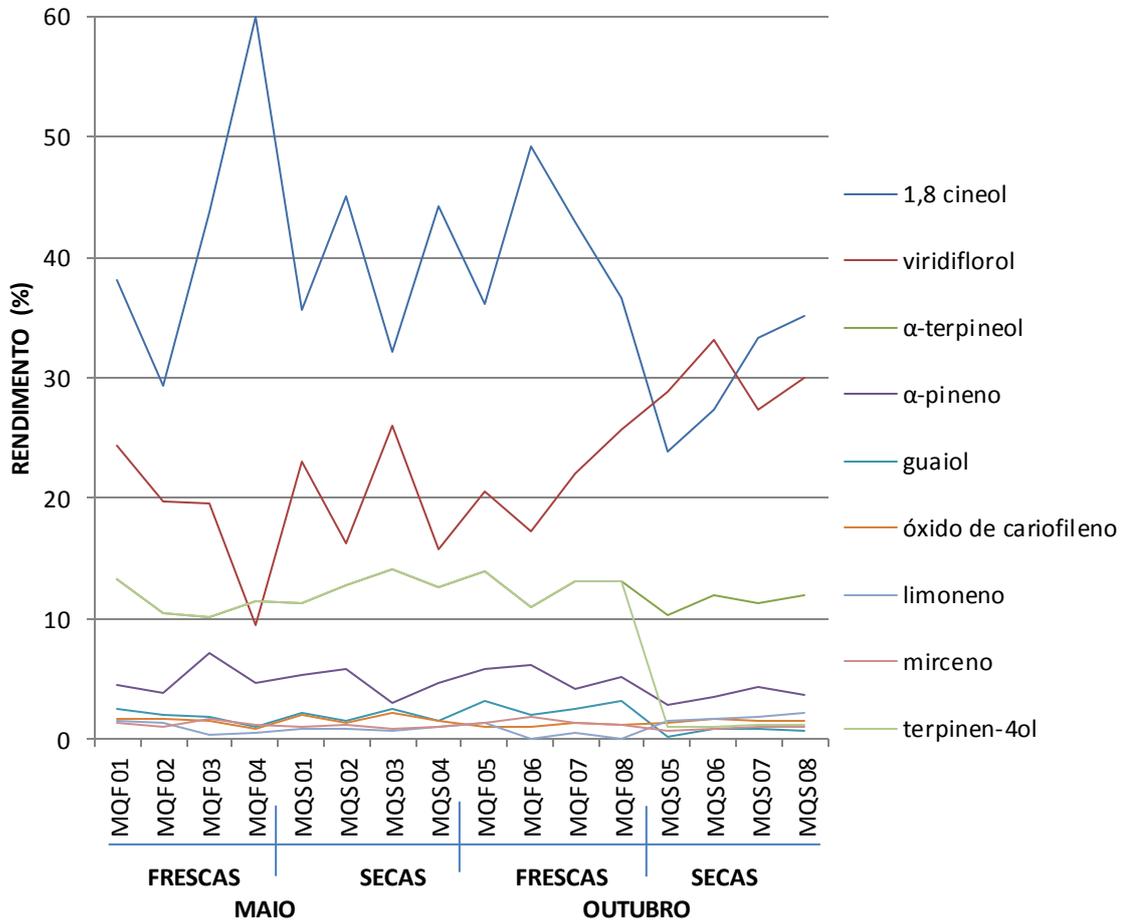
A composição química dos óleos foram as mesmas durante os dias e meses coletados, assim a Figura 12 apresenta o perfil cromatográfico para o óleo de *M. quinquenervia* (MQF01). Os cromatogramas de todas as amostras estudadas do óleo encontram-se no ANEXO 01, onde apresentam os mesmos picos.

Figura 12 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF01 por CG-DIC.



Observando a Tabela 6 e a Figura 12, foram identificados 24 constituintes que correspondem a 93,8% do teor total do óleo essencial, dentre eles 9 constituintes podem ser considerados como majoritários, estes são, 1,8 cineol, viridiflorol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pineno, guaiol, óxido de cariofileno, limoneno, mirceno, terpinen-4ol, respectivamente. Em todas as extrações estes foram os constituintes majoritários, indicando assim, que não houve variação de quimiótipos, somente variação da concentração, ou seja, não houve variação qualitativa e sim quantitativa. A Figura 13 apresenta como ocorreu essa variação.

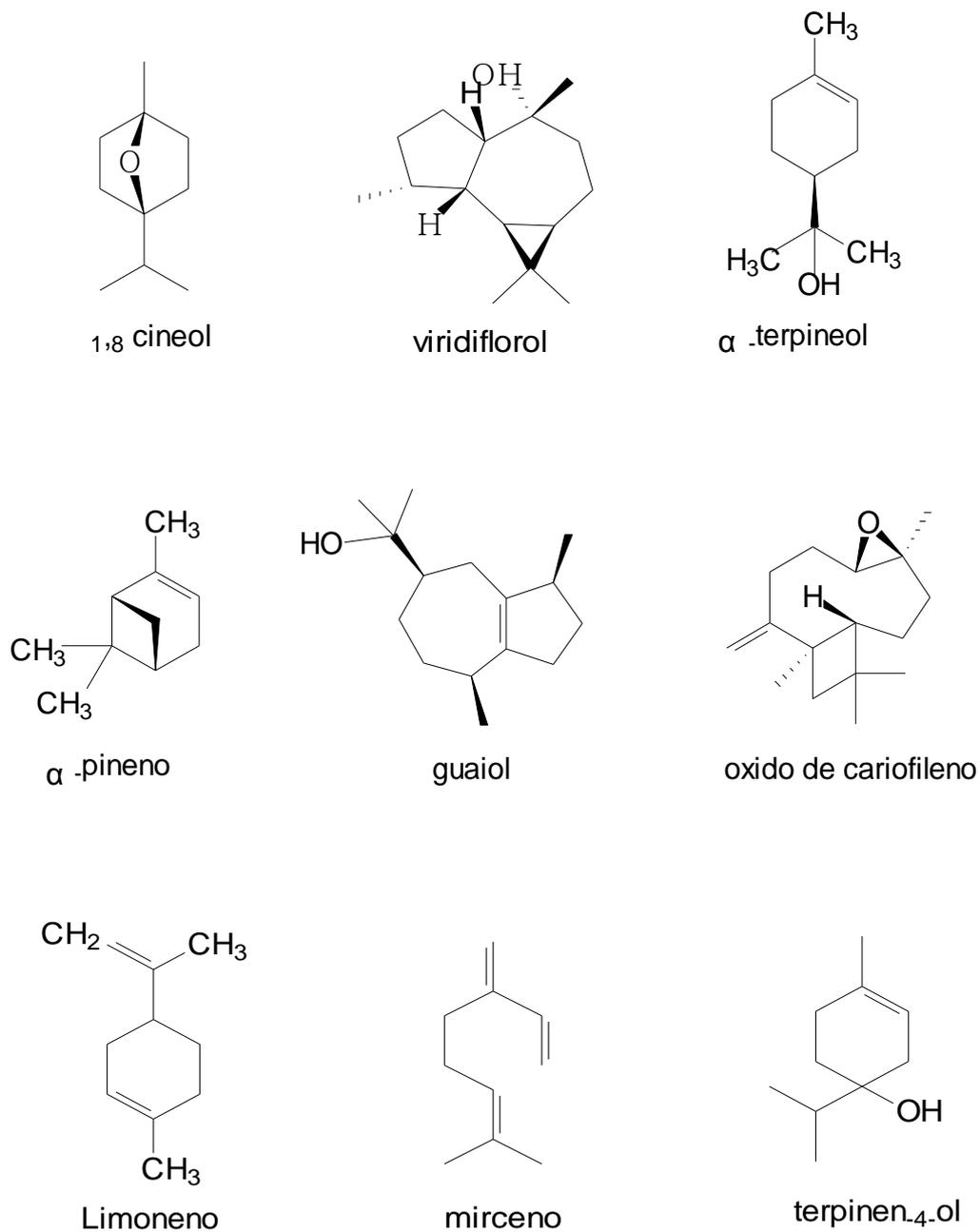
Figura 13 - Constituintes de maior porcentagem encontrados em cada um dos óleos essenciais de *M. quinquenervia* coletados nos diferentes períodos e horários de 2015.



A Figura 14 apresenta as estruturas físicas dos constituintes químicos majoritários identificados no óleo essencial de *M. quinquenervia*.

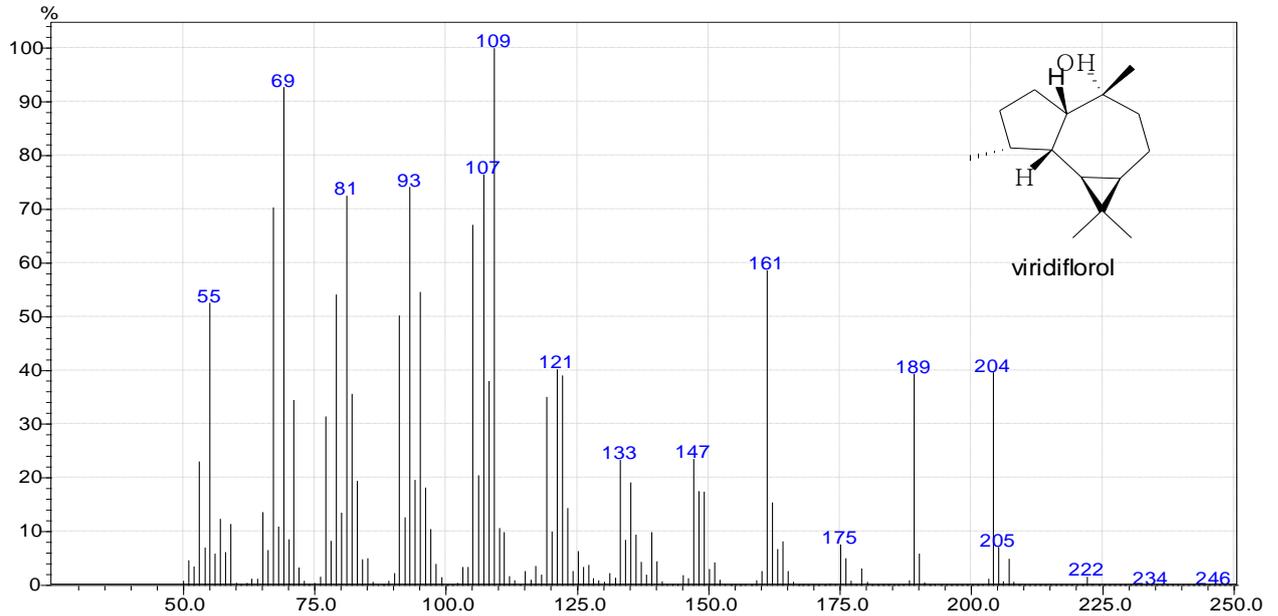
Nos estudos desenvolvidos por Silva (2007) com várias espécies do gênero *Melaleuca*, de origem do estado de Minas Gerais, verificou-se que as espécies apresentam padrões diferenciados entre si na composição química do óleo essencial. Os constituintes majoritários e suas respectivas espécies estudadas foram: terpinen-4-ol (53,7% *M. alternifolia* Cheel), 1,8-cineol (80,2% em *M. armillaris* Sm., 79,5% em *M. ericifolia* Sm., 43,7% em *M. cajuputi* Roxb), viridiflorol (71,0% em *M. quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake) e metileugenol (96,6% em *M. leucadendra* (L.) L).

Figura 14 - Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por (CG/EM) presentes no óleo essencial de *M. quinquenervia*.



No presente estudo, o viridiflorol foi o segundo constituinte de maior percentual, o seu espectro de massas é apresentado na Figura 15, com tempo de retenção de aproximadamente 27,7 min.

Figura 15 – Espectro de massas do óleo essencial de *M. quinquenervia* obtido por CG-EM para o constituinte viridiflorol.



Para o óleo de *M. quinquenervia* estudado por Silva (2007), o viridiflorol foi o constituinte de maior percentual (71,0%). No óleo do presente estudo, este constituinte foi o segundo de maior percentual médio de (20%). Simões e Spitzer (2004) dizem que o grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos essenciais e que cada espécie reage de forma diferenciada às condições que lhes são submetidas.

Já Wheeler (2005), ao analisar o óleo essencial de *M. quinquenervia* extraído na Flórida, obteve como constituintes majoritários 1,8 cineol (28,58%), viridiflorol (26,27%),  $\alpha$ -terpineol (8,66%), limoneno (6,77%),  $\beta$ -Caryophyllene (6,53%),  $\alpha$ -pineno (5,99%), respectivamente. Observa-se, assim, que os óleos apresentam mesmos constituintes, variando apenas na concentração.

Brophy e Doram, (2004), verificaram para a espécie *M. ericifolia*, que dependendo da localização da espécie ocorrem variações da composição química do óleo e que essa variação ocorreu apenas de forma quantitativa.

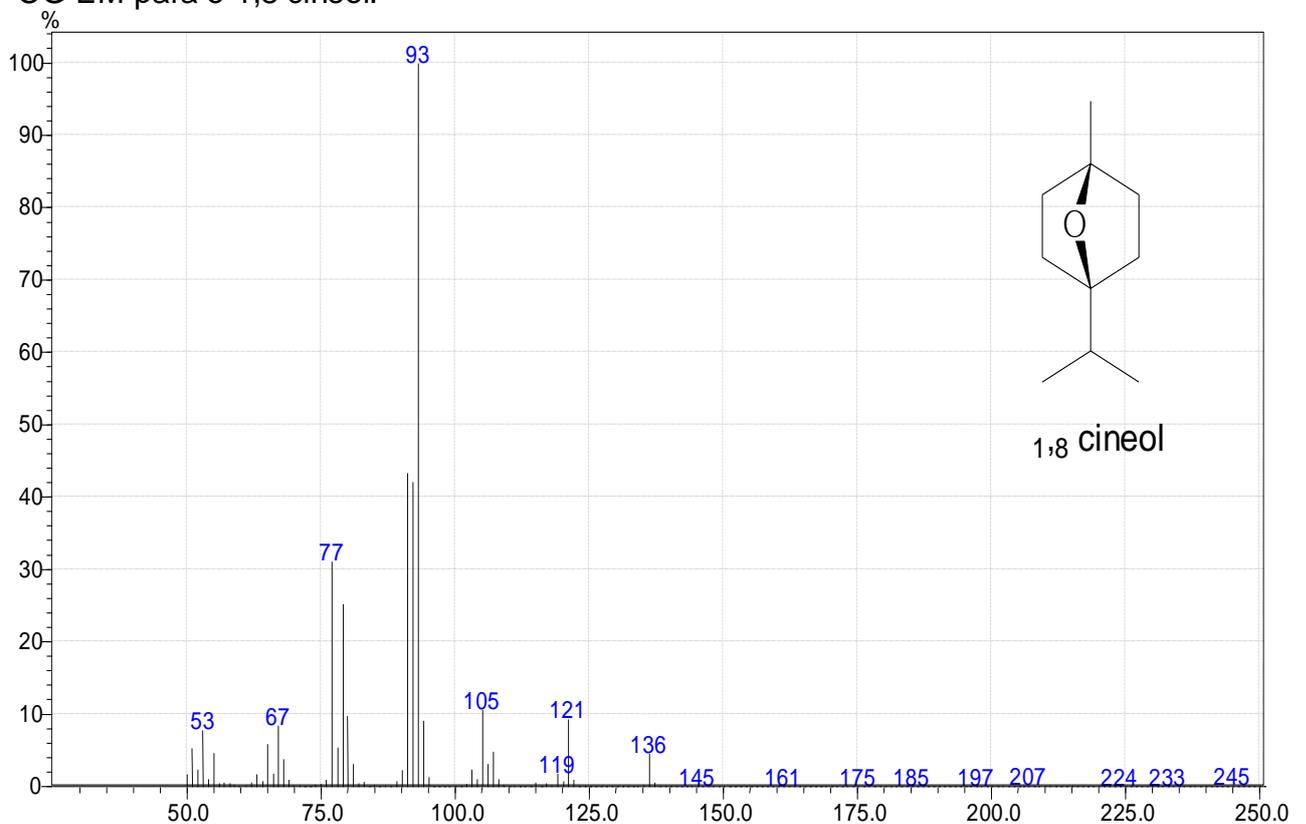
Essas diferenças foram parcialmente explicadas pelo predomínio de um quimiótipo rico em sesquiterpeno *E*-nerolidol em árvores de *melaleuca* da Costa do Golfo e apresentaram-se mais rica de uma mistura do monoterpenos 1,8-cineol e o sesquiterpeno viridiflorol em árvores da Costa Atlântica (DRAY JR et al., 2004).

De acordo com Ireland e seus colaboradores (2002) existem dois quimiótipos para a composição do óleo essencial de *M. quinquenervia* e ainda destaca que a diferença entre os mesmos é grande. Os quimiótipos são: quimiótipo 1 composto por *E*-nerolidol em grande concentração no óleo que pode ou não pode ser associação com o linalol e o quimiótipo 2 composto por 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, viridiflorol,  $\beta$ -cariofileno, tanto com 1,8-cineol ou viridiflorol em maior proporção.

Em Wheeler e Ordnung (2005) observou-se a existência dos mesmos quimiótipos apresentado por Ireland e seus colaboradores (2002). Porém, para o quimiótipo 1, chamado *E*-nerolidol (*E*-nerolidol, 41,03% e  $\beta$ -Caryophyllene, 2,22%) e o quimiótipo 2, chamado de viridiflorol (viridiflorol, 39,26%, 1,8 cineol 13,51% e  $\alpha$ -pineno 4,51%).

Para o presente estudo constituinte de maior percentual foi 1,8 cineol. O espectro de massas correspondente na Figura 16, com tempo de retenção de aproximadamente 6,5 min.

Figura 16 – Espectro de massas do óleo essencial de *M. quinquenervia* obtido por CG-EM para o 1,8 cineol.



Considera-se, assim, que a espécie de *M. quinquenervia* encontrada em Boa Vista, RR, possui o quimiótipo 2. Contudo, o 1,8 cineol foi o constituinte de maior percentual no presente estudo desenvolvido em Boa Vista, RR, chegando a 60%. Verifica-se, também, uma variação quantitativa da composição durante o dia, nas extrações realizadas em diferentes horários, variando entre 29,4% a 60,0%. Nas extrações de maio verificou-se as menores concentrações do composto às 12:00 horas e as maiores às 00:00 horas.

Dados da literatura indicam que o composto 1,8 cineol vem sendo o constituinte majoritário para espécies do gênero *Melaleuca*. Em Silva et al. (2007) observaram que a composição química do óleo essencial dessas subespécies de *Melaleucas* cultivadas no Brasil apresentam novos compostos, diferentes da espécie em outros países. Os quimiótipos em outros países de *M. alternifolia*, *M. quinquenervia* e *M. leucadendra* têm os seus óleos essenciais ricos em terpinen-4-ol, viridiflorol e eugenol de metilo, respectivamente. No Brasil, as espécies de *M. armillaris*, *M. ericifolia*, *M. cajuputi* subespécie *cajuputi* e *M. cajuputi* subespécie *platyphylla* possuem o composto 1,8-cineol como majoritários.

Quando amostras apresentam altas concentrações de 1,8 cineol, sugere-se que estas espécies possam ser uma promissora fonte alternativa de forma medicinal como broncodilatador, expectorante e anti-séptico (ALBORNOZ, 1992; MORTON, 1981). Prates et al. (1998) utilizando uma concentração de 10,6% do composto, causou em 5 minutos 100% de mortalidade em larvas de carrapato *Boophilus microplus*. Boland et al. (1984), o óleo apresentou 1,8 cineol como constituinte majoritário, indicando que seja responsável pela atividade germicida.

O 1,8 cineol pode ser encontrado em altas concentrações em diversas espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae), onde variam dependendo das espécies: *Eucalyptus globulus* (71,0%), *E. punctata* (66,0%), *E. maculata* (51,0%), *E. maidesii* (70,0%), *E. smithii* (84,0%) (CHALCHAT et al., 1997). Todas essas espécies de *Eucalyptus* citadas apresentam ótimas atividades biológicas, que podem estar ligadas diretamente a predominância do constituinte supracitado. O 1,8-cineol, 35-60%, reduz o efeito de outras drogas em função do conteúdo de que induz a detoxificação de enzimas hepáticas (BLUMENTHAL et al., 1998).

Com o levantamento bibliográfico sobre a composição da espécie *M. quinquenervia*, montou-se a Tabela 7, que apresenta estudos em diferentes países e suas respectivas composições químicas.

Tabela 7 – Composição química do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia*

Constituinte	Autor, 2015 Boa Vista – RR	(SILVA, 2007) Minas Gerais	(WHEELER; ORDUNG, 2005) Florida		(PANJA et al., 1994) Madagacar
			E-neradiol	Viridiflorol	
1,8 cineol	29,4 a 60 %	7,20%	0,76%	13,50%	17,40%
viridiflorol	9,4 a 26,1 %	71,00%	3,19%	39,20%	17,40%
$\alpha$ -terpineol	10,1 a 14,2 %	2,20%	0,20%	3,82%	4,46%
$\alpha$ -pineno	3,1 a 7,2 %	4,00%	1,19%	4,51%	-
guaiol	1,1 a 3,2 %	-	-	-	-
oxido de cariofileno	1,0 a 2,2 %	3,50%	0,16%	2,05%	0,77
limoneno	0,1 a 1,6 %	-	0,60%	2,57%	-
mircenol	0,9 a 1,9 %	-	0,05 %	0,38%	-
terpinen-4ol	0,9 a 1,4 %	-	0,03%	0,28%	3,93%

Ao comparar a composição química do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* em diferentes locais, pode-se verificar que os constituintes 1,8 cineol e o viridiflorol estão presentes em todas os locais e o mesmo se destaca na região norte, em Boa Vista, RR. Vale destacar que o constituinte guaicol foi encontrado apenas em Roraima.

Verificado o potencial biológico do 1,8 cineol e dos demais constituintes majoritários supracitados, os óleos essenciais extraídos em Boa Vista, RR, da espécie *M. quinquenervia* foram submetidos a testes de atividades biológicas.

#### 4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

##### 4.3.1 Determinação da Toxicidade Frente à *A. salina*

A Tabela 8 apresenta o número de náuplios vivos e mortos para o óleo obtido em maio e a Tabela 9 apresenta o número de náuplios vivos e mortos para o óleo obtido em outubro.

Tabela 8 – Número de náuplios vivos e mortos de maio.

	1000µg.mL-1		250µg.mL-1		62,5µg.mL-1		15,62µg.mL-1		3,906µg.mL-1		0,9765µg.mL-1		C	
	V*	M*	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M
A*	0	10	3	7	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0
D*	0	10	4	6	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0
T*	0	10	4	6	8	2	9	1	9	1	10	0	10	0
X*	0	10	3,6667	6,3333	7,3333	2,6667	8,3333	1,6667	9	1	10	0	10	0

Fonte: Autor V\*= vivos; M\*= mortos; A\*=amostra; D\*=duplicata; T\*=triplicata; X\*= média.

Tabela 9 – Número de náuplios vivos e mortos de outubro

	1000µg.mL-1		250µg.mL-1		62,5µg.mL-1		15,62µg.mL-1		3,906µg.mL-1		0,9765µg.mL-1		C	
	V*	M*	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M
A*	0	10	3	7	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0
D*	0	10	3	7	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0
T*	0	10	4	6	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0
X*	0	10	3,3333	6,6667	7	3	8	2	9	1	10	0	10	0

Fonte: Autor V\*= vivos; M\*= mortos; A\*=amostra; D\*=duplicata; T\*=triplicata; X\*= média.

Após a contagem e utilizando as fórmulas citadas na metodologia, foi possível obter o percentual de mortalidade para a *A. salina*. Os valores encontram-se organizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados de atividade frente à *A. salina* para *M. quinquenervia* de maio e outubro.

Concentração	Maio Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)	Outubro Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100%	100%
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	63%	67%
62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	26,7%	30%
15,52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16,7%	20,0%
3,906 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	10,0%	10,0%
0,9765 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0%	0,0%
Controle	0%	0%

Verifica-se que apenas na menor concentração (0,9765  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial de *M. quinquenervia*, não houve mortalidade dos náuplios de *A. salina*, indicando a existência de toxicidade do óleo nessa concentração.

Obtidos os percentuais de mortalidade para a *A. salina* com auxílio do Software Microsoft Excel, foram plotados gráficos e obtidas as regressões lineares entre as concentrações utilizadas com o óleo essencial de *M. quinquenervia* e suas respectivas atividades para *A. salina*, Figura 17 apresenta a atividade para o óleo essencial obtido em maio e a Figura 18 a atividade referente ao mês de outubro.

Figura 17 – Curva da atividade frente à *A. salina* de maio

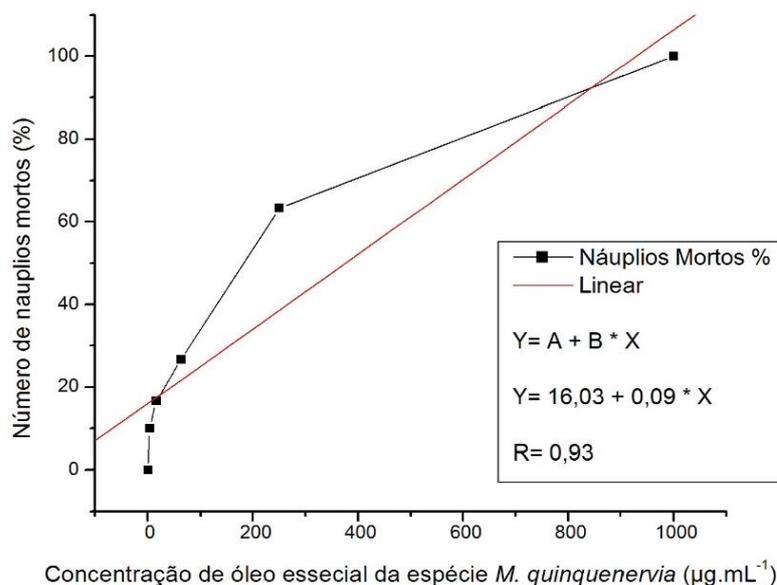
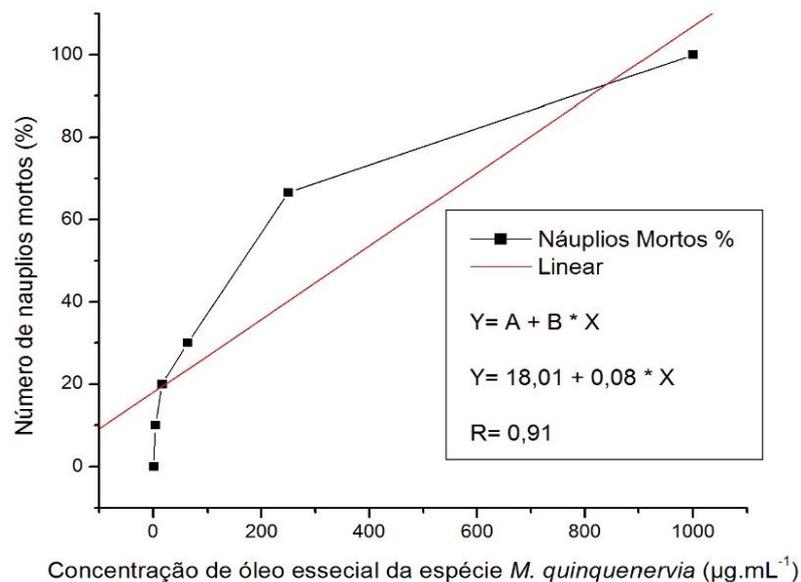


Figura 18 – Curva da atividade frente à *A. salina* de outubro



As interpretações dos resultados de toxicidade foram realizadas levando em conta o exposto pela literatura, onde pode-se classificar como altamente tóxico os valores de  $CL_{50}$  entre  $0-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; toxicidade moderada entre  $500-1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e baixa toxicidade ou atóxico os valores acima de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (MEYER et al., 1982; LOPES et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2016).

Através da fórmula de regressão linear  $Y = A + BX$ , podemos calcular a  $CL_{50}$ . Para o mês de maio considerando  $Y = 50$ ,  $A = 16,03$  e  $B = 0,09$ , encontra-se o valor de  $X$  que é igual a  $375,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para o mês de outubro considerando  $Y = 50$ ,  $A = 18,01$  e  $B = 0,08$ , encontra-se o valor de  $X$  que é igual a  $359,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

De acordo com Meyer et al. (1982), Lopes et al. (2002), Rodriguez et al. (2004) e Nascimento et al. (2016) pode-se verificar que o óleo essencial de *M. quinquenervia*, apresentou letalidade frente ao microcrustáceo. Sendo considerado uma amostra de alta toxicidade em ambas as extrações realizadas, baseando-se no valor do  $CL_{50}$  encontrado que foi inferior a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Esses resultados confirmam o encontrado na literatura para o gênero *Melaleuca*, dando destaque para o estudo de Soonthornchareonnon et al., (2012) que estudou extratos das folhas da espécie *M. cajuputi* Powell e *M. quinquenervia* e

verificou sua grande atividade tóxica contra bactérias Gram negativas e justificaram essa atividade devido a presença de compostos fixos, os metabólitos secundários, dentre eles flavonóides, taninos, e compostos fenólicos.

Os óleos essenciais, frequentemente, apresentam toxicidade elevada. Isso é particularmente importante levando em consideração a existência de terapias ditas “naturais” que estimulam a automedicação e o uso abusivo destes produtos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

De acordo com o levantamento bibliográfico, verificou-se que o teste de toxicidade frente à *A. salina* tem mostrado uma boa correlação com estudos voltados a atividades antitumorais, inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000) para as substâncias extratos que apresentam um  $CL_{50} < 103$  mg/L (MEYER et al., 1982; RUIZ et al., 2005).

Desta forma a comunidade científica encontra-se em uma constante busca para compreender os fenômenos responsáveis pelos mecanismos adaptados de resistência a microrganismos, pretendendo desenvolver alternativas e novas estratégias para o combate a bactérias resistentes (CARVALHO et al., 2009). Esses estudos baseiam-se em novas substâncias que sejam capazes de inibir, em menores concentrações, processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos resistentes.

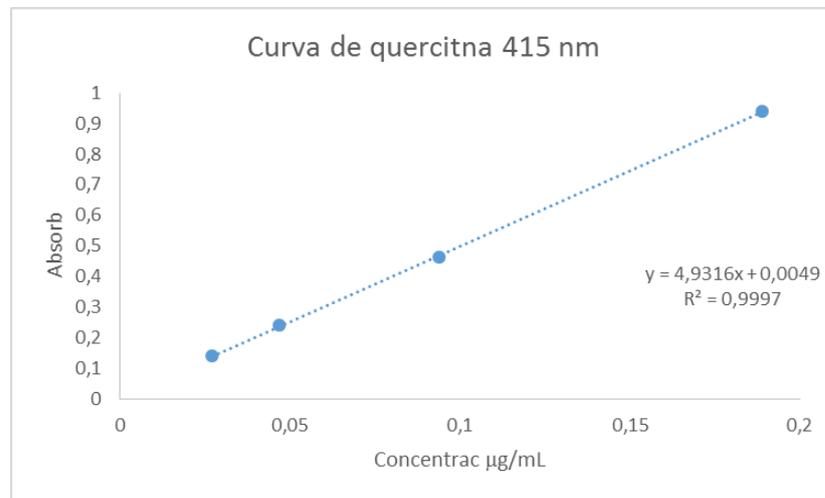
#### 4.3.2 Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de *M. quinquevervia*

Realizadas as leituras em equipamento UV-Visível e calculadas as absorvâncias médias e concentrações para o padrão de quercetina utilizada, montou-se a Tabela 11 e a Figura 19 apresenta a curva de calibração.

Tabela 11 – Preparo das soluções para a curva de quercetina.

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Absorbância Média
0,189	0,94
0,094	0,46
0,047	0,24
0,027	0,14

Figura 19 – Curva de calibração para o padrão de quercetina



Por meio da equação da reta  $Y = A + BX$ , foi possível obter o valor a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) para o padrão de quercetina igual a  $10,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

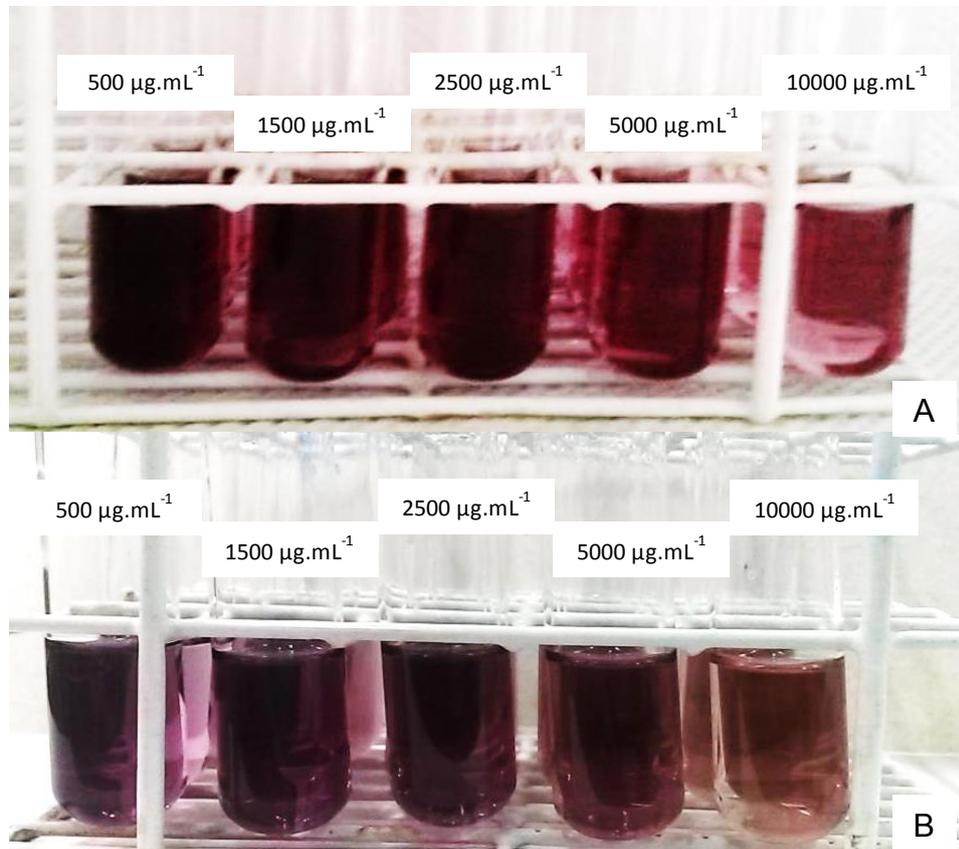
Após 30 minutos de montado o experimento com o óleo essencial de *M. quinquenervia*, foi possível observar o decaimento da cor púrpura da solução de DPPH (Figura 20).

Na Tabela 12, apresentam-se os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de *M. quinquenervia* em concentrações em ordem crescente. Ao observar os resultados verifica-se que o percentual para a atividade antioxidante aumenta, proporcionalmente, com o aumento das concentrações.

Tabela 12 – Preparo das soluções para a curva do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* coletadas em maio e outubro.

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	AA % Maio	AA % Outubro
500	7,24	20,1
1500	14,51	29,1
2500	18,20	34,1
5000	29,02	45,4
10000	40,00	56,1

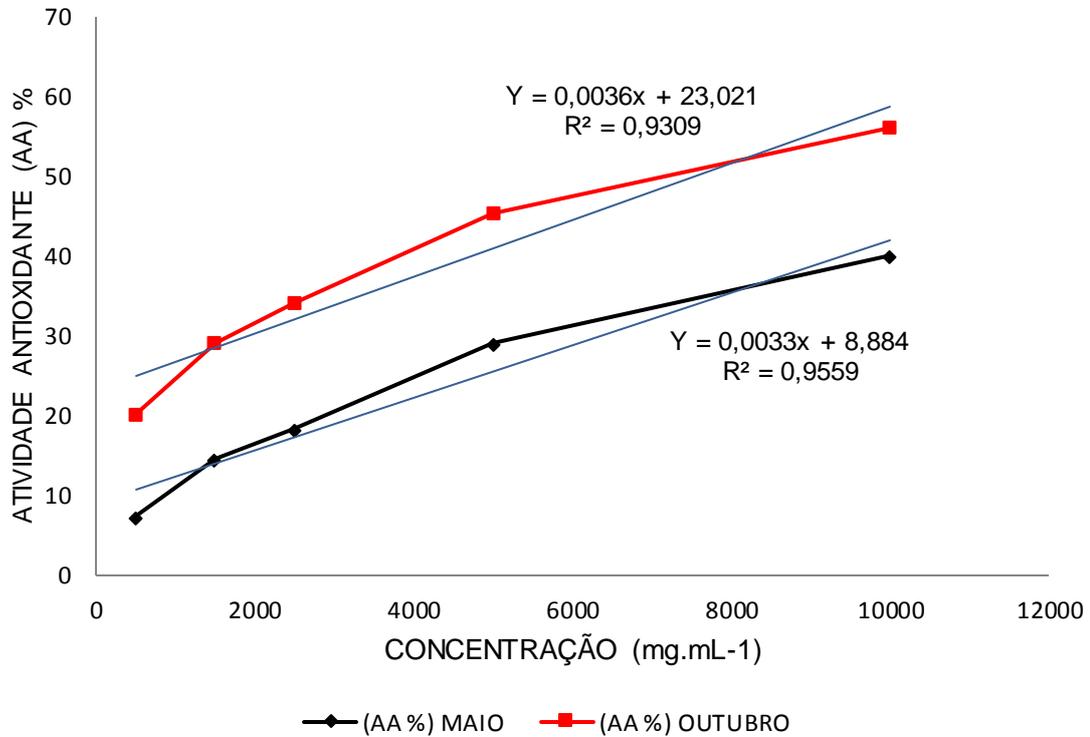
Figura 20 – A) Ensaio de cada concentração após a reação com DPPH, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  mês de maio; B) Ensaio de cada concentração após a reação com DPPH, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  mês de outubro.



A Figura 21 encontra-se a curva de calibração dos valores do potencial da atividade antioxidante representados graficamente.

Utilizando o Software Microsoft Excel 2010, foi possível obter a regressão linear entre as concentrações utilizadas com o óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* e suas respectivas atividades antioxidantes e por meio da equação da reta  $Y= A + BX$ . Por meio das equações foi possível obter a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), trata-se da quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

Figura 21 – Curva de redução de DPPH do óleo essencial da espécie *M. quinquenervia*.



Após a resolução do cálculo da equação da reta, o mês de maio apresentou um valor de CE<sub>50</sub> igual a 12.459,40 µg.mL<sup>-1</sup>. Para o mês de outubro o valor encontrado foi de 7.494,16 µg.mL<sup>-1</sup>. Esses valores de CE<sub>50</sub> indicam que a atividade para o mês de outubro foi mais eficiente que maio. Porém, para a indústria farmacêutica esse resultado não apresenta-se satisfatório, haja visto que o padrão de quercetina utilizado apresentou um valor de CE<sub>50</sub> igual a 10,14 µg.mL<sup>-1</sup>, bem inferior ao apresentado pelo óleo essencial da espécie *M. quinquenervia*.

#### 4.3.3 Atividade Antibacteriana

Para melhor organização dos bioensaios os óleos essenciais testados receberam siglas. E seus percentuais de inibição encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Bioensaio para o óleo essencial das folhas da espécie *M. quinquenervia*

% de Inibição para <i>Bacillus cereus</i>					
Concentração	MQI01	MQI02	MQV01	MQV02	AMPICILINA
01 (500 µg)	<b>*75,19 ± 054</b>	<b>*66,38 ± 2,52</b>	<b>*83,85 ± 0,94</b>	<b>*81,09 ± 2,42</b>	<b>95,36 ± 0,50</b>
02 (250 µg)	64,22 ± 3,50	75,45 ± 5,11	15,82 ± 1,15	52,33 ± 8,75	95,62 ± 0,44
03 (125 µg)	6,31 ± 2,05	39,96 ± 0,87	5,07 ± 3,09	39,73 ± 6,55	95,30 ± 0,88
04 (62,5 µg)	2,02 ± 2,56	7,13 ± 0,19	2,18 ± 0,77	12,81 ± 2,73	96,57 ± 0,72
05 (31,25 µg)	4,24 ± 4,98	0,22 ± 3,82	0,48 ± 2,42	-2,18 ± 3,50	97,33 ± 1,37
06 (15,625 µg)	0,22 ± 4,72	-0,15 ± 155	-1,30 ± 3,23	-1,36 ± 6,19	97,14 ± 1,01
07 (9,375 µg)	3,96 ± 3,23	5,61 ± 3,37	-11,38 ± 5,21	-3,45 ± 1,93	98,22 ± 0,77
08 (3,90625 µg)	-3,58 ± 1,44	-3,07 ± 2,86	-2,12 ± 0,87	-1,23 ± 1,12	98,03 ± 0,00
% de Inibição para <i>Staphylococcus aureus</i>					
Concentração	MQI01	MQI02	MQV01	MQV02	AMPICILINA
01 (500 µg)	48,05 ± 9,35	35,16 ± 0,85	<b>*51,65 ± 0,57</b>	33,29 ± 0,99	99,13 ± 0,20
02 (250 µg)	39,17 ± 13,07	45,98 ± 2,54	20,57 ± 0,14	41,17 ± 0,26	98,99 ± 0,64
03 (125 µg)	10,78 ± 7,24	31,45 ± 7,23	4,91 ± 2,73	36,69 ± 7,75	98,46 ± 0,12
04 (62,5 µg)	-0,90 ± 3,18	2,70 ± 4,51	-9,42 ± 1,56	12,22 ± 4,53	99,40 ± 0,12
05 (31,25 µg)	-6,91 ± 2,78	-18,73 ± 5,76	-18,26 ± 2,97	-4,24 ± 3,98	99,80 ± 0,35
06 (15,625 µg)	-6,44 ± 2,78	-14,92 ± 3,41	-16,19 ± 3,45	-7,18 ± 4,25	99,87 ± 0,31
07 (9,375 µg)	-10,52 ± 1,56	-19,67 ± 2,72	-22,54 ± 2,92	-12,32 ± 8,90	100,66 ± 0,31
08 (3,90625 µg)	-15,66 ± 3,56	-15,79 ± 1,82	-17,83 ± 1,84	-8,51 ± 9,06	100,46 ± 0,00
% de Inibição para <i>Salmonella typhimurium</i>					
Concentração	MQI01	MQI02	MQV01	MQV02	AMPICILINA
01 (500 µg)	<b>*60,51 ± 3,42</b>	39,69 ± 2,85	14,24 ± 4,84	<b>*67,23 ± 2,28</b>	101,48 ± 1,07
02 (250 µg)	48,29 ± 2,85	16,99 ± 20,05	-32,30 ± 23,98	44,19 ± 2,56	97,85 ± 1,30
03 (125 µg)	45,40 ± 8,26	25,52 ± 10,77	-51,78 ± 25,51	9,27 ± 4,27	96,78 ± 1,63
04 (62,5 µg)	47,08 ± 0,57	14,44 ± 9,24	-79,58 ± 9,77	15,58 ± 1,14	96,64 ± 0,40
05 (31,25 µg)	45,74 ± 0,57	-47,21 ± 95,42	-75,42 ± 12,57	0,67 ± 2,56	101,74 ± 0,23
06 (15,625 µg)	41,44 ± 10,54	-68,44 ± 60,47	-91,40 ± 43,39	3,22 ± 1,99	99,73 ± 1,23
07 (9,375 µg)	26,39 ± 16,10	-65,21 ± 80,92	-79,99 ± 38,47	3,36 ± 11,68	99,73 ± 1,16
08 (3,90625 µg)	-59,03 ± 6,27	-91,54 ± 10,48	-57,69 ± 27,60	5,17 ± 2,28	98,38 ± 0,00
% de Inibição para <i>Citobacter freundii</i>					
Concentração	MQI01	MQI02	MQV01	MQV02	AMPICILINA
01 (500 µg)	39,97 ± 2,31	<b>54,75 ± 1,05</b>	39,59 ± 0,36	17,72 ± 2,30	<b>96,56 ± 0,58</b>
02 (250 µg)	42,56 ± 8,35	47,40 ± 3,10	-4,57 ± 35,70	36,32 ± 10,97	94,30 ± 0,67
03 (125 µg)	-35,90 ± 16,82	44,32 ± 20,08	-58,94 ± 60,81	41,85 ± 18,29	88,94 ± 0,95
04 (62,5 µg)	-45,12 ± 22,83	40,80 ± 0,89	-29,45 ± 76,43	14,58 ± 9,95	92,62 ± 3,33
05 (31,25 µg)	-41,68 ± 2,83	-27,40 ± 6,22	-24,26 ± 46,55	-22,33 ± 16,40	96,90 ± 0,38
06 (15,625 µg)	-28,45 ± 9,66	-41,56 ± 25,42	-53,25 ± 56,25	-54,34 ± 23,11	97,31 ± 1,64
07 (9,375 µg)	-50,31 ± 51,62	-25,01 ± 2,49	-26,60 ± 41,45	-58,11 ± 14,30	98,07 ± 1,13
08 (3,90625 µg)	-53,50 ± 23,45	-2,30 ± 6,20	-37,08 ± 4,94	-47,13 ± 8,06	90,36 ± 0,00

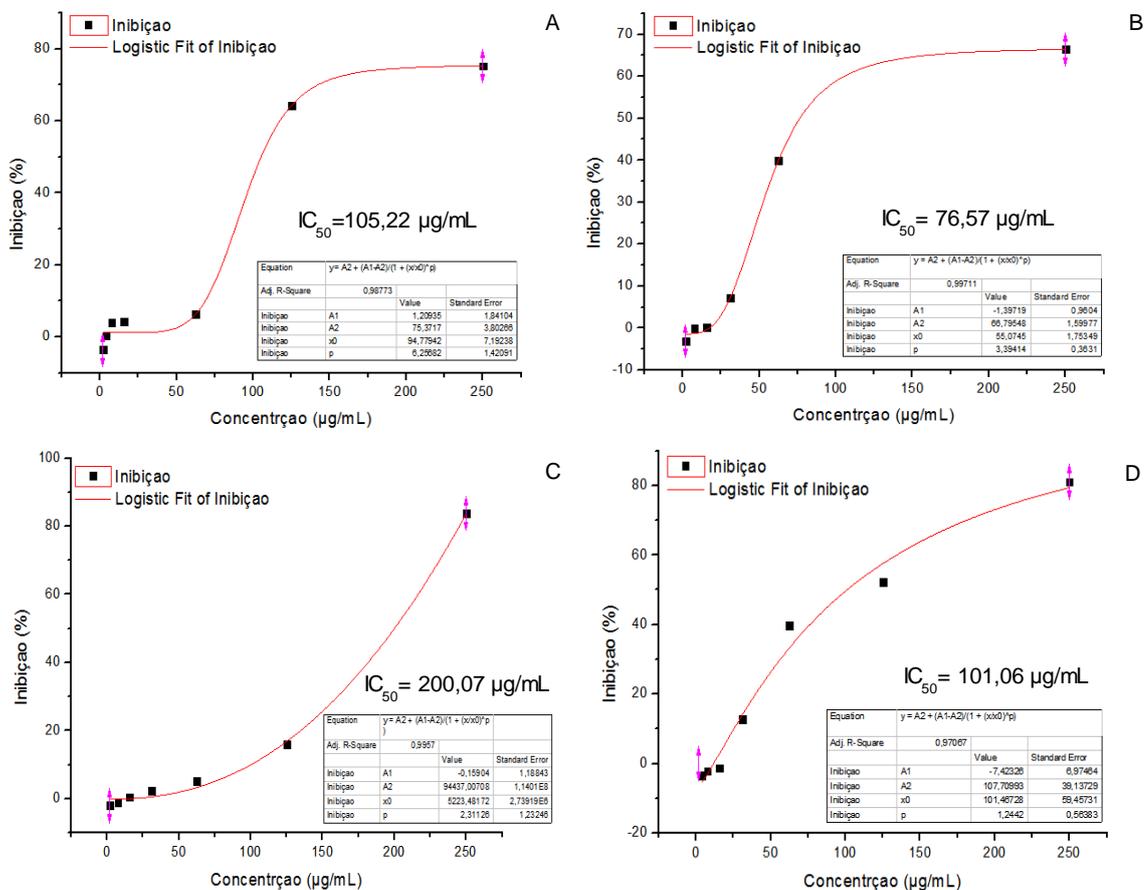
\*Inibição superiores a 50%, calculou-se o IC<sub>50</sub>

MQI01: Folhas Frescas Inverno; MQI02: Folhas Secas Inverno; MQV01: Folhas Frescas Verão  
MQV02: Folhas Secas Verão.

Ao analisar a Tabela 13, pode-se verificar que o óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* possui ação contra os microrganismos testados. Vale ressaltar que a bactéria gram-positiva *Bacillus cereus* foi inibida por todas as amostras de óleo essencial testadas e uma maior inibição na concentração de 500 µg, apresentando inibições que variaram entre  $66,38 \pm 2,52$  % e  $83,85 \pm 0,94$  %, ao comparar com a ampicilina, antibiótico já existente no mercado (padrão utilizado) que apresentou inibição de  $95,36 \pm 0,50$  %, pode-se considerar a eficácia do óleo essencial em inibir a bactéria.

Visto que os óleos testados apresentaram inibição superior à 50%, foram calculados os seus respectivos  $IC_{50}$ , que encontram-se na Figura 22.

Figura 22 - Curva de atividade frente a *Bacillus cereus* para o óleo essencial das folhas da espécie *M. quinquenervia* A) MQI01: Folhas Frescas Inverno; B) MQI02: Folhas Secas Inverno; C) MQV01: Folhas Frescas Verão D) MQV02: Folhas Secas Verão



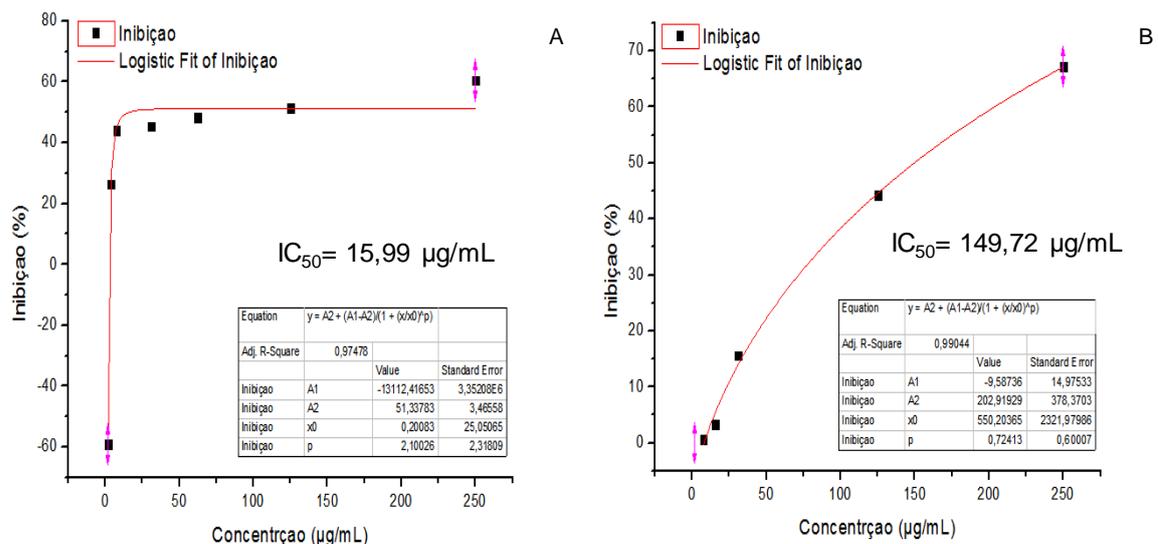
A análise dos gráficos da Figura 22 revelam que os óleos obtidos no inverno e com folhas secas apresentaram o menor valor de  $IC_{50}$  ( $76,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A bactéria *Bacillus cereus* está relacionada aos efeitos agudos no trato gastrointestinal, ocasionando diarreias e vômitos, que em casos mais graves pode levar a morte. Na maioria das vezes as contaminações por esta bactéria estão relacionados com a contaminação alimentar (MENDES, COELHO, EZEREDO, 2011).

Mendes, Coelho, Ezeredo, (2011) verificaram em seus estudos que a bactéria *Bacillus cereus* possui um controle relativamente complicado, pois além de aplicação antibiótico, há necessidade de uma investigação alimentar e de fatores externos que possam estar contaminados.

As segundas melhores inibições foram apresentadas contra uma bactéria gram-negativa a *Salmonella typhimurium*, com os óleos extraídos das folhas frescas inverno e folhas secas verão da espécie *M. quinquenervia*, inibindo  $60,51 \pm 3,42 \%$  e  $67,23 \pm 2,28 \%$  respectivamente de acordo com a Tabela 13. De acordo com os valores de  $IC_{50}$  apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Curva de atividade frente a *Salmonella typhimurium* para o óleo essencial das folhas da espécie *M. quinquenervia* A) MQI01: Folhas Frescas Inverno; B) MQV02: Folhas Secas Verão

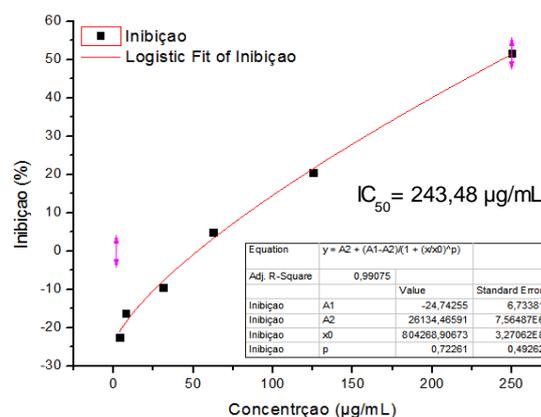


O  $IC_{50}$  igual a  $15,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentado indicam que para o período chuvoso e com as folhas frescas é possível uma inibição eficiente utilizando uma baixa concentração de óleo essencial da espécie *M. quinquenervia*. Esse valor vai de acordo com os valores apresentados na Tabela 13, onde na concentração de  $15,625 \mu\text{g}$  o óleo essencial inibiu  $41,44 \pm 10,54 \%$  e o padrão de ampicilina na concentração de  $15,625 \mu\text{g}$  inibiu  $99,73 \pm 1,23 \%$ .

A bactéria *Salmonella typhimurium* também está relacionada com os problemas no trato intestinal e que possuem seu controle relacionado com a aplicação de antibióticos. Esta bactéria também vem apresentando adaptação e resistência aos antibióticos já existentes no mercado, sendo indispensável o estudo e descoberta de novas substâncias que possam inibir o desenvolvimento desta bactéria que causa problemas na saúde pública (OLIVEIRA et al., 2008; PRUDÊNCIO, 2009; BORDIGNON-JUNIOR et al., 2012).

Para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* pode-se verificar na Tabela 13 que somente o óleo essencial extraído no verão e com folhas frescas apresentaram uma inibição de  $51,65 \pm 0,57 \%$ , na concentração de  $500 \mu\text{g}$  e o padrão de ampicilina inibiu  $99,13 \pm 0,20 \%$ . O  $IC_{50}$  encontra-se na Figura 24.

Figura 24 - Curva de atividade frente a *Staphylococcus aureus* para o óleo essencial das folhas da espécie *M. quinquenervia* para MQV01: Folhas Frescas Verão.



Este valor de  $IC_{50}$  igual a  $243,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , indica que deve-se utilizar aproximadamente  $243 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do óleo essencial para inibir 50% o desenvolvimento desta bactéria.

De acordo com Falci (2015) e Duarte; Sá (2011) o gênero *Staphylococcus* encontra-se incluído na microbiota humana e pode provocar diversas doenças, podendo variar de uma simples infecção, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia. Das partes do corpo humano de maior incidência desta bactéria encontra-se as fossas nasais, garganta, intestinos e pele (PALOS et al., 2009).

Duarte e Sá (2011) ainda destacam que o controle bactéria *Staphylococcus aureus* vem sendo realizado por meio do uso de antibióticos. E que com o passar dos tempos a mesma vem se adaptando e aumentando a sua resistência, o que levou a ser uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares.

Esse fato reforça a importância de estudo com novos compostos e principalmente derivados de produtos naturais a fim de inibir o desenvolvimento dessa bactéria.

A inibição para a bactéria gram-negativa *Citobacter freundii* não foram eficientes, somente o óleo essencial do período seco e com as folhas secas apresentaram uma inibição de  $54,75 \pm 1,05$  % na concentração de 500  $\mu\text{g}$ , porém trata-se de uma inibição não eficiente, visto que o padrão de ampicilina inibiu  $96,56 \pm 0,58$  %.

Desta forma, a avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, de frações ou extratos da droga do vegetal (SONAGLIO, 2004).

Óleos essenciais de vários vegetais vêm apresentando ótimas atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica e anticancerígena. Estes são empregados no controle de diversos microrganismos. González et al. (2013) testaram óleos essenciais de diferentes espécies contra microrganismos que atacam a lavoura de tomate, obtendo boa atividade biológica, em seus estudos a espécie *M. quinquenervia* foi capaz de inibir as principais atividades enzimáticas analisadas.

Vale ressaltar que todos os microrganismos avaliados nos testes biológicos da presente pesquisa, tratam-se agentes causadores de diversas enfermidades na população, acarretando em prejuízos na saúde pública e para o governo no tratamento das pessoas infectadas com essas doenças (PALOS et al., 2009; DUARTE; SÁ, 2011).

## 5 CONCLUSÃO

Foi obtido o óleo essencial das folhas de *M. quinquenervia* pela técnica de hidrodestilação, e as extrações com material vegetal seco proporcionaram um maior rendimento para o óleo essencial sem nenhum prejuízo qualitativo da constituição química nos dois períodos coletados, sendo às 18:00 horas o melhor horário para realizar extrações e no período de estiagem a planta produz mais óleo, corroborado por dados da literatura.

Nas coletas realizadas em períodos e horários diferentes, não verificou-se variação qualitativa dos constituintes químicos, apenas variação quantitativa. Foram identificados 24 compostos e os constituintes majoritários para o óleo essencial de *M. quinquenervia* encontrada em Boa Vista – RR são: 1,8 cineol, viridiflorol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pineno, guaiol, oxido de cariofileno, limoneno, mirceno, terpinen-4ol, respectivamente.

O constituinte de maior percentual foi o 1,8 cineol indicando que a espécie de *M. quinquenervia* de Boa Vista – RR pertence ao quimiótipo viridiflorol, contudo a espécie sintetizou o componente secundário 1,8 cineol. Esse fato está de acordo com a literatura onde justifica a variação da composição química dependem das condições de desenvolvimento da planta. E que espécies inseridas no Brasil vêm sintetizando o 1,8 cineol como constituinte majoritário.

Para verificação da toxicidade dos óleos frente à *A. salina* os óleos coletados em maio e outubro apresentaram-se com alta toxicidade  $375,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $359,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente, o que indica o uso destes óleos com promissores potenciais para atividade biológica.

A atividade antioxidante foi apresentada pelos dois óleos (maio e outubro), porém a  $\text{CE}_{50}$  foi superior comparando com o padrão de quercetina, não apresentando resultado satisfatório para a indústria farmacêutica.

Com relação as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas verificou-se um maior percentual de inibição para as bactérias *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*. Sendo que todos os óleos essenciais testados inibira a *Bacillus cereus*. Já para a bactéria *Salmonella typhimurium* verificou-se um percentual de inibição eficiente utilizando apenas  $15,625 \mu\text{g}$  o óleo essencial.

Desta forma vale ressaltar que este trabalho contribui com dados bibliográficos e científicos da espécie *M. quinquenervia* cultivada no estado de Roraima, com a análise química verificou-se que espécie biossintetizou o constituinte 1,8-cineol como majoritário com porcentagem superior aos estudos encontrados na literatura, este constituinte é responsável por inibir microrganismos, indicando que o óleo essencial da espécie *M. quinquenervia* possa vir a ser um potente antibiótico contra essas bactérias testadas. Necessitando de estudos mais aprofundados.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Rev. Virtual Quim.** v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- ALBORNOZ, A.. **Medicina Tradicional Herbaria. Instituto Farmacoterapêutico Latino.** División de Fitoterapia y Productos Naturales. Caracas. , 1992. S.A. ISBN 98-000- 0597-7.
- ALVES T.M.D. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Instituto Oswaldo Cruz** v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANDRADE, A. M.; GOMES, S. S. Influência de alguns fatores genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 181-189, 2000.
- ARAUJO, A.J.; LORDELLO, A.L.L.; MAIA, B.H.L.N.S. Análise comparativa de óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Laucaeeae). **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 81-84, 2001.
- ARAÚJO, W.F.; ANDRADE JÚNIOR, A.S.; MEDEIROS, R.D.; SAMPAIO R.A. Precipitação pluviométrica mensal provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.3, p.563-567, 2001.
- ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bull. W. H. O., Geneva**, v.79, n.7, p.691-692, 2001.
- BATISTA, A. D.; CORRÊA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica.** 6 ed., Petrópolis, RJ: Vozes, 2003.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 588-594, 2009.
- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C.W. E RISTER, R.S. (EDS.) - **The Complete Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines.** 1st edition. Boston, MA: American Botanical Council. 684 p. 1998.
- BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M., HALL, N.; HYLAND B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINIG, D. A.; McDONALD, M. W.; TURNER, J. D. **Forest Trees of Australia.** 5ª ed. Australia: Csiro, 1984. 77 p.
- BORDIGNON-JUNIOR, S.E.; MIYAOKA, M.F.; COSTA, J.L.; BENAVENTE C.A.T.; COUTO, G.H.; SOCCOL, C.R. Inhibiting Gram-negative bacteria growth in

microdilution by Nisin and EDTA treatment. **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, N.4: pp. 127-135, Nov. 2012.

BRAKO, L.; ROSSMAN, A. Y.; FARR, D. F. Scientific and Common Names of 7,000 Vascular Plants in the United States. **American Phytopathological Society.** p. 295, 1995.

BROPHY, J. J. Potentially Commercial Melaleucas, 1999. In: Southwell, I.A.; Lowe, R.F. (ed.). Tea Tree: The Genus Melaleuca, p. 247-274. Series Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles, vol. 9. Amsterdam: **Harwood Academic Publishers**, 1999.

BROPHY, J. J.; DORAN, J. C. - Geographic Variation in Oil Characteristics in Melaleuca ericifolia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 4-8, 2004.

BRUCE, P. Y. **Química orgânica:** volume 2. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. 641 p.

CARBONARI, K.A. **Avaliação do Potencial 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.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B.; ROSA, M. B. *Cipó-Cravo (Tynnanthus Fasciculatus Miers – Bignoniaceae): Estudo Fitoquímico E Toxicológico Envolvendo Artemia Salina.* **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n 1, p. 51-58, 2009.

CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore.** v. 29, p. 241-249, 2005.

CHALCHAT, J.C.; MUHAYIMANA, A.; HABIMANA, J. B.; CHABARD, J. L. Aromatic plants of Rawanda II. Chemical composition of essential oils of ten Eucalyptus species growing Ruhande Arboretum, Butare Rwanda. **Jornal of Essential Oil Reseaech.** v. 9, n. 2, p. 159-65, 1997.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás.** 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1985. 297 p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste.** Fortaleza: Editora UFC, 1981. 210 p.

DABAGUE, I. C. M. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE RIZOMAS DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe) SOB DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA E PERÍODOS DE SECAGEM. Curitiba, 2008.

DISCOVER-LIFE. Global Mapper. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Melaleuca+quinquenervia>. Acesso em 15 Jan. 2016.

DORAN, J. C.; TURNBULL, J. V. **Australian trees and shrubs: species for land rehabilitation and farm planting in the tropics**. Australia: Aciar Monograph. 1997. 384 p.

DRAY JR, F. A.; BENNETT, B. C.; CENTER, T. D.; WHEELER, G. S.; MADEIRA, P. T. Genetic Variation in *Melaleuca quinquenervia* Affects the Biocontrol Agent *Oxyops vitiosa*. **Weed Technology**. v. 18, p. 1400–1402, 2004.

DUARTE, D.A.; SÁ, A.L.B. **Resistência e sensibilidade de cepas do *Staphylococcus aureus* a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos isolados de unidades hospitalares: revisão bibliográfica sistemática metanalítica dos últimos dez anos**. REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde. V. 2, 108-121. 2011.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-90, 1961.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FALCI, S.P.P. ÓLEO DE *Melaleuca* sp. COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EM FERIDAS CONTAMINADAS POR *Staphylococcus aureus* EM RATAS. 2015. p. 71. Dissertação (Mestrado Profissional) Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre, 2015.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 1, p.213-226, 2008.

FLOGIO, M. A.; QUEIROGA, L. C.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multieficiência. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, 2006.

FRANK, B.; GUPTA, S. A. Review of Antioxidants and Alzheimer's Disease. **Ann. Clin. Psychiatry**, v. 17, p. 269-86, 2005.

GONZÁLEZ, I.; ARIAS, Y.; SÁNCHEZ, Y.; ROJAS, M. M.; GONZÁLEZ, E.; PINO, O.; PETEIRA, B. Inducción de mecanismos de defensivos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. *Amalia*) con el uso de aceites esenciales. **Rev. Protección Veg.** v. 28, n. 3, p. 185-191, 2013.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T. E. JAENICKE, C. - PDR® for Herbal Medicines™. Montvale, NJ: **Medical Economics Company**. p. 858, 2000.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of today and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HANSON, J. R. **Natural Products the secondary metabolites**. Great Britain: The Royal Society of Chemistry, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA DE BOA VISTA RORAIMA. **Fundação Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos de Roraima (FEMARH-RR)**. Boa Vista, RR, v. 1, p. 1-5, 2014, 2015. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo2/previsaoPorTipo&type=estadual>. Acesso em 15 fev. 2016.

IRELAND, B. F.; HIBBERT, D. B.; GOLDSACK, R. J.; DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 30, p. 457–470, 2002.

IRELAND, B. F.; HIBBERT, D. B.; GOLDSACK, R. J.; DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 30, p. 457–470, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. 777 p.

KEATING, R. C. Leaf histology and its contribution to relationships in the Myrtales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. n. 71, p. 801-823, 1984.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, mai./ago. 2010.

LEE, B. H.; ANNIS, P. C.; TURMAALII, F.; WON-SIK, C. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 553-564, 2004.

LOPES, W.B. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**, v.1, p.1-11, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. **Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants**. Nova York: Kinghorn & Balandrini, 1993, p.112-37.

MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Subtâncias Bioativas. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Genebra: IUPAC, 2006.

MONTANARI, R. M. **Composição Química e Atividades Biológicas dos óleos essenciais de espécie de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 173 p. Tese (Doctor Scientiae) Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/Minas Gerais, 2010.

MONTERO, I. F.; SILVA, F. S.; COSTA, H. N. R.; MELO FILHO, A. A.; SANTOS, R. C.; COSTA, G. V.; LIMAE, C. A. C. Actividad Biológica de *Combretum laurifolium*. **Orbital: Electron. J. Chem.** v. 6, n. 4, p. 233-239, 2014.

MORTON, J. F. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. **Charles C. Thomas Springfield, IL**, 1981.

NASCIMENTO, L.S.N.; RABELO, S.A.C.; SILVA, G.R.; NASCIMENTO, F.C.; SANTOS, R.C. Atividade biológica de *Davilla kunthii* A. St. –Hil. (Dilleniaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.172-179, 2016.

NETO, F. R. de A.; NUNES, D. da S. e S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.

OLIVEIRA, A. R. M. F.; JEZLER, C. N.; OLIVEIRA, R. A.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. B. 2012. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 155-159, jan./mar. 2012.

OLIVEIRA, I.S.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** 18 (4): Out./Dez. 2008.

ORWA, C. A.; MUTUA, K. R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. Agroforestry Database:a tree reference and selection guide version 4.0. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>. Acesso em: 20 jan. 2016, 2009.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método de avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, p. 345-353, 2007.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PALOS MAP. **Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus meticilina resistentes (MRSA) em profissionais de saúde e as interfaces com as**

**infecções nosocomiais** (tese doutorado). Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2006.

PANJA A. R. R.; JOSETTE, V.; JEAN-P, B.; EMILE M. G. Occurrence of Various Chemotypes in Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Essential Oils from Madagascar Using Multivariate Statistical Analysis. **J. Agric. FoodChem.** v. 42, p. 1177-1182, 1994.

PAWAR V. C.; THAKER, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, p. 316–323, 2006.

PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acido adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, Washington, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, out. 2001.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 193-197, 1998.

PRUDÊNCIO, C.V. **Inibição de salmonella typhimurium por bovina hc5 ssociada a agentes Quelantes e tensoativos**. 2009. p. 85. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

QUINTÃO, F. J. O. **CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE *Microlicia graveolens*, *Melaleuca leucadendron* E DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS E CAULES DE *Vellozia Squamata* PARA O DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA USO FARMACÊUTICO**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013. p. 117.

RODRIGUEZ, A.G.; TEXEIRA, J.R.A.; SALLES, F.G.; VITAL, J.P.; PEIXOTO, D.S. *Artemia salina* bioassay for detection of toxins in foods. 36 (5): 795-808, 2009.

RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (*Cyperaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n. 2, p.98-102, 2005.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; NETO, O. G. da R. Descrição de Sistema e Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Unidade e de Biomassa em Laboratório. **Comunicado técnico 99 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Belém, PA, ISSN 1517-2244, p. 1-5 Nov. 2004.

SANTOS, R. C. dos. **Análise por CG-EM do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* Denh. Influenciado por doses de NPK**. 2011. P. 126. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

SERI-KOUASSI, B. P.; KANKO, C.; ABOUA, L. R. N.; BEKON, K. A.; GLITHO, A. I.; KOUKOUA, G.; N'GUESSAN, Y. T. Action des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire sur *Callosobruchus maculatus* F. du niébé. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 7, n. 10/11, p. 1043-1046, 2004.

SILVA, C. J. **MORFOANATOMIA FOLIAR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE SETE ESPÉCIES DE *Melaleuca* L. (MYRTACEAE)**. 2007. 89p. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PINHEIRO, A. L.; ISMAIL, F. M. D. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. **Flavour And Fragrance Journal**. v. 22, p. 474–478, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **ÓLEOS VOLÁTEIS**. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora UFSC, 2004.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS**. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora UFSC, 2004.

SOONTHORNCHAREONNON, N.; WIWAT, C.; CHUAKUL, W. Biological Activities of Medicinal Plants from Mangrove and Beach Forests. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science**, v. 39 n.1, p. 9-18, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/42000198?tab=maps>. Acesso em 15 Jan. 2016.

VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E.; MACIEL, E. N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA JR P. T.; DALL'OGGIO, E. L.; COELHO, M. F. B. VARIAÇÃO ANUAL DO RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DA *Siparuna guianensis* AUBLET. **Quim. Nova**, v. 33, N. 7, 1506-1509, 2010.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

WHEELER, G. S. Maintenance of a narrow host range by *Oxyops vitiosa*; a biological control agent of *Melaleuca quinquenervia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 365–383, 2005.

WHEELER, G. S.; MASSEY, L. M.; SOUTHWELL, I. A. Dietary influences on terpenoids sequestered by the biological control agent *Oxyops vitiosa*: effect of plant volatiles from different *Melaleuca quinquenervia* chemotypes and laboratory host species. **Journal of Chemical Ecology**. v. 29, p. 188-207.

WHEELER, G. S.; ORDUNG, K. M. Secondary metabolite variation affects the oviposition preference but has little effect on the performance of *Boreioglycaspis melaleucae*: A biological control agent of *Melaleuca quinquenervia*. **Biological Control**, v. 35, p. 115–123, 2005.

WHEELER, G. S.; PRATT, P. D.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; ORDUNG, K. M. Intraspecific variation of *Melaleuca quinquenervia* leaf oils in its naturalized range in Florida, the Caribbean, and Hawaii. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 489-500, 2007.

YOSHIDA, T.; MARUYAMA, T.; NITRA, A.; OKUDA, T. An hydrolysable tannin and accompanying polyphenols From *Melaleuca leucadendron*. v. 42, p. 1171-1173, 1996.

ZACCHINO, A. S.; GUPTA, M. P. **Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos**, vol. 85; Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario, 2007.  
ZUBRICK, J. W. **Manual de sobrevivência no laboratório de química orgânica: Guia de técnicas para o aluno**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 262 p.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 – Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 48182-2	Data da Emissão: 18/02/2018 22:48
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular	
Nome: FRANCISCO DOS SANTOS SILVA	CPF: 008.329.512-14

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anulações, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites da unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 8.902/1990 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviço on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .
9	Este documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anulações, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.

#### Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxonomia
1	ESPÉCIE	Melaleuca quinquenervis, Lantana camara

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 37786793



Página 1/1

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas obtidos por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-DIC)

Figura 25 – Cromatograma de C<sub>11</sub> a C<sub>18</sub> por CG-DIC

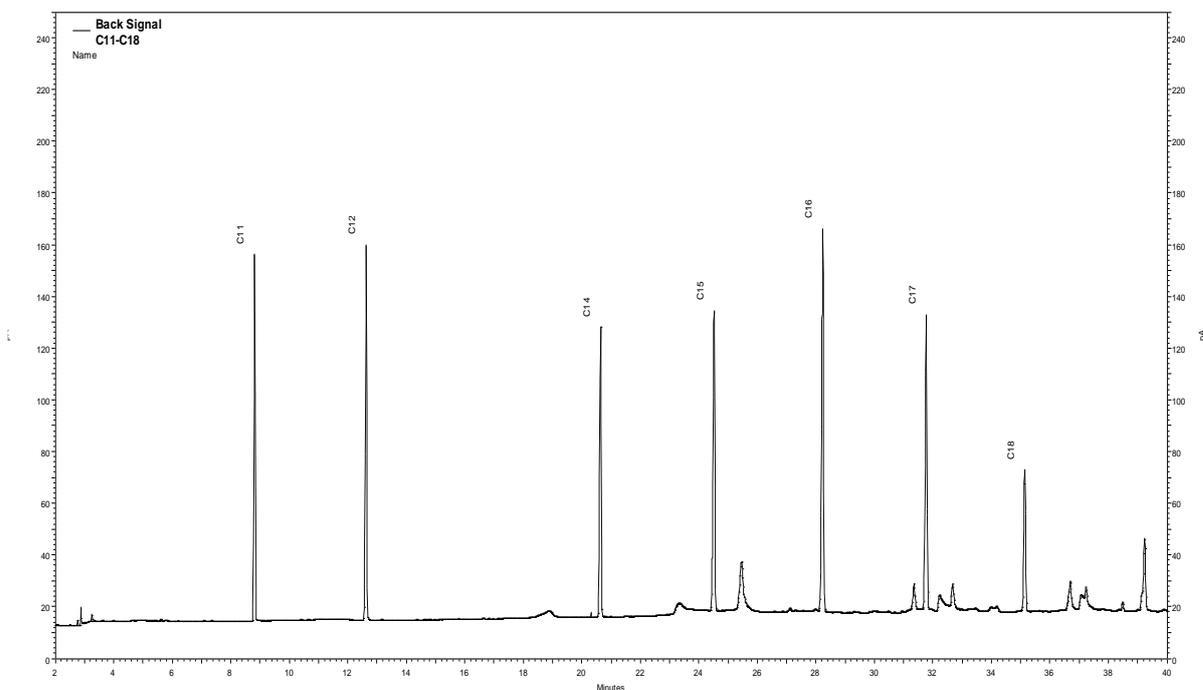


Figura 26 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF01 por CG-DIC

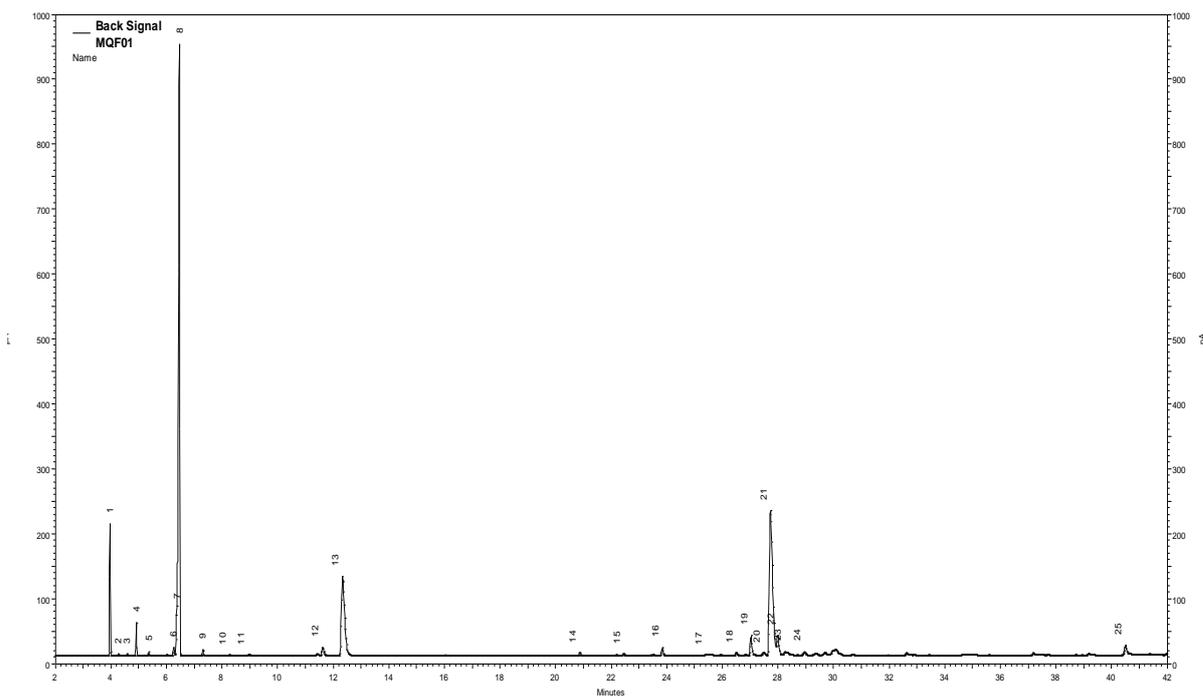


Figura 27 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF02 por CG-DIC

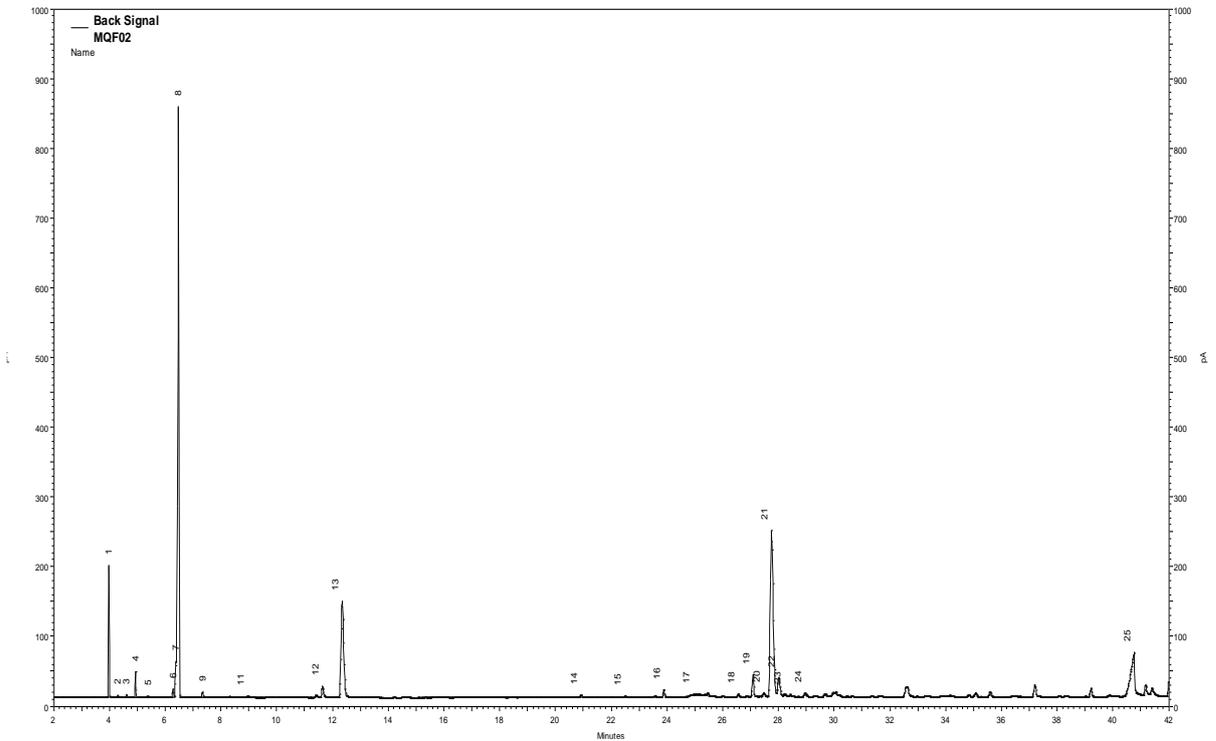


Figura 28 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF03 por CG-DIC

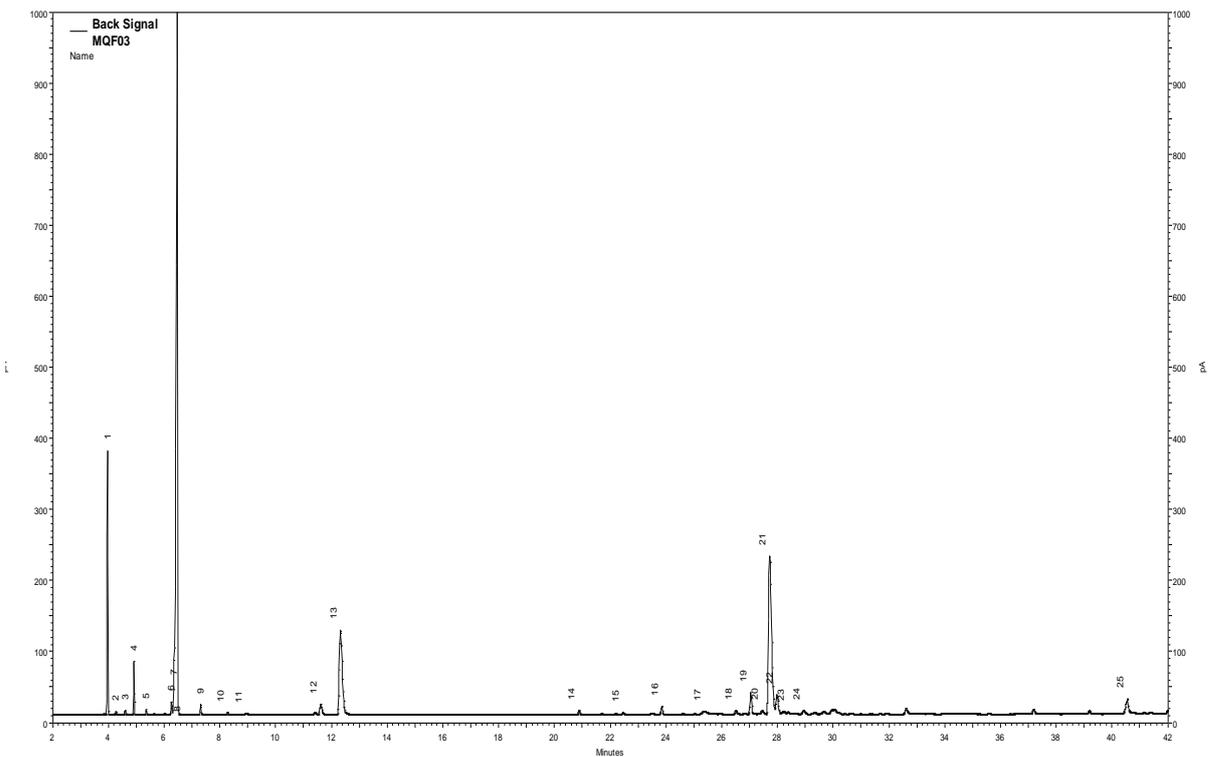


Figura 29 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF04 por CG-DIC

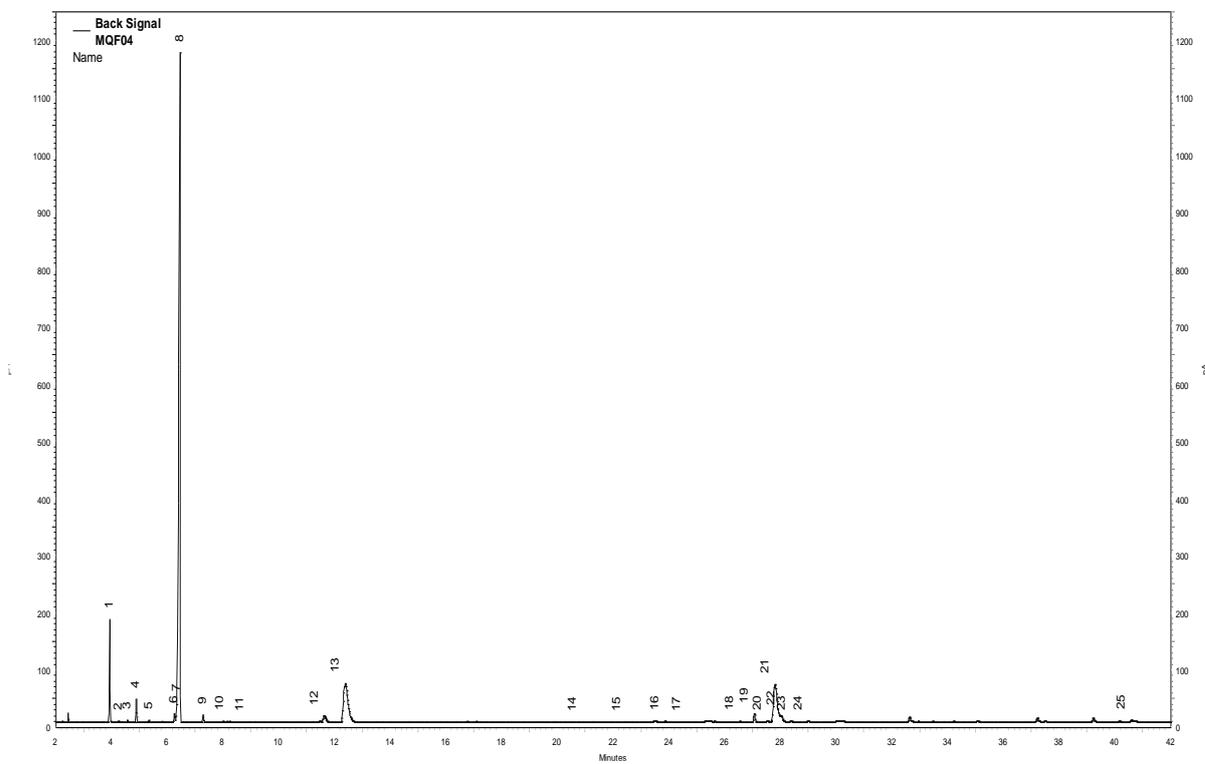


Figura 30 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* o MQS01 por CG-DIC

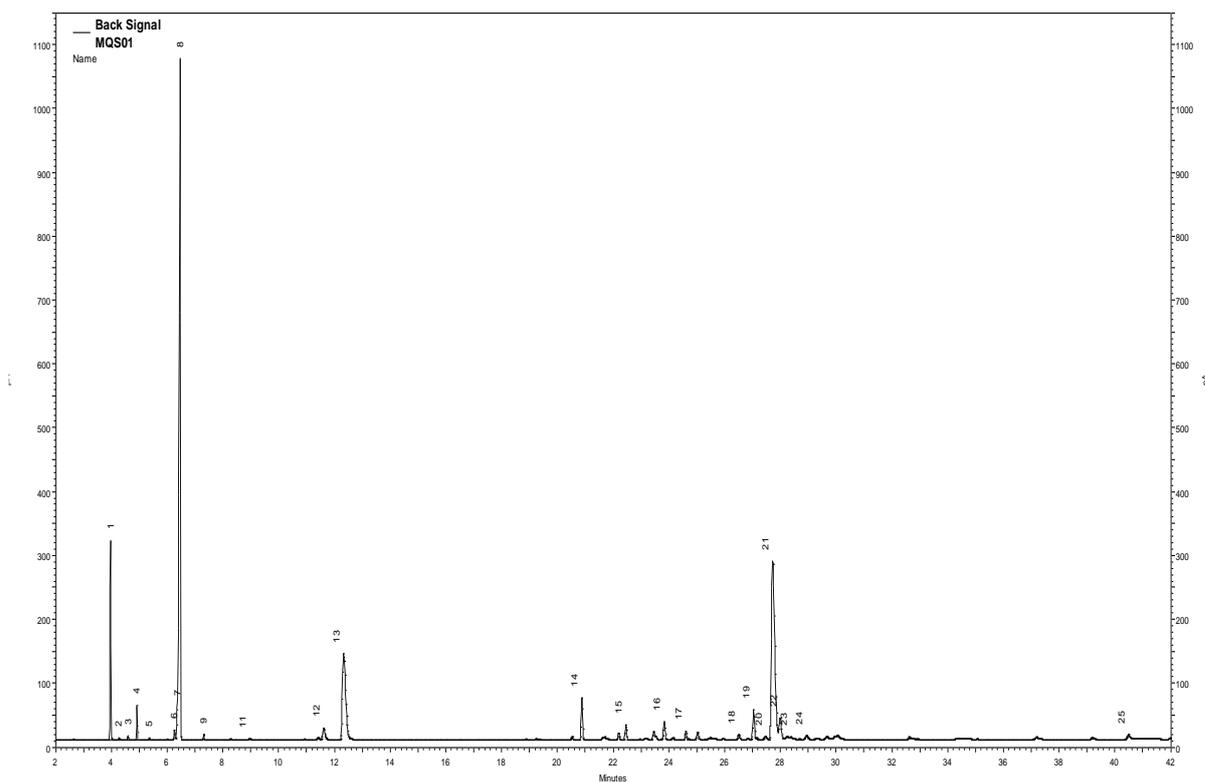


Figura 31 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQS02 por CG-DIC

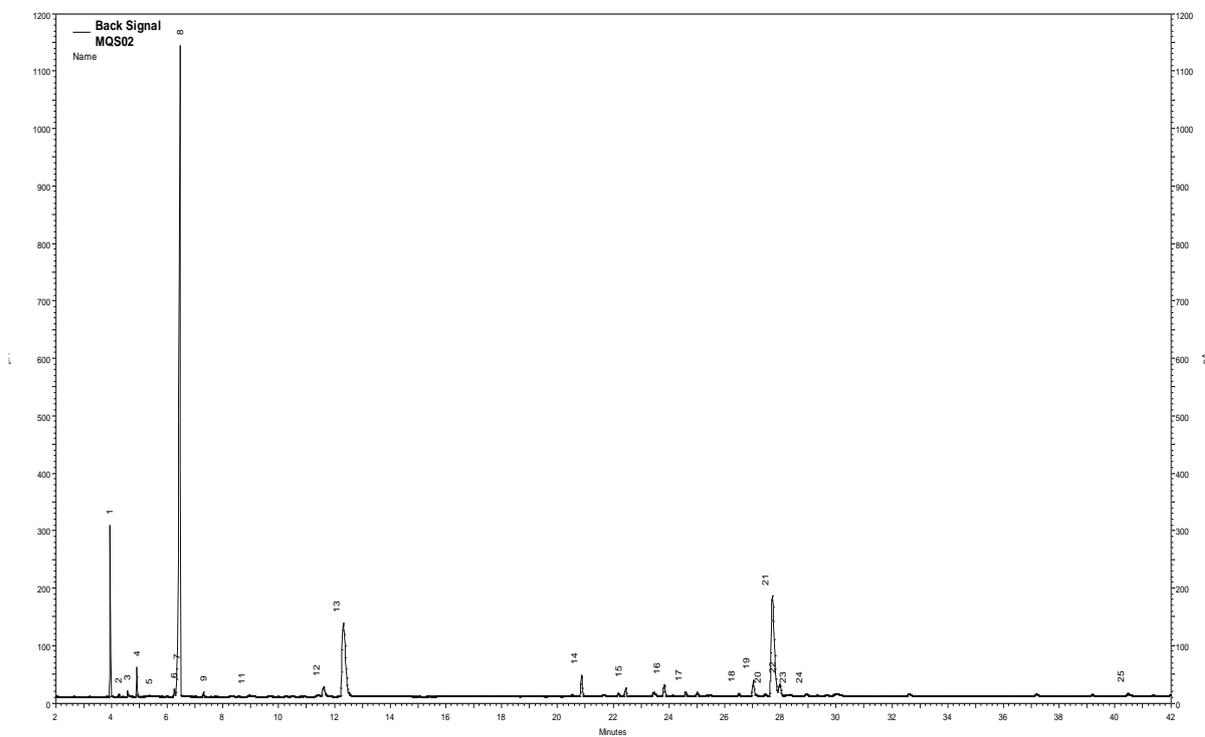


Figura 32 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQS03 por CG-DIC

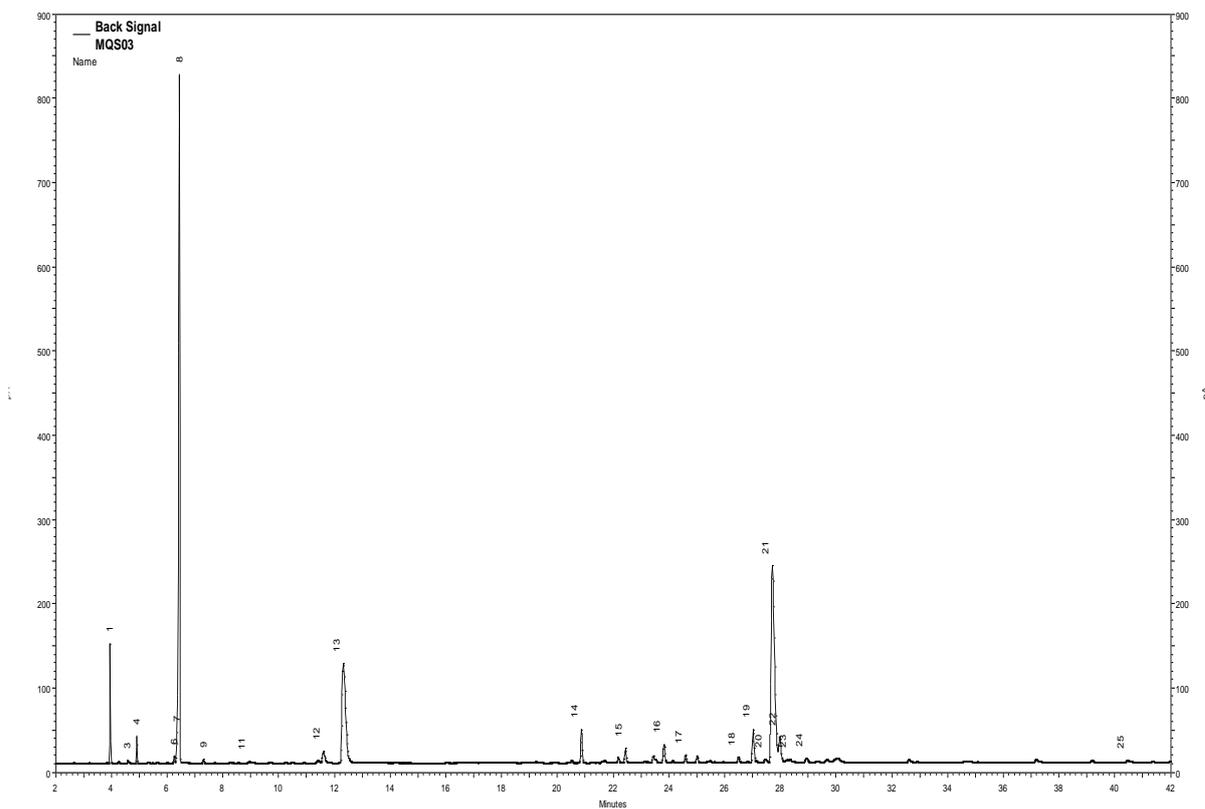


Figura 33 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQS04 por CG-DIC

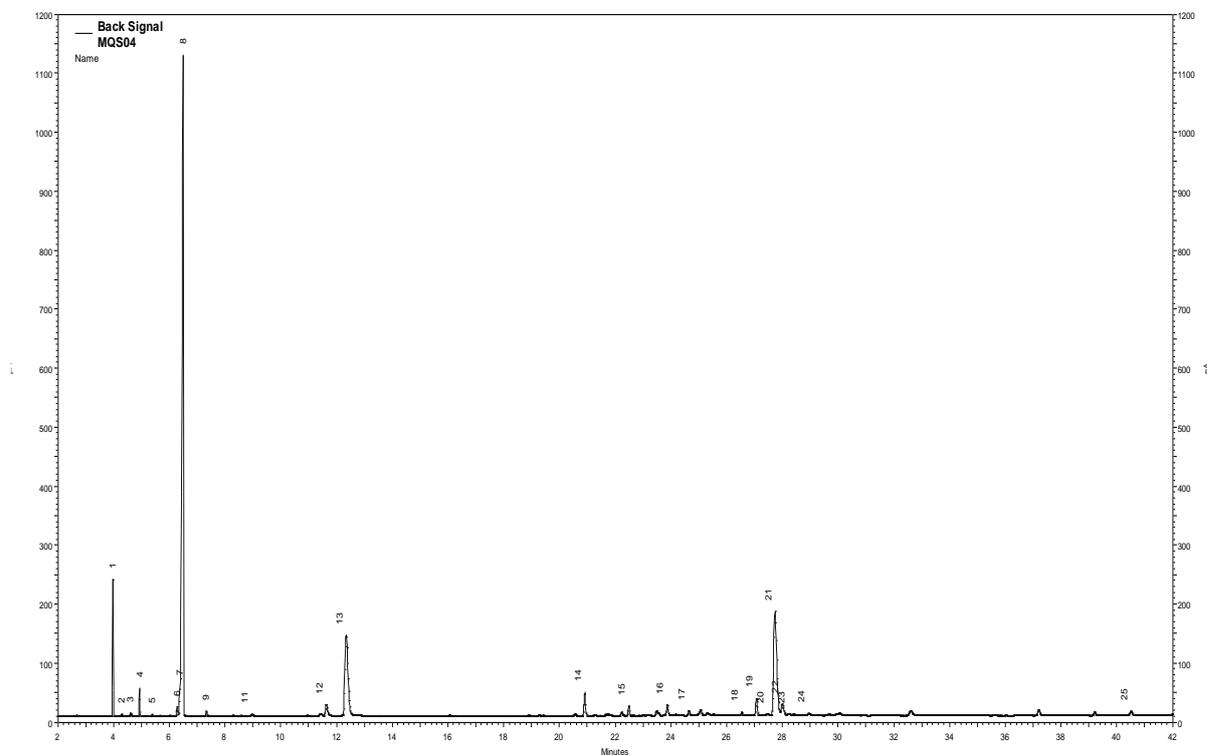


Figura 34 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF05 por CG-DIC

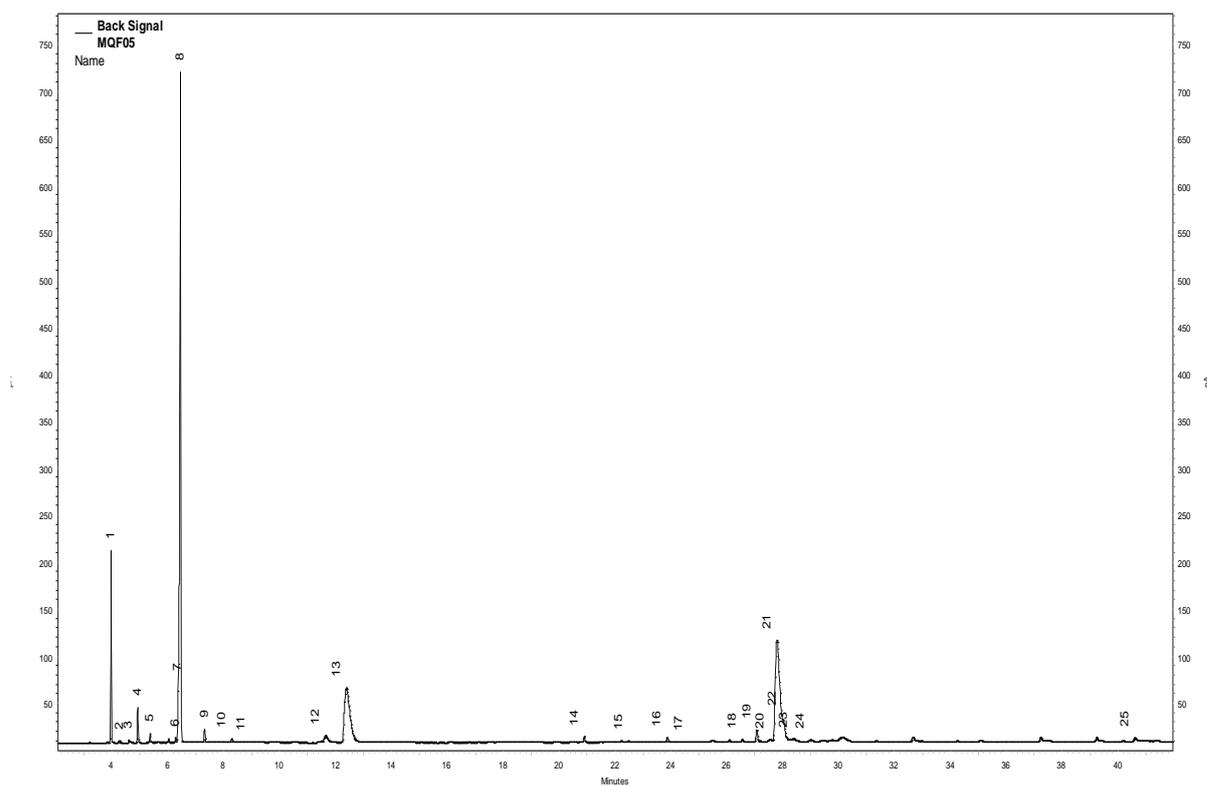


Figura 35 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF06 por CG-DIC

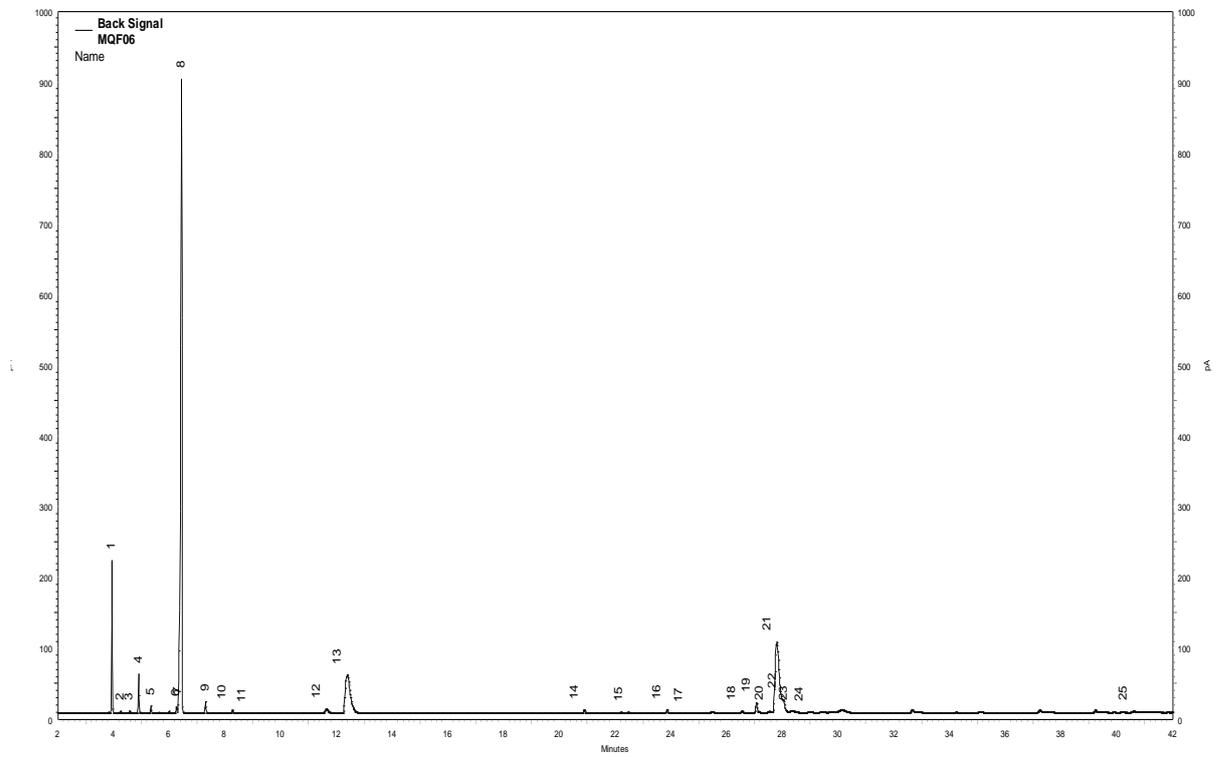


Figura 36 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF07 por CG-DIC

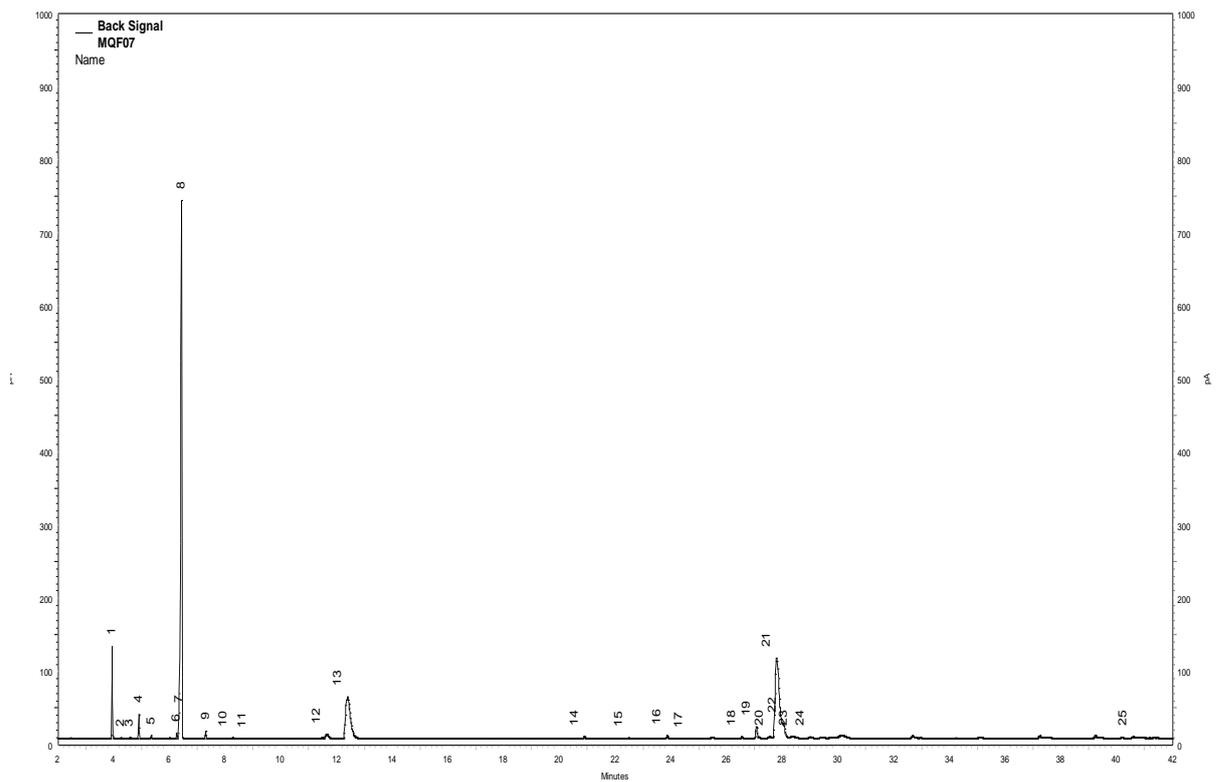


Figura 37 – Cromatograma de íons totais do óleo essencial da *M. quinquenervia* MQF08 por CG-DIC

