



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**



**ALINE DO NASCIMENTO SILVA**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *MYRCIA* DC. (MYRTACEAE).**

Feira de Santana – Bahia

2010

**ALINE DO NASCIMENTO SILVA**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *MYRCIA* DC. (MYRTACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Maria Lucchese (UEFS)  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula T. Uetanabaro (UESC)

Feira de Santana – Bahia

2010

## BANCA EXAMINADORA

  
**Profa. Dra. Carla Cardeal Mendes**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

  
**Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

  
**Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA  
2010**

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sempre acreditaram em mim e na minha capacidade de recomeçar. Em especial, à minha mãe Elizabeth e ao meu pai José, ao meu irmão Anderson, à minha princesa Alícia, ao meu eterno companheiro Márcio, aos meus tios e primos, à Dr<sup>a</sup>. Denise Carvalho e ao meu vovô Manoel (*in memorian*).

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e por guiar cada um dos passos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Maria Lucchese, pelas orientações, por dar assistência à execução de todas as etapas do trabalho, e principalmente, por sua forma humana, gentil, carinhosa e maternal de lidar com cada um dos seus orientandos.

Ao Professor Nilson Gonçalves de Jesus por me apresentar às Mirtáceas e pelo auxílio na descrição e na identificação das espécies.

À Dr<sup>a</sup>. Gracineide Almeida, pelo cuidado com as exsiccatas além do contínuo apoio e da sincera amizade.

À amiga Ângela Lidiane, companheira no estudo taxonômico da família Myrtaceae.

À Serly Santiago e à Alexandre Miranda pelo auxílio na injeção das amostras no Laboratório de Cromatografia.

À Edna Peralta, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos estagiários Robson Dias, Martha Rocha e Renata Pinto, pelo apoio na execução das primeiras hidrodestilações.

Aos colegas Jacqueline Miranda, Isabela Araújo e Getúlio Bomfim pela colaboração durante a minha estada no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia – LAPEM

À funcionária Maria Gorette, pela sua dedicação e competência na esterilização dos instrumentos de trabalho utilizados no LAPEM.

Ao meu amigo e irmão Matheus Leite, pela companhia e apoio no Laboratório, e especialmente, pela linda e eterna amizade que construímos dia após dia no decorrer destes dois anos.

Às amigas Camila de Ponzzes e Mona Liza, simplesmente por tê-las conhecido.

Ao amigo Edivan Assunção, pelas caronas para Alagoinhas e pelas intermináveis discussões sobre Estatística.

Aos companheiros da república Luis Henrique, Thiago, Robson, Uilliam e Crispim.

Aos amigos Edilene Bahia e Virgílio Vianna, pelo apoio nas horas difíceis e pelas orações.

À amiga Sônia Mendes, diretora do Colégio Municipal Dr. Jairo Azi, pelo apoio e compreensão.

À cada um dos meus alunos, por compreenderem e respeitarem as minhas ausências, e por terem orgulho do meu trabalho.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e por abdicarem dos seus próprios sonhos e necessidades para me proporcionar sempre uma excelente educação.

Ao meu amor Márcio, por me acompanhar em cada uma das coletas, pelas horas de espera em frente ao Laboratório e pela sua compreensão, ao ser muitas vezes substituído pelos livros, abstendo-se pacientemente da minha presença.

À minha pequenina sobrinha Alícia, por alegrar a minha vida e encher meu coração de esperança.

À minha madrinha e mãezinha Vanda, e a todos os meus tios e primos, por sempre acreditarem em mim.

À Deus e ao Mestre Jesus pela graça de viver e pelo merecimento de poder compartilhar a minha existência com pessoas tão iluminadas.

## RESUMO

A família Myrtaceae compreende mais de 3.100 espécies, que estão amplamente distribuídas na América e na Austrália. O gênero *Myrcia* DC., inclui 300 espécies em todo o território brasileiro, e aproximadamente, 52 espécies habitam no estado da Bahia. Este trabalho descreve a variação sazonal da composição química dos óleos essenciais das folhas de *Myrcia alagoensis* O. Berg, *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC. coletadas num remanescente de floresta no município de Alagoinhas, estado da Bahia, região nordeste do Brasil, em quatro diferentes estações durante os anos 2008 e 2009. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação das folhas frescas após três horas, em um aparelho de Clevenger. Os óleos foram analisados por CG-DIC e CG-EM. Foram identificados diferentes compostos, com predominância de sesquiterpenos, a exemplo do Carotol,  $\beta$ -Farneseno (*E*), Cariofileno, Germacreno D e Farnesoato de metila (2*E*, 6*E*), os quais foram predominantes na maioria das amostras analisadas. A composição química dos constituintes de todas as amostras de óleo essencial exibiu uma significativa variação sazonal. Todas as amostras de óleo, com exceção da *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., tiveram suas propriedades antimicrobianas testadas contra sete bactérias (*Staphylococcus aureus* resistente a novobiocina, *Staphylococcus aureus* resistente a estreptomicina e a diidroestreptomicina, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sensível a trimetoprima e resistente à sulfonamida, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e duas leveduras (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*) pelo método da microdiluição em caldo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada e os óleos essenciais foram ativos contra todos os microrganismos avaliados.

**Palavras-chave:** Myrtaceae, *Myrcia*, óleo essencial, sesquiterpenos, atividade antimicrobiana, Concentração Inibitória Mínima (CIM).

## ABSTRACT

The family Myrtaceae comprise more than 3.100 species, which are widely distributed in America and Australia. The genus *Myrcia* DC., include 300 species in all Brazilian territory and approximate 52 species reside in Bahia state. This work reports the seasonal variation of the composition of leaf essential oils of *Myrcia alagoensis* O. Berg, *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. and *Myrcia rostrata* DC. harvested in the remainder of forest in the municipal district of Alagoinhas, Bahia, northeastern region of Brazil in four different season during the years 2008 and 2009. The essential oils were obtained by hydro-distillation from fresh leaves after three hours in a Clevenger apparatus. The oils were analyzed by GC-FID and GC-MS. Different compounds were identified with predominancy of the sesquiterpenes, for example Carotol,  $\beta$ -Farnesene (*E*), Caryophyllene, Germacrene D and Methyl Farnesoate (2*E*, 6*E*), which were predominant in most of the analyzed samples. The chemical composition from all essential oil samples showed meaningful seasonal variation. All the sample oils, with exception of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., had their antimicrobial properties tested against seven bacteria (*Staphylococcus aureus* resistant a novobiocine, *Staphylococcus aureus* resistant a streptomycin and dihidrostreptomycin, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sensitive a trimetoprim and resistant a sulphonamide, *Salmonella choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa*) and two yeasts (*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*) by the broth microdilution method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determinate and the essential oils were active against all microorganisms evaluated.

**Keywords:** Myrtaceae, *Myrcia*, essential oil, sesquiterpenes, antimicrobial activity, Minimal Inhibitory Concentration (MIC).



## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 01</b> | Fragmento do Papiro de Ebers   | 21 |
| <b>Figura 02</b> | Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.                  | 34 |
| <b>Figura 03</b> | Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.   | 35 |
| <b>Figura 04</b> | Esquema do aparelho de Clevenger.  | 40 |
| <b>Figura 05</b> | Esquema básico de um cromatógrafo a gás.   | 42 |
| <b>Figura 06</b> | Esquema básico da cela de um detector por ionização em chama (DIC).  | 43 |
| <b>Figura 07</b> | Estrutura do isopreno.   | 49 |
| <b>Figura 08</b> | Formação dos terpenóides a partir de unidades isoprênicas.   | 50 |
| <b>Figura 09</b> | Localização geográfica do município de Alagoinhas-BA.  | 55 |
| <b>Figura 10</b> | Aspecto geral do solo na Área de coleta.   | 56 |
| <b>Figura 11</b> | Visão geral da Área de Coleta.   | 57 |
| <b>Figura 12</b> | Floração de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg.  | 63 |
| <b>Figura 13</b> | Frutos de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg.  | 63 |
| <b>Figura 14</b> | Frutos de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.   | 63 |
| <b>Figura 15</b> | Folhas rostradas de <i>Myrcia. rostrata</i> DC.  | 63 |
| <b>Figura 16</b> | Frutos de <i>Myrcia rostrata</i> DC.   | 63 |
| <b>Figura 17</b> | Principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos.   | 74 |
| <b>Figura 18</b> | Representação esquemática da estrutura das paredes celulares de bactérias Gram negativas e Gram positivas. | 75 |
| <b>Figura 19</b> | Estrutura química do Cloranfenicol.  | 78 |
| <b>Figura 20</b> | Estrutura química da Estreptomicina.   | 79 |
| <b>Figura 21</b> | Estrutura química da Sulfanilamida.  | 80 |
| <b>Figura 22</b> | Estruturas químicas da Anfotericina B e da Nistatina.  | 81 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Figura 23</b> | Coleta do material vegetal.  | 88  |
| <b>Figura 24</b> | Pesagem do material.   | 91  |
| <b>Figura 25</b> | Trituração do material vegetal.  | 91  |
| <b>Figura 26</b> | Hidrodestilação em aparelho de Clevenger.  | 91  |
| <b>Figura 27</b> | Funil de Separação.  | 91  |
| <b>Figura 28</b> | Teor de umidade presente na amostra detectado pelo Determinador de Umidade Marte®. | 92  |
| <b>Figura 29</b> | Cromatógrafo a Gás Varian®.  | 93  |
| <b>Figura 30</b> | Cromatógrafo a Gás Shimadzu®.  | 93  |
| <b>Figura 31</b> | Preparação das amostras para a injeção.  | 94  |
| <b>Figura 32</b> | Pesagem da amostra de óleo em balança analítica                                    | 94  |
| <b>Figura 33</b> | Repique das leveduras  | 96  |
| <b>Figura 34</b> | Placas de microtitulação   | 97  |
| <b>Figura 35</b> | Estufa   | 97  |
| <b>Figura 36</b> | Estufa B. O. D.  | 97  |
| <b>Figura 37</b> | Esquema da metodologia da microdiluição em placa                                   | 98  |
| <b>Figura 38</b> | Preparo para a adição do meio de Cultura nas placas                                | 100 |
| <b>Figura 39</b> | Esterilização da solução Óleo/Tween  | 100 |
| <b>Figura 40</b> | Membrana de acetato celulose   | 100 |
| <b>Figura 41</b> | Calibração do Colorímetro do Vitek (BioMerieux®)                                   | 100 |
| <b>Figura 42</b> | Preparo do material para a aplicação da Rezasurina                                 | 102 |
| <b>Figura 43</b> | Aplicação da Rezasurina  | 102 |
| <b>Figura 44</b> | Aplicação do Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC)                            | 103 |
| <b>Figura 45</b> | Preparo das placas de Petri para determinação da CBM e da CFM.                     | 103 |
| <b>Figura 46</b> | Preparo das placas de Petri para a determinação da CBM e da CFM.                   | 103 |

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Figura 47</b> | Realização do plaqueamento para a determinação da CBM e da CFM.   | 104 |
| <b>Figura 48</b> | Realização do plaqueamento para a determinação da CBM e da CFM.   | 104 |
| <b>Figura 49</b> | Dados meteorológicos registrados no município de Alagoinhas-BA durante os meses de coleta entre os anos 2008 e 2009.  | 106 |
| <b>Figura 50</b> | Diferença entre os valores máximos e mínimos dos dados meteorológicos: Soma da Precipitação (mm), Temperatura média (°C) e DAAS (mm), registrados no município de Alagoinhas-BA durante os meses de coleta entre os anos 2008 e 2009. | 106 |
| <b>Figura 51</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg na coleta do final da primavera.  | 108 |
| <b>Figura 52</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg na coleta do final do verão.  | 108 |
| <b>Figura 53</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg na coleta do final do outono.   | 108 |
| <b>Figura 54</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg na coleta da primavera.   | 108 |
| <b>Figura 55</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC., na coleta do final da primavera.   | 109 |
| <b>Figura 56</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC., na coleta do final do verão.   | 109 |
| <b>Figura 57</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC., na coleta do final do outono.  | 109 |
| <b>Figura 58</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC., na coleta da primavera.  | 109 |
| <b>Figura 59</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia rostrata</i> DC., na coleta do final da primavera.   | 109 |

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Figura 60</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia rostrata</i> DC., na coleta do final do verão.   | 109 |
| <b>Figura 61</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia rostrata</i> DC., na coleta do final do outono.  | 109 |
| <b>Figura 62</b> | Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de <i>Myrcia rostrata</i> DC., na coleta do final do inverno.   | 109 |
| <b>Figura 63</b> | Variação Sazonal do Teor de Umidade (%) presente nas folhas de espécies de <i>Myrcia</i> DC.  | 110 |
| <b>Figura 64</b> | Variação Sazonal do Rendimento (%) dos Óleos Essenciais obtidos de espécies de <i>Myrcia</i> DC.  | 110 |
| <b>Figura 65</b> | Diferença entre os valores máximo e mínimo do Teor de Óleo Essencial (%) para a <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg.   | 112 |
| <b>Figura 66</b> | Diferença entre os valores máximo e mínimo do Teor de Óleo Essencial (%) para a <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.  | 112 |
| <b>Figura 67</b> | Diferença entre os valores máximo e mínimo do Teor de Óleo Essencial (%) para a <i>Myrcia rostrata</i> DC.  | 112 |
| <b>Figura 68</b> | Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos Oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg        | 113 |
| <b>Figura 69</b> | Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos Oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.    | 113 |
| <b>Figura 70</b> | Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos Oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> DC.              | 114 |
| <b>Figura 71</b> | Diferenças Quantitativas e Qualitativas entre alguns constituintes majoritários identificados nos Óleos Essenciais obtidos das folhas frescas (MAFF) e das folhas secas (MAFS) de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg. | 115 |
| <b>Figura 72</b> | Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados na fração sesquiterpênica dos Óleos Essenciais de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg  | 117 |

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Figura 73</b> | Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados na fração sesquiterpênica dos Óleos Essenciais de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg  | 118 |
| <b>Figura 74</b> | Variação sazonal dos constituintes identificados na fração sesquiterpênica de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.  | 119 |
| <b>Figura 75</b> | Cromatogramas dos óleos essenciais de <i>M. guianensis</i> (Aubl.) DC. provenientes das coletas realizadas no final da primavera e do verão.  | 119 |
| <b>Figura 76</b> | Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados nos Óleos Essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> DC.  | 123 |
| <b>Figura 77</b> | Variação Sazonal dos constituintes majoritários da fração sesquiterpênica identificados nos Óleos Essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> DC.  | 124 |
| <b>Figura 78</b> | Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Tween 80 a 10% contra duas cepas de <i>S aureus</i> e uma de <i>Bacillus cereus</i> .  | 125 |
| <b>Figura 79</b> | Microdiluição em caldo do óleo essencial de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg  | 126 |
| <b>Figura 80</b> | Resultado da Microdiluição em Placa para o antibiótico Cloranfenicol testado numa concentração de 10mg/mL contra duas cepas de <i>S. aureus</i> e contra o <i>Bacillus cereus</i> .   | 128 |
| <b>Figura 81</b> | Variação Sazonal da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg contra Bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e Leveduras.   | 130 |
| <b>Figura 82</b> | Variação Sazonal da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de <i>Myrcia rostrata</i> DC. contra Bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e Leveduras.   | 131 |
| <b>Figura 83</b> | Microdiluição em caldo do óleo essencial de <i>Myrcia rostrata</i> DC. com determinação da Concentração Inibitória Mínima.  | 132 |
| <b>Figura 84</b> | Placa de Determinação da CBM para o óleo essencial da <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg, testado numa concentração inicial de 5% contra a <i>Staphylococcus aureus</i> (CCMB262), cepa resistente à estreptomicina e à diidroestreptomicina, evidenciando ação bactericida em todas as concentrações testadas. | 134 |
| <b>Figura 85</b> | Determinação da CFM para o óleo essencial de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg obtido das folhas coletas na primavera. Em A, poços identificados na frente da placa de Petri e em B a Determinação da CFM no fundo da mesma placa.   | 134 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Tabela 01</b> | Data e estação do ano correspondente à cada coleta de material vegetal.   | 89  |
| <b>Tabela 02</b> | Números de Tombo das exsicatas no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB) e no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).   | 89  |
| <b>Tabela 03</b> | Microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.   | 95  |
| <b>Tabela 04</b> | Dados referentes à massa vegetal hidrodestilada, volume de óleo essencial obtido, teor de umidade presente nas folhas e rendimento dos óleos essenciais obtidos de três espécies de <i>Myrcia</i> DC. em quatro diferentes estações do ano. | 107 |
| <b>Tabela 05</b> | Estatística Descritiva do Teor de Umidade presente nas folhas de espécies de <i>Myrcia</i> DC.  | 107 |
| <b>Tabela 06</b> | Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg   | 116 |
| <b>Tabela 07</b> | Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de <i>M. guianensis</i> (Aubl.) DC.   | 120 |
| <b>Tabela 08</b> | Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de <i>M. rostrata</i> DC.   | 122 |
| <b>Tabela 09</b> | Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Cloranfenicol e em (%) da CIM e da CBM para as amostras de óleo essencial de <i>M. alagoensis</i> O. Berg.   | 127 |
| <b>Tabela 10</b> | Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Cloranfenicol e em (%) da CIM e da CBM para as amostras de óleo essencial obtidas de <i>M. rostrata</i> DC.  | 127 |
| <b>Tabela 11</b> | Valores em (mg/mL) da CIM para o antifúngico Nistatina e em (%) da CIM e da CFM para as amostras de óleo essencial obtidas de <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg.   | 133 |
| <b>Tabela 12</b> | Valores em (mg/mL) da CIM para o antifúngico Nistatina e em (%) da CIM e da CFM para as amostras de óleo essencial obtidas de <i>Myrcia rostrata</i> DC.  | 133 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Equação 01</b> | Cálculo do Índice de Kovats (IK)           | 45 |
| <b>Equação 02</b> | Cálculo do rendimento de óleos essenciais. | 92 |
| <b>Equação 03</b> | Cálculo do Índice Aritmético.              | 94 |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>17</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>19</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL   | 19        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 19        |
| <b>3</b>     | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>   | <b>20</b> |
| 3.1          | PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA   | 20        |
| <b>3.1.1</b> | <b>Perspectiva Histórica</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.1.2</b> | <b>A Fitoterapia no Brasil: as contribuições indígena, européia e africana.</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1.3</b> | <b>A Fitoterapia e a Pesquisa Fitoquímica na contemporaneidade</b>   | <b>27</b> |
| 3.2          | METABOLISMO VEGETAL  | 31        |
| <b>3.2.1</b> | <b>Metabólitos Secundários em Plantas</b>  | <b>33</b> |
| 3.3          | ÓLEOS ESSENCIAIS   | 37        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Características gerais</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Obtenção</b>  | <b>38</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Métodos para análise e identificação dos constituintes químicos</b>   | <b>40</b> |
| 3.3.3.1      | Cromatografia Gasosa   | 42        |
| 3.3.3.2      | Espectrometria de massas   | 45        |
| <b>3.3.4</b> | <b>Ocorrência, funções biológicas e importância econômica.</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.3.5</b> | <b>Terpenóides e Fenilpropanóides: precursores biossintéticos dos óleos essenciais.</b>                                      | <b>48</b> |
| <b>3.3.6</b> | <b>A interferência dos fatores genéticos, mesológicos e sazonais no teor e na variabilidade química de óleos essenciais.</b> | <b>51</b> |



|              |  |    |
|--------------|--|----|
| <b>3.3.7</b> | <b>Ação Farmacológica</b>  | 53 |
| 3.4          | O MUNICÍPIO DE ALAGOINHAS E A ÁREA DE COLETA   | 54 |
| 3.5          | ASPECTOS BOTÂNICOS   | 58 |
| <b>3.5.1</b> | <b>A Família Myrtaceae</b>   | 59 |
| 3.5.1.2      | Aspectos Botânicos do gênero <i>Myrcia</i> DC.   | 61 |
| 3.5.1.2.1    | Aspectos Botânicos de <i>Myrcia alagoensis</i> O.Berg  | 62 |
| 3.5.1.2.2    | Aspectos Botânicos de <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.   | 62 |
| 3.5.1.2.3    | Aspectos Botânicos de <i>Myrcia rostrata</i> DC.   | 64 |
| 3.6          | ÓLEOS ESSENCIAIS DE REPRESENTANTES DA FAMÍLIA MYRTACEAE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA. | 64 |
| 3.7          | AGENTES ANTIMICROBIANOS  | 71 |
| <b>3.7.1</b> | <b>Histórico</b>   | 71 |
| <b>3.7.2</b> | <b>Aplicações</b>  | 73 |
| <b>3.7.3</b> | <b>Mecanismos de ação</b>  | 73 |
| <b>3.7.4</b> | <b>Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos</b>                                       | 77 |
| <b>3.7.5</b> | <b>Alguns agentes antimicrobianos</b>  | 78 |
| 3.7.5.1      | Cloranfenicol  | 78 |
| 3.7.5.2      | Estreptomicina   | 79 |
| 3.7.5.3      | Novobiocina  | 80 |
| 3.7.5.4      | Sulfonamida  | 80 |
| 3.7.5.5      | Polienos: Anfotericina B e Nistatina   | 81 |
| 3.8          | MICROORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA                                  | 82 |
| 3.8.1        | <i>Staphylococcus aureus</i>   | 82 |
| 3.8.2        | <i>Bacillus cereus</i>   | 82 |
| 3.8.3        | <i>Escherichia coli</i>  | 83 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.8.4    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 83         |
| 3.8.5    | <i>Salmonella choleraesuis</i>   | 84         |
| 3.8.6    | <i>Candida albicans</i>  | 84         |
| 3.8.7    | <i>Candida parapsilosis</i>  | 84         |
| 3.9      | MÉTODOS ANTIMICROBIANOS  | 85         |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>   | <b>88</b>  |
| 4.1      | COLETA DAS AMOSTRAS  | 88         |
| 4.2      | OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS  | 90         |
| 4.3      | ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA  | 92         |
| 4.4      | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS   | 95         |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>105</b> |
| 5.1      | Coleta   | 105        |
| 5.2      | Obtenção dos Óleos Essenciais  | 105        |
| 5.3      | Análise da Composição Química  | 112        |
| 5.4      | Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo método da Microdiluição em Caldo com Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 125        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>136</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>137</b> |
| <b>8</b> | <b>APÊNDICES</b>   | <b>150</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O contínuo aparecimento de novos mecanismos microbianos de resistência à terapêutica disponível nos dias em curso tem gerado uma corrida dos laboratórios de pesquisa e da indústria farmacêutica para a produção e o lançamento de um número crescente de novos agentes antimicrobianos, mais eficazes e com menores riscos de toxicidade e de ocorrência de efeitos colaterais adversos.

A literatura aponta os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais, como os principais componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana destes produtos do metabolismo secundário de plantas, e sinaliza a possibilidade dos mesmos serem utilizados, na indústria, para a conservação de alimentos (POIANA et al., 2008), principalmente, pelo fato de existir uma forte discussão a respeito dos aspectos relativos à segurança no uso de preservantes químicos na indústria alimentícia.

Assim, surge um grande interesse não apenas da indústria farmacêutica por novos agentes antimicrobianos, mas também do setor industrial no ramo de alimentos e cosméticos, em substituir os atuais compostos sintéticos, por similares oriundos de fontes naturais. Neste sentido, os óleos essenciais aparecem como potenciais candidatos, uma vez que amostras derivadas de diferentes espécies de plantas têm mostrado pronunciada atividade antimicrobiana frente a uma ampla gama de microrganismos.

É notório que o estudo da composição química, bem como da atividade biológica dos óleos essenciais é o primeiro passo para a descoberta de compostos com potenciais usos na indústria de alimentos, como preservantes; na agricultura, como herbicidas naturais e na proteção de grãos e sementes estocados; assim como, na indústria farmacêutica, potencializando os efeitos dos antibióticos já disponíveis.

A família Myrtaceae ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do globo, compreendendo entre 3.100 e 4.600 espécies, que se encontram distribuídas em 144 gêneros (SOBRAL, 2003). Uma das características mais marcantes dos representantes deste grupo é a presença de glândulas oleíferas evidentes nas folhas, flores e frutos sob a forma de pontos translúcidos, isto explica a significativa produção de óleos essenciais por algumas de suas espécies.

A literatura reúne pesquisas que indicam as propriedades antiinflamatória, antidiarréica (RUSSO et al., 1990 *apud* CERQUEIRA et al., 2007) e antidiabética (MATSUDA et al., 2002), além das atividades antimicrobiana (CERQUEIRA et al., 2007), moluscicida e larvicida (OLIVEIRA, et al., 2006) dos óleos e extratos provenientes de diferentes espécies de Myrtaceae. O gênero *Myrcia* DC., apesar da sua riqueza em número de espécies tanto no Brasil quanto na Bahia, ainda é pouco estudado, seja do ponto de vista químico como botânico e biológico. Estudos realizados no Rio Grande do Sul envolvendo a composição química de algumas espécies de *Myrcia* DC. apontaram a predominância de sesquiterpenos cíclicos, principalmente aqueles derivados das vias de ciclização do cadinano, germacrano e cariofilano (LIMBERGER et al., 2004).

A riqueza de espécies da família Myrtaceae do gênero *Myrcia* DC. na região do Litoral Norte do estado da Bahia, e a pressão antrópica que estas vêm sofrendo nos últimos anos atreladas à escassez de estudos envolvendo a composição química e a atividade biológica dos representantes deste grupo taxonômico motivaram a consecução da presente pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a composição química e a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae pertencentes ao gênero *Myrcia* De Candolle., oriundas de um remanescente de Floresta Ombrófila Densa em estágio secundário de regeneração, no município de Alagoinhas, no estado da Bahia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar quimicamente os óleos essenciais obtidos das espécies *Myrcia alagoensis* O.Berg, *Myrcia rostrata* DC. e *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.
2. Comparar a composição química qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais produzidos em diferentes estágios sazonais.
3. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais frente a alguns microrganismos, pelo método da microdiluição em caldo com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA**

##### **3.1.1 Perspectiva Histórica**

Desde tempos imemoráveis, o homem busca nos recursos naturais meios para melhorar suas próprias condições de vida, ampliando consideravelmente as suas chances de sobrevivência. As civilizações primitivas, de modo perspicaz, notaram a existência, ao lado das plantas utilizadas na alimentação, de outras, dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram o seu potencial curativo, ainda que empiricamente. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso (CUNHA, 2007).

A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Bem antes da existência de caracteres ou sinais gráficos que permitissem a comunicação entre indivíduos e povos, os vegetais já eram utilizados para fins medicinais. Ao buscar as espécies mais apropriadas para a cura de seus males, aos poucos, o ser humano foi selecionando as que serviam como medicamento, as que eram venenosas e as que causavam efeitos alucinógenos.

A simples observação das variações sazonais evidenciadas pelas plantas, certamente, deslumbrou os primeiros observadores da natureza. É provável que eles tenham percebido nestas uma “sabedoria” intrínseca em antecipar as estações do ano, assim como, uma força admirável em ressurgir do lodo ou do solo após as vicissitudes climáticas. Tal admiração, deve ter criado um respeito místico, que pode ter contribuído para o uso terapêutico das ervas com propriedades medicinais nos primórdios da civilização humana (LORENZI, 2002).

As mais antigas obras sobre a relação entre medicina e vegetais surgiram na China, Índia e Egito. Um tratado médico datado de 3700 a.C, escrito pelo imperador chinês Shen Wung, é um dos mais antigos documentos conhecidos sobre as

propriedades curativas das plantas (CUNHA, 2007). No livro de Pen Tsao-Ching (2700 a.C), nos Papiros (1500 a.C), bem como na Bíblia, são encontradas milhares de citações sobre o emprego de ervas medicinais e preparações à base de produtos do Reino Vegetal (CARVALHO, 2004). Deste modo, a utilização de recursos da natureza na arte de curar possui raízes muito antigas, relacionadas aos primórdios da prática médica, nas mais diferentes sociedades.

No famoso papiro decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, existe a seguinte afirmação introdutória: “Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano” (CUNHA, 2007). A partir desta informação, pode-se assegurar que o Papiro de Ebers (Figura 01) representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido, onde uma parte do seu texto, é destinada ao tratamento das doenças e, a restante, dá indicações sobre a constituição dos medicamentos a serem empregados.



**Figura 01:** Fragmento do Papiro de Ebers  
**Fonte:** CUNHA, 2007.

No âmbito da cultura ocidental, pode-se demarcar como decisiva a influência da medicina grega. Um dos primeiros testemunhos da prática dos médicos helênicos pode ser encontrado nos versos da *Ilíada*, o poema mais antigo de Homero (CORRÊA, 2003). Hipócrates (460-361 a.C.) catalogou e empregou centenas de drogas vegetais. Teofrasto (225 a.C.), inicialmente e, Dioscorides (20 d.C.), mais tarde, a partir da “evolução” da medicina empírica, foram autores de um significativo e valioso conjunto de volumes sobre ervas usadas na cura de doenças, o qual influenciou a Farmácia por mais de 1.500 anos. (CARVALHO, 2004).

A propensão desenvolvida pelo médico grego Pedanios Dioscorides, de catalogar várias plantas, após identificá-las e ilustrá-las em xilogravuras, bem como de compilar um acervo de tratamentos disponíveis para diferentes moléstias, foi elaborada a partir de métodos populares de cura, praticados pelos povos da região do Mediterrâneo e do Oriente e, culminou no famoso trabalho *Materia Medica*, publicado no primeiro século após Cristo, no qual as características e propriedades de diversos medicamentos são descritas (CORRÊA, 2003).

De um modo geral, os médicos hipocráticos acreditavam no poder curativo da própria natureza e, por conta disto, muitas vezes evitavam intervenções na história natural das enfermidades. Isto justifica o fato de serem prescritos, quando estritamente necessário: ar puro, banhos de sol, uma dieta adequada, purgativos suaves, sangrias moderadas, ginásticas e massagens. Por outro lado, nos casos mais sérios, alguns produtos de origem vegetal eram empregados, sendo os mais comuns: beladona, salsa, louro, aipo, azeite, linho, cebola silvestre, manjeriço, farinha de trigo, entre outros (CORRÊA, 2003).

Durante a Idade Média, ocorre uma estagnação da terapêutica, e até mesmo um retrocesso na evolução da Arte de Curar. Tal conjuntura pôde, de certo modo, ser compensada pelas escolas árabes, responsáveis pela preservação de parte dos antigos textos sobre a utilização de plantas medicinais. Esta iniciativa permitiu que os conteúdos a respeito da fitoterapia desenvolvida até o momento fossem passados para o ocidente (CARVALHO, 2004). Mais tarde, com o Renascimento, o charlatanismo e o empirismo da medicina e da farmácia medievais, cedem lugar, pouco a pouco, à experimentação. O estudo das plantas entra no período científico ao adotar a classificação e a descrição taxonômica das espécies. (CUNHA, 2007).

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de vegetais. Antes de 1800, a medicina tradicional, que se utilizava das plantas, era considerada como a base inquestionável para todos os livros-texto clássicos da farmacologia. Só com o advento da chamada “ciência médica” é que a fitoterapia foi relegada ao plano de uma modalidade alternativa.

Tendo em vista que a utilização das ervas, no tratamento e cura de enfermidades, atravessa mais de 2.000 anos, dos tempos antigos aos modernos, é razoável assumir que muitas das “receitas” usadas durante aquele período, não apenas têm ações específicas, como também parecem ser livres de efeitos



colaterais perigosos. Caso contrário, elas não teriam sido passadas adiante com tamanha confiança através de tantas épocas e culturas. Entrementes, seria leviano considerar a experiência coletiva de mais de 50 gerações de médicos e pacientes como um “efeito placebo” (BENEDUM, 1998 *apud* SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

As informações supracitadas sinalizam que a relação do homem com as substâncias encontradas na natureza é bastante antiga, podendo-se até dizer que se confunde, na linha do tempo, com a existência da própria humanidade. Tal relação não envolve apenas o uso medicinal, terapêutico e científico das plantas, mas também, mágico, religioso, cultural e festivo. Em muitos casos, a ciência moderna vem comprovando as virtudes mágico-curativas do passado, indicando que os antigos possuíam, de fato, sérios conhecimentos a respeito das propriedades terapêuticas das ervas-remédio que utilizavam (DUNIAU, 2003).

Inúmeros vegetais usados em rituais religiosos com fins medicinais tiveram sua composição química decodificada pela farmacologia, a qual comprovou sua eficácia e os incluiu no arsenal de tratamentos disponíveis para o uso médico. Nesta perspectiva, uma quantidade expressiva de medicamentos foi elaborada a partir de elementos da flora e da fauna. Farmacêuticos e químicos, já no século XIX, empenharam-se no isolamento de constituintes ativos a partir de produtos naturais. Inicia-se neste contexto, uma nova fase na utilização científica das plantas, com a substituição progressiva destas e dos seus extratos, pelos compostos reconhecidos como responsáveis pela sua ação farmacológica (CUNHA, 2007).

Um dos primeiros exemplos desta abordagem foi o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico a partir da salicina obtida da casca do salgueiro, um vegetal pertencente ao gênero *Salix* L. (SALICACEAE) (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Assim como, a utilização dos glicosídeos digitoxina e digoxina, de plantas do gênero *Digitalis* L. (SCROPHULARIACEAE), no tratamento da fibrilação atrial; da reserpina, proveniente da espécie *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz (APOCYNACEAE), como anti-hipertensiva; da pilocarpina, oriunda de *Pilocarpus jaborandi* Holmes (RUTACEAE), no tratamento do glaucoma; dos alcalóides vincristina e vimblastina, oriundos da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (APOCYNACEAE), por sua atividade antineoplásica, na leucemia infantil e na doença de Hodkin's; da efedrina, a partir da *Ephedra sinica* Stapf. (EPHEDRACEAE), como anti-histamínico (DUNIAU, 2003); e da quinina, extraída da casca de espécies de *Cinchona* L. (RUBIACEAE), como

antimalárica (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

Nota-se que do início do século XX até o presente momento, as correlações entre a estrutura química dos constituintes ativos e a sua respectiva ação fisiológica permitiram a descoberta de novas moléculas naturais de elevada atividade farmacológica. O desenvolvimento da química analítica através dos modernos métodos cromatográficos, espectrométricos, e radioimunológicos, atrelado ao advento de equipamentos cada vez mais sofisticados, têm permitido um melhor conhecimento da composição química dos fármacos vegetais e da estrutura dos seus componentes ativos (CUNHA, 2007).

Assim, a busca da saúde e do bem estar impulsionou o homem, através dos tempos, a procurar na natureza o alívio para os seus males. Desta maneira, a fitoterapia tradicional evoluiu para o atual método científico de prospecção de novos fármacos, onde, a partir de plantas com propriedades medicinais, constituintes ativos muito potentes podem ser transformados em produtos medicinais seguros, com uma composição química definida e uniforme, permitindo tanto um incremento das propriedades desejadas como a minimização dos efeitos colaterais adversos (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

A partir do exposto, depreende-se que o emprego das ervas na recuperação da saúde humana tem evoluído, paulatinamente, desde as formas mais simples de tratamento local e popular, até os métodos tecnologicamente avançados da fabricação industrial vigente nos dias em curso. Não obstante, ainda que as disparidades entre as duas maneiras de uso sejam significativas, há um consenso: em ambos os casos, a humanidade percebeu, empiricamente ou não, a presença de algo nos vegetais capaz de provocar reações benéficas no organismo, resultando na recuperação da saúde. Assim, em todas as épocas e em todas as culturas, o homem aprendeu a tirar proveito dos recursos advindos da natureza. (LORENZI, 2002).

### **3.1.2 A Fitoterapia no Brasil: as contribuições indígena, europeia e africana.**

No Brasil, as primeiras referências escritas sobre a utilização de ervas com propriedades terapêuticas são atribuídas aos jesuítas. No entanto, o grande legado histórico sobre o uso das plantas medicinais, se deve preponderantemente, às culturas indígena e africana, que apesar de seus componentes essencialmente empíricos, manifestaram significativas contribuições com a seleção de espécies vegetais reconhecidamente eficazes (BERTOLUCCI; CAPPELLE e PINHEIRO, 2001).

Há milhares de anos, os índios brasileiros já faziam uso das plantas medicinais e aromáticas em seus rituais e no processo de cura de suas enfermidades (VIEIRA, 2002). Isso corrobora o fato de neste país, o conhecimento sobre as propriedades curativas dos vegetais ser uma das maiores riquezas herdadas da cultura indígena. Uma civilização detentora de uma sabedoria tradicional passada oralmente de geração em geração desde épocas remotas até os dias em curso.

Ao longo do tempo, os autóctones desenvolveram um conhecimento profundo sobre a flora medicinal, ao retirar dela, através da constante experimentação, os mais diversos remédios, usados das mais diferentes formas. Assim, o legado indígena atravessou os séculos e chegou até a atualidade por intermédio dos Jesuítas ou dos colonos do interior. Em ambos os casos, o uso dos vegetais empregados pelos nativos foi apartado do seu contexto religioso original e colocado dentro dos princípios terapêuticos em vigor no mundo civilizado. Perdeu-se, assim, o uso original de muitas plantas brasileiras nativas, prevalecendo aquilo que melhor se adaptava aos princípios fisiológicos e farmacológicos da cultura oficial.

Ao analisar-se a contribuição da cultura europeia para o desenvolvimento da fitoterapia brasileira, é notório que, quando os primeiros colonos portugueses se estabeleceram no Brasil, tanto os conhecimentos médicos como as ervas comumente empregadas na Europa da Renascença foram sendo, paulatinamente, introduzidos na cultura local. A medicina do século XVI era um somatório de saberes vindos da Grécia, de Roma e da cultura árabe, às plantas nativas do continente europeu agregavam-se os vegetais vindos do Oriente. Desse modo, o movimento

renascentista, emergindo da sombria Idade Média, abriu espaço para que as pessoas e nações expandissem seus interesses: pelo conhecimento do corpo humano, pela alquimia, pelas descobertas de terras longínquas bem como, das suas riquezas naturais (DUNIAU, 2003).

Os primeiros europeus ao chegarem no Brasil depararam-se com uma numerosa quantidade de plantas medicinais em uso pelas diversas tribos que aqui habitavam. Por intermédio dos pajés, os saberes populares a respeito das ervas locais e dos seus usos puderam ser transmitidos e aprimorados, tais informações foram prontamente absorvidas pelos colonizadores que passaram a residir no país. A necessidade de viver do que a natureza tinha a oferecer localmente, assim como o contato com índios, frequentemente, usados como “guias” terminaram por ampliar a conexão dos estrangeiros com a flora medicinal brasileira (LORENZI, 2002).

Assim, os novos conhecimentos sobre as plantas locais acabaram sendo atrelados àqueles trazidos da Europa, usualmente, de uso popular bastante difundido. Além disso, diversos vegetais empregados no Velho Mundo, por suas propriedades medicinais, induziram os europeus a testar usos similares para as espécies nativas, proximamente relacionadas. Muitas vezes, o mesmo princípio podia ser encontrado nos vegetais endêmicos, de modo ocasional em maior quantidade ou qualidade.

Os escravos africanos também deram sua contribuição com o uso de plantas trazidas do seu continente, muitas delas originalmente utilizadas em rituais religiosos, mas também, por suas propriedades farmacológicas descobertas por intermédio da experimentação e perpassadas oralmente ao longo das gerações. Neste sentido, pode-se inferir que com as contribuições indígena, européia e africana, os principais alicerces de toda a tradição no uso de plantas medicinais no Brasil puderam ser fundados e estabelecidos (LORENZI, 2002).

Segundo Duniau (2003), esse mosaico cultural, que permeia o uso das plantas com propriedades medicinais no Brasil, faz com que aos olhos de um observador estrangeiro, a medicina atualmente praticada no país pareça uma colcha de retalhos, em que o todo é orçado pela junção de várias partes bem diferentes. Destarte, do conhecimento milenar dos índios ao descobrimento do Brasil e da introdução dos escravos africanos à chegada dos imigrantes no século XIX, inúmeras espécies de plantas de outras regiões foram introduzidas e incorporadas à cultura brasileira, tornando a fitoterapia nos dias atuais uma realidade para 80% da

população deste país (VIEIRA, 2002).

Portanto, faz-se mister a presença de olhares da Ciência voltados tanto para a análise quanto para a conservação e reprodução do objeto deste saber popular, resultante da relação direta de tantas raças, épocas e culturas, as quais promoveram o arsenal botânico, que representa o maior recurso terapêutico natural da relação homem-natureza (ANDRADE, 1989 *apud* MIGUEL; MIGUEL, 2004).

### **3.1.3 A Fitoterapia e a Pesquisa Fitoquímica na contemporaneidade**

A utilização de vegetais na promoção da saúde humana constitui-se numa constante busca tanto do alívio como da cura de diversos males. Tendo em vista a tradição milenar do uso terapêutico das plantas e a quantidade de espécies que podem constituir valiosos recursos no combate e no tratamento de doenças, torna-se imprescindível o estudo sistemático da flora com propriedades medicinais (CASTRO; GAVILANES, 2000). Mesmo porque, os vegetais são uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais utilizadas em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA; NODARI, 2004).

No Brasil e em todo o mundo, a fitoterapia foi a peça indispensável do arsenal terapêutico até meados do século XIX. Desde então, ela foi cedendo lugar a produtos biológicos de origem animal e a preparados feitos com moléculas puras de elementos ativos, isolados de plantas medicinais dotadas de ação farmacológica mais específica (CARVALHO, 2004).

Com o início da industrialização brasileira e sua subsequente urbanização, o conhecimento tradicional passou a ser posto em segundo plano. O acesso a medicamentos sintéticos e o pouco cuidado com a comprovação das propriedades farmacológicas dos vegetais tornaram o conhecimento da flora medicinal sinônimo de atraso tecnológico e muitas vezes de charlatanismo. Isso contribuiu para manter a fitoterapia em um período de obscurantismo, aproximando-a mais do misticismo do que da ciência. Essa propensão seguiu o que já acontecera em outros países em processo de urbanização (LORENZI, 2002).

*A posteriori*, com o desenvolvimento da ciência, e especialmente, a partir dos avanços da química orgânica e da síntese de compostos, começaram a surgir as drogas sintéticas, que praticamente dominaram o comércio de medicamentos no mundo. O advento de sucessivas descobertas na área farmacêutica, ocasionou uma crescente expectativa em sanar a maior parte das doenças que afligiam a humanidade. Todavia, isto não se confirmou, devido aos efeitos colaterais e contra-indicações causados pelos medicamentos sintéticos, além dos altos custos envolvidos na produção dos mesmos. Outro agravante, foi o surgimento de microrganismos resistentes às terapias convencionais, em especial, após o uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos pela população (FRANCO et al., 2005).

O presente cenário influenciou o retorno ao uso de plantas como alternativa aos métodos de tratamento e cura preconizados pela clínica médica e o uso de vegetais sob a forma de extratos e fitoterápicos, ganhou importância na terapêutica atual. Tal fato pode ser corroborado tanto devido à recomendação da Organização Mundial de Saúde para o uso terapêutico de plantas (PINTO et al., 2001), quanto devido às aprovações em 2005, pelo Conselho Nacional de Saúde, da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, e em 2006, da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Tais medidas têm como principal objetivo a ampliação das opções terapêuticas aos usuários do SUS. Com garantia de acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção e promoção à saúde (RODRIGUES; SANTOS, 2007).

Então, conforme supracitado, foi a partir do aparecimento de novas doenças e do ressurgimento de outras, que sobreveio a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, mais potentes e com efeitos adversos minimizados. Por isso, a cada ano têm surgido grupos de pesquisadores na área da Fitoquímica, empenhados no isolamento, na caracterização ou mesmo na síntese de produtos naturais que apresentem algum tipo de ação farmacológica (ABELSON, 1990 *apud* LUCCHESI et al., 2006).

Neste sentido, a Fitoquímica, reconhecida como química de vegetais ou química de produtos naturais, é a área do conhecimento que trata do isolamento e identificação, determinação e modificação estrutural de substâncias orgânicas presentes em plantas. Assim, ela se preocupa em estudar formas adequadas de

obtenção de derivados dos compostos previamente isolados e identificados, com o intuito de obter substâncias puras, com maior atividade farmacológica e menor toxicidade, contribuindo na produção de novos fármacos naturais que junto aos sintéticos, podem oferecer uma terapêutica mais segura, eficaz e preventiva (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

É notório que fármacos derivados de plantas apresentam uma importância global nas economias dos diferentes países industrializados. Atualmente, na medicina são utilizadas aproximadamente 120 substâncias químicas puras extraídas de plantas superiores. Por outro lado, dos 25 medicamentos mais comercializados nos Estados Unidos, doze deles são derivados de produtos naturais. Isto demonstra a importância econômica dos produtos naturais derivados de plantas no desenvolvimento de novos fármacos (LUCCHESI et al., 2006).

É relevante levar em consideração que o Brasil inclui-se entre os países de maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes biomas: a Amazônia com 25 a 30 mil espécies (IUCN, 1986 *apud* VIEIRA et al., 2002), a Mata Atlântica com 16 mil, o Cerrado com 7 mil (MENDONÇA et al., 1997 *apud* VIEIRA et al., 2002) e as demais espécies distribuídas na Caatinga e na Floresta Subtropical (SKORUPA; VIEIRA, 2002 *apud* VIEIRA et al., 2002), e que paralelamente à sua diversidade de recursos genéticos, existe uma diversidade de etnias, com forte influência nos hábitos alimentares e culturais, em especial, no que diz respeito ao uso de plantas medicinais e aromáticas.

Assim, torna-se evidente que a ampla sociobiodiversidade brasileira figura como condição altamente favorável para o desenvolvimento das diversas formas de aproveitamento das plantas medicinais, desde aquelas vinculadas ao conhecimento tradicional até as empresariais com grande envolvimento tecnológico para validá-las cientificamente (MATTOS et al., 2007).

As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares ao estudo das plantas medicinais brasileiras, que acabaram despertando novamente um interesse geral na fitoterapia. Novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em Universidades brasileiras, algumas delas buscando bases mais sólidas para a validação científica do uso de vegetais com propriedades medicinais.

A busca por novos fitoterápicos também acabou retroalimentando a pesquisa

Botânica brasileira, que vislumbrou na prospecção de potenciais produtos naturais de uso farmacológico uma ótima justificativa para intensificar seus trabalhos. Como já ocorrera nos primórdios das duas ciências, a Fitoterapia e a Botânica voltaram a ser vistas como aliadas a cooperar para a melhoria da qualidade de vida do povo brasileiro (LORENZZI, 2002).

Nota-se que o Brasil tem uma tradição de muitos anos dedicados ao estudo da química de produtos naturais. Entretanto, dado ao tamanho e à riqueza da sua biodiversidade, esta pesquisa é ilimitada. Mesmo porque, os avanços significativos nesse ramo da ciência, bem como o grande volume de trabalhos publicados na literatura ainda não foram suficientes para abranger tamanho manancial biológico. Além disso, estudos envolvendo a composição química atrelada à atividade biológica de compostos isolados de plantas ainda são pouco explorados, acarretando num desconhecimento do potencial destes compostos bioativos para a elaboração de novos fármacos (LUCCHESI et al., 2006).

Outrossim, o potencial de recursos genéticos vegetais, no Brasil, encontra-se ameaçado pela destruição acelerada da vegetação natural, por meio da expansão agrícola, das queimadas, da exploração madeireira, da construção de estradas e hidrelétricas, do turismo, além do extrativismo predatório a que são submetidas algumas espécies. Neste sentido, é premente e necessária a realização de estudos científicos envolvendo as espécies medicinais e aromáticas nativas das matas brasileiras (VIEIRA et al., 2002).

Doravante, considerando a amplitude da biodiversidade do Brasil, com apenas 15 a 17% das plantas estudadas até o momento quanto ao seu potencial medicinal, se faz mister tanto o incentivo ao estudo sistemático das propriedades químicas da flora brasileira, quanto a formação e a capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento da pesquisa fitoquímica (BRASIL, 2006), a fim de instituí-la de forma integrada, multiprofissional e aliada à farmacologia clínica, com a possibilidade de apontar caminhos elucidativos, eficazes, seguros e economicamente viáveis e, desse modo, promover o desenvolvimento tecnológico da terapêutica natural neste país (MIGUEL; MIGUEL, 2004).



### 3.2 METABOLISMO VEGETAL

As plantas, apesar de auferirem a vantagem do autotrofismo, são imóveis e desprovidas de garras, não podendo, por isso, defender-se do ataque dos seus inimigos. É, pois, compreensível que com a escassez de outras alternativas, utilizem, com maior intensidade do que os animais, a estratégia dos produtos químicos naturais para sua proteção (CARVALHO, 2004).

Os constituintes químicos encontrados no Reino Vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas. A produção de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, faz parte do seu metabolismo primário. Por outro lado, os compostos elaborados por outras vias e, que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, fazem parte do metabolismo secundário (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Assim, os produtos resultantes do metabolismo vegetal estão divididos em dois grandes grupos: o dos metabólitos primários ou macromoléculas, provenientes dos processos fotossintéticos e com funções vitais bem definidas; e o dos metabólitos secundários ou micromoléculas, originados à custa de energia, através de rotas biossintéticas diversas e, freqüentemente desconhecidas. Estes últimos, além de apresentarem estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas são, diferentemente daqueles do metabolismo primário, encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (VON POSER, 2004).

No passado, alguns autores conjecturavam que os metabólitos secundários nada mais eram do que subprodutos do metabolismo primário. Entretanto, o fato de o vegetal utilizar rotas biossintéticas elaboradas, com elevados gastos energéticos, conduziu à hipótese, mais aceita atualmente, de que as plantas consomem tamanha energia com a finalidade de sintetizar compostos necessários para a sua sobrevivência, preservação e reprodução.

Tal suposição pode ser corroborada inclusive pelas interações existentes entre plantas e herbívoros. Esta ação recíproca se estabeleceu paulatinamente, no decurso da evolução, dentro do grupo das Fanerógamas, ou seja, as relações

existentes entre as plantas com flores e seus visitantes (polinização), e entre os frutos e seus dispersores (dispersão). Tais interações têm levado, no decorrer do tempo, ao desenvolvimento, pelos vegetais, de uma grande variedade de defesas químicas e de mecanismos de atração na forma de metabólitos secundários. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Na natureza, alguns produtos do metabolismo secundário parecem ter um papel importante, restringindo a palatabilidade dos vegetais onde eles ocorrem, ou fazendo com que os animais evitem a planta completamente. Tais compostos podem atuar tanto na defesa quanto na preservação de órgãos importantes, agindo como dissuasórios alimentares. Constituintes como os taninos, presentes em frutos verdes, possuem ação adstringente e permitem a preservação do fruto até o pleno desenvolvimento da semente, quando então desaparecem. Substâncias de outras classes tais como alcalóides, saponinas, cumarinas, limonóides, quassinóides, lactonas sesquiterpênicas e iridóides, devido ao sabor amargo e desagradável que freqüentemente apresentam, também podem atuar como desestimulantes de herbívoros (VON POSER, 2004).

Da mesma maneira que uma planta produz constituintes para a sua defesa, ela o faz para favorecer a polinização e/ou a dispersão de suas sementes. Dentre os metabólitos que atuam atraindo insetos, pássaros, morcegos e até mesmo ratos, incluem-se os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) e os óleos voláteis (mono e sesquiterpenos, além dos fenilpropanóides) (HARBONE e WILLIAMS, 1995 *apud* VON POSER; MENTZ, 2004).

Quando determinada família botânica é caracterizada por uma classe específica de metabólitos secundários, suas espécies são usadas como alimento somente por insetos pertencentes a grupos bem limitados. As mesmas substâncias que funcionam como barreiras para a maioria das famílias de insetos herbívoros podem atuar como estimulantes alimentares para fitófagos de dieta restrita. Estas relações bioquímicas parecem ter desempenhado um papel-chave para o sucesso das Angiospermas, as quais apresentam um conjunto de produtos do metabolismo secundário muito mais diversificado do que o dos demais organismos do Reino Vegetal (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Para Carvalho (2004), a maioria, se não todas as espécies botânicas, parece ter um sistema imunológico rudimentar capaz de defendê-la quimicamente contra o ataque de patógenos e de herbívoros que possam utilizá-la como pasto. Estes

produtos apresentam atividade biológica sobre os outros seres vivos e estão armazenados em vacúolos a fim de evitar a auto-toxicidade do vegetal, sendo as principais formas de liberação no ambiente: a volatilização, a exsudação (pelas raízes) e a lixiviação.

Alguns autores acreditam que a sobrevivência de uma determinada espécie não está assegurada unicamente pelo fato dela garantir sua reprodução e se defender de predadores, da radiação solar e das demais intempéries climáticas. Podem ocorrer também interações planta-planta, ou seja, uma alelopatia, na qual um vegetal compete com outro, provavelmente, para assegurar o fornecimento de água, luz e nutrientes. Esses efeitos alelopáticos podem acontecer até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, principalmente quando a indisponibilidade de elementos nutritivos limita o crescimento. Nesse caso, o fenômeno é denominado autotoxicidade ou autopatia. Durante tal processo, vários metabólitos secundários estão envolvidos, especialmente mono e sesquiterpenos (VON POSER et al., 1996 *apud* VON POSER; MENTZ, 2004).

Diante das informações supracitadas, depreende-se que os metabólitos secundários, considerados em certa ocasião como produtos de dejetos, são importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem, bem como, são uma fonte incomensurável de substâncias de extrema importância para a indústria farmacêutica.

### **3.2.1 Metabólitos Secundários em Plantas**

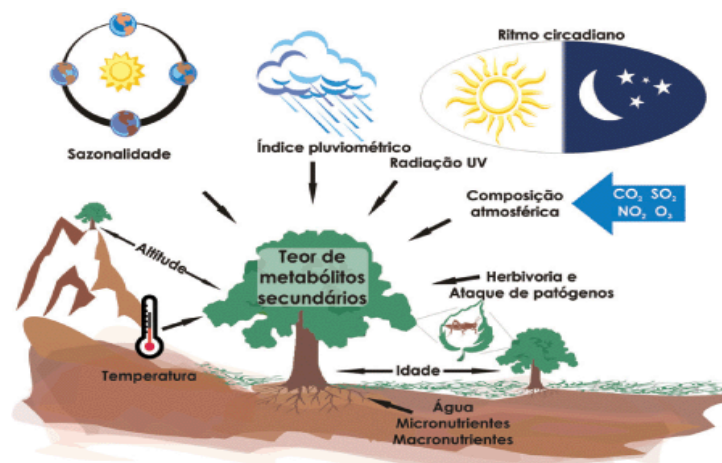
Em contraste com as vias que dão origem aos produtos do metabolismo primário, as quais sintetizam, degradam e convertem compostos comumente encontrados em todos os seres vivos, existem vias metabólicas direcionadas para a produção de constituintes que têm uma distribuição mais limitada na natureza. Tais compostos, chamados de metabólitos secundários, são encontrados apenas em organismos específicos e são uma expressão da individualidade das espécies (DEWICK, 2002).

É sabido que os metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao meio ambiente. Assim, as rotas metabólicas que os origina, provavelmente, só são ativadas durante alguns

estágios particulares de crescimento e desenvolvimento, ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ainda, pelo ataque de herbívoros ou microrganismos patogênicos. Isto explica o fato de os metabólitos secundários não estarem uniformemente distribuídos pela planta (MANN, 1987 *apud* SANTOS, 2004). Além disso, a composição química e a concentração destes compostos podem variar a depender dos fatores ambientais e ecológicos, das condições edafoclimáticas, da sazonalidade e até mesmo por interferência do ritmo circadiano (Figura 02) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A origem de todos os constituintes secundários presentes em plantas pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, por intermédio de dois precursores principais, o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2004). De acordo com Mann (1987) *apud* Di Stasi (1996), há três pontos de origem e produção de metabólitos secundários (Figura 03), diferenciados mediante seus precursores:

- ácido chiquímico, como precursor de inúmeros compostos aromáticos;
- aminoácidos, fonte de alcalóides e peptídeos;
- acetato, que através de duas rotas biossintéticas origina: poliacetilenos, terpenos, esteróides e outros.

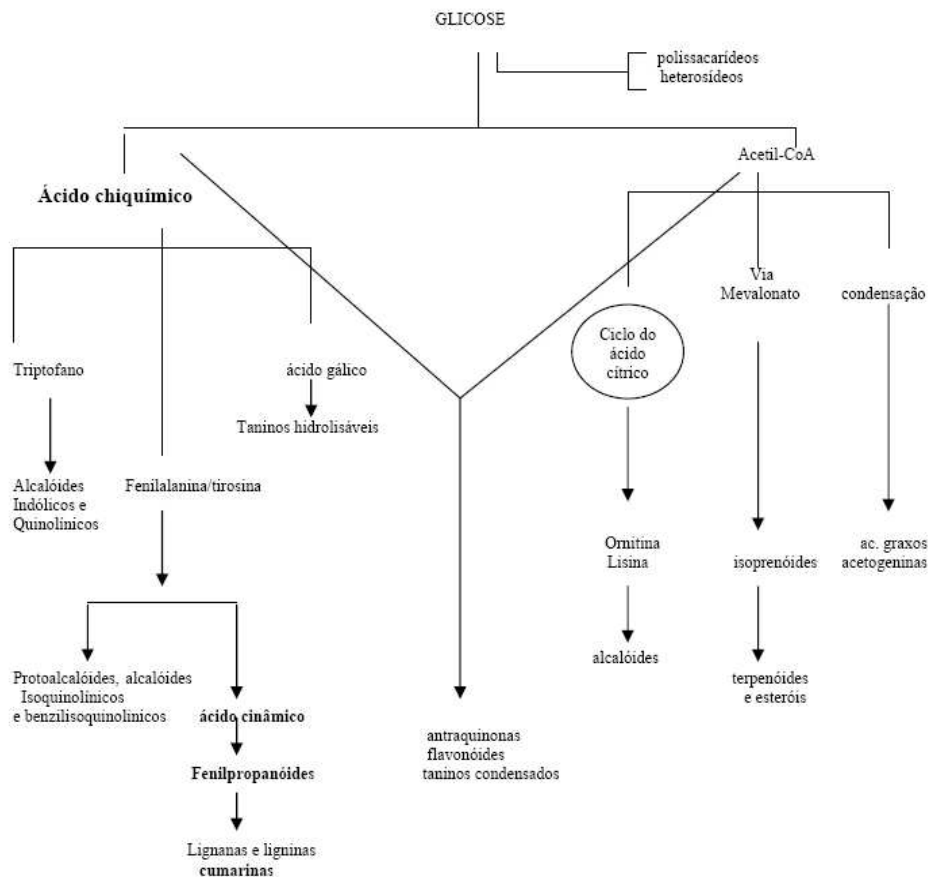


**Figura 02:** Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas

**Fonte:** GOBBO-NETO, 2007.

Para Dewick (2002), os mais importantes blocos construtores empregados na biossíntese de compostos secundários são derivados dos intermediários: acetil

coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxixilulose 5-fosfato. Os quais são utilizados respectivamente nas vias do: acetato, chiquimato, mevalonato e deoxixilulose fosfato.



**Figura 03:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários  
**Fonte:** SIMÕES, 2004.

Nota-se que o metabolismo secundário vegetal é constituído por uma imbricada rede de reações, sendo coordenado por uma série de enzimas e coenzimas responsáveis pelos processos de síntese e degradação das substâncias que estarão, diferentemente, distribuídas nas diversas espécies de plantas (DI STASI, 1996).

O número de substâncias existentes na natureza é extremamente grande e praticamente desconhecido. Não se sabe, com exatidão, como elas são formadas na célula. Conhece-se, atualmente, cerca de 10.000 produtos secundários e supõe-se que este número ultrapasse 100.000. Segundo Carvalho (2004) os três principais grupos de compostos secundários são os terpenos, os fenóis e os alcalóides. Já Di

Stasi (1996), aponta os alcalóides e os terpenos como as classes químicas com maiores potencialidades de fornecer constituintes com atividade farmacológica, seguidos das lignanas, flavonóides e cumarinas.

É notório que a composição química das espécies vegetais, especialmente daquelas encontradas nas florestas tropicais, está longe de ser descrita em sua totalidade, principalmente, quando se leva em conta o enorme arsenal de constituintes naturais que sequer foram estudados. Por outro lado, uma grande quantidade de compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas, já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foram analisados quanto às suas atividades biológicas. Tal ausência de estudos refere-se tanto às funções que estas substâncias desempenham na própria espécie vegetal, quanto às potencialidades de uso para outras finalidades, especialmente, no que concerne às utilizações industrial e farmacêutica (DI STASI, 1996).

Cerca de um quarto das receitas médicas prescritas nos Estados Unidos contém pelo menos um produto que foi obtido de uma planta. Uma das razões pelas quais os vegetais continuarão a ser importantes como fonte de fármacos, apesar da facilidade com que muitas substâncias podem ser sintetizadas em laboratório, é que eles produzem os fármacos de modo não-dispendioso, sem o fornecimento adicional de energia. Além disso, a estrutura de algumas moléculas – tais como os esteróides, incluindo a cortisona e os hormônios usados nas pílulas anticoncepcionais – é tão complexa que, embora as moléculas possam ser sintetizadas quimicamente, os métodos de produção tornam-nas proibitivamente caras (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Em vista disso, no que concerne à busca de novos fármacos é indispensável levar-se em consideração tanto os elevados custos envolvidos na produção de medicamentos sintéticos; como a imensa variedade de substâncias que as plantas produzem, uma vez que o Reino Vegetal é detentor de uma importante fonte de novos produtos, potencialmente úteis do ponto de vista farmacológico, muito mais barata e praticamente inesgotável.

É importante destacar que o conhecimento que o homem tem das plantas, especialmente daquelas oriundas de florestas tropicais, é extremamente rudimentar. Para Raven et al. (2001), a humanidade está diante da perspectiva de perder muitas delas antes mesmo de inteirar-se de sua existência e, obviamente, sem a mínima possibilidade de examiná-las para verificar se as mesmas teriam alguma utilidade.

### 3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.3.1 Características gerais

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, podem ser definidos, quimicamente, como uma mistura complexa de substâncias com tensões de vapor elevadas, ou seja, voláteis; lipofílicas; geralmente odoríferas e líquidas; constituídas basicamente de fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos. Apresentam solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, as quais são denominadas hidrolatos. Por outro lado, são solúveis em solventes orgânicos como o éter, o álcool, o clorofórmio e o benzeno. São instáveis na presença da luz, umidade, calor e metais, além de serem aptos a sofrer polimerizações, ciclizações, dimerizações e oxidações (CARDOSO; SHAN; SOUZA, 2001).

Justamente por isso, devem ser guardados dessecados (secos com sulfato de sódio anidro –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e livres de impurezas insolúveis. A redução das degradações pode ser conseguida pelo emprego de frascos de pequenos volumes, feitos de materiais como o alumínio, aço inoxidável ou vidro âmbar, completamente cheios e hermeticamente fechados, os quais devem ser armazenados a baixa temperatura (SIMÕES; SPITZER, 2004).

As essências são definíveis por um conjunto de propriedades dentre as quais se destacam o cheiro e o sabor já revelados nas plantas donde provêm e, apenas exaltados pela elevada concentração. Apresentam-se, então, geralmente, sob a forma de líquidos oleosos, de aroma agradável e intenso, todavia existem alguns mal-cheirosos (como o de quenopódio e mostarda) ou até inodoros (isolados de cogumelos); lançados sobre papel produzem manchas translúcidas de aspecto gorduroso, mas que desaparecem rapidamente por exposição ao ar (COSTA, 2002a).

São segregadas em aparelhos glandulares particulares de cada grupo taxonômico vegetal: células secretoras epidérmicas e subepidérmicas, ou localizadas nos tecidos parenquimatosos, bolsas e canais de origem esquizogênica ou esquizolisigênica e glândulas externas, também conhecidas como pêlos

secretores. São encontradas quase que exclusivamente, no grande grupo das Espermatófitas (plantas vasculares com sementes). Os gêneros capazes de elaborar estes princípios voláteis se agrupam em um número bastante restrito de famílias das Angiospermas, pertencentes às ordens: Magnoliales, Laurales, Rutales, Lamiales, Myrtales, Asterales entre outras (COSTA, 1975).

Os óleos voláteis podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais: nas flores, folhas, menos freqüentemente nas raízes (vetiver), rizomas (gengibre), lenho (sândalo), cascas (canela), frutos (anis) e sementes (noz moscada). Ainda que todos os órgãos de um vegetal possam conter óleos essenciais, a composição química destes pode variar de acordo com a sua localização. Assim, uma essência obtida das folhas pode ser diferente daquela obtida das flores, ainda que seja proveniente de uma mesma planta. Quantitativamente, os redimentos dos óleos essenciais são muito baixos, percentagens elevadas, como nos botões florais de cravo (15%) são exceções (BRUNETON, 1991). Para Schulz et al. (2002), a proporção de planta para o produto concentrado (proporção planta-extrato) geralmente está na faixa de 50:1 a 100:1 (peso/volume), correspondente a um conteúdo de óleo de 1 a 2% em plantas que os contêm.

### 3.3.2 Obtenção

O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos. No método conhecido como *enfleurage* ou enfloração, pétalas de flores são depositadas sobre uma camada de gordura, até a saturação total desta. Em seguida, a gordura é tratada com álcool, que ao ser destilado a baixa temperatura permite a obtenção dos voláteis. Esta metodologia foi muito utilizada no passado, mas restringe-se, atualmente, a algumas indústrias de perfumes. Outros métodos são a extração com solventes orgânicos; a expressão ou prensagem, utilizada na obtenção de óleos voláteis de frutos cítricos; e, a extração por dióxido de carbono supercrítico, o qual é o método de escolha para a obtenção industrial de óleos voláteis, uma vez que nenhum traço de solvente permanece no produto final, tornando-o extremamente puro (SIMÕES; SPITZER, 2004).

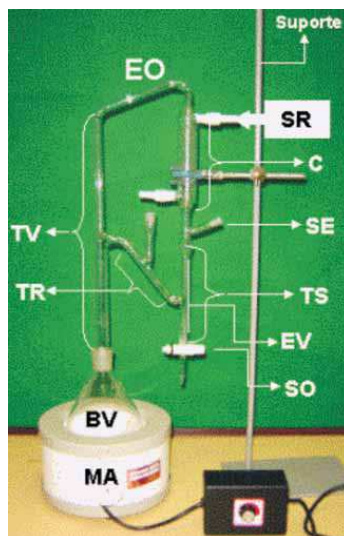


Entretanto, o método mais frequentemente utilizado para a obtenção de óleos essenciais é a destilação por arraste a vapor de água. Para Faria (2003), a destilação, num sentido mais amplo, é um método de separação de líquidos misturados com sólidos ou com outros líquidos, baseado na diferença dos pontos de ebulição dos diversos componentes da mistura. O processo consiste no aquecimento de um líquido até seu ponto de ebulição, fazendo-o passar para o estado gasoso e, em seguida, favorecendo o retorno deste à forma líquida (condensação) por meio da refrigeração do vapor. Assim, o líquido obtido da condensação do vapor é chamado de destilado.

Mais especificamente, no processo de destilação por arraste a vapor, a água e um ou mais líquidos imiscíveis nesta são destilados conjuntamente. Tal metodologia se caracteriza pela sua extrema simplicidade: o material a ser extraído, geralmente moído ou triturado, é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. O vapor arrasta os produtos voláteis existentes no material vegetal e a mistura de vapores é conduzida a um condensador. O óleo essencial, que é uma mistura de substâncias orgânicas imiscíveis em água, desta se separa formando um sistema de duas fases. Dependendo do tipo de planta aromática, as condições de extração podem variar quanto à duração do processo e quanto à pressão ou temperatura do vapor de água utilizado (CRAVEIRO et al., 1981).

Muitas substâncias orgânicas se decompõem quando em temperaturas próximas à do seu ponto de ebulição, portanto a co-destilação com a água previne tal decomposição, uma vez que o composto a ser destilado entra em ebulição a uma temperatura inferior à do ponto de ebulição da mesma. Dessa maneira, a temperatura de destilação por arraste a vapor de água de uma substância razoavelmente volátil será sempre inferior a 100°C, ponto de ebulição da água à pressão normal (FARIA, 2003).

Neste sentido, como os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada do que a da água são, por isso, arrastados pelo vapor da mesma. Em pequena escala, no processo de hidrodestilação, emprega-se o aparelho de Clevenger (Figura 04) com algumas modificações, o qual funciona de acordo com o sistema de destilação por arraste a vapor em consonância com o preconizado pela quarta edição da Farmacopéia Brasileira (SIMÕES; SPITZER, 2004).



**Figura 04:** Esquema do aparelho de Clevenger  
**Fonte:** Santos, 2004.

TV – Tubo de transferência de vapor  
 EO – Extrator de óleo essencial  
 C – Condensador  
 SE – Suspiro de equilíbrio da pressão  
 TS – Tubo separador  
 EV – Escala volumétrica  
 SO – Saída de óleo  
 TR – Tubo de retorno

### 3.3.3 Métodos para análise e identificação dos constituintes químicos

A separação e a purificação dos constituintes químicos de plantas são efetuadas mediante a utilização de uma ou mais técnicas cromatográficas. Cromatografia é o nome geral dado à metodologia, na qual dois ou mais compostos em mistura são separados fisicamente pelas suas distribuições entre duas fases: uma estacionária, que pode ser um sólido ou um líquido; e uma fase móvel, um gás ou um líquido, que flui continuamente pela fase estacionária. A separação dos componentes depende primariamente das diferentes afinidades com a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos componentes individuais (FERRI, 1996).

De acordo com Simões e Spitzer (2004), os métodos cromatográficos de análise de óleos essenciais incluem:

- a cromatografia em camada delgada (CCD), uma técnica bastante utilizada, uma vez que permite obter várias informações sobre um óleo em curto espaço de tempo, com uma quantidade pequena de amostra (menos que 1 $\mu$ L) e com poucos custos, sendo o perfil cromatográfico característico para cada óleo;
- a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual é empregada na avaliação qualitativa e quantitativa de óleos voláteis desde a década de 70;
- a análise por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C) que é muito utilizada na elucidação estrutural de compostos orgânicos, e é um método extremamente útil quando aplicado em conjunto com dados de retenção da análise paralela por cromatografia gasosa.

Entretanto, a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, mesmo sendo menos recente do que a CLAE, é o método de escolha para separar, identificar e quantificar os diferentes componentes encontrados em óleos essenciais. Como estes compostos são, suficientemente, voláteis, a amostra é apenas solubilizada em solventes antes de ser injetada no cromatógrafo.

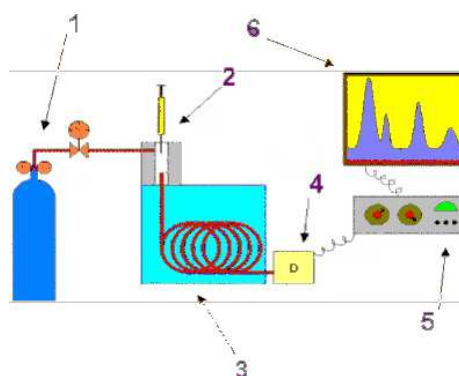
Neste sentido, as técnicas cromatográficas têm aplicações qualitativas e quantitativas, cujos resultados são obtidos analisando-se o cromatograma após o desenvolvimento do método, seja diretamente na superfície planar, seja pelos sinais obtidos por um registrador gráfico após a passagem do eluato por um detector (CHRISTIAN; O'REILLY, 1986 *apud* FERRI, 1996). No caso de sinais registrados por um detector, uma pré-identificação é quase sempre conseguida através de um processo automático, o qual usa um computador e um banco de dados que contém informações existentes na literatura para um grande número de substâncias já conhecidas (CRAVEIRO, 1987).

Diante do exposto, é relevante levar em consideração que não existe uma técnica universal capaz de solucionar todos os problemas envolvidos durante a separação dos componentes de uma mistura, e, normalmente, os melhores resultados decorrem da utilização combinada de uma ou mais técnicas cromatográficas (FERRI, 1996).

### 3.3.3.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia, em seu sentido mais amplo, pode ser definida como um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária e de grande área, e a outra, um fluido que percola através da primeira (CIOLA, 1973). Assim, a cromatografia gasosa favorece a separação dos componentes de uma mistura através do emprego de uma fase móvel, constituída por um gás quimicamente inerte em relação à fase estacionária e em relação aos constituintes da amostra analisada. É uma técnica bastante utilizada na separação de compostos volatilizáveis, ou seja, os analitos a serem separados devem apresentar uma razoável pressão de vapor à temperatura de separação (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A cromatografia gasosa (Figura 05) consiste num processo de eluição, o qual envolve a passagem de um gás de arraste, de forma contínua, através de uma coluna cromatográfica. A amostra gasosa ou líquida volatilizada é introduzida rapidamente na corrente do gás carreador que a leva sobre o adsorvente contido na coluna. Para que as substâncias sólidas ou líquidas possam ser submetidas ao processo de partilha, é indispensável a sua passagem ao estado gasoso – o que se consegue, em geral, por aquecimento, mas de tal modo que estas não se alterem, nem, sequer, isomerizem (COSTA, 2002b).



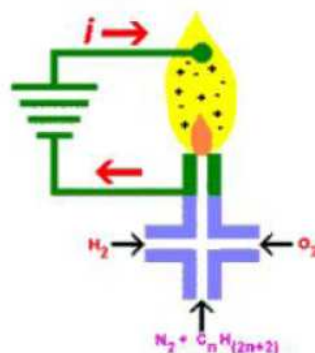
1. Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão.
2. Injetor (Vaporizador) de Amostra.
3. Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna.
4. Detector.
5. Eletrônica de Tratamento (Amplificação) de Sinal.
6. Registro de Sinal (Registrador ou Computador).

**Figura 05:** Esquema básico de um cromatógrafo a gás  
**Fonte:** AUGUSTO, 2000.

Cada constituinte da amostra distribui-se de um modo característico, de acordo com suas propriedades físicas, entre a fase gasosa e a fase fixa estável (filme) acondicionada num tubo apropriado (coluna), movendo-se a porção que está na fase de vapor com a corrente do gás. Em casos favoráveis, os componentes da amostra são separados e saem da coluna no fluido efluente em tempos diversos, característicos da coluna e das condições experimentais.

Os diferentes constituintes da mistura em análise, mediante o aquecimento da coluna, são isolados a velocidades diversas, logo, em tempos distintos (tempos de retenção). Por definição, chama-se tempo de retenção de uma substância, ao tempo decorrido desde o instante em que a amostra é introduzida no injetor ao instante de máximo pico. A área sob o pico, dependendo do sistema de detecção usado na saída da coluna, é proporcional à massa ou à concentração do material. Nos casos ideais, cada substância produz um pico separado, porém, na prática, podem ocorrer superposições parciais, ou mesmo totais, dos picos (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

Na extremidade final da coluna coloca-se o aparelho detector, capaz de acusar a saída de cada um dos constituintes eluídos – porém, ainda inadequado por si só à identificação direta (COSTA, 2002). Assim, um detector funciona como um transdutor, isto é, transforma as moléculas que chegam à câmara de detecção em sinal elétrico, o qual é enviado a um registrador ou sistema de dados (CIOLA, 1973).



**Figura 06:** Esquema básico da cela de um detector por ionização em chama (DIC)  
**Fonte:** AUGUSTO, 2000.

Para Aquino Neto e Nunes (2003), o detector por ionização em chama (DIC) apresenta grande aplicabilidade, sendo um instrumento quase universal na cromatografia gasosa de compostos orgânicos (Figura 06). Tal universalidade,

acoplada à sua elevada sensibilidade, alta estabilidade e resposta rápida, faz com que o DIC seja o detector de maior uso corrente. A detecção por ele produzida é alicerçada no princípio de que:

o gás efluente da coluna, misturado com o hidrogênio e queimado numa atmosfera de ar ou oxigênio, produzem uma chama (2.100 °C) que tem energia suficiente para ionizar as moléculas do soluto que tenham potenciais de ionização baixos, formando um plasma. As espécies iônicas então produzidas são coletadas por eletrodos e a corrente (iônica) elétrica resultante é amplificada e enviada para o sistema de registro (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

De acordo com Ciola (1973), os detectores de ionização em chama baseiam-se na propriedade de ser a condutibilidade elétrica de um gás diretamente proporcional à concentração das partículas com carga, dentro do gás. Quando os componentes do analito passam entre os eletrodos, suas moléculas são ionizadas, acarretando a passagem de corrente, que produz um sinal elétrico, detectado pelo eletrômetro e concomitantemente registrado sob a forma de um cromatograma. Para este autor, a espécie responsável pelo sinal foi sugerida como sendo o  $\text{CH}^+$ , levando à suposição de que a presença da ligação carbono-hidrogênio seria necessária para que a molécula fosse adequadamente detectada.

Após serem detectados, a identificação dos compostos individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões. Segundo Simões e Spitzer (2004), o índice de Kovats (IK), o qual relaciona o tempo de retenção do analito ao tempo de retenção de uma série homóloga de n-alcenos ( $\text{C}_8$  a  $\text{C}_{24}$ ) (Equação 01), foi introduzido a fim de que a determinação da identidade de um composto pudesse ser mais independente das variações do tempo de retenção, tão comuns, tendo em vista que os cromatógrafos podem operar sob condições distintas. Neste ínterim, o advento da utilização do índice permitiu uma melhor comparação dos dados obtidos por diferentes laboratórios.

Para aumentar a segurança na identificação dos picos individuais de um cromatograma e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável realizar a análise química de um óleo essencial também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Isto porque esse método permite a separação dos constituintes da amostra, e ainda, fornece um espectro de massas

para cada pico, o qual geralmente indica a massa molecular do composto, bem como, o seu padrão de fragmentação (SIMÕES; SPITZER, 2004).

$$IK_A = 100N + \left[ 100 \left[ \frac{\log RT_{(A)} - \log RT_N}{\log RT_{(N+1)} - \log RT_N} \right] \right]$$

Onde:

$IK_A$  : Índice de retenção do pico a ser calculado "A" (amostra)

N: Número de átomos de carbono do padrão com eluição anterior a "A"

$RT_{(A)}$  : Tempo de retenção do pico a ser calculado "A" (amostra)

$RT_N$  : Tempo de retenção do pico do alcano com eluição anterior ao pico "A"

$RT_{(N+1)}$  : Tempo de retenção do pico do alcano com eluição posterior ao pico "A"

**Equação 01:** Cálculo do Índice de Kovats (IK)

### 3.3.3.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para se obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico, separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica ( $m/z$ ) e o número de íons que corresponde a cada unidade de massa/carga é então registrado na forma de um espectro (HARRIS, 2001). Os espectrômetros de massa são muito úteis tanto na análise de compostos cujo espectro de massas é conhecido quanto na análise de compostos de estrutura completamente desconhecida (SILVERSTEIN; BASSLER, 1979).

No caso de compostos conhecidos, a partir do padrão de fragmentação do constituinte a ser analisado, o equipamento realiza uma busca computadorizada e compara o espectro de massas do composto em questão com aqueles contidos numa biblioteca de espectro de massas. Assim, o espectro da amostra é comparado com os das substâncias da biblioteca, e o computador faz propostas de probabilidade quanto à identidade do constituinte sob análise (SIMÕES; SPITZER,

2004). Entretanto, para compostos desconhecidos, o íon molecular, a seqüência de fragmentações e evidências de outros tipos de espectrometria, por exemplo, Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), podem levar à identificação de novos compostos.

De acordo com Silverstein e Bassler (1979), o método do impacto de elétrons (EI) é a técnica mais usada na geração de íons para a espectrometria de massas. As moléculas da amostra são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV), o qual remove um elétron da molécula da amostra para produzir um cátion-radical, conhecido como íon molecular. Para os referidos autores, a unicidade de um espectro de massas, obtido por impacto de elétrons, de um dado composto orgânico, até mesmo para estereoisômeros, é quase uma certeza. Essa unicidade, acoplada à grande sensibilidade do método, é o que torna a CG-EM um método analítico poderoso e bastante utilizado.

Neste sentido, a espectrometria de massas é, atualmente, a melhor técnica de detecção para a cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a pequenas quantidades de analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna, e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2001).

### **3.3.4 Ocorrência, funções biológicas e importância econômica**

Os óleos essenciais são raramente encontrados em Gimnospermas (com exceção das coníferas). Em Angiospermas monocotiledôneas, a ocorrência é relativamente rara, com exceção das gramíneas (gêneros *Cymbopogon* e *Vetiveria*) e zingiberáceas (espécies de *Alpinia* e *Curcuma*). Entretanto, plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em Angiospermas dicotiledôneas, principalmente nas famílias: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae entre outras. Dependendo do grupo taxonômico, os óleos podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como: pêlos e tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (SIMÕES; SPITZER, 2004).



Durante muito tempo, as substâncias odoríferas produzidas pelos vegetais foram consideradas como “desperdício fisiológico”, ou ainda, como produtos de desintoxicação. Todavia, nos dias em curso, considera-se que estes compostos do metabolismo secundário exibem funções ecológicas específicas: podem atuar como inibidores da germinação; na preservação contra predadores; na atração de polinizadores; na proteção contra a perda de água e o aumento da temperatura; além de apresentar efeitos alelopáticos.

Os fisiologistas julgam as essências necessárias em certos fenômenos químicos celulares, como moderadores dos fenômenos de oxidação e como modificadores da permeabilidade celular, influenciando os fenômenos de osmose; podendo ainda, atuar nos processos de polinização entomófila, pelo atrativo do seu aroma. Atribuíram-lhes também o papel de proteção da planta produtora dos ataques produzidos por microrganismos, além de evitar a herbivoria (COSTA, 2002a).

Assim, a literatura aponta a existência de funções diversificadas para os óleos essenciais, sendo muitas delas determinadas pelas relações do vegetal com o meio ambiente, com os animais e com outras plantas.

Do ponto de vista econômico, os óleos essenciais são usados para conferir aroma e odores especiais em inúmeros produtos tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, desodorantes, condimentos, doces, entre outros. São empregados também como solventes e insumos em produtos das indústrias de plásticos, tintas, borracha e inseticidas. Muitos fornecem produtos de partida para a síntese de outras substâncias úteis nas indústrias química e farmacêutica. Alguns componentes têm propriedades farmacológicas como: antibacterianos, analgésicos sedativos, expectorantes e estimulantes, e por isso, são integrantes da composição de diversos medicamentos (CRAVEIRO, 1981).

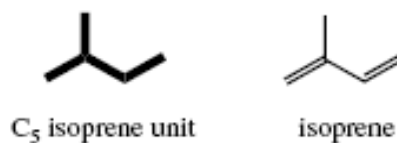
Diferentes aplicações são dadas aos óleos voláteis: na medicina, na culinária, na cosmética, e mais recentemente, na agricultura. O conhecimento de que alguns dos compostos que fazem parte dos óleos essenciais podem atuar como antimicrobianos, e outros, como repelentes ou tóxicos para herbívoros, tem estimulado pesquisas com o objetivo de fazer uso das plantas aromáticas para proteger culturas e produtos agrícolas armazenados, sem contaminar os alimentos com pesticidas sintéticos (SAITO; SCRAMIN, 2000 *apud* MATTOS, 2007).

A indústria, em diferentes setores, sempre foi a maior consumidora de boa parte dos óleos essenciais. Em primeiro lugar, absorvendo mais da metade de uma produção calculada em milhares de toneladas, coloca-se o grupo da perfumaria e cosmética, em virtude de constituir a sua principal matéria-prima. Logo em seguida, encontram-se as indústrias de alimentos em geral (conservas, molhos, salsicharia, massas, biscoitos, pastelaria e confeitaria), de bebidas alcoólicas (vinhos, licores) e não-alcoólicas (refrigerantes, vinagres). Por fim, a indústria farmacêutica e a terapêutica utilizam a parte remanescente, quer pelas propriedades medicinais reveladas (estimulantes, anti-sépticas, sedativas, diaforéticas, abortivas, vermífugas), quer como corretivos do sabor e do aroma de medicamentos (COSTA, 1975).

Atualmente, as substâncias aromáticas de plantas estão sendo testadas no combate a insetos que afetam a atividade agropecuária e a saúde humana. Isto pode levar, no futuro, à substituição dos atuais compostos sintéticos utilizados, por similares oriundos de fontes naturais. Tal iniciativa poderia garantir a produção de alimentos mais seguros, com menores riscos de toxicidade para os consumidores e de impactos ao meio ambiente. Doravante, o controle biológico de pragas e o uso de produtos químicos naturais são alternativas possíveis e potenciais que devem merecer cada vez mais a atenção da comunidade científica e dos defensores do desenvolvimento sustentável (MATTOS, 2007).

### **3.3.5 Terpenóides e Fenilpropanóides: precursores biossintéticos dos óleos essenciais.**

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo preponderante a presença dos últimos. Os fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico, já os terpenóides, constituem uma grande variedade de substâncias vegetais. O termo terpenóide é empregado para designar todas as substâncias originadas biossinteticamente de unidades do isopreno (Figura 07), as quais, por sua vez são oriundas do ácido mevalônico (SIMÕES; SPITZER, 2004).



**Figura 07:** Estrutura do isopreno  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

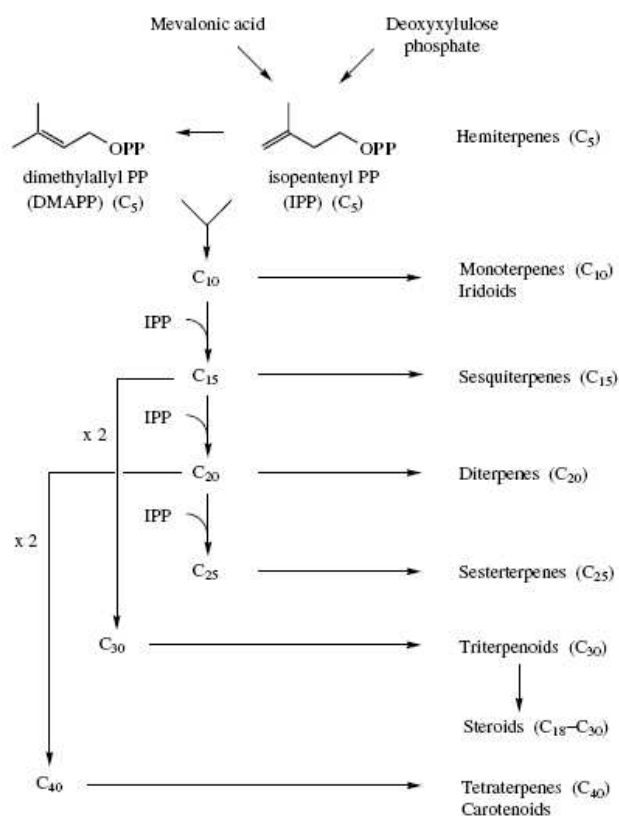
Os terpenos ocorrem em todas as plantas e são de longe a maior classe de metabólitos secundários, havendo mais de 22.000 compostos terpenóides descritos. O mais simples dos terpenóides é o hidrocarboneto isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Estes compostos estão subdivididos de acordo com o número de unidades isoprênicas (Figura 08) e de acordo com as várias formas de ciclização, em monoterpenos (10 unidades de carbono), sesquiterpenos (15 unidades de carbono), diterpenos (20 unidades de carbono), sesterterpenos (25 unidades de carbono), triterpenos (30 unidades de carbono) e tetraterpenos (40 unidades de carbono) (DI STASI, 1996). Uma única planta pode sintetizar muitos terpenóides diferentes, em distintos órgãos, para uma grande variedade de propósitos e em épocas diferentes, ao longo de seu desenvolvimento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Os monoterpenos representam uma subclasse que inclui compostos muito comuns como o citral, linalol, cânfora, terpinen-4-ol, carvacrol, *p*-cimeno e outros. O carvacrol, por exemplo, além de seu grande emprego como germicida, antifúngico e na preparação de sabonetes e essências artificiais, teve sua ação antibiótica e antiespasmódica recentemente determinada. Inúmeros outros metabólitos desta classe reúnem diversas atividades farmacológicas e usos distintos na indústria farmacêutica e de cosméticos. Quanto aos sesquiterpenos verifica-se que aumentando-se o número de carbonos ocorre um aumento no número de ciclizações e modificações nas moléculas, levando a uma grande variedade de compostos. Poucos sesquiterpenos lineares são conhecidos em comparação com o número de sesquiterpenos cíclicos. Alguns compostos antitumorais, como vernolepina, fenolina e elefantina, também são exemplos de sesquiterpenos (DI STASI, 1996).

Muitos dos monoterpenóides e sesquiterpenóides são componentes dos óleos essenciais. Por serem altamente voláteis, contribuem para a fragrância ou essência das plantas que os produzem. Agem inibindo a ação dos herbívoros; alguns

protegem contra o ataque de fungos ou bactérias; outros são conhecidos por serem alelopáticos, e além disso, por atuarem na atração de insetos polinizadores. Nota-se que os terpenóides desempenham uma multiplicidade de papéis nas plantas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Já os fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico, o qual forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Os ácidos cinâmicos por sua vez, são os precursores da maioria dos fenilpropanóides, que são compostos aromáticos caracterizados por apresentarem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático. A redução da cadeia lateral dos ácidos cinâmicos conduz à formação de compostos importantes nos óleos essenciais, a exemplo do eugenol presente no cravo-da-índia – *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et L. M. Perry (MYRTACEAE) – o qual é empregado em produtos de higiene oral, por sua reconhecida atividade antimicrobiana. Nos vegetais, os fenilpropanóides desempenham um papel preponderante na defesa contra insetos herbívoros e contra fungos (SIMÕES; SPITZER, 2004).



**Figura 08:** Formação dos terpenóides a partir de unidades isoprênicas.  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

### **3.3.6 A interferência dos fatores genéticos, mesológicos e sazonais no teor e na variabilidade química de óleos essenciais.**

A composição química do óleo volátil produzido por uma planta é pré-determinada evolutivamente, sendo na maioria das vezes específica para um órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento. Contudo, as condições ambientais, são capazes de causar variações bastante significativas (TEUSCHER, 1990 *apud* SIMÕES; SPITZER, 2004).

A complexidade da composição dos óleos essenciais e a concentração dos seus constituintes são o resultado dos diferentes processos metabólicos que ocorrem nos vegetais, cuja biossíntese é afetada por fatores como o clima, o solo, localização geográfica, duração do dia e da noite, idade da planta, órgão onde se localiza, além de estresses (MATTOS, 2007).

Uma vez que os caracteres de cada espécie são determinados geneticamente, num certo nível, a composição química dos metabólitos secundários por ela produzidos também o são (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Entretanto, as plantas, individual ou coletivamente consideradas, devem ser encaradas como organismos vivos que reagem às forças ambientais de modos variados, justamente pelo fato de o fenótipo ser o produto da interação do genótipo com o ambiente.

Os seres vivos, em suma, são flexíveis em suas respostas aos fatores ambientais. Daí derivam: a plasticidade fenotípica de inúmeros vegetais, de acordo com a natureza e a intensidade de forças mesológicas. Embora haja para cada ser vivo um padrão de desenvolvimento estabelecido e comandado pelo seu patrimônio genético, o complexo ambiental ou mesológico (distribuído em quatro fatores: climáticos, edáficos, fisiográficos ou topográficos, e bióticos) atua de modo poderoso. Pode-se inferir que a rede de interações estabelecida entre o biótico e o abiótico provoca alterações em vários sentidos, por força da seleção natural ao longo do processo evolutivo (RIZZINI, 1996). Isto explicaria a ocorrência de quimiotipos ou raças químicas, muito frequente em plantas ricas em óleos voláteis; ou seja, vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Nota-se que variações no conteúdo total, bem como nas proporções relativas de metabólitos secundários produzidos pelas plantas ocorrem em diferentes níveis

(sazonais e diários; intraplanta, inter e intraespecífica), e apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese frequentemente é afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Neste sentido, é evidente que a composição de um óleo essencial ocorre em função da espécie produtora. Entretanto, em algumas delas é muito frequente a existência de raças químicas. Por exemplo, no tomilho (*Thymus vulgaris*) uma espécie vegetal botanicamente homogênea e geneticamente estável, se pode distinguir apenas no sul da França, sete quimiotipos como timol, carvacrol, geraniol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, 4-*trans*-tujanol e 8-*cis*-mirceno; na Espanha é encontrado mais um quimiotipo para esta mesma espécie com eucaliptol (BRUNETON, 2001).

Para uma dada espécie, a proporção dos diferentes constituintes do óleo essencial, pode variar de maneira importante ao longo do seu desenvolvimento. Por este motivo, se compreende facilmente que é necessário escolher racionalmente a data de coleta. Para Costa (2002a), as folhas jovens são mais ricas em essências; assim como, no período da floração estas se concentram de forma mais acentuada nas inflorescências, onde predominam; na frutificação, pelo contrário, há uma diminuição em resultado do seu consumo parcial, mas observa-se um novo enriquecimento nas partes verdes das plantas.

Conforme Gobbo-Neto e Lopes (2007), a idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura. Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, tais como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, alcalóides e flavonóides.

De maneira semelhante, fatores do entorno como as condições climáticas e a natureza do solo influenciam diretamente no teor e nos constituintes químicos de um óleo essencial. De acordo com Bruneton (2001), até o procedimento de obtenção interfere na composição química dos óleos voláteis e o produto obtido por hidrodestilação, raramente será idêntico àquele que resulta da extração com solventes. Isto depende da instabilidade e da importante reatividade das moléculas

constituintes destas misturas naturais que facilmente se isomerizam, rancemizam, recombinaam e oxidam.

Portanto, é relevante considerar que as variáveis ambientais incluindo a temperatura, o regime de chuvas, a duração e a hora do dia, o tempo de exposição e a intensidade de luz, a estação do ano e a altitude, além de fatores edáficos, ecológicos e ontogenéticos, podem fazer com que a composição química bem como, a quantidade de princípios ativos produzidos pelas plantas sofram alterações (DUNIAU, 2003).

### **3.3.7. Ação Farmacológica**

Para Costa (2002a), o número e a diversidade de constituintes dos óleos essenciais conduzem a uma atividade farmacológica que se manifesta de modos diferentes no organismo humano. As ações simultâneas dos diversos compostos sobre as mucosas, secreções, músculos lisos e sistema nervoso, determinam efeitos benéficos utilizados na terapêutica, como: anestésico local, carminativo, antiespasmódico, antiinflamatório, expectorante, diurético e digestivo. A atividade específica sobre a musculatura lisa explica também o seu emprego na dismenorréia (canela, açafraão) e em doses elevadas, como abortivo (arruda, losna e salsa).

Sobre o sistema nervoso central atuam de modos diversos e determinam efeitos diferentes: analépticos, sedativos, excitante, narcótico e até convulsivo a depender da dose administrada; no sistema cardiovascular provocam o aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Suas propriedades bactericidas e cáusticas são associadas aos seus constituintes fenólicos (a exemplo da essência de cravinho e do eugenol), o que justifica o emprego nas cáries dentárias. Os fármacos aromáticos, de maneira geral, são utilizados com maior frequência, para destruir os agentes causadores de infecções: bactérias e fungos patogênicos, vermes e insetos parasitas. Numerosos trabalhos foram publicados a respeito dos poderes bactericidas e bacterioestáticos das essências, o que justifica seu uso na profilaxia e terapêutica de várias doenças causadas microrganismos patogênicos (COSTA, 2002a).

Além dos compostos fenólicos, a presença de aldeídos e alcoóis parece está

envolvida na inibição do crescimento de bactérias e fungos. Compostos como o citral, geraniol, linalol e o timol têm alto poder antisséptico frente a bactérias patogênicas variadas, inclusive certas cepas antibiótico-resistentes, estes compostos são até vinte vezes mais potentes do que o fenol. Alguns óleos essenciais, também são ativos frente a fungos, responsáveis por micoses, a exemplo das leveduras do gênero *Candida*. As doses ativas, em geral são baixas, sendo as essências com maior poder antisséptico aquelas oriundas de espécies de canela, tomilho, cravo, lavanda e eucalipto (BRUNETON, 2001).

Há relatos de que alguns óleos essenciais foram utilizados externamente, na desinfecção de feridas, durante a Primeira Guerra Mundial. A essência de niauli, por exemplo, serviu como antisséptico dos ferimentos produzidos em combate. Notável também é a atividade anti-helmíntica manifestada por várias essências e seus constituintes (quenopódio, eucalipto, tomilho, alho, ascaridol, timol), na expulsão de vermes parasitas dos intestinos do homem e de animais domésticos. Mais recentemente, foi reconhecida uma nova propriedade farmacológica dos óleos voláteis, a ação sinérgica sobre certos medicamentos, a exemplo dos antibióticos (COSTA, 2002a).

### 3.4 O MUNICÍPIO DE ALAGOINHAS E A ÁREA DE COLETA

O município de Alagoinhas encontra-se situado na área situada entre o Agreste e o Litoral Norte do estado da Bahia, estando geograficamente delimitado pelas coordenadas 12° 08' – 12° 10' S e 38° 26' – 38° 30' W, distando aproximadamente 119 Km da capital Salvador (Figura 09).

A região caracteriza-se por apresentar um clima de caráter transicional, exibindo elementos tanto do tipo úmido quanto do sub-úmido, de acordo com a classificação de Thornthwaite. Precipitação média anual de aproximadamente 1.234 mm, com períodos de maior pluviosidade concentrados entre os meses de abril a junho e deficiência hídrica nos meses de setembro a janeiro. Temperatura média de 23,9 °C e umidade relativa com valores próximos a 80,4% (IGEO/UFBA, 1999).





**Figura 09:** Localização geográfica do município de Alagoas-BA.  
**Fonte:** Image Digital Globe Google Earth, 2008

Entretanto, de acordo com dados recentes obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia/INMET, referentes ao período de janeiro de 2007 a maio de 2009, a precipitação média anual não ultrapassou os 1.187,3 mm; a temperatura média anual atingiu 30,33 °C e a disponibilidade média de água no solo foi de 20,64 mm.

O relevo apresenta configuração plana, suavemente ondulada, com altitude em torno de 207 m, compreendendo os Tabuleiros Interioranos do Recôncavo, de idade Cretácea Inferior, e os Tabuleiros Costeiros, de Idade Tércio-Quaternária. Do ponto de vista pedológico, ocorrem de maneira predominante, os solos Podzólicos Acinzentados seguidos de Areias Quartzosas (Figura 10), normalmente álicas ou distróficas. Ambos apresentando baixa permeabilidade, fertilidade química reduzida tanto em macro quanto em micronutrientes, baixos teores em fósforo, cálcio, magnésio e potássio, porém altos em alumínio. A drenagem varia de moderada a imperfeita, com reduzida capacidade de retenção hídrica (IGEO/UFBA, 1999).

As informações relacionadas à topografia desta localidade estão em consonância com as referências feitas por Rizzini (1996), a respeito da existência no Brasil, da Floresta dos Tabuleiros, um dos corpos florestais que ocorre de Pernambuco até o Rio de Janeiro. Segundo este autor, trata-se de uma faixa litorânea, por dentro das areias quaternárias, que suporta a restinga em algumas localidades. Essa faixa, quase plana ou suavemente ondulada, eleva-se de 20 a 200 m acima do nível do mar e é formada por depósitos terciários (pliocênicos). O nome

tabuleiro, que se lhe fornece, prende-se à configuração do relevo, com solos usualmente pobres, em conformidade com a sua identidade geológica.



**Figura 10:** Aspecto geral do solo na Área de coleta.  
**Foto:** SILVA, 2009.

Com relação à rede hidrográfica, a região de Alagoinhas é composta pela bacia do Rio Pojuca, a qual engloba os rios: Sauípe, Catu, Aramari e Subaúma. Além disso, este território apresenta elevado potencial de recursos hídricos de subsuperfície, representado pelo aquífero de São Sebastião. É importante ressaltar, a presença na área de coleta de um dos afluentes do Rio Catu, o Riacho do Mel (Figura 11).

A flora apresenta uma grande variedade de ecossistemas, entretanto, caracteriza-se pela presença de diversos fragmentos em regeneração da Floresta Ombrófila Densa Submonta, reunindo elementos típicos do Domínio Mata Atlântica. A família Myrtaceae destaca-se na região pela riqueza e abundância no conjunto das populações que compõem a vegetação secundária, com formas arbustivas e arbóreas constituindo a estrutura inicial, média e avançada da cobertura vegetal (SILVA et al., 2004).

A área na qual a coleta do material vegetal foi realizada (Figura 11) pertence ao Governo do Estado da Bahia. A princípio, a vegetação ocupava uma extensão de aproximadamente 400 hectares, sendo boa parte explorada, ao longo do tempo, para o cultivo de coco e a citricultura. *A posteriori*, foram realizadas doações para a construção do Parque de Exposições Agropecuárias Miguel Santos Fontes e para as implantações do Campus II da Universidade do Estado da Bahia/UNEB e da sede no

município da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola/EBDA. Em virtude disso, a cobertura vegetal remanescente, encontra-se restrita, no presente momento, em uma área 140 hectares.



**Figura 11:** Visão geral da Área de Coleta  
**Fonte:** Image Digital Globe Google Earth, 2009.

Levando-se em consideração as características edafo-climáticas bem como, os aspectos fitofisionômicos, pode-se inferir que a cobertura vegetal desta localidade se enquadra no Domínio Mata Atlântica. Para Rizzini (1996), a expressão Floresta Atlântica designa um complexo vegetacional que, embora dominado pela Floresta Pluvial Montana, engloba tipos de cobertura vegetal muito díspares. Isto porque, sua ampla distribuição geográfica, sobre solos distintos, aliada a uma série de formações montanhosas com altitudes variadas, favorecem o estabelecimento de uma infinidade de condições ambientais: diferentes graus de temperatura, umidade, insolação, nichos específicos e adaptações decorrentes de sucessivas eras geológicas. Estes elementos do biótopo, permitem tamanha diferenciação que faz deste bioma, um dos maiores detentores de diversidade biológica de todo o planeta (VIEIRA, 2002).

Entretanto, esta é uma área que sofre uma pressão antrópica histórica, tanto devido aos vários ciclos econômicos que nela se estabeleceram, a exemplo do pau-brasil, da cana-de-açúcar e do café, como devido à própria ocupação humana, uma vez que 62% da população brasileira, cerca de 110 milhões de pessoas, estão concentradas nesta extensão de terra (PORTAL SOS MATA ATLÂNTICA, 2009).

Atualmente, restam da Mata Atlântica cerca de 4% de sua formação primária e outros 4% de formações secundárias, os quais são de grande importância para a proteção da sua biodiversidade. Esses escassos remanescentes de sua área original estão, na sua maior parte, fragmentados em pequenas ilhas, exceto, ao longo das serras do Sudeste e do Sul onde ainda persistem importantes corredores ecológicos. Por isso, a Mata Atlântica é considerada como uma das principais florestas tropicais passíveis de extinção do planeta e um dos principais *hot-spots* do Brasil, ou seja, uma área prioritária para conservação, pelo fato de ser rica em biodiversidade e ameaçada no mais alto grau (VIEIRA, 2002).

### 3.5 ASPECTOS BOTÂNICOS

Uma das principais vantagens da nomenclatura definida por Carolus Linnaeus, em 1753, é que cada espécie vegetal tem apenas um nome botânico. É de extrema importância que qualquer estudo envolvendo plantas medicinais seja iniciado pela amostragem botânica. Para tanto, um material testemunha ou *voucher* deve ser preparado. Este material consiste em um ramo da planta, de preferência fértil, que é prensado, seco e acondicionado em coleção científica denominada herbário. Num sentido mais estrito, um herbário é uma coleção botânica reconhecida, um museu de plantas, que armazena e cataloga inúmeros espécimes secos. Esses espécimes servem de comparação para determinação taxonômica de outros espécimes, ou como documentação da existência de uma planta em um determinado lugar (LORENZI, 2002).

Um dos aspectos mais delicados no âmbito da Fitoterapia e nos estudos científicos envolvendo plantas refere-se à correta identificação do vegetal. Por ser fortemente baseada em nomes vernaculares, a identidade de uma planta pode variar enormemente de região para região. Assim como plantas completamente distintas podem ter o mesmo nome popular, algumas plantas acumulam um grande número deles para a mesma espécie. Portanto, a uniformização da nomenclatura botânica se faz necessária para evitar ambigüidades, uma vez que interpretações taxonômicas errôneas podem não só induzir o usuário a utilizar uma planta sem o princípio ativo desejado, como também induzi-lo a fazer uso de uma planta perigosa.

### 3.5.1 A Família Myrtaceae

A família Myrtaceae caracteriza-se por apresentar glândulas oleíferas translúcidas presentes nas folhas, flores e frutos, o que justifica a produção relativamente alta de óleos essenciais pelos seus representantes. Compreende entre 3.100 e 4.600 espécies agrupadas, tradicionalmente, em duas subfamílias: Leptospermiodeae e Myrtoideae, distintas pela morfologia das folhas e dos frutos (JUDD et al., 1999 *apud* SOBRAL, 2003). Folhas dispostas de forma alternada nos ramos, e frutos secos estão presentes em Leptospermiodeae, e folhas em disposição oposta, e frutos carnosos em Myrtoideae.

A subfamília Leptospermiodeae tem seu principal centro de radiação na Oceania, sendo o *Eucalyptus* L'Herit, nativo da Austrália, um dos gêneros de maior importância, por ser cultivado atualmente em larga escala nas regiões tropicais do globo para a obtenção de matérias-primas como: madeira, celulose, carvão vegetal, além de óleos essenciais. O Brasil e alguns países do continente africano se destacam por serem detentores dos maiores plantios de espécies de *Eucalyptus* do mundo.

Na década de 70, o Brasil apresentava-se como um dos mais importantes exportadores de óleos derivados de folhas de Myrtaceae no mundo, porém todas as espécies exploradas eram de origem australiana (CORRÊA; GOTTLIEB, 1970). Atualmente, apenas a produção brasileira de óleo essencial proveniente de espécies de *Eucalyptus* L'Herit é estimada em torno de 1.000 toneladas ao ano, gerando aproximadamente 10 mil empregos diretos e uma movimentação financeira de cerca de 4 milhões de dólares, com quase a metade devido às exportações (BRITO, 2002).

Por outro lado, as mirtáceas Myrtoideae, possuem espécies dispersas em todos os continentes, com exceção da Antártida. Todos os exemplares brasileiros incluem-se nesta subfamília (SOBRAL, 2003), que mesmo não apresentando espécies produtoras de madeiras valiosas, apresentam numerosas plantas frutíferas, algumas cultivadas e exploradas comercialmente como a goiabeira, *Psidium guajava* L.; a jaboticabeira, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.; e a pitangueira, *Eugenia uniflora* L. (GRESSLER, PIZO e MORELLATO, 2006).

Em geral, as mirtáceas figuram entre as famílias mais representativas em

florestas tropicais e sub-tropicais. Vários estudos florísticos e fitossociológicos comprovam a riqueza e/ou abundância das espécies de Myrtaceae nestes ambientes. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2005) realizou um inventário da Flora da região do Litoral Norte da Bahia, objetivando disponibilizar informações sobre a composição florística desta localidade. A região foi escolhida como prioritária para ser estudada, pois nos últimos anos vem sendo submetida a diversos impactos ambientais. Principalmente, com a recente instalação de complexos hoteleiros, ocupação desordenada e forte influência antrópica, as quais têm modificado características naturais locais. Neste estudo foram catalogadas 105 famílias, e dentre as dez melhor representadas em número de espécies, a família Myrtaceae ocupou a quinta posição.

Em 2003, pesquisadores do Departamento de Ciências Exatas e da Terra do Campus II da Universidade do Estado da Bahia, realizaram um levantamento florístico da família Myrtaceae no mesmo remanescente de floresta utilizado como área de coleta para a consecução da presente pesquisa. Foram catalogadas preliminarmente 19 espécies (SILVA et al., 2004). As particularidades apresentadas tanto no inventário do IBGE quanto no estudo desenvolvido no Campus II da UNEB corroboram o fato de que no Domínio Mata Atlântica, a referida família apresenta-se como uma das mais numerosas em termos de espécies.

Do ponto de vista botânico, Sobral (2003) descreve a família Myrtaceae da seguinte maneira:

Árvores ou arbustivos. Tricomas, quando presentes, simples e unicelulares. Folhas opostas, inteiras, com glândulas translúcidas evidentes. Inflorescências terminais ou axilares, ocasionalmente unifloras (flores solitárias, axilares). Flores bissexuais, radiais, com hipanto desenvolvido ou não; lóbulos do cálice 4-5 ou soldados, abrindo-se em lobos irregulares ou sob a forma de caliptra; pétalas (1-)4-5 ou ausentes; estames geralmente numerosos, raro oito, desenvolvendo-se centripetamente, as anteras às vezes com glândulas; pólen tricolpado; carpelos 2-5(-10), soldados; ovário ínfero; placentação axilar, ocasionalmente apresentando intrusão da placenta no lóculo; óvulos (1-)2-20 por lóculo. Frutos uni a multisseminados, carnosos; embriões com cotilédones menores que o hipocótilo, ou de tamanho equivalente ao do hipocótilo e dobrados sobre si mesmo, ou com hipocótilo vestigial ou ausente, neste caso, às vezes soldados; endosperma escasso ou ausente (SOBRAL, 2003).

De acordo com o exposto, é importante atentar para o fato de que mesmo

sendo uma família bastante representativa em ambientes de Floresta Atlântica, é notório que as espécies de Myrtaceae foram, desde o descobrimento do Brasil, e ainda são submetidas a uma forte influência antrópica extrativista e predatória. E, por isso, necessitam com urgência de estudos que permitam tanto a identificação desta incomensurável diversidade molecular constituída no decorrer de milhões de anos, no curso da evolução; como a descoberta dos usos biológicos, ecológicos, industriais e farmacológicos em potencial advindos da pesquisa fitoquímica.

No entanto, tal tarefa somente se concretizará se estiver atrelada à identificação taxonômica das espécies, principalmente em se tratando de um grupo de vegetais onde os caracteres morfo-anatômicos isoladamente não são capazes de solucionar seus típicos problemas nomenclaturais. Neste sentido, a própria investigação química pode auxiliar na distinção taxonômica das espécies através da descoberta de metabólitos secundários que possam ser usados como marcadores quimiotaxonômicos (GALLO et al., 2006).

#### 3.5.1.2 Aspectos Botânicos do gênero *Myrcia* DC.

No Brasil, todos os representantes nativos da família Myrtaceae, pertencem à subfamília Myrtoideae. O gênero *Myrcia* DC. apresenta mais de 300 espécies distribuídas do México até o sul do Brasil, seus representantes caracterizam-se pela presença de indivíduos subarbustivos a arbóreos, com folhas geralmente evidenciando nervura marginal e pontos translúcidos no limbo, devido à presença de glândulas oleíferas (SOBRAL, 2003).

**Domínio** – Eucariota

**Reino** – Plantae

**Divisão** – Magnoliophyta

**Classe** – Magnoliopsida

**Subclasse** – Rosidae

**Ordem** – Myrtales

**Família** – Myrtaceae

**Subfamília** – Myrtoideae

**Tribo** – Myrteae

**Subtribo** – Myrciinae

**Gênero** – *Myrcia*

#### 3.5.1.2.1 Aspectos Botânicos de *Myrcia alagoensis* O.Berg

Na área de coleta, a espécie é comum. Os indivíduos são arbóreos; apresentam caule com coloração acizentada, às vezes descamando-se em lâminas finas (ritidoma); folhas discolores, com consistência coriácea e portando pubescência ferrugíneo esbranquiçada em ambas as faces, nas folhas jovens. Entretanto, nas folhas mais senis, os pelos são mais evidentes na face abaxial e concentram-se na nervura principal. As nervuras são impressas na face adaxial e sobressalentes na abaxial. Presença marcante de nervura submarginal e glândulas oleíferas.

Os botões florais são abertos, levemente pilosos, com coloração amarelada, agrupados em dicásios compostos, os quais se reúnem para formar uma inflorescência paniculada. Os lobos do cálice são regulares (5). Pétalas (5), presença de numerosos estames (Figura 12), estigma presente, mesmo após a antese. Frutos pilosos, baciformes, ovais, com lobos do cálice persistentes, os imaturos com coloração amarelada e os maduros em tons que variam do vináceo ao negro (Figura 13).

#### 3.5.1.2.2 Aspectos Botânicos de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.

Na área de coleta, a espécie é rara. Os indivíduos são arbustivos; apresentam caule com manchas liquênicas, descamando-se em lâminas fibrosas (ritidoma); é frequente a presença de casulos de insetos; as folhas são glabras (sem pelos), porém é notória a presença de pubescência ferrugínea na nervura principal da face



abaxial. Presença de nervura submarginal e glândulas oleíferas. Flores reunidas em inflorescências paniculadas. Frutos redondos, coroados pelos lobos do cálice, os imaturos em tons rosados e os maduros, variando de vináceos a negros (Figura 14).



**Figura 12:** Floração de *Myrcia alagoensis* O. Berg  
Foto: SILVA, 2009.



**Figura 13:** Frutos de *Myrcia alagoensis* O. Berg  
Foto: SILVA, 2009.



**Figura 14:** Frutos de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.  
Foto: SILVA, 2009.



**Figura 15:** Folhas rostradas de *Myrcia rostrata* DC.  
Foto: SILVA, 2009.



**Figura 16:** Frutos de *Myrcia rostrata* DC.  
Foto: SILVA, 2009.

### 3.5.1.2.3 Aspectos Botânicos de *Myrcia rostrata* DC.

Na área de coleta, a espécie é comum nas bordas da mata e nas trilhas. Os indivíduos são arbustivos; as folhas são glabras (sem pelos), com ápice evidentemente acuminado (rostrado). Presença de nervura submarginal e glândulas oleíferas. Botões florais abertos em tons rosados (Figura 15). Flores reunidas em inflorescências paniculadas. Frutos ovais, coroados pelos lobos do cálice, os imaturos em tons rosados e os maduros em tons vináceos (Figura 16).

## 3.6. ÓLEOS ESSENCIAIS DE REPRESENTANTES DA FAMÍLIA MYRTACEAE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.

Myrtaceae é uma família de plantas que produz compostos secundários, geralmente aromáticos, os quais são armazenados em pontuações translúcidas (glândulas) existentes na lâmina foliar. Destacam-se o óleo de mirto (*Myrtus comunis*) produzido na Ilha de Córsega, de pimenta (*Pimenta officinalis*) da América Central, usados na preparação de condimentos. O óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata*) produzido principalmente na África e os óleos procedentes das diversas espécies de *Eucalyptus* dentre os quais se destacam os tipos de uso medicinal (*E. globulus*), aromatizante doméstico (*E. citriodora*), desinfetante (*E. dives*) e outros como fontes de compostos de interesse na indústria química (CRAVEIRO et al., 1981).

O *Eucalyptus citriodora* Hook., conhecido como eucalipto limão apresenta nas suas folhas um teor de óleo essencial que varia de 3 a 5%, com até 80% da sua composição constituída por citrionelal, componente responsável pelo seu aroma característico e por sua atividade desinfetante e repelente de insetos. O *Eucalyptus tereticornis* Smith., de nome popular, eucalipto medicinal contém de 3 a 5% de óleo essencial com 60% ou mais de cineol ou eucaliptol, principal responsável por sua atividade antigripal, balsâmica e adstringente (MATOS, 1997).

De acordo o referido autor, a goiabeira vermelha (*Psidium guajava* L.), apresenta os brotos jovens (vulgarmente conhecidos como olho da goiabeira) ricos

em tanino, óleo essencial e rutina e, embora seu princípio ativo não esteja bem definido sabe-se que sua ação antidiarréica parece está relacionada a três fatores: uma ação adstringente devida ao tanino, uma ação inibidora da transferência de água dos tecidos para o intestino, devida aos flavonóides, e uma ação antimicrobiana especialmente contra bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shighella*. Além de ser usada popularmente no combate a diarreias, essa espécie parece também ser útil nas inflamações da boca e da garganta.

Corrêa (2003), aponta as folhas e a raiz da pedra-ume-caã (*Myrcia sphaerocarpa*) como coadjuvante no tratamento do Diabetes *Mellitus* e da hipertensão arterial. Assim como, nos quadros de diarreia, gastroenterites e aftas, além de apresentar ação diurética. Em sua composição química encontram-se taninos e glicoproteínas.

Na década de 70, Corrêa e colaboradores (1972) constataram que:

o Brasil inclui-se entre os maiores exportadores de óleos essenciais de folhas de mirtáceas em todo o mundo. Paradoxalmente, todas as espécies aqui exploradas são de origem australiana (*Eucalyptus citriodora* Hook., *E. maideni* F.v.M., *E. smithii* Baker e *E. staigeriana* F.v.M.). Não é por falta de mirtáceas na flora brasileira que inexistente exploração industrial de espécies nativas. Pelo contrário, é no Brasil onde esta família encontra-se melhor representada quanto ao número de gêneros e de espécies. Quer nos parecer, por isto que a razão do fato possa residir no desconhecimento da composição química de óleos essenciais de nossas mirtáceas (CORRÊA et al., 1972).

É evidente que a literatura especializada reúne uma série de estudos envolvendo a composição química dos óleos essenciais produzidos por espécies de Myrtaceae, todavia, dada a grandiosa diversidade biológica desta família botânica, ainda há muito por ser descoberto. Numa breve análise de artigos publicados nos últimos anos, somente uma pequena monta de trabalhos possui a análise da atividade biológica atrelada ao estudo fitoquímico das suas espécies. E mais especificamente, sobre os óleos essenciais obtidos de exemplares do gênero *Myrcia* DC. nota-se que a escassez é extremamente pronunciada.

Até o presente momento, existem em torno de 700 espécies diferentes de *Eucalyptus* catalogadas. Destas, aproximadamente, 500 produzem óleos essenciais, usados das mais diferentes formas: doenças respiratórias, como bronquite e asma;

condições febris, em casos de malária, tifo e cólera; problemas de pele, como queimaduras e úlceras. No tocante a um dos seus principais constituintes, o 1,8-cineol, há relatos de efeitos antiinflamatórios, antioxidantes, além do uso farmacêutico no preparo de unguentos, inalantes e xaropes para tosse (SEFIDKON; BAHMANZADEGAN; ASSAREH, 2008).

Pesquisadores nigerianos estudaram os óleos voláteis obtidos de diferentes espécies cultivadas naquele país, os constituintes majoritários foram: 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, em diferentes proporções nas três espécies analisadas. Esses autores relataram que espécies deste gênero têm sido utilizadas por suas propriedades carminativas, inseticidas e antimicrobianas frente a vários microrganismos (OGUNWANDE et al., 2003).

Da mesma maneira, das seis espécies de *Eucalyptus* coletadas no sudeste do Irã, cinco apresentaram o 1,8-cineol como constituinte majoritário (ASSAREH; JAIMAND; REZAEI, 2007). Um estudo realizado na Alemanha comparou a composição química dos óleos essenciais de *Eucalyptus dives* Schau. Type extraídos de folhas frescas e de folhas secas, apesar de o constituinte majoritário ter sido o mesmo ( $\alpha$ -felandreno), foram notadas algumas diferenças nas duas amostras (WEBER et al., 2006).

No Brasil, Franco e colaboradores (2005), analisaram as diferenças químicas que os óleos de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth. apresentaram ao ser coletados do aparelho de Clevenger em diferentes tempos (Fração 1 – nos primeiros quinze minutos, Fração 2 – entre quinze minutos e uma hora, Fração 3 – entre uma e duas horas e Fração 4 – entre a segunda e a terceira hora). O 1,8-cineol foi detectado como majoritário nas três primeiras frações, sendo o ocimeno, o principal composto da última fração. Neste trabalho, os pesquisadores concluíram que a maior parte do óleo essencial é obtida na primeira hora de hidrodestilação e que existem diferenças na composição química dos óleos obtidos em diferentes intervalos de tempo.

*Melaleuca* é um gênero de Myrtaceae originado da Austrália e de regiões do Pacífico, as suas espécies são conhecidas naquela região como niaouli. Seus óleos afetam o crescimento de microrganismos e, por isso, são utilizados por suas propriedades antimicrobianas (BEYLIER, 1979; VALNET, 1984 *apud* GBENOU et al., 2007).

Gbenou e colaboradores (2007) avaliaram a composição química dos óleos essenciais de uma população de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake coletada em diferentes estações do ano, na região sul de Benin (África). O maior rendimento obtido correspondeu à estação mais chuvosa (teor de 4,2%). A composição química dos óleos revelou a presença de três diferentes quimiotipos (1,8-cineol; 1,8-cineol/viridiflorol e viridiflorol).

Além disso, a variação quantitativa de alguns constituintes foi extremamente ampla:  $\alpha$ -pineno (1,5 a 12,5%),  $\alpha$ -terpineol (1,1 a 15%), 1,8-cineol (2,6 a 60%) e viridiflorol (10,5 a 62,7%), indicando que as condições climáticas podem atuar modificando a composição química de uma espécie, bem como dos seus quimiotipos (GBENOU et al., 2007). Já Ramanoelina et al. (2007) estudaram os óleos obtidos de *M. quinquenervia* coletada entre os anos de 1992 – 2001, na região de Madagascar. Os autores identificaram naquela região quatro quimiotipos: 1,8-cineol (37%); 1,8-cineol (23%)/viridiflorol (20%); viridiflorol (48%) e (*E*)-nerolidol (87%).

Outras espécies australianas de Myrtaceae tiveram a composição química dos seus óleos essenciais estudada por Brophy e Goldsack em diferentes anos (2003), (2005) e (2007). Os diversos gêneros bem como, as percentagens dos seus respectivos constituintes majoritários foram: *Decaspermum* com 37,5% de  $\alpha$ -pineno; *Backhousia* com 42% de  $\beta$ -pineno; *Barongia* (58% de  $\alpha$ -pineno), *Mitranthia* (29% de  $\beta$ -cariofileno), *Sphaerantia* (19% de biciclogermacreno) e *Ristantia* (48% de  $\alpha$ -pineno).

Com relação à algumas espécies do gênero *Campomanesia*, os estudos da composição química dos óleos essenciais revelaram a presença de uma diversidade de constituintes majoritários. Geraniol (18,1%) no estudo de Stefanello et al. (2008a) e ledol (20,9%) no estudo de Coutinho e colaboradores (2007) para a espécie *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg.

Cariofileno e linalol (11,7% e 11,1%, respectivamente) em *C. phaea* (O. Berg) Landrum (ADATI; FERRO, 2006) e  $\alpha$ -pineno, limoneno, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno e  $\beta$ -cariofileno nas concentrações de 10,61%; 10,09%; 9,22 e 7,04% para o óleo extraído dos frutos em diferentes estágios de amadurecimento, da espécie *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg (VALLILO et al., 2006).

Neste mesmo estudo de Vallilo e colaboradores (2006), são citados trabalhos que enfatizam resultados positivos no tratamento de tumores malignos em modelo

animal para o câncer de mama, de pâncreas e de próstata pela administração do limoneno, na sua forma enantiômera D-limoneno. Assim como, os efeitos antiinflamatório, anestésico local e espasmolítico do  $\beta$ -cariofileno.

A respeito das espécies de *Psidium*, a análise da composição química das suas essências, evidenciou a presença preponderante do epi- $\alpha$ -muurolol (21,9%) para *P. cattleianum* Sabine e do viridiflorol (31,9%) para *P. parvifolium* Griseb., do  $\alpha$ -cadinol (46,6%) para *P. cymosum* Urb., do limoneno (43%) e do  $\alpha$ -pineno (39,5%) para *P. sartorianum* Niedz. todas provenientes de Cuba e estudadas por Pino e colaboradores (2003a) e (2004). Já para espécie *P. guajava* L. oriunda de Taiwan os compostos majoritários foram 1,8-cineol (12,%),  $\alpha$ -pineno (14,7%) e  $\beta$ -cariofileno (27,7%) (CHEN et al., 2007).

Um gênero bastante estudado no Brasil e no mundo é o *Eugenia*. Stefanello et al. (2006) estudaram a composição química e a atividade antimicrobiana contra vinte linhagens de bactérias, pelo método da difusão em poço, dos óleos obtidos das folhas e das flores de *Eugenia chlorophylla*. Houve predominância de sesquiterpenos e os constituintes majoritários foram:  $\beta$ -cariofileno, globulol, 1-epi-cubenol, epi- $\alpha$ -muurolol, e  $\alpha$ -cadinol. A composição do óleo proveniente das flores mostrou-se mais complexa quimicamente do que aquela apresentada pelo óleo das folhas. Todos os óleos exibiram efeitos antimicrobianos frente às bactérias Gram positivas, entretanto foram inativos contra as Gram negativas.

Os estudos desenvolvidos por pesquisadores brasileiros com essências produzidas por espécies de *Eugenia* apresentaram os seguintes resultados: *Eugenia mattsii*, com óleo rico em sesquiterpenos como o  $\beta$ -elemeno (16,1%),  $\beta$ -cariofileno (12,4%) e biciclogermacreno (17,5%) (APEL et al., 2005); *Eugenia florida* (germacreno D e biciclogermacreno) e *Eugenia mansoi* com viridifloreno (12,5%), *E,E*-farnesol (14,5%) e *E,Z*-farnesol (17,3%) (APEL et al., 2004a); *Eugenia uniflora* composto majoritariamente por furanodieno (50,2%) (MELO et al., 2007); *Eugenia brasiliensis* com uma riqueza preponderante em sesquiterpenos como  $\beta$ -cariofileno (12,6%),  $\beta$ -selineno (12,6%) e  $\alpha$ -selineno (14,8%) (FISCHER et al, 2005); *Eugenia brasiliensis* com  $\alpha$ -tujeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno, espatulenol e cubenol em diferentes proporções a depender da época da coleta (LIMA et al., 2007).

*Eugenia puniceifolia* coletada em diferentes localidades de Pernambuco apresentou altas concentrações de linalol e  $\beta$ -cariofileno em todas as amostras (OLIVEIRA et al., 2005); *Eugenia hyemalis* proveniente da região Sul do Brasil

produziu um óleo rico em biciclogermacreno (37,7%) e *Eugenia stigmata* do sudeste com óleo rico em ácido fisetérico (90,5%) (APEL et al., 2004b). Por fim, o estudo realizado por Ferri et al. (2008) com o óleo obtido dos frutos de *Eugenia dysenterica* em diferentes estágios de amadurecimento, evidenciou que o teor de óleo decresce à medida que os frutos amadurecem, e que a maturação dos frutos intensifica a síntese de sesquiterpenos em detrimento dos monoterpenos, sendo o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e o  $\gamma$ -muuroleno os constituintes majoritários do óleo oriundo dos frutos maduros.

Alguns trabalhos correlacionam o estudo da composição química dos óleos voláteis com testes de atividade biológica, como o de Medeiros et al. (2003) onde óleos obtidos de *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*, pelo método da difusão em disco. Os resultados apontaram óleos ricos em constituintes como o  $\beta$ -cariofileno, exibindo uma significativa atividade antimicrobiana.

Alguns estudos já demonstraram a eficácia das espécies de Myrtaceae ou de seus óleos, como moluscicida, por combater caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* (OLIVEIRA et al., 2006), leishmanicida *in vitro* (BEZERRA et al., 2006), inseticida (LIMA, 2006), antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6.538, *Escherichia coli* ATCC 8.739, *S. epidermidis* ATCC 12.228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027 e *Candida albicans* ATCC 10.231 (FRANCO et al., 2005) e acaricida (CHAGAS et al., 2002).

De acordo com Apel et al. (1998), as espécies desta família são ricas em sesquiterpenos que apresentam um amplo espectro de efeitos biológicos, como atividade antineoplásica, antimalária, antiviral e antimicrobiana. Investigações vêm sendo feitas com *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. quanto ao seu poder alelopático, ou seja, a capacidade de inibir o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas localizadas no seu entorno; isto implicaria na produção de herbicidas naturais, em substituição ao uso de similares sintéticos (SOUZA FILHO et al., 2006). Óleos essenciais de *Myrcia rostrata* DC., provenientes do Rio Grande do Sul, foram estudados por Limberger et al. (2004) e a análise química também revelou predominância de sesquiterpenos (93,3%), principalmente dos grupos cadinanos e germacranos. Quanto a *Myrcia alagoensis* O. Berg, até o presente momento não foram registradas publicações de estudos fitoquímicos, envolvendo esta espécie.

Espécies de diferentes gêneros da família Myrtaceae tiveram seus óleos essenciais, testados pelo método da microdiluição em placa quanto ao potencial antimicrobiano frente aos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Os óleos testados inibiram quase que totalmente o crescimento de *S. aureus*. Particularmente, com relação às espécies do gênero *Myrcia* DC., os potenciais de inibição foram significativos: *Myrcia detergens*, *Myrcia tomentosa* e *Myrcia brasiliensis* apresentaram valores respectivamente iguais a 96,1%; 89,7% e 76,4%. Porém, os mesmos óleos, quando testados frente ao crescimento de *E. coli*, revelaram atividade antimicrobiana apenas em *M. tomentosa*, com um valor de 54,7%. Estes resultados indicam o potencial antibacteriano contra microrganismos Gram positivos dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae (LIMA et al., 2005).

Nesse mesmo estudo, Lima et al. (2005) constataram que os óleos essenciais obtidos de diferentes espécies de Myrtaceae, coletadas no estado de São Paulo, exibiram uma composição química variada, sendo constituídos de substâncias com reconhecida atividade antimicrobiana e anestésica, a exemplo do eugenol.

Nota-se que apesar da significativa representatividade de gêneros e espécies da família Myrtaceae, a quantidade de estudos envolvendo os indivíduos deste grupo, assim como, os óleos por eles produzidos é ainda, nos dias em curso, incipiente.

No concernente à pesquisa química dos representantes da família Myrtaceae atrelado ou não à testes de atividade antimicrobiana, e mais precisamente, aos estudos dos óleos essenciais produzidos pelas espécies do gênero *Myrcia* DC., a carência de trabalhos publicados revela que ainda há muito a ser estudado. É provável que a escassez de dados sobre mirtáceas esteja mais relacionada à dificuldade encontrada pelos especialistas na identificação taxonômica das espécies, do que na falta de interesse por parte dos pesquisadores em investigar a química e a potencial utilização biológica e ecológica apresentada pelos representantes deste grupo.



## 3.7 AGENTES ANTIMICROBIANOS

### 3.7.1 Histórico

A coalhada de soja embolorada parece ter sido o primeiro antibiótico natural, utilizado pelos chineses, por volta do ano 500 a.C., para tratar furúnculos e outras infecções semelhantes. Quase tão antigo e presente em várias civilizações é o uso de pão mofado e teias de aranha em fermentos infectados. Embora os médicos tenham procurado nos anos seguintes uma espécie de medicamento que pudesse combater infecções causadas por bactérias, nenhum pesquisador pensou em investigar cientificamente o uso medicinal popular dos bolores (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). O conceito mais aceito define o antibiótico como uma substância química de origem sintética ou natural (ou seja, produzida por um microrganismo) e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, microrganismos, sem causar danos ao hospedeiro (por exemplo, o ser humano).

Tal definição exclui compostos como o etanol, que são ativos em concentrações maiores e tendem a exercer ação principalmente física sobre os microrganismos, esses compostos, geralmente, são conhecidos como antissépticos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados segundo o tipo específico de microrganismo inibido, desta maneira têm-se substâncias: antifúngicas, antibacterianas, antiparasitárias e antivirais. Para Eldin e Dunford (2001), o termo “antimicrobiano” foi usado pela primeira vez para descrever as plantas medicinais que destruíam diretamente o organismo causador da doença, ou agiam no sentido de aumentar a capacidade de o corpo combater a infecção fortalecendo o sistema imunológico. Portanto, as plantas desta categoria passaram a ser subdivididas em antifúngicas, antivirais, antibacterianas, antiparasitárias e grupos estimulantes do sistema imunológico.

O desenvolvimento dos antibióticos teve início em 1928, com a constatação

do bacteriologista escocês, Alexander Fleming, de que colônias do fungo *Penicillium* que haviam contaminado uma cultura de *Staphylococcus*, tinham impedido o crescimento bacteriano. Embora não tenha sido o primeiro a observar este fenômeno, Fleming reconheceu o seu potencial para conter infecções. Assim, a penicilina tornou-se disponível como um agente quimioterápico versátil e seguro para ser usado em seres humanos (BLACK, 2002). Neste sentido, os antibióticos podem ser definidos como produtos do metabolismo secundário de microrganismos, dotados da capacidade de inibir o processo de crescimento de outros microrganismos, inclusive quando utilizado em baixas concentrações (SATO, 2001).

Ao longo do tempo, a busca por novos antibióticos se processou por intermédio de métodos relativamente simples e rápidos para selecionar previamente os microrganismos com capacidade de produção de medicamentos com ação antibacteriana. Nessa tarefa, geralmente foram empregadas amostras de solo, por sua riqueza nesse tipo de organismos. A maioria deles pertencente a um grupo de seres vivos procarióticos ramificados, portadores de características morfológicas que ocupam uma posição intermediária entre o grupo dos fungos e o grupo das bactérias. Conforme Robbers et al. (1997), estes organismos situam-se na ordem taxonômica dos actinomicetáceos e recebem o nome comum de actinomicetos ou actinobactérias.

Uma compilação das fontes microbianas de antibióticos descobertas nos Estados Unidos e no Japão entre 1953 e 1970 revelou que aproximadamente 85% destes medicamentos eram produzidos por actinobactérias, 11% por fungos e 4% por bactérias. Mais recentemente, os antibióticos usados na terapêutica são produzidos por grupos pequenos e restritos de organismos entre os quais, existe um parentesco distante (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

É notório que o número de antibióticos descritos continua aumentando, principalmente devido aos programas intensivos de busca em todos os países industrializados. Em 1961, eram conhecidos 513 antibióticos, 4.076 em 1972, 7.650 em 1985, e atualmente, ao redor de 8.000. Além disso, têm sido detectadas em líquens, algas, animais superiores e plantas, em torno de 3.000 novas substâncias com atividade antibiótica (SATO, 2001).

Nestes termos, os antibióticos provavelmente representam o maior avanço da farmacoterapia nos últimos anos. Fundamentalmente, porque os mesmos, desde a sua descoberta, permitiram o controle efetivo de microrganismos patogênicos que

provocavam a incapacitação prolongada ou a morte de seres humanos, independente da idade, situação financeira ou higidez da pessoa atingida.

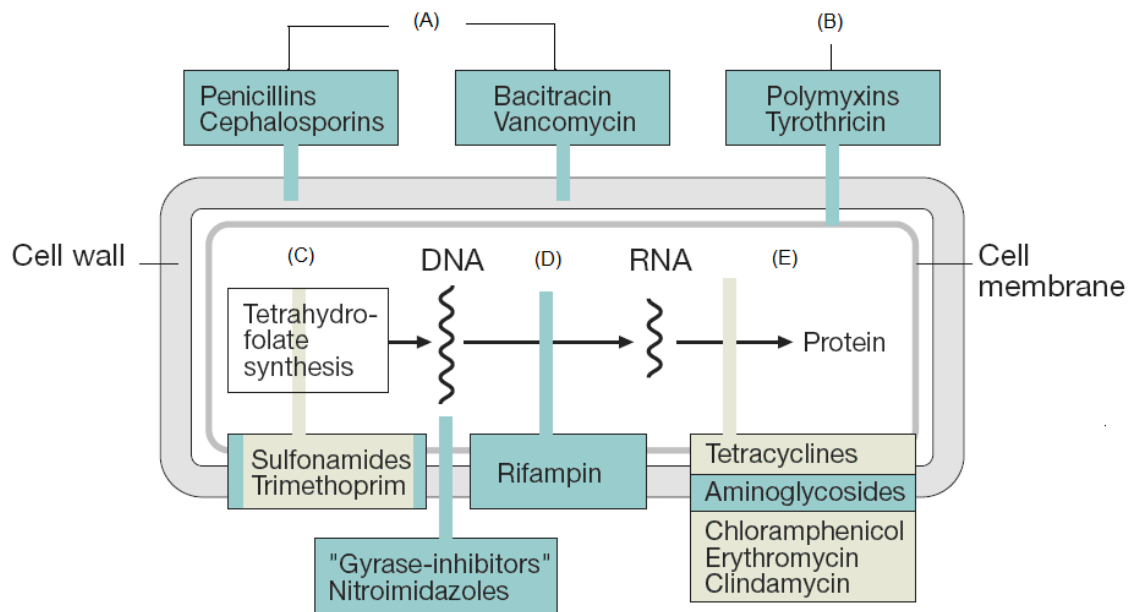
### **3.7.2 Aplicações**

Os antibióticos são usados principalmente como agentes terapêuticos nas infecções causadas por microrganismos sensíveis a eles. Assim, a maior parte desses fármacos é destinada à quimioterapia, mas alguns têm outras aplicações como na agricultura, contra doenças de plantas sejam de origem bacteriana ou fúngica, uma vez que podem ser mais úteis que os produtos químicos sintéticos. É bastante difundida também a prática de desinfecção de sementes com antibióticos. Além disso, podem ser utilizados como preservantes de alimentos e cosméticos, como estimuladores do crescimento animal e do aumento de peso e na medicina veterinária, tendo em vista que as rações animais são processadas mais eficientemente no sistema digestório do animal. (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 2001).

Tal gama de aplicações faz da indústria de antibióticos um ramo altamente lucrativo em todo o mundo. De acordo com Sato (2001), a produção mundial de antibióticos está por volta das 100.000 toneladas ao ano e as vendas brutas anuais, só nos EUA eram de US\$ 1 bilhão em 2000. Acredita-se que os antibióticos como aditivos de alimentos tenham um mercado mundial de US\$ 100 milhões.

### **3.7.3 Mecanismos de ação**

Compreender o modo de ação dos fármacos antimicrobianos (Figura 17) é importante para determinar a sua utilidade clínica, uma vez que tal procedimento aumenta enormemente o potencial para a sofisticação da terapia (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).



**Figura 17:** Principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos: em A, inibição da síntese do peptídeo glicano; em B, alteração da estrutura da membrana celular; em C, inibição da síntese de metabólitos essenciais; em D, interferência do metabolismo dos ácidos nucleicos; e em E, inibição da biossíntese protéica.

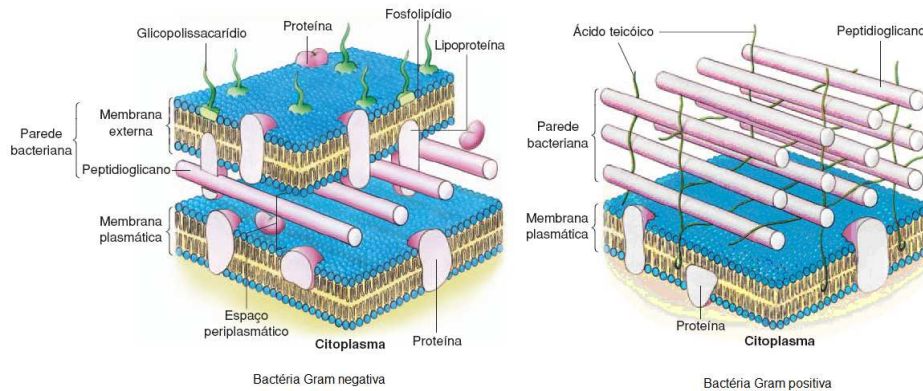
**Fonte:** LÜLLMANN et al., 1996.

De acordo com LEVINSON e JAWETZ (2006), foram identificados cinco mecanismos gerais de ação:

- inibição da síntese do peptídeo glicano da parede celular do microrganismo;
- alteração da função normal da membrana celular, pela inibição de algumas enzimas citoplasmáticas;
- inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais como o ácido tetraidrofólico que funciona como doador do grupamento metila na síntese de nucleotídeos, precursores do ácido nucleico;
- interferência no metabolismo do ácido nucleico pela alteração da síntese e replicação do DNA ou inibição da enzima RNA-polimerase;
- inibição da biossíntese protéica.

Para que haja inibição da formação da parede celular bacteriana é necessário que a síntese dos mucopéptídeos que a constituem seja interrompida. As bactérias Gram positivas são particularmente suscetíveis aos antibióticos que inibem a formação de mucopéptídeos porque sua parede celular contém uma camada

relativamente espessa destes constituintes, conhecida como peptidoglicano, a qual favorece uma maior sustentação estrutural do citoplasma devido à sua natureza e estrutura químicas (Figura 18).



**Figura 18:** Representação esquemática da estrutura das paredes celulares de bactérias Gram negativas e Gram positivas.

**Fonte:** TORTORA et al., 2005.

Segundo ROBBERS e colaboradores (1997), há a necessidade de uma maior sustentação nas bactérias Gram positivas, porque as mesmas concentram metabólitos de baixo peso molecular, como aminoácidos, que lhe conferem alta pressão osmótica interna. Por outro lado, as Gram negativas têm uma pressão osmótica interna relativamente baixa, sendo suficiente uma camada muito mais delgada de mucopeptídeo.

A formação de uma proteína essencial pode ser bloqueada em qualquer um dos estágios básicos de sua biossíntese. O antibiótico poderia exercer influência deletéria sobre a replicação da síntese do DNA, sobre a transcrição do código genético e da síntese seqüencial específica do RNAm ou sobre a síntese e a organização dos ribossomos. Todos esses processos biológicos são fundamentais para a síntese final de uma proteína, porém muitos dos componentes que atuam nesses níveis tendem a ser relativamente tóxicos. A toxicidade seletiva dos inibidores da síntese de proteínas resulta do fato de que as células do hospedeiro humano têm ribossomos 80S (com subunidades 40S e 60S), e não 70S (com subunidades 30S e 50S) como as bactérias, e os antibióticos usados são seletivos para ribossomos 70S (TRABULSI; TOLEDO, 2004).

Entretanto, as células humanas têm ribossomos 70S em suas mitocôndrias, e

alguns antibióticos muito lipofílicos provocam intoxicação quando administrados em altas doses. Isto decorre da capacidade destes agentes antimicrobianos em penetrar através da membrana mitocondrial, inibindo a síntese de proteínas destas estruturas. No que se refere ao metabolismo do DNA há muita coisa em comum entre procariontes e organismos superiores, por isso, a maioria dos antibióticos que interferem no metabolismo do DNA é muito tóxica, sendo esses fármacos utilizados preponderantemente como agentes antitumorais (JAWETZ et al., 2000).

Outros antibióticos afetam a permeabilidade da membrana celular de um modo que provoca o vazamento dos solutos citoplasmáticos. Os dois grupos mais importantes são os antibióticos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os antibióticos peptídicos, tais como as polimixinas. A seletividade para fungos baseia-se em ligações seletivas ao ergosterol, esterol encontrado nos fungos, mas não em células humanas. A seletividade não é completa, e os polienos são agentes relativamente tóxicos (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

A partir do exposto, nota-se que uma das limitações para o uso terapêutico de um antibiótico é a sua toxicidade em mamíferos. Teoricamente, o antibiótico mais seguro é aquele que inibe um processo essencial (tal como a formação da parede celular), e exclusivo do microrganismo sendo, portanto, inócuo ao hospedeiro. Nestes termos, a toxicidade seletiva é um dos aspectos mais relevantes da terapia antimicrobiana, isto é, a inibição seletiva do crescimento do microrganismo, sem dano ao hospedeiro. Tal seletividade é obtida pela exploração das diferenças existentes entre o metabolismo e a estrutura do microrganismo e as características correspondentes nas células hospedeiras (LEVINSON; JAWETZ, 2006).

Assim, quanto mais seletivo um antimicrobiano para o metabolismo do agente patogênico, menor a possibilidade do aparecimento de reações adversas para o hospedeiro. Por exemplo, as células humanas não têm paredes, e os antibióticos que inibem paredes celulares, como as penicilinas, costumam ser muito seguros e com amplo espectro terapêutico. Em contrapartida, tanto as células dos procariontes quanto as humanas têm membranas, e os antibióticos que rompem membranas celulares tendem a ser muito tóxicos (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

Além disso, o mecanismo de ação determinará se o antibiótico é bactericida (quando causa a morte dos microrganismos na fase de crescimento logarítmico; período no qual há um aumento da atividade metabólica, acarretando numa acentuação da suscetibilidade ao antimicrobiano); ou bacteriostático (quando inibe o

crescimento exponencial dos microrganismos). Na maioria das vezes, os inibidores da síntese das paredes celulares são bactericidas, visto que as células sofrem lise na ausência de paredes intactas. Por outro lado, em sua maioria, os inibidores da síntese protéica têm ação reversível e são bacteriostáticos porque as células continuam proliferando depois da retirada do antibiótico (JAWETZ et al., 2000).

### **3.7.4 Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem aumentado muito nos últimos anos e representam um problema global, sendo uma das principais causas de complicações terapêuticas da clínica médica na atualidade (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Os mecanismos de resistência aos antibióticos podem advir de mutação genética espontânea ou induzida. No entanto, muitos dos problemas práticos ocorreram através do processo de seleção artificial. Em outras palavras, o uso indiscriminado de antibióticos, favoreceu paulatinamente, a exacerbação da frequência de microrganismos do genótipo resistente que naturalmente existiam na população natural sensível.

Um dos principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos são a inativação enzimática do antibiótico e a alteração da permeabilidade do agente patogênico ao antibiótico. Um exemplo de alteração da permeabilidade encontra-se em espécies de *Pseudomonas*, cuja resistência a antibióticos se deve em parte à sua capacidade de interferir na estrutura das porinas (poros das membranas externas que se abrem e fecham segundo controle exercido por proteínas), através das quais os antibióticos devem passar. Conjetura-se a possibilidade de que algumas das sequências que codificam a resistência aos antibióticos teriam surgido devido à transferência de genes dos organismos naturalmente produtores do antibiótico, os quais seriam detentores de “habilidades” para resistir aos agentes antimicrobianos que eles mesmos produzissem, com o intuito de evitar a autotoxicidade (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

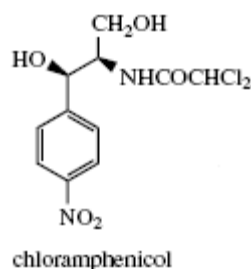
Analisando a emergência de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, conclui-se que o fato de muitos antibióticos já terem sido descobertos não faz cessar a pesquisa por novos. De acordo com Black (2002),

enquanto existirem doenças infecciosas sem tratamento, a pesquisa continuará. Mesmo quando um tratamento eficaz estiver disponível, será sempre possível e necessário que outro melhor, menos tóxico ou mais barato seja encontrado.

### 3.7.5 Alguns agentes antimicrobianos

#### 3.7.5.1 Cloranfenicol

O cloranfenicol (Figura 19) foi obtido inicialmente numa cultura de *Streptomyces venezuelae*, microrganismo isolado em 1947 de uma amostra de solo colhida nas proximidades de Caracas, Venezuela. Esse antibiótico despertou muito interesse por ser o primeiro a apresentar um espectro realmente amplo, por abranger bactérias Gram negativas e Gram positivas, alguns organismos rickettsia e um pequeno número de vírus. Atua através da inibição da síntese protéica nos ribossomos. Liga-se reversivelmente à subunidade 50S e rompe a peptidiltransferase, enzima que catalisa a formação de ligações peptídicas. Apresenta pouca afinidade pelos ribossomos 80S (dos mamíferos), embora, devido à sua lipofilidade, é provável que ele penetre nas mitocôndrias e iniba seus ribossomos 70S acarretando a supressão da medula óssea (DEWICK, 2002).



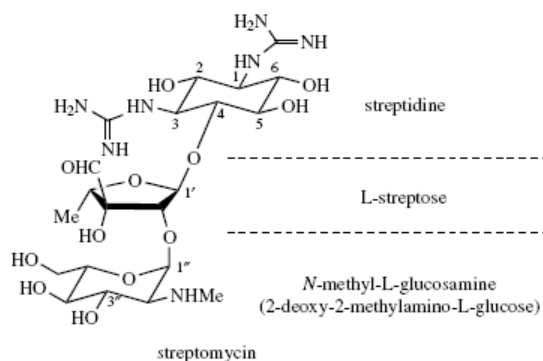
**Figura 19:** Estrutura química do Cloranfenicol  
**Fonte:** DEWICK, 2002.



Do ponto de vista químico, o cloranfenicol é bastante simples. Seu esqueleto molecular indica que ele se origina através do metabolismo dos fenilpropanóides. Estudos experimentais feitos com precursores radioativos confirmaram a presença de uma seqüência constituída por ácido chiquímico e fenilpropanóide na biossíntese biológica deste agente antimicrobiano (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

### 3.7.5.2 Estreptomicina

A estreptomicina (Figura 20) foi o primeiro antibiótico aminoglicosídico descoberto. Este agente antimicrobiano foi isolado em 1944 de uma cepa de *Streptomyces griseus*, depois de ter sido notado o efeito inibitório de seus metabólitos sobre bactérias Gram negativas *in vitro*. Age interferindo na biossíntese de proteínas por atuação na subunidade 30S dos ribossomos bacterianos. O estudo de sua biossíntese mostrou que os três componentes (estreptidina, L-estreptose e N-metil-L-glicosamina) são derivados da D-glicose (DEWICK, 2002).



**Figura 20:** Estrutura química da Estreptomicina.  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

O uso difundido de antibióticos aminoglicosídeos é limitado devido à sua nefrotoxicidade. Assim, eles são restritos ao tratamento de infecções sérias, a exemplo da tuberculose, contra linhagens resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, quando os agentes menos tóxicos têm se mostrado ineficazes. A resistência bacteriana a estes agentes contribuiu para seu crescente desuso.

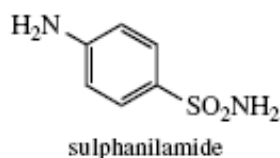
Diversos mecanismos têm sido identificados, dentre eles a produção de enzimas que inativam o antibiótico.

### 3.7.5.3 Novobiocina

A novobiocina é produzida por *Streptomyces niveus* e *Streptomyces spheroides*. Sua estrutura leva a crer que ela tem origem numa biossíntese biológica pouco comum, de que parecem participar partes derivadas de vias metabólicas de aminoácidos, acetatos e carboidratos. Seu espectro de atividade é predominantemente Gram positivo. É um inibidor específico da DNA girase, acarretando numa alteração na síntese do ácido desoxirribonucléico. Os estafilococos costumam ser muito sensíveis a este composto, mas a resistência se desenvolve rapidamente (ROBBERS; SPEENDIE; TYLER, 1997).

### 3.7.5.4 Sulfonamida

Também conhecidas como sulfas, as sulfonamidas constituem um grande grupo de agentes bacteriostáticos inteiramente sintéticos. A maioria é derivada da sulfanilamida (Figura 21), que atua como um antimetabólito do ácido p-aminobenzóico (PABA), um dos precursores do ácido fólico (DEWICK, 2002).



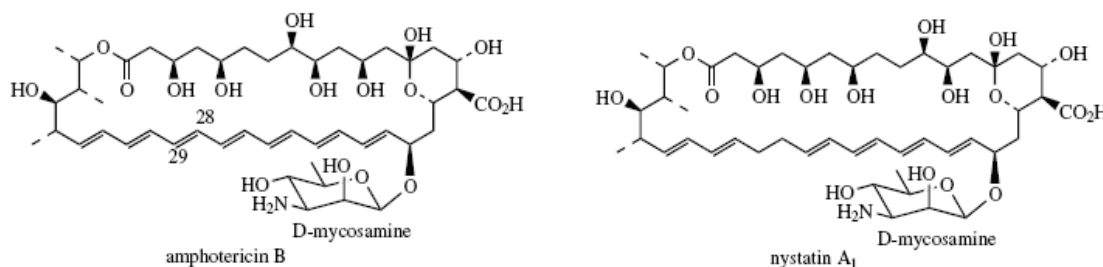
**Figura 21:** Estrutura química da Sulfanilamida.  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

Neste sentido, o mecanismo de ação das sulfonamidas baseia-se no bloqueio da síntese do ácido fólico, o qual é necessário para a elaboração das bases

nitrogenadas do DNA. As sulfonamidas têm sido substituídas por antibióticos, uma vez que estes últimos são mais específicos em seus mecanismos de ação e menos tóxicos do que as primeiras. São usadas para tratar alguns casos de meningite porque penetram no fluido cerebrospinal com maior facilidade do que o fazem os antibióticos (BLACK, 2002).

### 3.7.5.5 Polienos: Anfotericina B e Nistatina

Os polienos são um grupo de lactonas macrocíclicas que atuam destruindo a integridade da membrana celular dos organismos suscetíveis. Esta ação pode estar relacionada com sua ligação a esteróides na membrana e com a formação de poros aquosos. Tal mecanismo explicaria a ausência de atividade antibacteriana, já que a membrana das bactérias não apresenta componentes esteroidais (DEWICK, 2002).



**Figura 22:** Estruturas químicas da Anfotericina B e da Nistatina.

**Fonte:** DEWICK, 2002.

Nos fungos, a anfotericina B liga-se firmemente ao ergosterol presente na membrana celular. Esta interação resulta em alterações na fluidez da membrana acarretando a perda de moléculas e íons da célula fúngica, e eventualmente, morte celular. As células de mamíferos são relativamente resistentes a estas ações, devido à ausência do ergosterol, entretanto a ligação ao colesterol apesar de fraca é suficiente para ocasionar os efeitos colaterais tóxicos do fármaco. A anfotericina B é produzida por *Streptomyces nodosus* e a nistatina é produzida por *Streptomyces noursei*, ambos os compostos (Figura 22) são utilizados no tratamento de infecções

que têm como agentes etiológicos fungos, a exemplo das leveduras do gênero *Candida* (JAWETZ et al., 2000).

### 3.8 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 3.8.1 *Staphylococcus aureus*

Abrange cocos Gram positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. É considerado um patógeno humano oportunista e frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Embora faça parte da microbiota da pele e mucosas humanas, esta espécie é uma das mais importantes entre os estafilococos, pois pode produzir infecções que apresentam alto índice de mortalidade, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos. O *S. aureus* é relativamente resistente, seu estado vegetativo resiste a até 60 °C, radiação, dessecação e locais de elevada pressão osmótica. Produz toxinas termoestáveis, capazes de resistir à ebulição por 30 minutos. Estas toxinas contribuem para a patogenicidade da bactéria, uma vez que podem exacerbar a sua capacidade em invadir e danificar tecidos (TRABULSI; TOLEDO, 2004).

#### 3.8.2 *Bacillus cereus*

O gênero *Bacillus* inclui bastonetes Gram positivos aeróbios, que ocorrem em cadeias. O *Bacillus cereus* pode desenvolver-se em alimentos e produzir uma enterotoxina termoestável que causa intoxicação alimentar. Algumas vezes estes microrganismos podem produzir doenças como meningite, endocardite, endoftalmite, conjuntivite ou gastroenterite aguda, em seres humanos imunocomprometidos (JAWETZ et al., 2004).

### 3.8.3 *Escherichia coli*

São bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, comumente encontrados no trato intestinal de seres humanos e animais. Podem provocar complicações clínicas como diarreia, disenteria, colite hemorrágica, septicemias, gastroenterites, infecções urinárias e pneumonia em pacientes imunocomprometidos, além de meningites em neonatos. Sua presença na água e alimentos é indicativa de contaminação fecal. Apresentam diferentes mecanismos de resistência, entre eles a produção de  $\beta$ -lactamases (TORTORA, 2005).

### 3.8.4 *Pseudomonas aeruginosa*

O grupo *Pseudomonas* consiste em bastonetes Gram negativos, aeróbios e móveis. A *Pseudomonas aeruginosa* é quase sempre encontrada em pequeno número na microbiota intestinal e cutânea de humanos, constituindo o principal patógeno do grupo. Distribui-se amplamente na natureza, sendo encontrada em ambientes úmidos dos hospitais. Pode provocar doenças em indivíduos com defesas orgânicas anormais. Cresce facilmente em diversos meios de cultura, produzindo às vezes, odor adocicado. Forma colônias de coloração esverdeada, proveniente de pigmentos hidrossolúveis (JAWETZ et al., 2000).

Sua importância clínica está baseada na resistência natural e adquirida aos diversos antibacterianos de uso habitual. Os principais mecanismos de resistência são: a síntese de  $\beta$ -lactamase, a impermeabilidade da membrana, a presença de sistemas de efluxo e a aquisição de plasmídios de resistência. Está envolvida em doenças humanas, principalmente em casos de queimaduras, diálises, transplantes, diabetes, imunodeficiência ou uso prolongado de cateter (TRABULSI; TOLEDO, 2004).

### 3.8.5 *Salmonella choleraesuis*

São bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Não são hospedeiros normais do trato gastrointestinal, e em caso de infecção, indicam a ingestão de alimentos, água ou leite contaminado por fezes humanas ou de animais. Frequentemente causa gastroenterites, infecção aguda da mucosa intestinal. A taxa de mortalidade é baixa, menor que 1% (TORTORA, 2005)

### 3.8.6 *Candida albicans*

É uma levedura de forma oval, que produz pseudo-hifas tanto em cultura quanto em tecidos e exsudados. Trata-se de um membro da microbiota normal das mucosas dos tratos respiratório, gastrintestinal e genital feminino. Nesses locais, pode predominar e estar associada a condições patológicas. Algumas vezes, provoca doença sistêmica progressiva, em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, sobretudo se houver comprometimento da imunidade celular. *Candida* pode produzir invasão da corrente sanguínea, tromboflebite, endocardite ou infecção dos olhos e de praticamente qualquer órgão ou tecido quando introduzida por via intravenosa. A taxa de mortalidade em caso de candidíase sistêmica está acima de 70%, mesmo em pacientes com início de terapia antifúngica. Devido ao desenvolvimento rápido de resistência a antifúngicos, este tem sido o microrganismo que tem causado sérios problemas no ambiente hospitalar (JAWETZ et al., 2004).

### 3.8.7 *Candida parapsilosis*

É considerada um dos principais fatores de infecções da musculatura cardíaca, vaginites, lesões de mucosas e da pele, afluindo principalmente, pacientes imunodeprimidos. Há indícios de que esta espécie é produtora de um biofilme marcador capaz de aumentar a incidência de bactérias. De acordo com a

literatura, infecções fúngicas causadas pela *Candida parapsilosis* está, epidemiologicamente, associada à implantes, a exemplo do marcapasso, e à cateteres venosos (TITTON et al., 2009).

### 3.9 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS

A partir da sua descoberta, a penicilina passou a ser produzida em quantidades cada vez maiores nos anos subseqüentes. Seu poder e disponibilidade deram origem à “era dos antibióticos”, uma das maiores revoluções na saúde pública e na medicina. Entretanto, em 1959, Sawada e colaboradores estudando a transferência horizontal de genes, demonstram que a resistência aos antibióticos poderia ser adquirida por intermédio de plasmídeos, inclusive entre linhagens diferentes. No mesmo ano, eram feitos comentários de que o desenvolvimento da resistência aos antibióticos ocorria como uma resposta à introdução de agentes antimicrobianos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Diante da emergência de cepas resistentes à terapêutica vigente, os laboratórios de microbiologia foram impulsionados a elaborar metodologias para avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos. Em 2003, o National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS), indica a realização de testes de sensibilidade para qualquer organismo causador de um processo infeccioso que justifique a terapêutica medicamentosa e que apresente resistência aos agentes farmacológicos geralmente usados. Nota-se que tais testes podem ser importantes também nos estudos epidemiológicos de resistência, e na busca de novos agentes antimicrobianos.

Assim, ao longo do tempo, diversos testes foram desenvolvidos para medir a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos aos agentes antimicrobianos: difusão em disco, difusão em poço, macrodiluição e microdiluição em caldo, entre outros. Os laboratórios clínicos e de pesquisa têm utilizado, preferencialmente, a microdiluição em caldo com posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este tem sido o método de escolha, porque além de permitir a avaliação qualitativa do agente antimicrobiano (pela presença ou ausência de atividade), mede

quantitativamente a concentração mínima do composto capaz de inibir *in vitro* o crescimento de determinado microrganismo (NCCLS, 2003).

Vários comitês internacionais de padronização (cada um com particularidades que refletem as características das cepas estudadas em seus respectivos países de origem) disponibilizam protocolos de referência, a exemplo do National Committee for Clinical Laboratory Standards atual Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI – EUA). O Brasil, até o momento, não possui normas definidas para a sua realidade. A maioria dos laboratórios adota o NCCLS, porém de forma não oficial (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

O NCCLS pode ser definido como uma organização internacional interdisciplinar e sem fins lucrativos, que promove o desenvolvimento de normas e diretrizes voltadas para a resolução de questões relacionadas com a atenção à saúde (NCCLS, 2003). Suas recomendações são publicadas anualmente através de documentos que definem os critérios de interpretação dos resultados, as técnicas, a forma de preparação dos testes, o tamanho do inóculo microbiano, além do tempo e da temperatura de incubação.

É de se esperar que o resultado final dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos, seja influenciado de maneira significativa pela metodologia. Por isso, os métodos devem ser cuidadosamente controlados para que possam ser obtidos dados confiáveis e reprodutíveis intra e interlaboratórios (NCCLS, 2003). Nota-se que a utilização de protocolos como os disponibilizados pelos comitês internacionais de padronização é de fundamentação importância para garantir e favorecer o intercâmbio de informações entre os membros da comunidade científica.

Para Trabulsi e Toledo (2004), o método da diluição em caldo consiste em se preparar diluições sucessivas de um agente antimicrobiano, em meio de cultura líquido, semear a placa com um inóculo, e após incubação, verificar a menor concentração (maior diluição) do agente que inibiu o crescimento do microrganismo. Esta concentração é geralmente chamada de Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

Neste sentido, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição em caldo é um ensaio quali-quantitativo *in vitro* aplicado na avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou de substâncias puras. Este método analisa em meio de cultura líquido, o comportamento de diferentes microrganismos frente a concentrações decrescentes do agente



antimicrobiano. A menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos é denominada, conforme supracitado, Concentração Inibitória Mínima (NCCLS, 2003).

Na metodologia são utilizadas placas de microtitulação com 96 poços (Figura 35), nas quais uma série de diluições do provável agente antimicrobiano é realizada em meio líquido. Os poços são inoculados com uma suspensão do microrganismo e as placas são incubadas. Após o período de incubação, a CIM é determinada, e o conteúdo dos poços onde não foi observado crescimento, é utilizado para semear placas portando meio sólido. Tal procedimento é feito com o intuito de avaliar se a atividade do agente é bacteriostática/fungistática ou bactericida/fungicida, bem como determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), para bactérias, ou a Concentração Fungicida Mínima (CFM), para leveduras e fungos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Visando avaliar a provável interferência da sazonalidade na composição química, bem como na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos de *Myrcia alagoensis* O. Berg, *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC., a coleta das amostras (Figura 23) foi efetuada em quatro momentos diferentes entre os anos 2008 e 2009, no período entre as 6 e 8h da manhã. O local de coleta trata-se de um remanescente de Floresta Ombrófila (12° 10' S e 38° 24' W), em estágio secundário de regeneração, localizado no município de Alagoinhas, no estado da Bahia. As datas, bem como as estações do ano correspondentes a cada uma delas estão ilustradas na Tabela 01.



**Figura 23:** Coleta do material vegetal.  
**Foto:** SILVA, 2009.

Após coletado, o material fértil foi devidamente herborizado para a confecção das exsiccatas, as quais foram depositadas no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB). Uma exsiccata de cada uma das três espécies foi doada ao Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). A identificação taxonômica foi realizada com a colaboração do Prof. Nilson Gonçalves de Jesus, do

Departamento de Ciências Exatas e da Terra/DCET, do Campus II da Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

**Tabela 01:** Data e estação do ano correspondente à cada coleta de material vegetal.

| COLETAS | DATA       | ESTAÇÃO DO ANO     |
|---------|------------|--------------------|
| 1       | 15/12/2008 | FINAL DA PRIMAVERA |
| 2       | 21/03/2009 | FINAL DO VERÃO     |
| 3       | 15/06/2009 | FINAL DO OUTONO    |
| 4       | 25/09/2009 | PRIMAVERA          |

A Tabela 02 mostra as espécies de *Myrcia* DC. utilizadas na presente pesquisa e os respectivos números de tombo que as exsicatas receberam tanto no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB), quanto no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

**Tabela 02:** Números de Tombo das exsicatas no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB) e no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

| Espécies                             | Números de Tombo |         |
|--------------------------------------|------------------|---------|
|                                      | HUNEB            | HUEFS   |
| <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg     | 12.215           | 155.925 |
| <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC. | 12.216           | 155.924 |
| <i>Myrcia rostrata</i> DC.           | 12.217           | 155.923 |

As folhas de cada exemplar coletado foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON-UEFS) para a realização do processo de hidrodestilação.

Para a espécie *Myrcia alagoensis* O. Berg, foram feitas duas coletas preliminares. A primeira ocorreu em 15 de janeiro de 2007. Após a coleta, o material vegetal foi separado em dois volumes: uma parte das folhas foi hidrodestilada ainda fresca, e a outra foi seca em temperatura ambiente. Somente após a secagem, o óleo foi obtido por hidrodestilação. O objetivo desta coleta foi avaliar, preliminarmente, se o período de secagem poderia influenciar causando variações quantitativas e/ou qualitativas na composição química dos óleos essenciais.

Em 10 de março de 2008, foi realizada outra coleta preliminar à avaliação sazonal proposta nos objetivos da presente pesquisa. Foi coletado material vegetal apenas das espécies *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram obtidos das folhas frescas. O material foi pesado (Figura 24) e em seguida, triturado em um liquidificador industrial com a frequente adição de água destilada para facilitar o processo (Figura 25). Após triturada, a biomassa vegetal foi transferida para um balão de destilação com capacidade para 5 L, sendo submetida à hidrodestilação, em um aparelho de Clevenger (Figura 26), por um período de três horas, contadas a partir do início do refluxo da água condensada, do tubo separador para o balão de destilação.

Após este intervalo de tempo, esperou-se o sistema estabilizar para que fosse realizada a leitura do volume de óleo extraído. Os óleos obtidos foram retirados do tubo separador com o auxílio de uma micropipeta do tipo Pasteur, sendo *a posteriori* desidratados pela adição de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrados e conservados em frascos de vidro. Os quais foram adequadamente vedados e armazenados sob baixa temperatura, até a realização da análise química e dos testes de atividade antimicrobiana. Cada amostra de óleo essencial recebeu um código, que informava a espécie da qual o mesmo havia sido extraído, bem como a estação do ano na qual a coleta das folhas foi realizada (Apêndice A).

Ao hidrolato (mistura de óleo essencial e água) remanescente no tubo separador, foram adicionadas 5 mL do solvente heptano, visando separar pequenas porções de óleo dispersas na água condensada. A mistura hidrolato-heptano foi transferida para um funil de separação (Figura 27). Após a separação das duas fases: apolar (heptano e óleo) e polar (água), a solução heptânica foi removida do recipiente, desidratada com a adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada e acondicionada em frascos de vidro. Sendo os mesmos mantidos sob condições semelhantes às das amostras de óleo essencial.

Soluções de óleo em heptano são utilizadas, eventualmente, na análise da composição química de óleos voláteis, quando o rendimento destes é

demasiadamente ínfimo, a ponto de impossibilitar a sua remoção do equipamento de hidrodestilação.



**Figura 24:** Pesagem do material.  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 25:** Trituração do material vegetal.  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 26:** Hidrodestilação em aparelho de Clevenger.  
**Foto:** SILVA, 2009



**Figura 27:** Funil de Separação  
**Foto:** SILVA, 2009

O teor de óleo essencial de cada amostra foi determinado pela relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal livre de umidade, conforme a Equação 02. Para a obtenção do teor de umidade presente nas folhas, aproximadamente 1 g do material vegetal fresco foi pesado e submetido a um Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®.

Este equipamento possui como fonte de calor o infravermelho. De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, no modo automático, o determinador provoca a desidratação de um grama da amostra, num intervalo de tempo de dez

minutos e sob a temperatura de até 100 °C. O percentual de umidade perdido pela amostra durante o aquecimento é detectado e fornecido, assim como a massa vegetal remanescente (Figura 28).



**Figura 28:** Teor de umidade presente na amostra detectado pelo Determinador de Umidade Marte®.  
**Foto:** SILVA, 2009.

$$TO = \frac{Vo}{Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100}\right)} \times 100$$

Onde:

TO = Teor de óleo essencial (%)

Vo = Volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador.

Bm = Biomassa vegetal (g)

U = Teor de umidade presente na biomassa vegetal (%)

**Equação 02:** Cálculo do rendimento de óleos essenciais.

### 4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada pela combinação de duas técnicas: Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).



**Figura 29:** Cromatógrafo a Gás Varian®.  
Foto: SILVA, 2009.

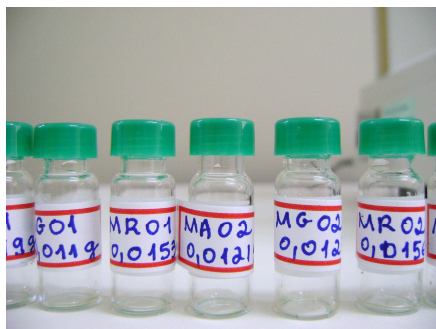


**Figura 30:** Cromatógrafo a Gás Shimadzu®.  
Foto: SILVA, 2009.

Na análise por Cromatografia Gasosa foi utilizado um Cromatógrafo Varian® CP-3380 (Figura 29), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0,5 mm), com espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor de 220  $^{\circ}\text{C}$  e do detector de 240  $^{\circ}\text{C}$ , hélio como gás de arraste na vazão de 1 mL/min, com programa de temperatura do forno de: 60  $^{\circ}\text{C}$  a 240  $^{\circ}\text{C}$  (3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), mantendo uma isoterma de 240  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.

As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu® (Figura 30), coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), com espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor 220  $^{\circ}\text{C}$ , gás de arraste hélio na vazão de 1 mL/min, temperatura da interface de 240  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura da fonte de ionização de 240  $^{\circ}\text{C}$ , energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60  $^{\circ}\text{C}$  a 240  $^{\circ}\text{C}$  (3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), mantendo uma isoterma de 240  $^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.

Antes da injeção, aproximadamente 0,01 g de cada amostra de óleo essencial foi pesada em balança analítica (Figuras 31 e 32) e diluída em 500  $\mu\text{L}$  do solvente trimetilpentano. Um volume de 0,2  $\mu\text{L}$  desta solução foi injetado, sob as mesmas condições supracitadas, no CG/DIC e duas vezes no CG/EM com razões de split de 1:100 e 1:30. Para determinação do índice de Kovats foi efetuada uma análise no CG/DIC, onde um volume de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução a 5% de n-alcenos (C8 a C24) foi adicionada às amostras de óleo que haviam sido previamente diluídas em trimetilpentano.



**Figuras 31 e 32:** Preparação das amostras para a injeção.  
**Foto:** SILVA, 2009.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats (Equação 01) e do índice Aritmético (Equação 03) de cada um dos picos. Os índices foram calculados com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos ( $C_8$  a  $C_{24}$ ).

$$IA = 100N + \left[ 100 \left[ \frac{TR_{(A)} - TR_N}{TR_{(N+1)} - TR_N} \right] \right]$$

Onde:

**AI = Índice Aritmético**

**N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano ( $C_8$  a  $C_{24}$ )**

**TR(A) = tempo de retenção do pico calculado**

**TR(N) = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado**

**TR(N + 1) = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado**

**Equação 03:** Cálculo do Índice Aritmético.

Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, pela consulta da literatura especializada (ADAMS, 2007; JOULAIN; KONIG, 1998) e pela injeção de padrões. Já a quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização.



#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras dos óleos com rendimento suficiente foram individualmente testadas contra microrganismos através do método da microdiluição em placa, com posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) também foram determinadas através do plaqueamento de cada um dos poços, nos quais a inibição do crescimento dos microrganismos foi observada.

Os microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana, bem como suas respectivas resistências e/ou sensibilidades, quando presentes, encontram-se listados na Tabela 03.

Todas as cepas utilizadas pertencem à Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) do Laboratório de Pesquisas em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-BA).

**Tabela 03:** Microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

| CÓDIGOS  | MICROORGANISMOS                | RESISTÊNCIAS E/OU SENSIBILIDADES                        |
|----------|--------------------------------|---|
| CCMB 262 | <i>Staphylococcus aureus</i>   | cepa resistente à estreptomicina e diidroestreptomicina |
| CCMB 263 | <i>Staphylococcus aureus</i>   | cepa resistente à novobiocina                           |
| CCMB 282 | <i>Bacillus cereus</i>         | -   |
| CCMB 261 | <i>Escherichia coli</i>        | cepa sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida |
| CCMB 284 | <i>Escherichia coli</i>        | -   |
| CCMB 281 | <i>Salmonella choleraesuis</i> | -   |
| CCMB 268 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | -   |
| CCMB 266 | <i>Candida albicans</i>        | -   |
| CCMB 288 | <i>Candida parapsilosis</i>    | -   |

Para o repique dos microrganismos (Figura 33) e para a determinação da Concentração Bactericida Mínima e da Concentração Fungicida Mínima foi utilizado o meio de cultura Agar Mueller Hinton. Para o preparo de 1.000 mL de meio foram utilizados 21 g de Caldo Mueller Hinton (Himedia®) e 25 g de Agar (Himedia®) diluídos em água destilada. O meio de cultura foi autoclavado e vertido em placas de Petri previamente esterilizadas.



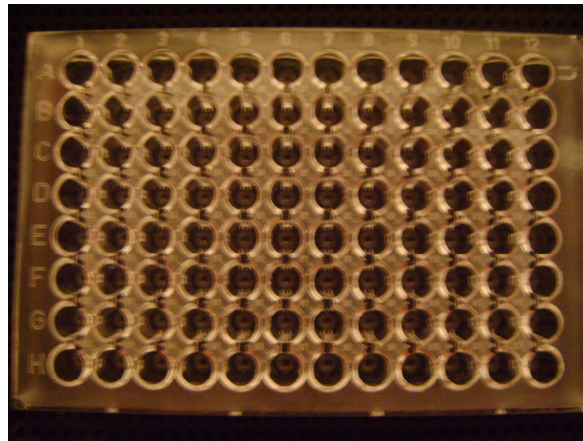
**Figura 33:** Repique das leveduras  
**Foto:** SILVA, 2009

Para a execução da microdiluição em caldo, foi utilizado o meio de cultura Caldo Mueller Hinton (Himedia®) em duas concentrações diferentes (uma e duas vezes concentrado). Para o preparo deste meio, o fabricante recomenda que 21 g do Caldo Mueller Hinton (CMH), sejam diluídos em água destilada até o volume final de 1.000 mL de solução, logo, numa concentração de 0,021 (m/v). Já para a obtenção do meio duas vezes concentrado (0,042), dobrou-se a massa de CMH utilizada para o mesmo volume final de solução usado no preparo do meio mais diluído, ou reduziu-se o volume à metade, mantendo-se a mesma quantidade de meio de cultura. Após o preparo, ambos os meios foram autoclavados.

No ensaio foram utilizados dois reveladores: a rezasurina (Vetec®) numa concentração de 0,01%, para a revelação das placas contendo bactérias e o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) (Sigma Aldrich®) na concentração de 5 mg/mL, para revelar as placas contendo leveduras. Ambos os reveladores são comercializados na forma de pó. Assim, a massa de cada revelador, foi inicialmente obtida por pesagem em balança analítica e transferida para frascos de vidro previamente esterilizados, nos quais foram adicionados os volumes correspondentes de água destilada estéril para a obtenção do volume e concentrações finais desejadas.

Os reveladores são considerados indicadores de reações de oxi-redução e mudam de cor mediante alterações na concentração de íons  $H^+$ . A rezasurina, na forma oxidada, tem coloração azulada e torna-se rosa na forma reduzida, já o TTC é incolor na forma oxidada e torna-se rosa quando reduzido. Como o metabolismo dos carboidratos, realizado pelos microrganismos para a obtenção de energia, diminui o pH do meio de cultura, e portanto, altera os níveis de íons  $H^+$ , os reveladores, ao serem aplicados, indicam pela alteração de cor, onde houve crescimento ou inibição dos microrganismos.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o ensaio de suscetibilidade a agentes antimicrobianos por microdiluição em caldo recomendado pelo NCCLS (2003). No desenvolvimento desta metodologia, são feitas diluições geométricas do agente a ser testado em placas de microtitulação de 96 poços (Figura 34).



**Figura 34:** Placas de microtitulação  
**Foto:** SILVA, 2009.

O ensaio de atividade antimicrobiana foi iniciado com o repique dos microrganismos (Figura 33), o qual consiste em transferi-los para um novo meio de cultura e *a posteriori*, incubá-los. Neste ensaio, foi utilizado tanto para as bactérias como para as leveduras o meio de cultura Agar Mueller Hinton Himedia®. Para as bactérias, a incubação foi feita em estufa (Figura 35), sob a temperatura de 37 °C por um período de 18 a 24 horas. Já para as leveduras, a incubação se processou em estufa B.O.D. (Figura 36), sob a temperatura de 28 °C por um período de 48 horas.

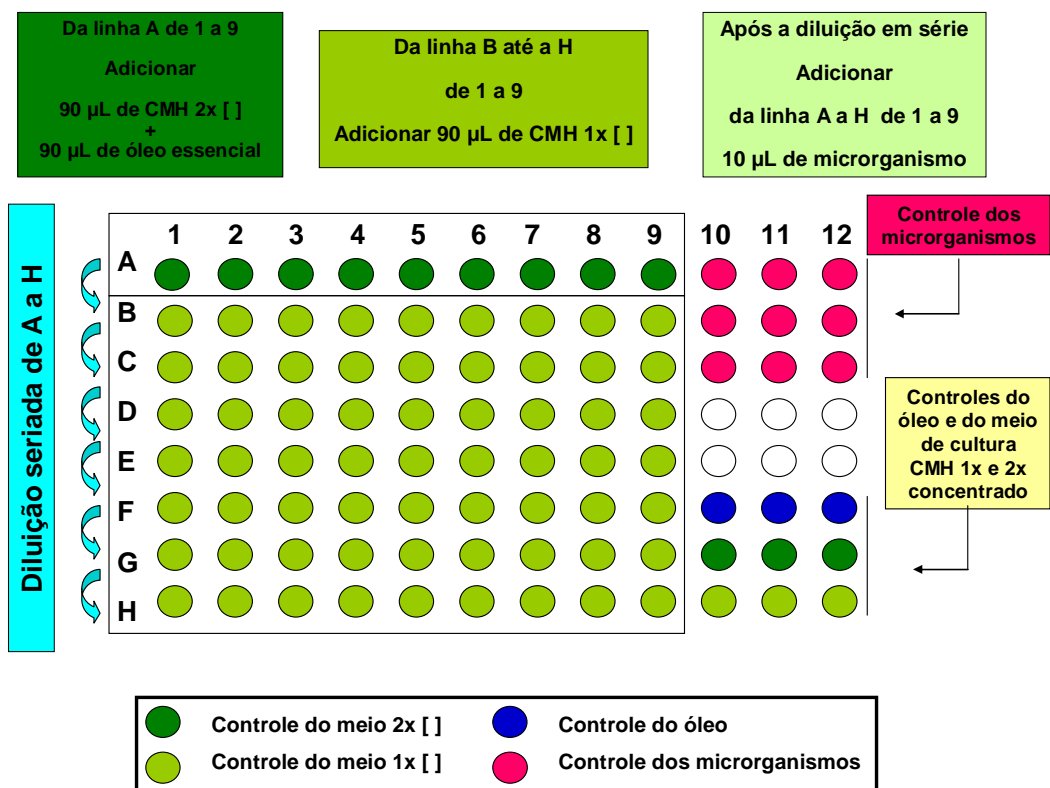


**Figura 35:** Estufa  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 36:** Estufa B.O.D.  
**Foto:** SILVA, 2009.

Após os repiques, foi realizada a adição dos meios de cultura. A princípio foram colocados 90  $\mu\text{L}$  do Caldo Mueller Hinton na linha A (colunas 1 a 9). Em seguida, 90  $\mu\text{L}$  deste mesmo meio de cultura; porém, numa concentração reduzida à metade, foram adicionados em cada poço das linhas B à H (colunas 1 a 9) e das linhas A à C (colunas 10 a 12) para a realização dos controles de viabilidade dos microrganismos (Figura 37).



**Figura 37:** Esquema da metodologia da microdiluição em placa  
**Fonte:** SILVA, 2009.

Foram feitos controles dos meios de cultura, para garantir que os mesmos estavam estéreis. Para tanto, adicionou-se em cada um dos poços, um volume de 100  $\mu\text{L}$  do Caldo Mueller Hinton duas vezes concentrado (linha G, colunas 10 a 12) e 100  $\mu\text{L}$  do Caldo Mueller Hinton uma vez concentrado (linha H, colunas 10 a 12) (Figura 38).

O passo seguinte consistiu em preparar a solução do Tween 80 (Merck®), mediante a sua diluição em água destilada estéril, numa concentração de 10% (v/v). A solução do Tween foi utilizada com a finalidade de facilitar a homogeneização dos

óleos essenciais ao meio de cultura Caldo Müller Hinton, essencialmente aquoso.

A escolha do Tween foi feita pelo fato de o mesmo ser um agente surfactante amplamente utilizado para minimizar a tensão superficial de líquidos imiscíveis entre si. E, principalmente, por ter sido confirmada, mediante a realização de testes preliminares de susceptibilidade, a ausência de atividade antimicrobiana deste agente contra os microrganismos utilizados na presente pesquisa.

Assim, cada amostra de óleo essencial foi diluída em Tween a 10%, e as soluções dos óleos, no referido agente surfactante, apresentaram concentrações variáveis: 1% (com diluições de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625; 0,0078125 e 0,00390625); 5% (com diluições de 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125; 0,0390625 e 0,01953125); 10% (com diluições de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125 e 0,0390625 ) e 30% (com diluições de 15; 7,5; 3,75; 1,85; 0,9375; 0,46875; 0,234375 e 0,1171875). As soluções de óleo essencial em Tween foram homogeneizadas em agitador tipo Vortex e em seguida esterilizadas (Figura 39) por filtração em membrana de acetato celulose (Wathmam®), com espessura dos poros de 0,2  $\mu\text{m}$  (Figura 40).

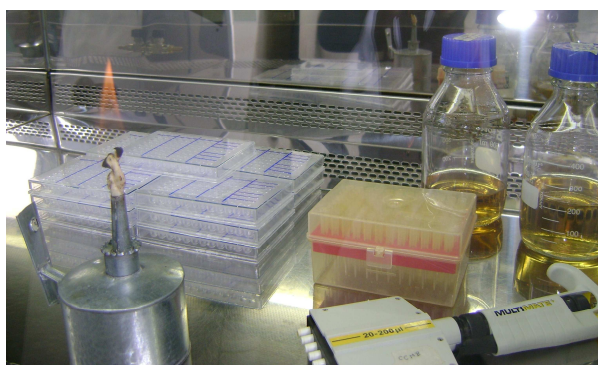
A diluição seriada de cada amostra de óleo essencial foi feita, aplicando-se um volume de 90  $\mu\text{L}$  em cada poço da linha A (colunas 1 a 9). Após homogeneização ao meio de cultura, já acondicionado nos poços, o mesmo volume de 90  $\mu\text{L}$  foi então retirado e transferido aos poços da linha B. O procedimento supracitado foi feito também na linha B, e repetido sucessivamente, até a linha H da placa (Figura 38). A solução de óleo em Tween quando preparada a 10%, teve sua concentração inicial nas placas reduzida para 5% na linha A, diminuindo geometricamente nas linhas subsequentes a 2,5% (linha B); 1,25% (linha C); 0,625% (linha D); 0,3125% (linha E); 0,15625% (linha F); 0,078125% (linha G) e 0,0390625% na linha H.

Para garantir que a solução do óleo em Tween havia sido adequadamente esterilizada, foi feito o controle da mesma mediante a aplicação de 50  $\mu\text{L}$  desta nos poços da linha F (colunas 10 a 12).

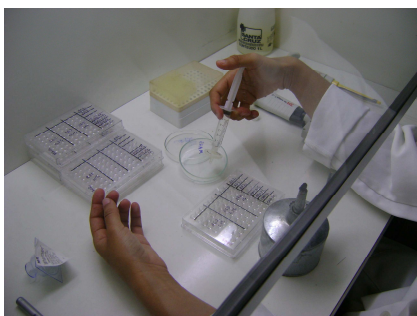
O passo seguinte consistiu em preparar a suspensão dos microrganismos. De acordo com o NCCLS (2003), é imprescindível diluir adequadamente a suspensão do inóculo a fim de obter uma concentração final de  $5 \cdot 10^4$  Unidades Formadoras de Colônia por poço para as bactérias e de 0,5 a  $2,5 \cdot 10^3$  UFC/mL por poço para as leveduras. Como as suspensões de microrganismos são, via de regra, ajustadas ao padrão McFarland, foi necessário realizar as devidas diluições, para que os ensaios

de atividade antimicrobiana fossem executados em conformidade com a norma preconizada pelo NCCLS (2003).

Inicialmente, 1.800  $\mu\text{L}$  da solução salina estéril a 0,45% foram adicionados em um tubo de ensaio para a realização do ajuste do colorímetro do Vitek (BioMerieux®). Com a passagem de luz fechada, o equipamento foi calibrado para 0% e com a passagem de luz aberta, foi calibrado para 100% (Figura 41).



**Figura 38:** Preparo para a adição do meio de Cultura C.M.H. nas placas de microdiluição.  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 39:** Esterilização da solução Óleo/Tween  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 40:** Membrana de acetato celulose  
**Foto:** SILVA, 2009.



**Figura 41:** Calibração do Colorímetro do Vitek (BioMerieux®)  
**Foto:** SILVA, 2009.

Em seguida, com uma alça de repique, retirou-se uma alíquota do microrganismo repicado e transferiu-se para o tubo de ensaio contendo a solução salina a 0,45%. A solução do microrganismo foi homogeneizada e ajustada para a faixa vermelha do colorímetro, a qual corresponde a um tamanho de inóculo de aproximadamente  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL para bactérias.

Como o tamanho do inóculo para as bactérias, preconizado pelo NCCLS, deve ser de  $5 \cdot 10^4$  UFC/poço, foi feita uma diluição (1:300), pegando-se 10  $\mu$ L da solução inicial ajustada no colorímetro (concentração de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL), e acrescentando-se a esta, um volume de 2.990  $\mu$ L de solução salina. Após esta diluição, foi obtida uma segunda solução de microrganismo, porém com uma concentração de  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL.

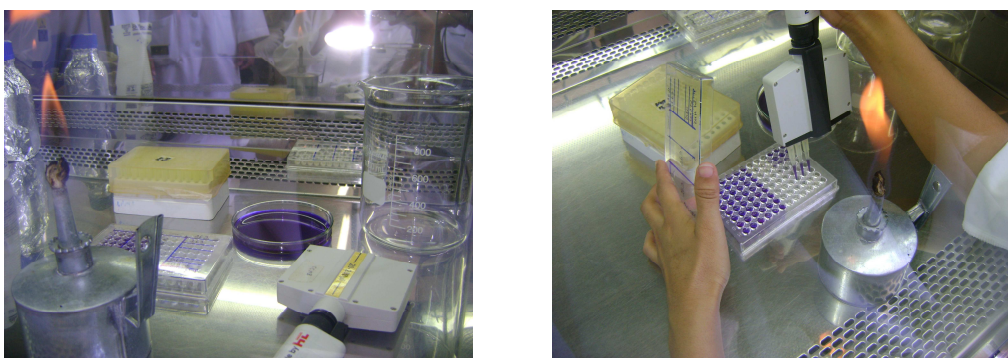
Portanto, da segunda solução (contendo  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL), foram retirados 10  $\mu$ L para serem inseridos nos poços da placa, que já continham um volume de 90  $\mu$ L (da solução do óleo em meio de cultura). Assim, o volume final por poço foi de 100  $\mu$ L, o que possibilitou uma nova diluição do inóculo (1:10), mantendo-o na concentração desejada, ou seja,  $5 \cdot 10^4$  UFC/poço.

Já para as leveduras, a suspensão foi ajustada para a faixa amarela do colorímetro, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente  $1,5 \cdot 10^5$  UFC/mL. A concentração recomendada pelo NCCLS (2003) por poço deve ter de 0,5 a  $2,5 \cdot 10^3$  UFC. Neste sentido, foi feita uma diluição (1:10), pegando-se 100  $\mu$ L da solução ajustada no colorímetro e adicionando-se 900  $\mu$ L de solução salina. Após esta diluição, foi obtida uma segunda solução de microrganismo, porém com uma concentração de  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/mL. Enfim, tendo-se um volume final por poço de 100  $\mu$ L na placa, a segunda diluição do inóculo (1:10), permitiu a obtenção da concentração desejada, ou seja,  $1,5 \cdot 10^3$  UFC/poço.

Feitos os ajustes do tamanho do inóculo, 10  $\mu$ L da suspensão dos microrganismos (nas concentrações de  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL para bactérias e  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/mL para leveduras) foram adicionados aos poços da placa, das linhas A a H (colunas 1 a 9), e aos poços das linhas A a C (colunas 10 a 12). Em cada placa, foram feitos testes de suscetibilidade, em triplicata, para até três microrganismos diferentes. A incubação foi feita em estufa a 37 °C por 24 horas para as placas contendo bactérias e em estufa B.O.D. a 28 °C por 48 horas para as placas contendo leveduras.

Para a análise qualitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio,

bem como para a determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras foi feita a aplicação dos reveladores, após o período de incubação. Nas placas contendo bactérias, 30  $\mu$ L da rezasurina foram aplicados em todos os poços (Figuras 42 e 43), inclusive nos poços dos controles dos microrganismos, dos meios de cultura e do óleo. As placas foram mantidas na estufa, por um período de três horas, até a leitura dos resultados.



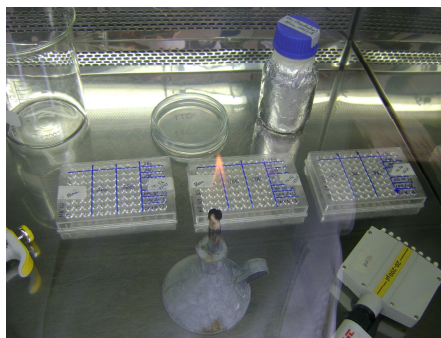
**Figuras 42 e 43:** Preparo do Material e Aplicação do revelador Rezasurina.  
**Foto:** SILVA, 2009.

A cor azul indicou a ausência de crescimento microbiano e a rosa, presença de crescimento, este parâmetro foi utilizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A coloração azulada, nos controles dos meios de cultura e da solução do óleo, indicou que os mesmos estavam estéreis. Já a coloração rósea, no controle dos microrganismos, evidenciou que os mesmos estavam viáveis.

Nas placas contendo leveduras, 50  $\mu$ L do Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio foram aplicados em todos os poços (Figura 44), inclusive nos poços dos controles dos microrganismos, dos meios de cultura e do óleo. As placas foram mantidas na B.O.D, por um período de três horas, até a leitura dos resultados.

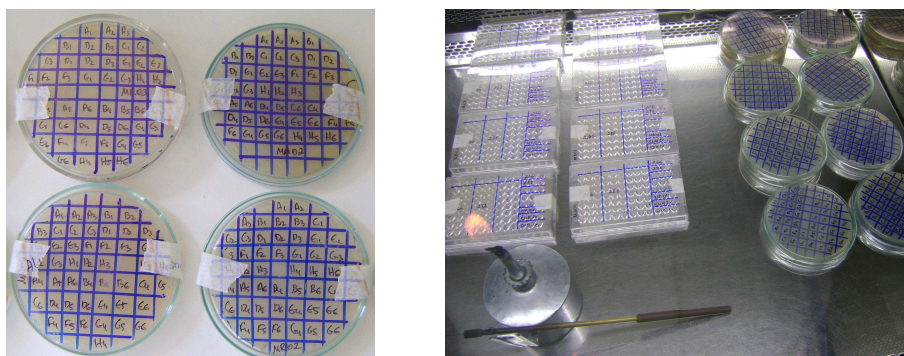
Poços incolores indicaram ausência de crescimento microbiano e poços com coloração rosa, presença de crescimento, este parâmetro foi utilizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Poços incolores, nos controles dos meios de cultura e da solução do óleo, indicaram que os mesmos estavam estéreis. Já a coloração rósea, no controle dos microrganismos, sinalizou que os mesmos estavam viáveis.





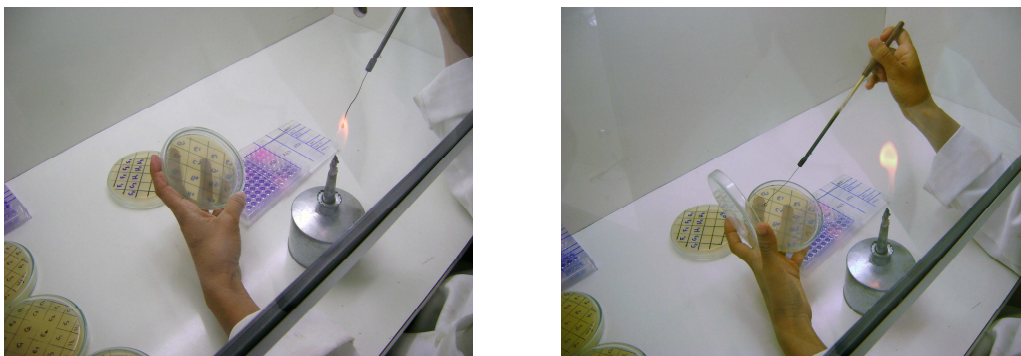
**Figura 44:** Aplicação do Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC)  
Foto: SILVA, 2009.

Decorrido o período de três horas da aplicação dos reveladores, a Concentração Inibitória Mínima foi determinada, e o conteúdo dos poços onde foi detectada a inibição do crescimento dos microrganismos, foi utilizado para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para tanto, foram usadas placas de Petri contendo meio de cultura Agar Mueller Hinton. As placas de Petri foram divididas em pequenos quadrados, os quais foram identificados com a letra e o número correspondente ao poço do qual seria feito o plaqueamento (Figuras 45 e 46).



**Figuras 45 e 46:** Identificação dos poços nas placas de Petrie Preparo do material para a determinação da CBM e da CFM.  
Foto: SILVA, 2009.

Com a alça de repique previamente flambada e esfriada, mergulhou-se a mesma no poço onde houve inibição e transferiu-se uma alíquota do conteúdo deste para o quadrado correspondente na placa de Petri contendo o Agar Mueller Hinton (Figuras 47 e 48).



**Figuras 47 e 48:** Realização do plaqueamento para a determinação da CBM e da CFM.  
**Foto:** SILVA, 2009.

Logo em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições supracitadas. A leitura dos resultados foi feita com 24 horas para as bactérias e com 48 horas para as leveduras, visando avaliar a presença ou a ausência de crescimento dos microrganismos.

Diluições do antibiótico Cloranfenicol, numa concentração inicial de 10 mg/mL, e do antifúngico Nistatina, na concentração inicial de 2 mg/mL foram feitas e utilizadas como controle positivo para a avaliação relativa do nível de inibição das amostras testadas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Coleta**

Para cada coleta de material vegetal foram obtidos da Estação Climatológica do Município de Alagoinhas, vinculada ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET/AgriTempo®), os seguintes dados meteorológicos: Soma da Precipitação (mm), Temperatura média (°C) e Disponibilidade média de água no solo – DAAS (mm).

Os dados meteorológicos referentes à cada mês no qual houve a realização das coletas estão exibidos na Figura 49 e no Apêndice B. Para fins de comparação, são ilustrados também os dados pertencentes ao mês imediatamente anterior à cada coleta.

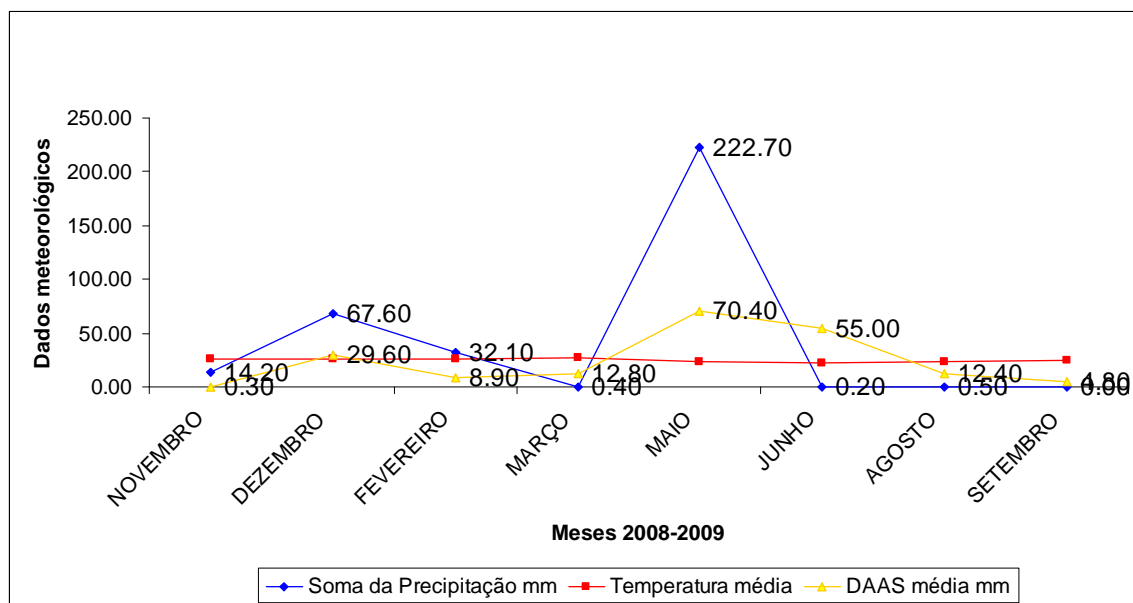
A temperatura média praticamente não sofreu alterações durante todo o período de realização das coletas, isto pode ser observado na Figura 50, a qual mostra a diferença entre os valores máximos e mínimos de cada dado meteorológico. Os cálculos, bem como o gráfico foram elaborados com o auxílio do Programa Estatístico BioEstat Versão 3.0.

Variações mais significativas ocorreram no mês de maio, apenas com relação à soma da precipitação e à DAAS. O índice de pluviosidade de 222,7 mm registrado no referido mês, ocasionou um aumento no índice de umidade presente no solo no mês de junho. Mesmo tendo sido registrado um índice de precipitação de apenas 0,2 mm em junho, o valor de 55 mm da DAAS, repercutiu minimizando sobremaneira o rendimento dos óleos essenciais provenientes da coleta 3, conforme dados da Figura 64.

### **5.2 Obtenção dos Óleos Essenciais**

Apesar de ser uma família que apresenta como um dos caracteres mais marcantes, a presença de glândulas oleíferas evidentes nos órgãos aéreos, o

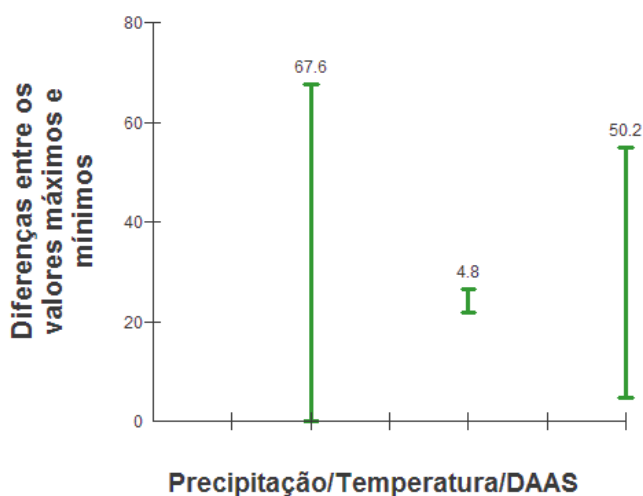
rendimento dos óleos essenciais das três espécies de Myrtaceae estudadas foi inferior a 0,6%. Os resultados encontrados, estão em conformidade com os obtidos na literatura, rendimentos superiores a 1% não são muito comuns em espécies desta família. As exceções são alguns óleos provenientes de algumas espécies do gênero *Eucalyptus*. Além daqueles obtidos dos botões florais do cravo (*Syzygium aromaticum*), os quais chegam a alcançar teores de até 15% (CRAVEIRO, 1981).



**Figura 49:** Dados meteorológicos registrados no município de Alagoinhas-BA durante os meses de coleta entre os anos 2008 e 2009.

**Fonte:** Agritempo©, 2009.

Embrapa – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura.



**Figura 50:** Diferença entre os valores máximos e mínimos dos dados meteorológicos: Soma da Precipitação (mm), Temperatura média (°C) e DAAS (mm), registrados no município de Alagoinhas-BA durante os meses de coleta entre os anos 2008 e 2009.

**Fonte:** Programa Estatístico BioEstat Versão 3.0.

A Tabela 04 reúne os dados da massa total de folhas frescas utilizada na obtenção das amostras de óleo essencial; assim como, o respectivo volume de óleo obtido; exibe também a média aritmética do teor de umidade presente nas folhas e o rendimento dos óleos essenciais. O teor de umidade presente nas folhas das três espécies foi determinado, usando-se a média aritmética, calculada a partir de um conjunto de seis repetições, em cada uma das quatro coletas. Também foram calculados, com o auxílio do Programa Estatístico SISVAR, a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação, os quais encontram-se reunidos na Tabela 05.

**Tabela 04:** Dados referentes à massa vegetal hidrodestilada, volume de óleo essencial obtido, teor de umidade presente nas folhas e rendimento dos óleos essenciais obtidos de três espécies de *Myrcia* DC. em quatro diferentes estações do ano.

| Espécies                 | Códigos | Massa de folhas frescas (g) | Volume de óleo obtido (mL) | Teor de Umidade (%) | Rendimento (%) |
|--------------------------|---------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------|
| <i>Myrcia alagoensis</i> | MA01    | 1255,60                     | 3,00                       | 46,31               | 0,56           |
| <i>Myrcia guianensis</i> | MG01    | 894,10                      | 0,25                       | 47,98               | 0,05           |
| <i>Myrcia rostrata</i>   | MR01    | 621,46                      | 1,40                       | 46,14               | 0,42           |
| <i>Myrcia alagoensis</i> | MA02    | 1803,90                     | 3,80                       | 48,75               | 0,41           |
| <i>Myrcia guianensis</i> | MG02    | 1500,69                     | 0,50                       | 48,39               | 0,06           |
| <i>Myrcia rostrata</i>   | MR02    | 1142,34                     | 3,70                       | 36,40               | 0,51           |
| <i>Myrcia alagoensis</i> | MA03    | 1654,10                     | 2,70                       | 52,97               | 0,16           |
| <i>Myrcia guianensis</i> | MG03    | 1130,68                     | 0,30                       | 60,79               | 0,02           |
| <i>Myrcia rostrata</i>   | MR03    | 1125,87                     | 2,10                       | 50,21               | 0,19           |
| <i>Myrcia alagoensis</i> | MA04    | 1722,94                     | 3,70                       | 45,59               | 0,21           |
| <i>Myrcia guianensis</i> | MG04    | 1232,48                     | 0,70                       | 50,73               | 0,05           |
| <i>Myrcia rostrata</i>   | MR04    | 1176,43                     | 2,70                       | 38,67               | 0,22           |

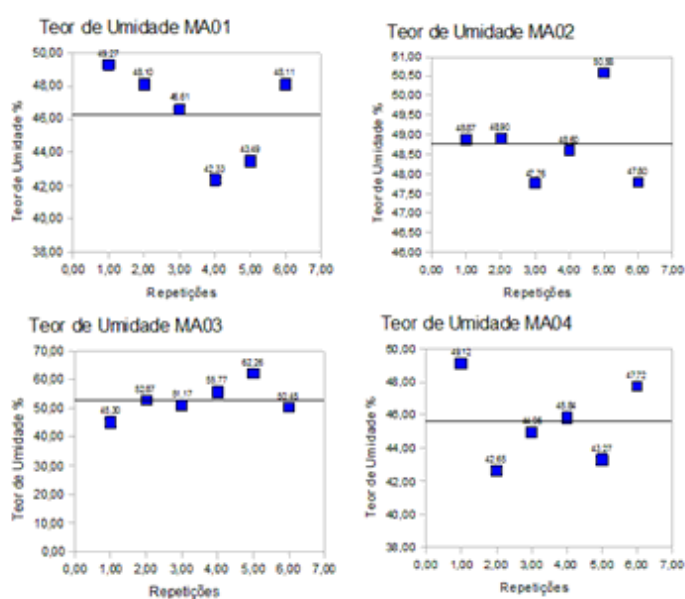
**Tabela 05:** Estatística Descritiva do Teor de Umidade presente nas folhas de espécies de *Myrcia* DC.

| Espécies                 | Estatística Descritiva | Teor de Umidade % |          |          |          |
|--------------------------|------------------------|-------------------|----------|----------|----------|
|                          |                        | Coleta 1          | Coleta 2 | Coleta 3 | Coleta 4 |
| <i>Myrcia alagoensis</i> | 1                      | 49,27             | 48,87    | 45,30    | 49,12    |
|                          | 2                      | 48,10             | 48,90    | 52,87    | 42,65    |
|                          | 3                      | 46,61             | 47,76    | 51,17    | 44,95    |
|                          | 4                      | 42,33             | 48,60    | 55,77    | 45,84    |
|                          | 5                      | 43,49             | 50,58    | 62,26    | 43,27    |
|                          | 6                      | 48,11             | 47,80    | 50,45    | 47,72    |
|                          | Média                  | 46,31             | 48,75    | 52,97    | 45,59    |
|                          | Variância              | 7,81              | 1,05     | 32,51    | 6,29     |
|                          | Desvio padrão          | 2,79              | 1,02     | 5,7      | 2,5      |
|                          | CV %                   | 6,03              | 2,11     | 10,76    | 5,5      |

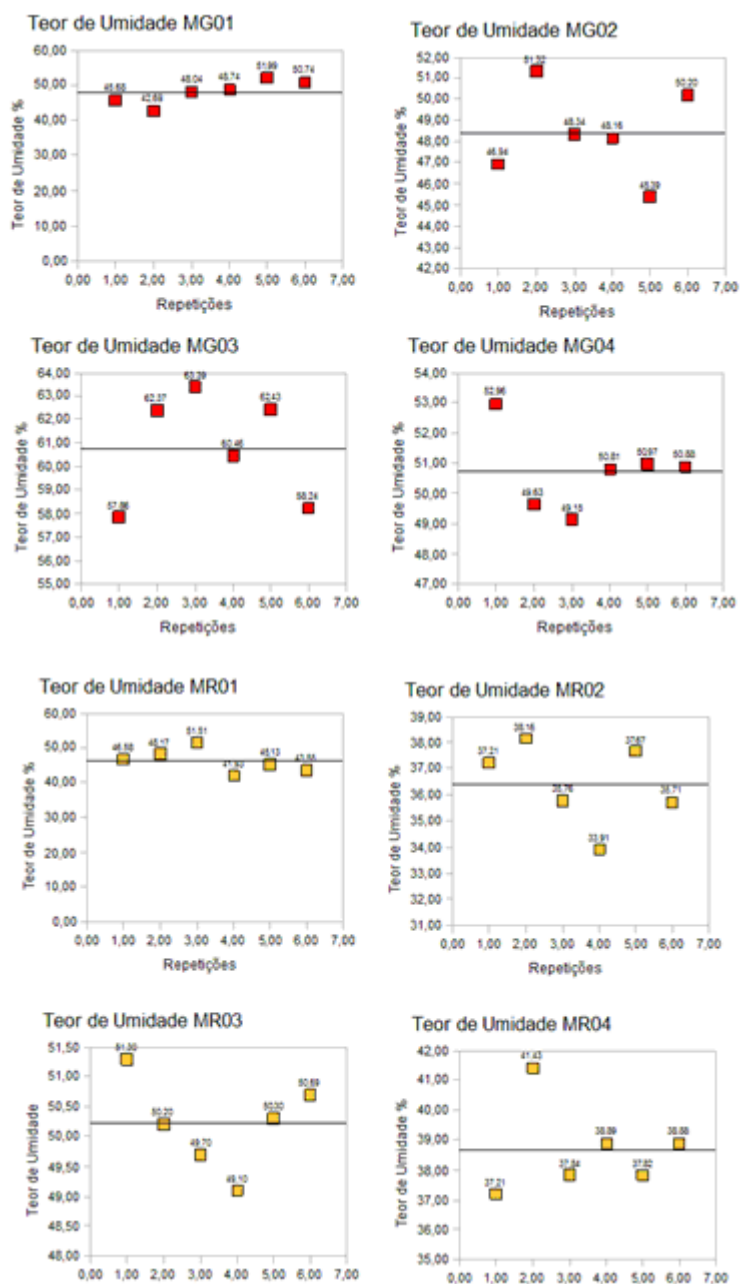
Tabela 05: Continuação

| Espécies                 | Estatística Descritiva | Teor de Umidade (%) |           |           |           |
|--------------------------|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
|                          |                        | Coleta 01           | Coleta 02 | Coleta 03 | Coleta 04 |
| <i>Myrcia guianensis</i> | 1                      | 45,68               | 46,94     | 57,86     | 52,96     |
|                          | 2                      | 42,69               | 51,32     | 62,37     | 49,63     |
|                          | 3                      | 48,04               | 48,34     | 63,39     | 49,15     |
|                          | 4                      | 48,74               | 48,16     | 60,46     | 50,81     |
|                          | 5                      | 51,99               | 45,39     | 62,43     | 50,97     |
|                          | 6                      | 50,74               | 50,20     | 58,24     | 50,88     |
|                          | Média                  | 47,98               | 48,39     | 60,79     | 50,73     |
|                          | Variância              | 11,51               | 4,60      | 5,42      | 1,75      |
|                          | Desvio padrão          | 3,39                | 2,14      | 2,32      | 1,32      |
|                          | CV %                   | 7,07                | 4,43      | 3,83      | 2,6       |
| <i>Myrcia rostrata</i>   | 1                      | 46,58               | 37,21     | 51,30     | 37,21     |
|                          | 2                      | 48,17               | 38,16     | 50,20     | 41,43     |
|                          | 3                      | 51,51               | 35,76     | 49,70     | 37,84     |
|                          | 4                      | 41,93               | 33,91     | 49,10     | 38,89     |
|                          | 5                      | 45,13               | 37,67     | 50,30     | 37,82     |
|                          | 6                      | 43,55               | 35,71     | 50,69     | 38,88     |
|                          | Média                  | 46,14               | 36,40     | 50,21     | 38,67     |
|                          | Variância              | 11,72               | 2,49      | 0,58      | 2,25      |
|                          | Desvio padrão          | 3,42                | 1,57      | 0,76      | 1,5       |
|                          | CV %                   | 7,41                | 4,33      | 1,52      | 3,87      |

A dispersão dos dados do teor de umidade das folhas de *M. alagoensis* O. Berg., *M. guianensis* (Aubl.) DC. e *M. rostrata* DC., em relação à média aritmética está ilustrada nas Figuras 51 a 62. Tal dispersão pode ser explicada pelo fato de as folhas terem sido coletadas de indivíduos diferentes, com idades e estágios de desenvolvimento diferenciados, além de localizarem-se em pontos diferentes da mata, estando sujeitos a níveis variados de incidência solar e sombreamento.

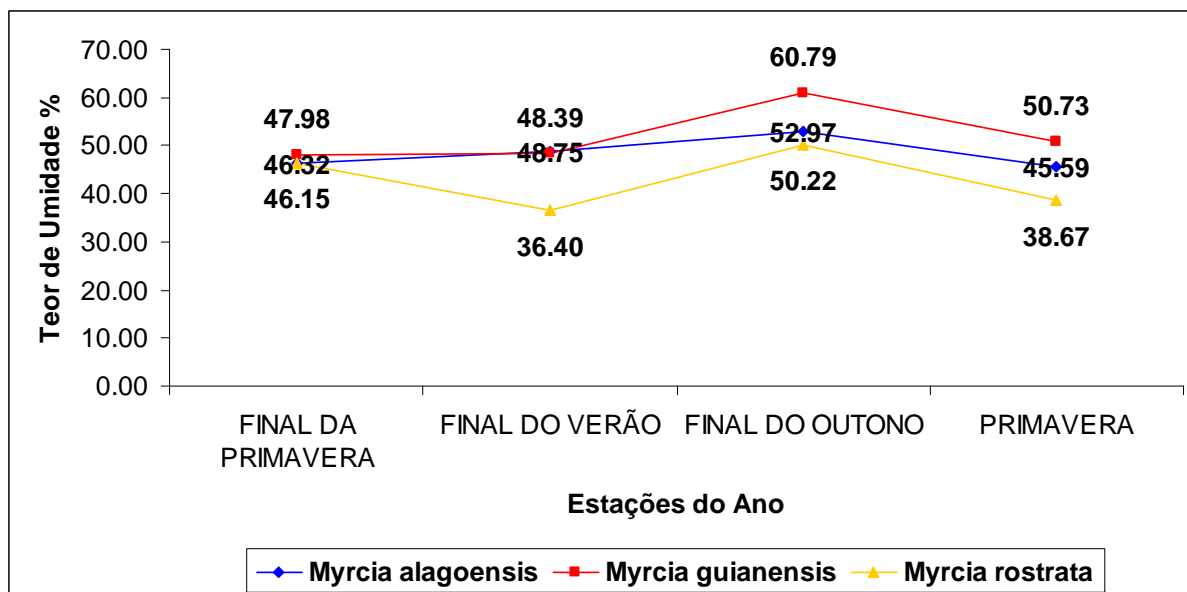


**Figuras 51 a 54:** Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de *Myrcia alagoensis* O. Berg em cada uma das coletas.

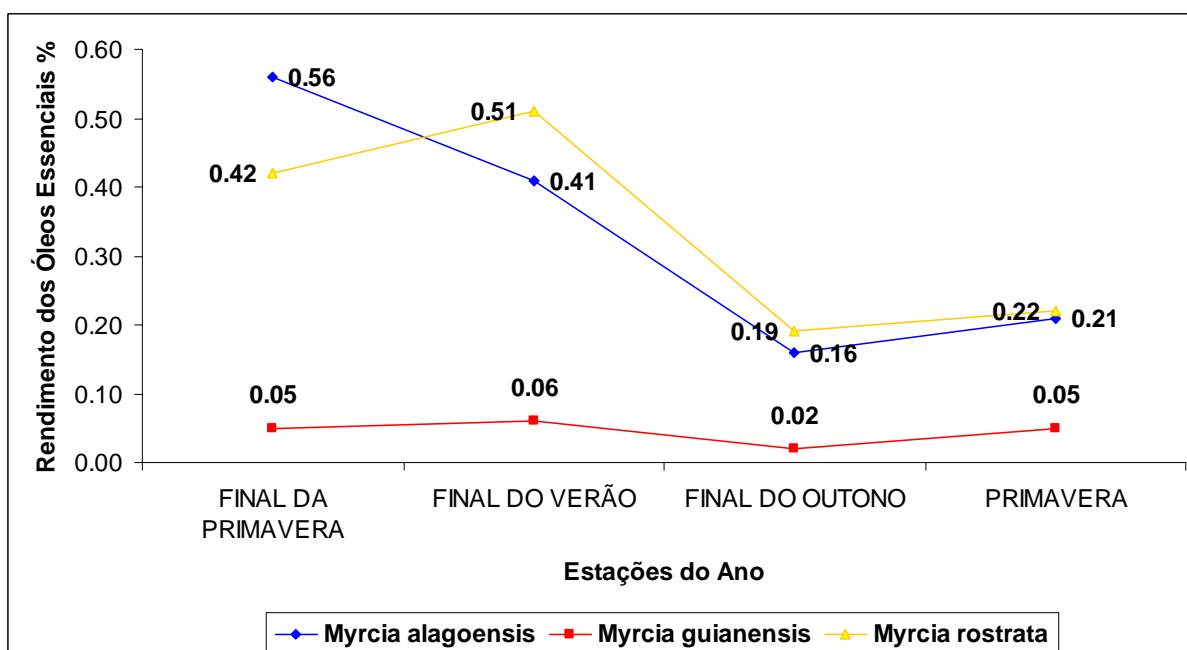


**Figuras 55 a 62:** Dispersão dos dados em relação à média para o Teor de Umidade (%) presente nas folhas de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC.

O teor de umidade presente nas folhas é um dado importante, pois este dado é uma das variáveis usadas no cálculo do rendimento dos óleos essenciais. Existe uma correlação alta entre o teor de umidade e o teor de óleo essencial. Ou seja, quanto maior a umidade presente nas folhas, menor o rendimento dos óleos. Isto pôde ser constatado, com os resultados obtidos na coleta 3, realizada no final do outono, conforme os dados apresentados nas Figuras 63 e 64.



**Figura 63:** Variação Sazonal do Teor de Umidade (%) presente nas folhas de espécies de *Myrcia* DC.



**Figura 64:** Variação Sazonal do Rendimento (%) dos Óleos Essenciais obtidos de espécies de *Myrcia* DC.

O maior teor de óleo essencial para a *Myrcia alagoensis* O. Berg foi registrado na primavera (0,56%) e o menor (0,19%), no outono, o que correspondeu a um decréscimo de 71,43%. Para a *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. o maior valor foi alcançado no verão (0,06%) e o menor, também no outono (0,02%), acarretando uma redução de 33,33%. Esta foi a espécie com os menores teores de óleo em todas as estações do ano, e a que obteve a menor variação entre o maior e o menor



teor (Figura 66).

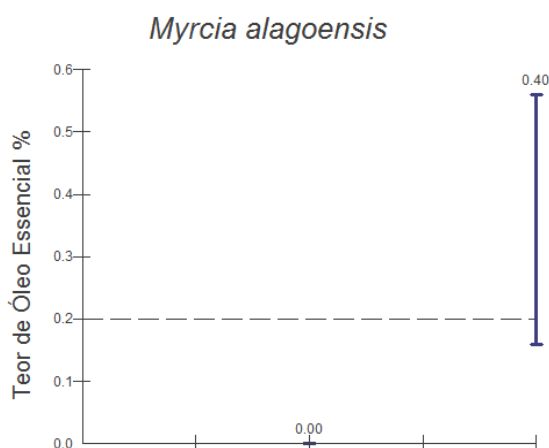
Isto indica que os fatores ambientais exerceram uma menor influência em termos da produção de óleo essencial para a *M. guianensis* (Aubl.) DC e que a mesma não demonstrou ser uma boa produtora de óleo, quando comparada às outras duas espécies.

Para a *Myrcia rostrata* DC. o maior teor foi obtido no verão (0,51%) e o menor na coleta do outono (0,19%), indicando uma diminuição de 62,74%. Mesmo ocorrendo reduções expressivas, o teor médio de óleo essencial para esta espécie (0,34%) foi superior àquele encontrado por Limberger et al. (2004), ao estudarem exemplares de *Myrcia rostrata* DC. coletados entre os meses de novembro e janeiro, no Rio Grande do Sul. O rendimento obtido pelos pesquisadores gaúchos foi de 0,2%.

É notório que as três espécies tiveram uma redução significativa no rendimento dos óleos essenciais na coleta realizada no outono. Nesta estação do ano, foram registrados os maiores índices de pluviosidade e de disponibilidade média de água no solo (DAAS), repercutindo no aumento do teor de umidade presente nas folhas e no decréscimo da produção de óleo. Todavia, a espécie que teve a maior diferença entre o maior e o menor teor de óleo ao longo do ano foi a *Myrcia alagoensis* O. Berg, conforme indica a Figura 65.

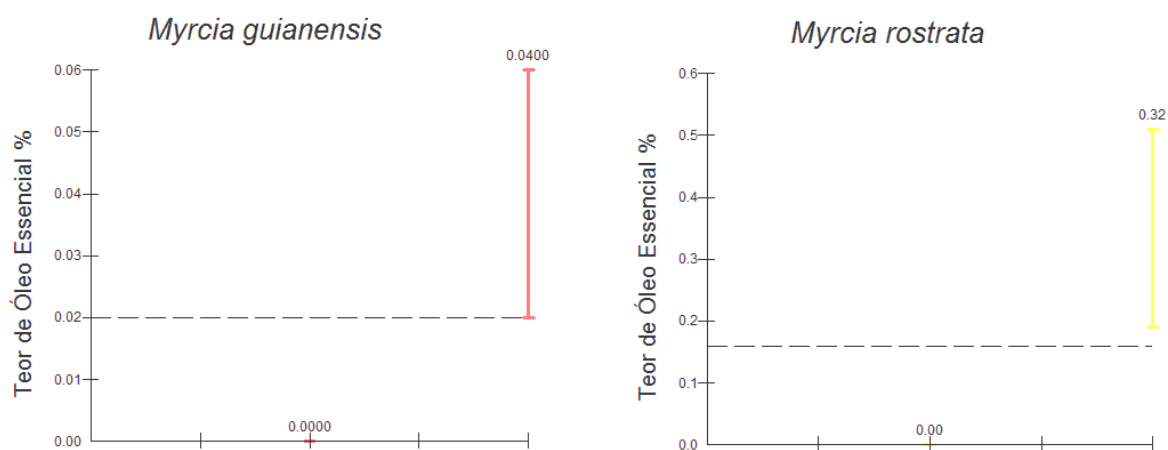
É amplamente discutido na literatura que a produção de óleos essenciais pelas plantas pode ser diretamente afetada por fatores ambientais. As condições climáticas e a natureza do solo influenciam diretamente tanto no teor como nos constituintes químicos de um óleo essencial (BRUNETON, 2001).

É relatado também em diversos estudos, uma redução no teor de óleo, durante os meses mais úmidos do ano e um aumento deste, durante os períodos de estiagem. Entretanto, pesquisadores africanos, avaliando uma população de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (MYRTACEAE), coletada em diferentes estações do ano na região sul de Benin (África), registrou o maior rendimento de óleo essencial na estação mais chuvosa (GBENOU et al., 2007).



**Figura 65:** Diferença entre os valores máximo e mínimo do Teor de Óleo Essencial (%) para a *Myrcia alagoensis* O. Berg.

**Fonte:** Programa Estatístico BioEstat Versão 3.0.



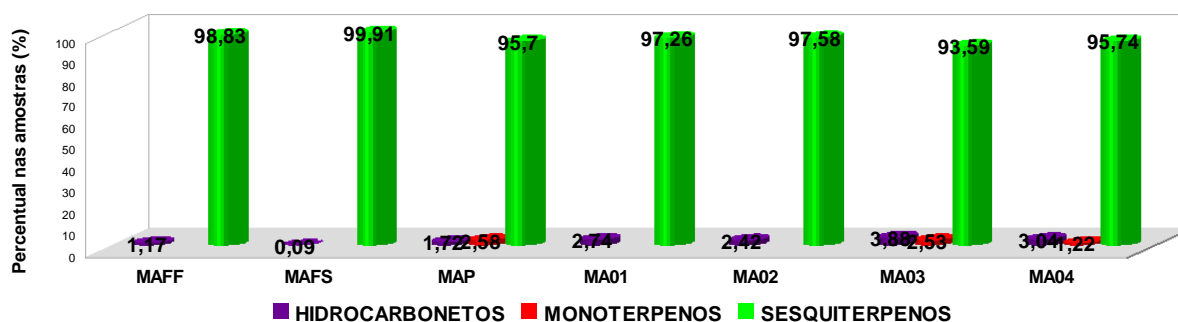
**Figuras 66 e 67:** Diferença entre os valores máximo e mínimo do Teor de Óleo Essencial (%) para as espécies *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC.

**Fonte:** Programa Estatístico BioEstat Versão 3.0.

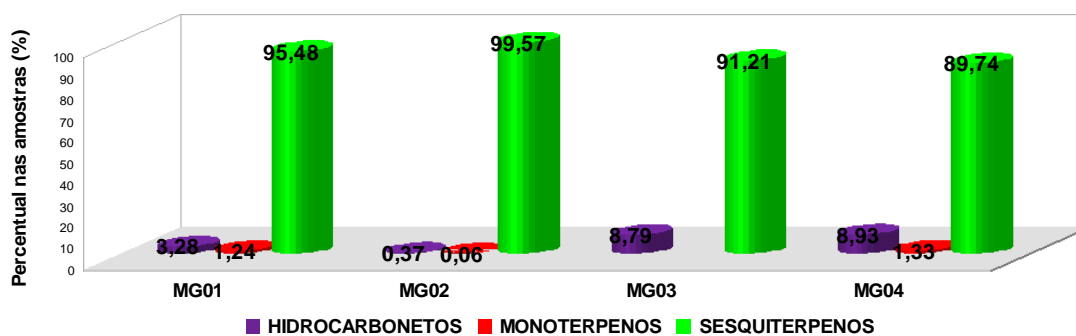
### 5.3 Análise da Composição Química

A análise dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg, *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC. revelou a predominância de sesquiterpenos nas três espécies estudadas, conforme os dados ilustrados nas Figuras 68 a 70.

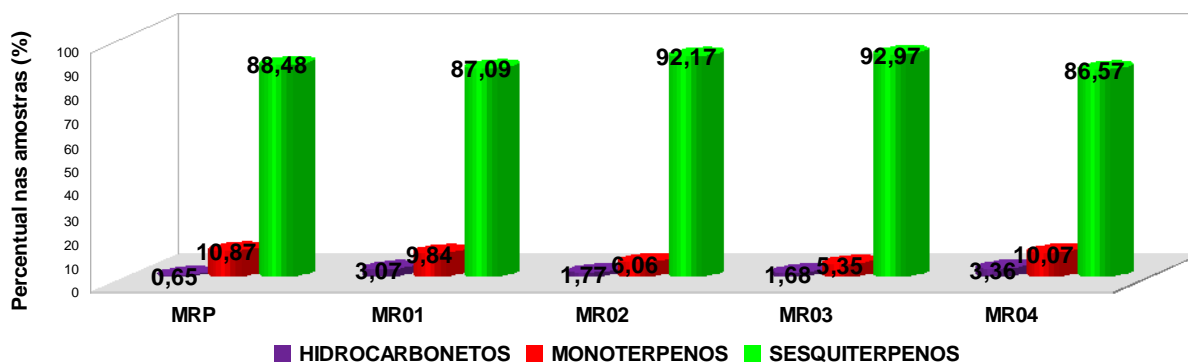
Existe uma significativa semelhança entre os resultados obtidos na presente pesquisa, com a maior parte dos trabalhos descritos na literatura tanto para a família Myrtaceae em geral, como especificamente, para as espécies do gênero *Myrcia* DC. Limberger e colaboradores (2004), também registraram a preponderância de sesquiterpenos em espécies de *Myrcia* DC., coletadas no Rio Grande do Sul. Por outro lado, resultados divergentes foram aqueles encontrados por Cerqueira e colaboradores (2007), que ao analisarem a variação sazonal da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas, flores e frutos de *Myrcia myrtifolia*, coletada no município de Salvador-BA, entre os anos 2002 e 2003, encontraram uma predominância de monoterpenos, principalmente do  $\alpha$ -pineno, em concentrações que variaram de 61,5 a 90,9%.



**Figura 68:** Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg. MAFF (indica *M. alagoensis* folhas frescas), MAFS (indica *M. alagoensis* folhas secas), MAP (indica *M. alagoensis* proveniente da coleta preliminar).



**Figura 69:** Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos Oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.

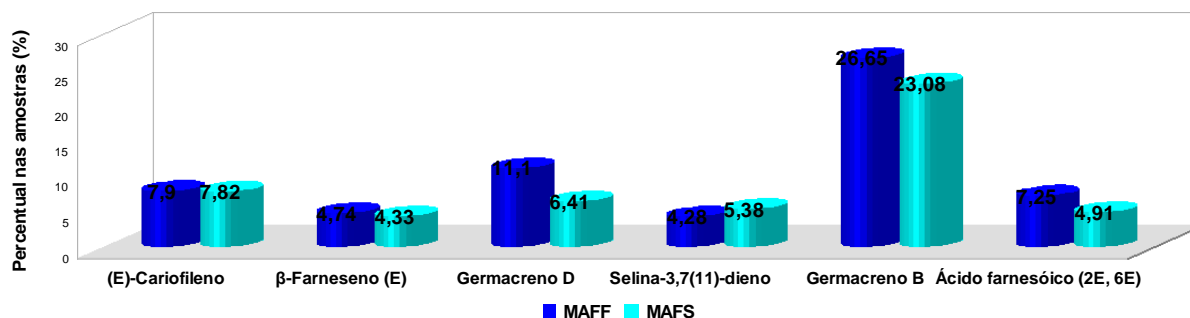


**Figura 70:** Comparação entre o percentual de Hidrocarbonetos Oxigenados de cadeia curta, Monoterpenos e Sesquiterpenos nos constituintes químicos identificados nos Óleos Essenciais de *Myrcia rostrata* DC. MRP (indica *M. rostrata* proveniente da coleta preliminar)

A variação quantitativa e qualitativa nos constituintes químicos dos óleos essenciais das três espécies de *Myrcia* DC., coletadas entre os anos 2008 e 2009, está de acordo com o exposto na literatura especializada. É bastante discutido que alterações no clima e no solo; as interações com herbívoros, dispersores de sementes e polinizadores; as interações planta-planta; bem como, a idade do vegetal, seu estágio de desenvolvimento e a fenologia (períodos de floração e frutificação) provocam modificações metabólicas que refletem tanto no rendimento das essências como na sua composição química (GOBBO-NETO, 2007).

Modificações na composição química também podem ser observadas quando se altera o método de obtenção dos óleos (FRANCO et al., 2005), ou quando se compara a composição química do óleo essencial obtido das folhas frescas com aquele obtido das folhas secas. Isto ficou evidente para a *Myrcia alagoensis* O. Berg, os dados são exibidos na Tabela 06 e na Figura 71.

Variações quantitativas foram constatadas para os sesquiterpenos do grupo Germacreno. Tanto o Germacreno D como o B sofreram uma redução de respectivamente 42,25% e 13,40% no óleo proveniente das folhas secas (Figura 71). Esta redução pode ser explicada pelo fato dos germacrenos serem conhecidos como compostos instáveis, podendo ter sofrido rearranjos moleculares ou degradação durante o processo de secagem, originando outros sesquiterpenos tipo cadinano (DE KRAKER et al., 1998; RADULOVIC et al., 2007). Por outro lado, houve um aumento de 32,43% e 29,79% para o Eudesma-4(14),11-dieno e o  $\alpha$ -Muuroleno. Do ponto de vista qualitativo, a diferença refere-se ao constituinte  $\alpha$ -Chamigreno que não foi detectado no óleo proveniente das folhas secas (Tabela 06).



**Figura 71:** Diferenças Quantitativas e Qualitativas entre alguns constituintes majoritários identificados nos Óleos Essenciais obtidos das folhas frescas (MAFF) e das folhas secas (MAFS) de *Myrcia alagoensis* O. Berg.

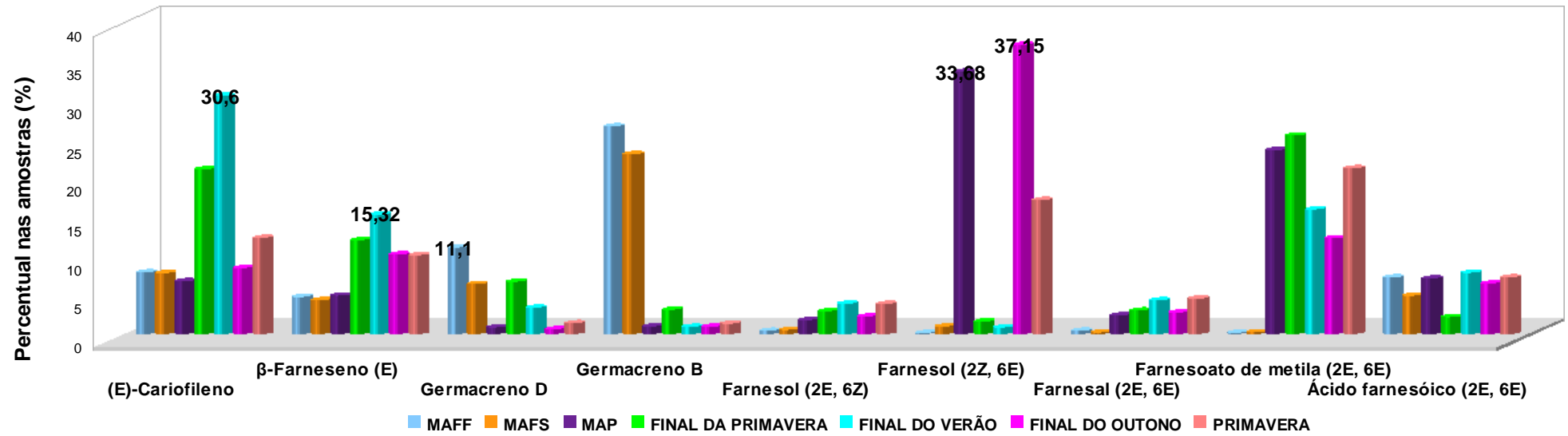
Analisando-se a Figura 72, pode-se observar que o (E)-Cariofileno e o  $\beta$ -Farneseno (E) foram detectados em todas as amostras, sendo os maiores percentuais (30,6 e 15,32%, respectivamente) encontrados na amostra coletada no final do verão. O Germacreno D também foi detectado em todas as amostras, porém o maior percentual (11,1%) foi encontrado na amostra coletada em 2007. O Farnesol (2Z,6E) apesar de também ter sido detectado em todas as amostras, registrou maiores percentuais na coleta do final do outono e na coleta preliminar (37,15% e 33,68%, respectivamente).

Os dados reunidos na Figura 73, mostram a variação sazonal nos constituintes majoritários para a *Myrcia alagoensis* O. Berg. A alteração mais expressiva foi aquela apresentada pelo Farnesol (2Z,6E). Este composto foi detectado nas coletas do final da primavera e do final do verão em concentrações inferiores a 2%. Todavia, teve seu percentual gradativamente acentuado até a chegada do outono (37,15%), voltando a reduzir, à medida que o inverno se aproximou (17,19%).

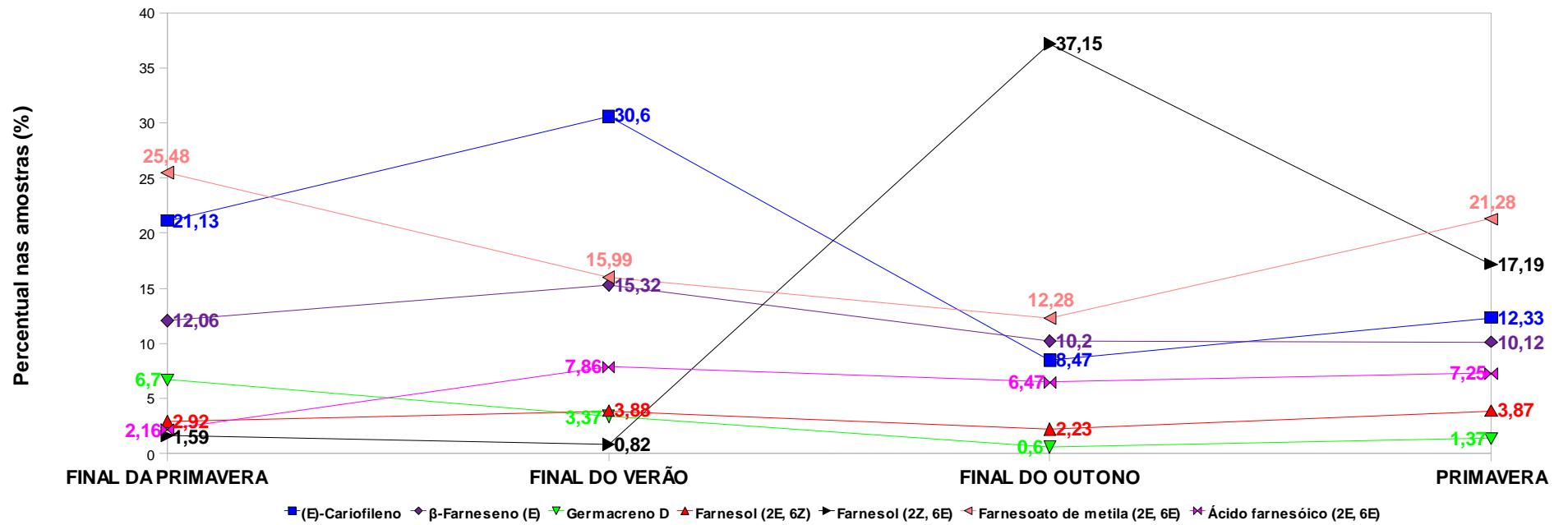
**Tabela 06:** Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg

| Composto                      | IK Calculado | IK da Literatura | <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg |              |              |              |              |              |              |
|-------------------------------|--------------|------------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                               |              |                  | Coletas                          |              |              |              |              |              |              |
|                               |              |                  | 27/01/2007                       | 10/03/2008   | 15/12/2008   | 21/03/2009   | 15/06/2009   | 25/09/2009   |              |
|                               |              |                  | MAFF                             | MAFS         | MAP          | MA01         | MA02         | MA03         | MA04         |
| 4-Hidróxi-4-metil-2-pentanona | 838 a 843    | 839              | 0,02                             | -            | 0,29         | 1,10         | 0,66         | 0,96         | 0,49         |
| 2-Hexenal, (E)                | 850 a 855    | 855              | 0,82                             | 0,07         | 0,66         | 1,35         | 1,59         | 2,73         | 1,88         |
| 3-Hexen-1-ol (Z)              | 854          | 859              | 0,10                             | -            | 0,65         | -            | -            | -            | 0,38         |
| α-Pineno                      | 938          | 939              | -                                | -            | 1,52         | -            | -            | 1,78         | 0,82         |
| β-Pineno                      | 980 a 981    | 979              | -                                | -            | 0,87         | -            | -            | 0,63         | 0,28         |
| α-Cubebeno                    | 1353         | 1348             | 0,56                             | 0,60         | t            | -            | 0,42         | -            | 0,25         |
| Ylangeno                      | 1374         | 1375             | 0,55                             | 0,13         | -            | -            | -            | -            | -            |
| α-Copaeno                     | 1379         | 1376             | 0,09                             | 0,61         | 0,26         | 0,30         | 1,06         | 1,80         | 0,93         |
| β-Elemeno                     | 1393 a 1394  | 1390             | 0,50                             | 0,44         | t            | 0,61         | -            | 0,34         | 0,22         |
| (E)-Cariofileno               | 1423         | 1419             | 7,90                             | 7,82         | 6,76         | 21,13        | 30,60        | 8,47         | 12,33        |
| γ-Elemeno                     | 1436         | 1436             | 2,23                             | 2,44         | -            | -            | -            | -            | 0,12         |
| β-Farneseno (Z)               | 1440 a 1442  | 1442             | 0,09                             | 0,09         | 0,30         | -            | -            | 0,52         | 0,38         |
| β-Farneseno (E)               | 1459         | 1456             | 4,74                             | 4,33         | 4,93         | 12,06        | 15,32        | 10,20        | 10,12        |
| α-Cariofileno                 | 1457         | 1466             | 1,79                             | 1,62         | 0,25         | 0,26         | 0,22         | 0,25         | 0,23         |
| γ-Muuroloeno                  | 1479         | 1479             | 1,45                             | 2,14         | 0,20         | -            | 0,34         | -            | 0,35         |
| Germacreno D                  | 1484         | 1485             | 11,10                            | 6,41         | 0,85         | 6,70         | 3,37         | 0,60         | 1,37         |
| Eudesma-4(14),11-dieno        | 1488 a 1489  | 1489             | 1,00                             | 1,48         | -            | 0,45         | 0,26         | 0,39         | 0,59         |
| δ-Selineno                    | 1491         | 1492             | 0,23                             | 0,33         | -            | -            | -            | -            | 0,08         |
| γ-Amorfenol                   | 1496 a 1497  | 1495             | 1,37                             | 1,68         | -            | -            | -            | -            | 0,69         |
| α-Muuroloeno                  | 1493 a 1509  | 1500             | 0,66                             | 0,94         | -            | 1,77         | -            | -            | 0,73         |
| α-Chamigreno                  | 1496 a 1497  | 1503             | 0,80                             | -            | -            | 1,37         | -            | 0,76         | -            |
| α-Bulneseno                   | 1510 a 1516  | 1509             | 1,16                             | 0,72         | -            | -            | 1,35         | 0,32         | 0,25         |
| δ-Amorfenol                   | 1516 a 1517  | 1512             | 0,14                             | 1,82         | -            | 0,45         | 0,42         | 0,22         | -            |
| δ-Cadineno                    | 1526         | 1524             | 3,44                             | 5,42         | 0,45         | 2,42         | 1,81         | 1,08         | 1,06         |
| Selina-3,7(11)-dieno          | 1545         | 1546             | 4,28                             | 5,38         | -            | 0,58         | 0,36         | 0,24         | 0,31         |
| Germacreno B                  | 1561 a 1562  | 1561             | 26,65                            | 23,08        | 0,95         | 3,10         | 0,90         | 0,91         | 1,32         |
| Espatulenol                   | 1580         | 1578             | 0,08                             | 0,14         | 0,80         | -            | 0,39         | 1,15         | 0,32         |
| Óxido cariofileno             | 1585 a 1586  | 1583             | 0,17                             | 1,26         | 4,37         | 0,73         | 1,11         | 0,88         | 0,61         |
| Farnesol (2E, 6Z)             | 1715         | 1715             | 0,39                             | 0,52         | 1,77         | 2,92         | 3,88         | 2,23         | 3,87         |
| Farnesol (2Z, 6E)             | 1719 a 1723  | 1723             | 0,12                             | 0,96         | 33,68        | 1,59         | 0,82         | 37,15        | 17,19        |
| Farnesal (2E, 6E)             | 1742 a 1743  | 1741             | 0,40                             | 0,20         | 2,38         | 3,00         | 4,32         | 2,76         | 4,53         |
| Farnesoato de metila (2E, 6E) | 1785         | 1784             | 0,16                             | 0,21         | 23,61        | 25,48        | 15,99        | 12,28        | 21,28        |
| Ácido farnesóico (2E, 6E)     | 1818         | 1816             | 7,25                             | 4,91         | 7,13         | 2,16         | 7,86         | 6,47         | 7,25         |
| <b>Total</b>                  |              |                  | <b>80,24</b>                     | <b>75,75</b> | <b>92,68</b> | <b>89,53</b> | <b>93,05</b> | <b>95,12</b> | <b>90,23</b> |
| <b>Não identificados</b>      |              |                  | <b>19,76</b>                     | <b>24,25</b> | <b>7,32</b>  | <b>10,47</b> | <b>6,95</b>  | <b>4,88</b>  | <b>9,77</b>  |

(-) Não detectado na amostra; (t) quantidade inferior a 0,01% (traços). MAFF - *M. alagoensis* folhas frescas; MAFS - *M. alagoensis* folhas secas; MAP - *M. alagoensis* coleta preliminar; MA01 - coleta do final da primavera; MA02 - coleta do final do verão; MA03 - coleta do final do outono e MA04 - coleta da Primavera.



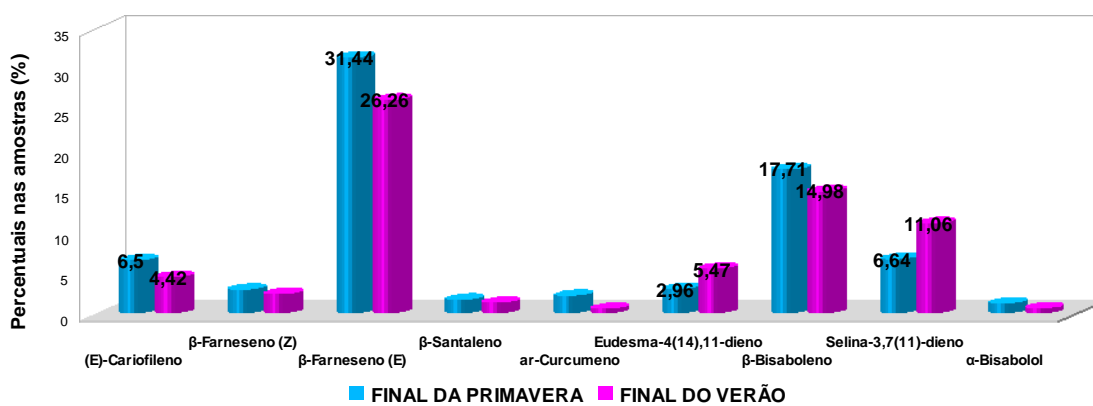
**Figura 72:** Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados na fração sesquiterpênica dos Óleos Essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg. MAFF (indica *M. alagoensis* folhas frescas); MAFS (indica *M. alagoensis* folhas secas) e MAP (indica *M. alagoensis* proveniente da coleta preliminar).



**Figura 73:** Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados na fração sesquiterpênica dos Óleos Essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg

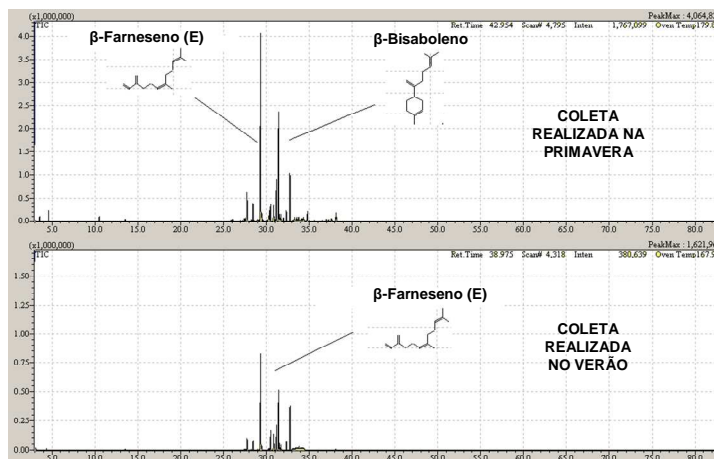


A variação sazonal na composição química dos óleos essenciais de *M. guianensis* (Aubl.) DC., pode ser visualizada na Tabela 07. As diferenças quantitativas apresentadas pelos óleos essenciais de *M. guianensis* (Aubl.) DC., provenientes das coletas realizadas no final da primavera e do verão estão relacionadas aos compostos: (*E*)-Cariofileno,  $\beta$ -Farneseno (*E*) e  $\beta$ -Bisaboleno, que sofreram reduções de 32; 16,48 e 15,42%; respectivamente. Assim como, para o Eudesma-4(14),11-dieno e o Selina-3,7(11)-dieno, que tiveram um aumento de 45,89% e 39,96%; no mesmo período (Figura 74).



**Figura 74:** Variação sazonal dos constituintes identificados na fração sesquiterpênica de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.

A variação sazonal da composição química dos óleos essenciais de *M. guianensis* (Aubl.) DC. pode ser visualizada, quando os cromatogramas referentes às coletas do final da primavera e do verão são comparados (Figura 75). É notório o decréscimo na intensidade do pico do constituinte majoritário  $\beta$ -Farneseno (*E*).



**Figura 75:** Cromatogramas dos óleos essenciais de *M. guianensis* (Aubl.) DC. provenientes das coletas realizadas no final da primavera e do verão.

**Tabela 07:** Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de *M. guianensis* (Aubl.) DC.

| Composto                             | IK<br>Calculado | IK da Literatura | <i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC. |                    |                    |                    |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                      |                 |                  | Coletas                              |                    |                    |                    |
|                                      |                 |                  | 15/12/2008<br>MG01                   | 21/03/2009<br>MG02 | 15/06/2009<br>MG03 | 25/09/2009<br>MG04 |
| 4-Hidróxi-4-metil-2-pentanona        | 838 a 843       | 839              | 0,35                                 | 0,18               | 0,19               | 0,20               |
| 2-Hexenal, ( <i>E</i> )              | 850 a 854       | 855              | 2,54                                 | 0,12               | 5,99               | 5,88               |
| 3-Hexen-1-ol ( <i>Z</i> )            | 853 a 866       | 859              | -                                    | -                  | 0,26               | 0,14               |
| 1-Hexanol                            | 866             | 867              | -                                    | -                  | 0,14               | -                  |
| $\alpha$ -Pineno                     | 938             | 939              | -                                    | -                  | -                  | 0,59               |
| $\beta$ -Pineno                      | 981             | 979              | -                                    | -                  | -                  | 0,34               |
| Limoneno                             | 1032            | 1024             | 1,09                                 | 0,05               | -                  | -                  |
| Ylangeno                             | 1375            | 1375             | -                                    | -                  | -                  | 0,20               |
| $\alpha$ -Copaeno                    | 1379            | 1376             | -                                    | -                  | -                  | 1,25               |
| Di-epi- $\alpha$ -Cedreno            | 1413 a 1415     | 1411             | -                                    | 0,65               | 0,61               | 0,38               |
| <i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoteno   | 1415 a 1418     | 1415             | 0,28                                 | 0,53               | 0,38               | 0,30               |
| ( <i>E</i> )-Cariofileno             | 1421 a 1423     | 1419             | 6,50                                 | 4,42               | 5,74               | 3,98               |
| <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno | 1435            | 1436             | -                                    | -                  | 1,82               | 1,36               |
| $\beta$ -Farneseno ( <i>Z</i> )      | 1439 a 1444     | 1442             | 2,88                                 | 2,34               | 0,19               | 0,34               |
| $\beta$ -Farneseno ( <i>E</i> )      | 1454 a 1459     | 1456             | 31,44                                | 26,26              | 23,58              | 19,21              |
| $\beta$ -Santaleno                   | 1457 a 1464     | 1459             | 1,64                                 | 1,28               | 0,33               | 1,06               |
| $\gamma$ -Muuroleno                  | 1477 a 1478     | 1479             | -                                    | 0,32               | -                  | 0,24               |
| $\alpha$ -Curcumeno                  | 1481 a 1484     | 1480             | 2,11                                 | 0,54               | 0,68               | -                  |
| Germacreno D                         | 1484            | 1485             | -                                    | -                  | -                  | 0,72               |
| Eudesma-4(14),11-dieno               | 1488 a 1489     | 1489             | 2,96                                 | 5,47               | 6,31               | 2,90               |
| $\delta$ -selineno                   | 1489            | 1492             | -                                    | -                  | -                  | 3,35               |
| $\alpha$ -Selineno                   | 1489 a 1497     | 1494             | 2,77                                 | 4,84               | 5,11               | 5,14               |
| $\alpha$ -Bisaboleno                 | 1497 a 1503     | 1498             | 6,77                                 | 6,51               | 5,47               | 4,76               |
| $\beta$ -Bisaboleno                  | 1503 a 1510     | 1505             | 17,72                                | 14,98              | 12,49              | 9,49               |
| $\delta$ -Cadineno                   | 1526            | 1524             | 0,70                                 | 0,34               | 1,58               | 3,12               |
| Selina-3,7(11)-dieno                 | 1545 a 1549     | 1546             | 6,64                                 | 11,06              | 3,32               | 3,68               |
| Germacreno B                         | 1561            | 1561             | 0,61                                 | 0,21               | -                  | 0,66               |
| $\alpha$ -Bisabolol                  | 1688 a 1685     | 1685             | 1,17                                 | 0,56               | 0,70               | 0,38               |
| <b>Total</b>                         |                 |                  | 88,17                                | 80,66              | 74,89              | 69,67              |
| <b>Não Identificados</b>             |                 |                  | 11,83                                | 19,34              | 25,11              | 30,33              |

(-) Não detectado na amostra. MG01 - coleta do final da primavera; MG02 - coleta do final do verão; MG03 - coleta do final do outono e MG04 - coleta da Primavera.

Os constituintes químicos identificados nos óleos essenciais obtidos da *Myrcia rostrata* DC. estão listados na Tabela 08. Variações quantitativas foram observadas para o (*E*)-Cariofileno que registrou uma diferença entre o maior teor, atingido na primavera, e o menor, alcançado no verão de 45,76%, e para o  $\alpha$ -Bisabolol, com uma diferença de 56,43% entre o maior teor, registrado na coleta preliminar realizada no verão, e o menor, na coleta realizada na primavera.

O Germacreno D, sofreu variações durante todas as estações do ano. No final da primavera este composto foi detectado numa concentração de 7,72%, sofrendo um aumento gradativo até 17,21% à medida que o verão se aproximou. Entretanto, uma nova redução é detectada com a proximidade das estações mais úmidas, outono e inverno.

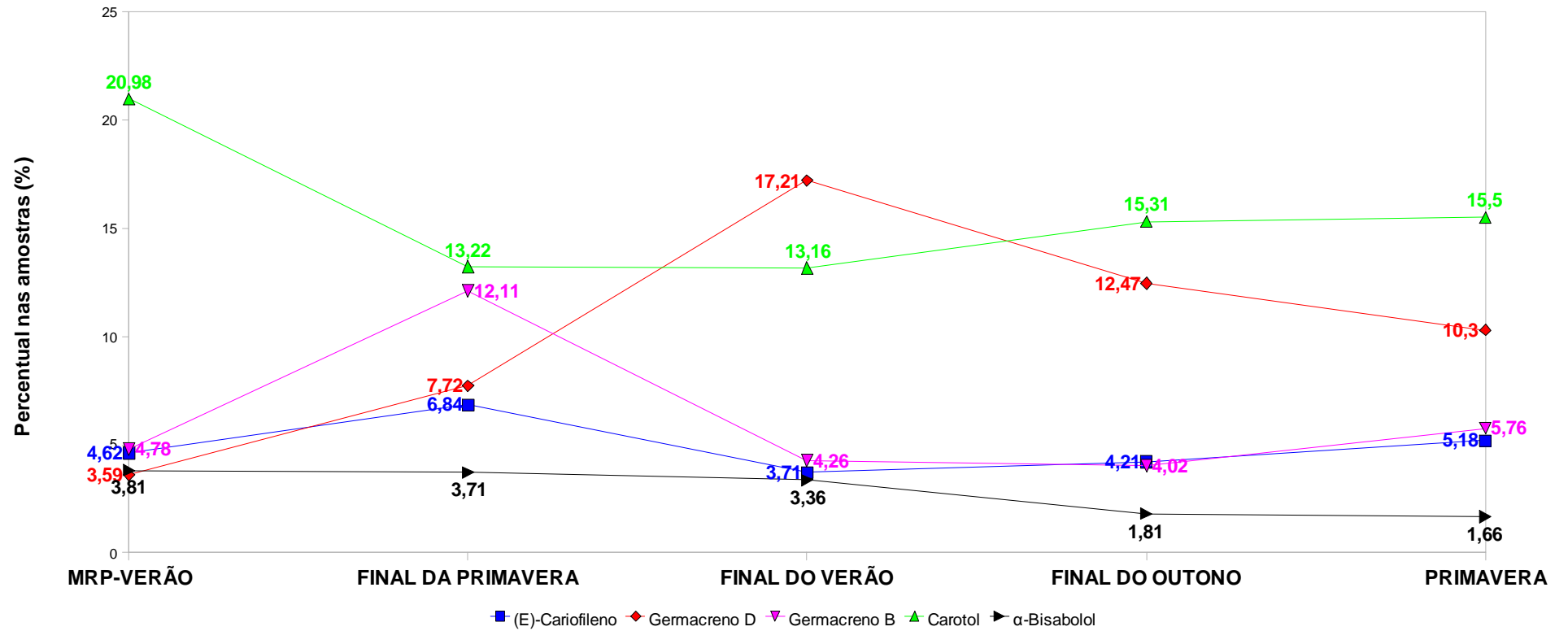
Já o Germacreno B, teve o maior teor registrado na amostra proveniente da coleta realizada no final da primavera, reduzindo sua concentração em 64,82% com a proximidade do verão. Para o Carotol, o maior teor (20,98%) foi detectado na coleta preliminar, realizada em março de 2008 e o menor (13,16%) na coleta realizada no final do verão, conforme os dados exibidos nas Figuras 76 e 77.

Destarte, a partir dos dados encontrados na presente pesquisa, é notória a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo.

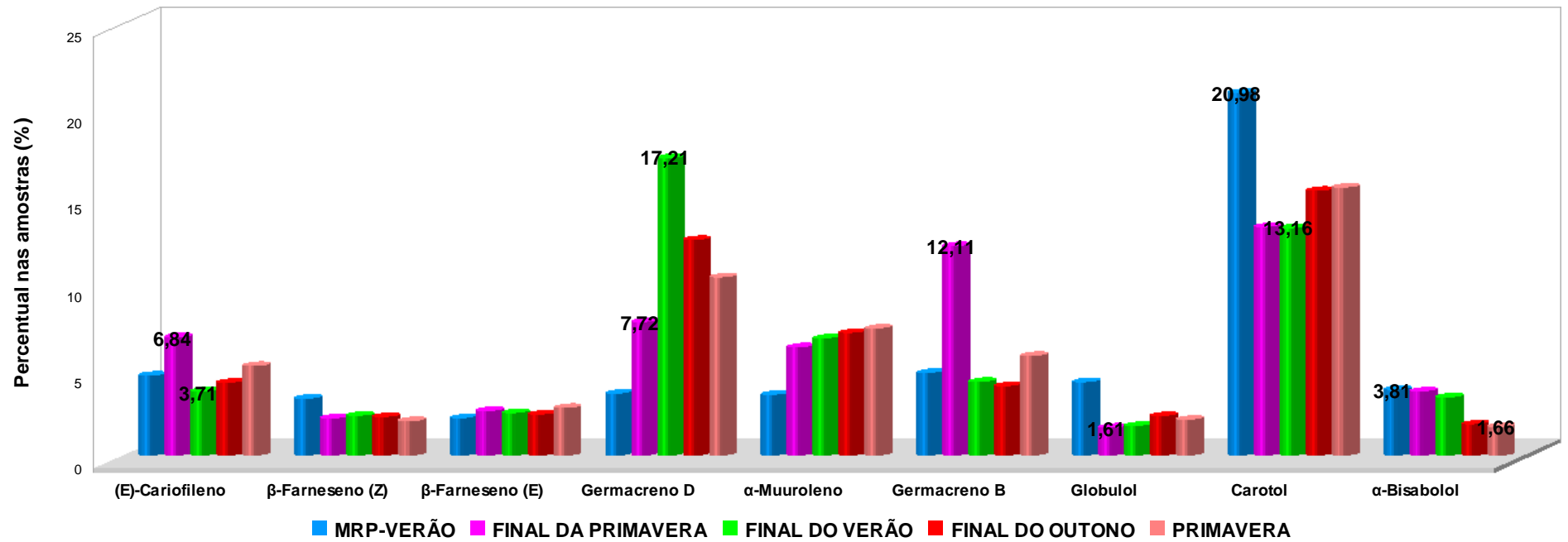
**Tabela 08:** Variação sazonal na Composição Química dos Óleos Essenciais de *M. rostrata* DC.

| Composto                           | IK calculado | IK da Literatura | <i>Myrcia rostrata</i> DC. |              |              |              |              |
|------------------------------------|--------------|------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                    |              |                  | Coletas                    |              |              |              |              |
|                                    |              |                  | 10/03/2008                 | 15/12/2008   | 21/03/2009   | 15/06/2009   | 25/09/2009   |
|                                    |              |                  | MRP                        | MR01         | MR02         | MR03         | MR04         |
| Hexanal                            | 802          | 801              | -                          | -            | -            | 0,24         | -            |
| 4-hidróxi-4-metil-2-pentanona      | 838 a 842    | 839              | -                          | 0,34         | 0,38         | 0,26         | 0,09         |
| 2-Hexenal, (E)                     | 850 a 851    | 855              | 0,16                       | 2,17         | 0,76         | 0,82         | 2,52         |
| 3-Hexen-1-ol (Z)                   | 854          | 859              | 0,21                       | -            | 0,24         | -            | 0,09         |
| 1-Hexanol                          | 865          | 867              | 0,14                       | -            | -            | -            | -            |
| $\alpha$ -Pinoeno                  | 938          | 939              | 3,99                       | 3,68         | 2,20         | 1,76         | 3,26         |
| $\beta$ -Pinoeno                   | 977 a 981    | 979              | 2,35                       | 2,17         | 1,39         | 0,93         | 2,11         |
| $\beta$ -Miraceno                  | 991          | 990              | 0,95                       | 1,30         | 0,59         | 1,10         | 1,79         |
| Limoneno                           | 1032         | 1029             | 0,62                       | 0,46         | 0,26         | 0,22         | 0,46         |
| $\alpha$ -Terpineol                | 1190 a 1191  | 1188             | 0,65                       | 0,43         | 0,28         | 0,20         | 0,46         |
| $\delta$ -Elemeno                  | 1341         | 1339             | 0,09                       | -            | 0,28         | 1,65         | 0,19         |
| $\alpha$ -Cubebeno                 | 1353         | 1348             | 0,33                       | 0,21         | -            | -            | 0,24         |
| Isoledeno                          | 1376         | 1376             | 0,18                       | 0,19         | -            | -            | 0,10         |
| $\alpha$ -Copaeno                  | 1379         | 1376             | 2,22                       | 1,75         | 1,52         | 2,73         | 0,20         |
| $\beta$ -Elemeno                   | 1394         | 1390             | 0,32                       | 0,45         | 0,43         | 0,51         | 2,42         |
| <i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamoteno | 1417         | 1412             | 0,32                       | 0,23         | -            | -            | 0,18         |
| (E)-Cariofileno                    | 1422 a 1423  | 1419             | 4,62                       | 6,84         | 3,71         | 4,21         | 5,18         |
| $\gamma$ -Elemeno                  | 1430         | 1434             | 0,40                       | 0,22         | 0,27         | 0,27         | 0,05         |
| Aromadendreno                      | 1443         | 1439             | 1,08                       | 0,59         | 0,61         | 0,91         | 0,82         |
| $\beta$ -Farneseno (Z)             | 1439         | 1442             | 3,29                       | 2,15         | 2,30         | 2,23         | 1,99         |
| $\beta$ -Farneseno (E)             | 1459         | 1456             | 2,16                       | 2,58         | 2,46         | 2,37         | 2,75         |
| allo-Aromadendreno                 | 1464 a 1465  | 1460             | 1,05                       | 0,94         | 0,75         | 1,14         | 1,01         |
| $\gamma$ -Muuroloeno               | 1479         | 1479             | 1,02                       | 0,91         | 1,50         | 1,67         | 1,59         |
| Germacreno D                       | 1484         | 1485             | 3,59                       | 7,72         | 17,21        | 12,47        | 10,30        |
| Eudesma-4(14),11-dieno             | 1489         | 1489             | 0,51                       | 0,28         | 0,24         | 0,32         | 0,30         |
| $\alpha$ -Muuroloeno               | 1497 a 1498  | 1500             | 3,51                       | 6,26         | 6,78         | 7,09         | 7,35         |
| $\beta$ -Bisaboleno                | 1510         | 1505             | 2,78                       | 2,43         | 2,75         | 3,11         | 2,39         |
| $\gamma$ -Cadineno                 | 1516         | 1513             | 1,18                       | 1,43         | 1,86         | 1,73         | 1,39         |
| $\alpha$ -Cadineno                 | 1532         | 1538             | 2,89                       | 4,95         | 6,29         | 6,66         | 5,18         |
| Germacreno B                       | 1562         | 1561             | 4,78                       | 12,11        | 4,26         | 4,02         | 5,76         |
| Espatuleno                         | 1581         | 1578             | 4,24                       | 0,35         | 0,34         | 0,60         | 0,85         |
| Globulol                           | 1587 a 1588  | 1590             | 4,24                       | 1,61         | 1,71         | 2,28         | 2,07         |
| Carotol                            | 1606         | 1594             | 20,98                      | 13,22        | 13,16        | 15,31        | 15,50        |
| $\alpha$ -Bisabolol                | 1685 a 1687  | 1685             | 3,81                       | 3,71         | 3,36         | 1,81         | 1,66         |
| <b>Total</b>                       |              |                  | <b>78,75</b>               | <b>81,68</b> | <b>77,89</b> | <b>78,62</b> | <b>80,25</b> |
| <b>Não identificados</b>           |              |                  | <b>21,25</b>               | <b>18,32</b> | <b>22,11</b> | <b>21,38</b> | <b>19,75</b> |

(-) Não detectado na amostra. MRP - *M. rostrata* proveniente da coleta preliminar; MR01 - coleta do final da primavera; MR02 - coleta do final do verão; MR03 - coleta do final do outono e MR04 - coleta da Primavera.



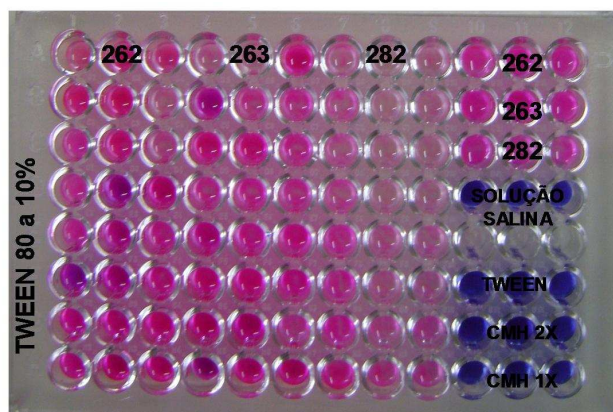
**Figura 76:** Variação Sazonal dos constituintes majoritários identificados nos Óleos Essenciais de *Myrcia rostrata* DC.



**Figura 77:** Variação Sazonal dos constituintes majoritários da fração sesquiterpênica identificados nos Óleos Essenciais de *Myrcia rostrata* DC.

#### 5.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo método da Microdiluição em Caldo com Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Antes de serem iniciados os testes de suscetibilidade dos microrganismos às amostras de óleo essencial, foi realizado um ensaio preliminar de microdiluição em caldo para o Tween 80 (Merck®) diluído em água destilada a 10%. O Tween foi testado contra os mesmos microrganismos usados na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, e não apresentou qualquer tipo de atividade inibitória no crescimento dos mesmos nas concentrações utilizadas nos testes (inferiores a 5%) (Figura 78).



**Figura 78:** Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Tween 80 a 10% contra duas cepas de *S aureus* e uma de *Bacillus cereus*.

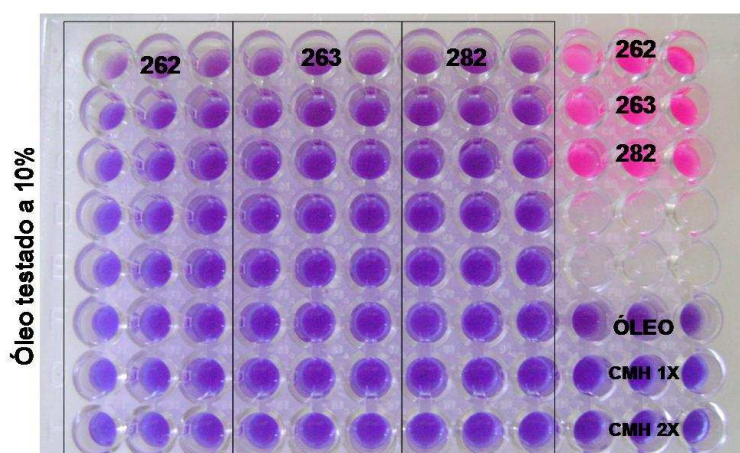
A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC., revelou que o conjunto das amostras testadas foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos listados na Tabela 03.

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados apenas com os óleos essenciais das espécies *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC, pois para a espécie *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC o rendimento dos óleos, em todas as coletas, foi insuficiente para a realização dos mesmos.

As Tabelas 09 e 10, resumem os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), para as amostras de óleo essencial obtidas da *Myrcia alagoensis* O. Berg e da *Myrcia rostrata* DC. Os óleos apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas. A

concentração inicial das soluções dos óleos essenciais usadas nos testes variou de 1 a 10%.

Inicialmente, a solução de óleo essencial foi testada numa concentração de 10%. Entretanto, para alguns microrganismos a inibição do crescimento foi total (Figura 79), impossibilitando a determinação da CIM. Tendo em vista resultados semelhantes a este, foram feitas repetições com concentrações iniciais menores, até que a CIM para todas as bactérias fosse determinada.



**Figura 79:** Microdiluição em caldo do óleo essencial de *Myrcia alagoensis* O. Berg

Nos testes de atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo, os melhores resultados referem-se aos menores valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Ou seja, quanto menor o valor da CIM, maior é a atividade antimicrobiana do agente testado, uma vez que, quantidades menores do mesmo, são suficientes para provocar a inibição do crescimento dos microrganismos sensíveis a este agente antimicrobiano.

Para a *Staphylococcus aureus* (CCMB262), cepa resistente à estreptomicina e à diidroestreptomicina, os melhores resultados foram aqueles das amostras da espécie *Myrcia alagoensis* O. Berg coletadas em março de 2008 (MAP) e para aquela coletada no final do outono (MA03), com valores da CIM inferiores a 0,02%. A espécie *Myrcia rostrata* DC. também exibiu um bom resultado, CIM equivalente a 0,04%, para a amostra coletada no final do inverno. Já para a *S. aureus* (CCMB263), resistente à novobiocina, os resultados da CIM foram inferiores a 0,02% para as amostras da *Myrcia alagoensis* O. Berg obtidas no final do verão (MA02) e do outono (MA03); e iguais a 0,16% para os óleos essenciais de *Myrcia rostrata* DC., provenientes do final da primavera (MR01), outono (MR03) e inverno (MR04).



**Tabela 09:** Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Cloranfenicol e em (%) da CIM e da CBM para as amostras de óleo essencial de *M. alagoensis* O. Berg.

| BACTÉRIAS                      | CÓDIGOS | CONTROLE<br>CIM | <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|---------|-----------------|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                |         |                 | MAFF                             |      | MAFS |      | MAP  |      | MA01 |      | MA02 |      | MA03 |      | MA04 |      |
|                                |         |                 | CIM                              | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  |
| <i>S. aureus</i>               | CCMB262 | 1,25            | 0,04                             | 0,63 | 0,16 | 0,16 | *    | 0,02 | 0,16 | 0,31 | 0,25 | 0,25 | *    | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| <i>S. aureus</i>               | CCMB263 | <0,04           | 0,08                             | 1,25 | 0,08 | 0,63 | 0,04 | 0,04 | 0,16 | 0,31 | *    | 0,02 | *    | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| <i>Bacillus cereus</i>         | CCMB282 | 1,25            | 0,08                             | 0,63 | 0,16 | 0,16 | 0,04 | 0,04 | 0,08 | 0,08 | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| <i>E. coli</i>                 | CCMB284 | 1,25            | 5                                | 5    | -    | -    | -    | -    | 2,5  | -    | -    | -    | -    | -    | 2,5  | 2,5  |
| <i>E. coli</i>                 | CCMB261 | 1,25            | -                                | -    | -    | -    | -    | -    | #    | 0,47 | #    | 0,12 | 0,16 | 0,47 | 0,16 | 0,47 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | CCMB281 | 1,25            | 5                                | 5    | 5    | 0    | 1,25 | 1,25 | 0,63 | 1,25 | 2,5  | 0    | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | CCMB268 | 0,16            | 0,63                             | 0    | 0,08 | 0    | 2,5  | 2,5  | 1,25 | 1,25 | 5    | 0    | 5    | 0    | 5    | 0    |

(\*) Indica CIM inferior a 0,02%; (-) Indica não testado; (#) Indica CIM inferior a 0,04%; (0) Indica que não houve ação bactericida, ou seja, o óleo teve ação bacteriostática. MAFF - *M. alagoensis* folhas frescas; MAFS - *M. alagoensis* folhas secas; MAP - *M. alagoensis* coleta preliminar; MA01 - coleta do final da primavera; MA02 - coleta do final do verão; MA03 - coleta do final do outono e MA04 - coleta da Primavera.

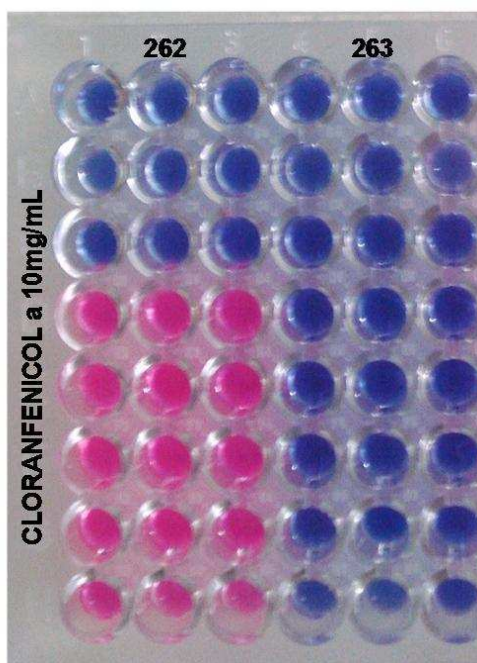
**Tabela 10:** Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Cloranfenicol e em (%) da CIM e da CBM para as amostras de óleo essencial obtidas de *M. rostrata* DC.

| BACTÉRIAS                      | CÓDIGOS | CONTROLE<br>CIM | <i>Myrcia rostrata</i> DC. |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|---------|-----------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                |         |                 | MR01                       |      | MR02 |      | MR03 |      | MR04 |      |
|                                |         |                 | CIM                        | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  | CIM  | CBM  |
| <i>S. aureus</i>               | CCMB262 | 1,25            | 0,16                       | 0,16 | 0,31 | 0    | 0,16 | 0,63 | 0,04 | 0,31 |
| <i>S. aureus</i>               | CCMB263 | <0,04           | 0,16                       | 0,31 | 1,25 | 2,5  | 0,16 | 0,31 | 0,16 | 0,63 |
| <i>Bacillus cereus</i>         | CCMB282 | 1,25            | 0,16                       | 1,25 | 0,16 | 0,31 | 0,08 | 0,31 | 0,04 | 0,08 |
| <i>E. coli</i>                 | CCMB284 | 1,25            | 1,25                       | 5    | 0,31 | 1,25 | 0,08 | 1,25 | 2,5  | 2,5  |
| <i>E. coli</i>                 | CCMB261 | 1,25            | 1,25                       | 1,25 | 0,63 | 1,25 | 0,63 | 1,25 | 1,25 | 2,5  |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | CCMB281 | 1,25            | 0,63                       | 1,25 | 0,16 | 0,63 | 0,16 | 0,63 | 0,63 | 1,25 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | CCMB268 | 0,16            | 2,5                        | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 0,63 | 1,25 | 2,5  | 2,5  |

(0) Indica que não houve atividade bactericida, ou seja, o óleo teve ação bacteriostática. MR01 - coleta do final da primavera; MR02 - coleta do final do verão; MR03 - coleta do final do outono e MR04 - coleta da Primavera.

O Cloranfenicol foi capaz de inibir o crescimento da *S. aureus* (CCMB263), em todas as diluições da placa, ou seja, a inibição ocorreu até uma concentração de 0,04 mg/mL, sendo a CIM inferior a este valor. O mesmo aconteceu com as amostras de óleo essencial da *Myrcia alagoensis* O. Berg provenientes da coleta preliminar, realizada em março de 2008. Assim como, com as amostras do final do verão e do outono, quando testadas contra a referida cepa. A inibição também aconteceu em todas as diluições e a CIM dos óleos, provavelmente, equivale a um valor inferior a 0,02% para MA02 e MA03.

Para o *Bacillus cereus* (CCMB282), o óleo da *M. alagoensis* O. Berg, obtido no final do outono, inibiu o crescimento do referido microrganismo numa concentração de 0,02%, e no final do verão e inverno numa concentração de 0,04%. Já o óleo obtido da *Myrcia rostrata* DC. coletada no final do inverno apresentou uma CIM de 0,04%. Cabe ressaltar que os resultados do antibiótico Cloranfenicol (Figura 80), usado como controle positivo e testado a 10 mg/mL contra as bactérias, indicaram uma CIM equivalente a 1,25% para o *Bacillus cereus* (CCMB282). Entretanto, o referido microrganismo foi inibido por todas as amostras de óleo essencial testadas, numa concentração inferior a 0,63%. Além disso, os óleos exibiram ação bactericida contra este bacilo em concentrações inferiores a 1,25%.



**Figura 80:** Resultado da Microdiluição em Placa para o antibiótico Cloranfenicol testado numa concentração de 10 mg/mL contra duas cepas de *S. aureus*.

**Foto:** VASCONCELOS NETO, 2010.

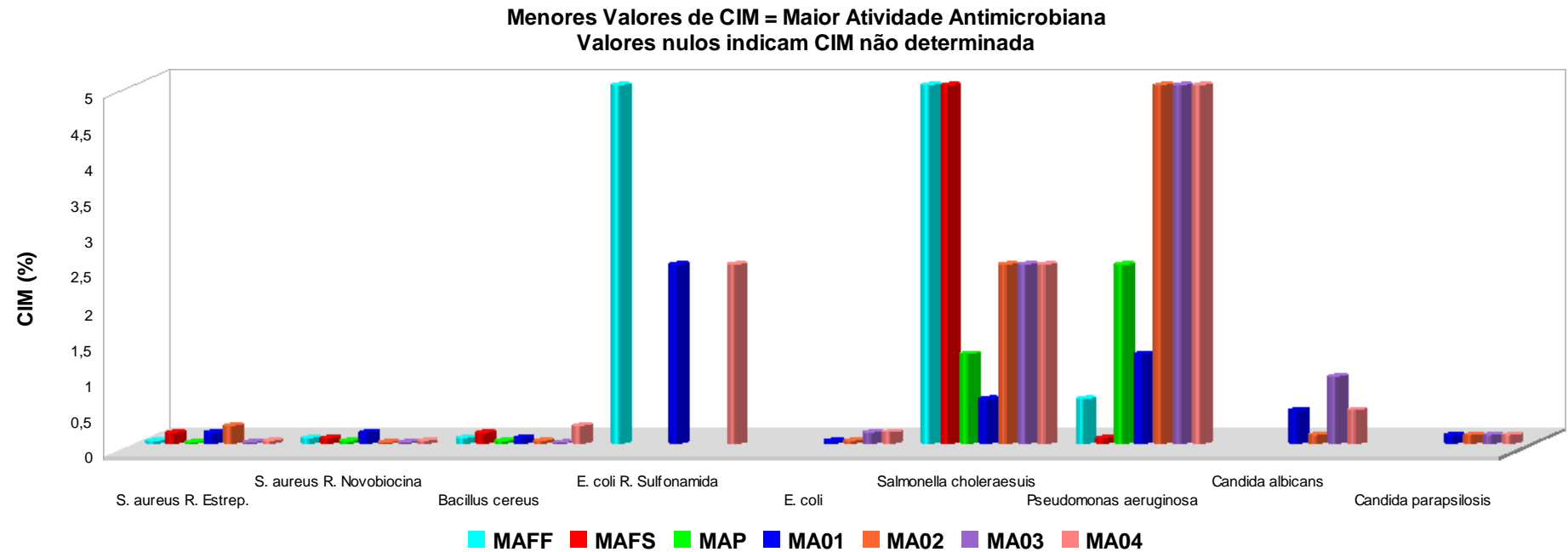
As amostras de óleo essencial também inibiram o crescimento das bactérias Gram negativas, embora com valores de CIM superiores aos obtidos para as bactérias Gram positivas. Para a *Escherichia coli* (CCMB284), os melhores resultados foram os da *M. alagoensis* O. Berg, amostras obtidas no final da primavera (MA01) e do inverno (MA04) e para o óleo da *Myrcia rostrata* DC., proveniente da coleta realizada no final do outono. Os valores da CIM foram respectivamente iguais a 2,5 e 0,08%. Por outro lado, para a *Escherichia coli* (CCMB261), resistente à sulfonamida, os melhores resultados foram de CIM inferior 0,04% para a *M. alagoensis* O. Berg, amostras oriundas do final da primavera e verão e 0,63% para as amostras da espécie *Myrcia rostrata* DC. coletadas no final do verão e outono.

As duas cepas de *E. coli* não tiveram a CIM determinada para algumas amostras, devido à falta de óleo essencial ocasionada pela necessidade de realização de repetições.

A *Salmonella choleraesuis* (CCMB281) foi inibida nas concentrações de 0,63% para o óleo da *M. alagoensis* O. Berg obtido no final da primavera (MA01) e de 0,16% para os óleos da *Myrcia rostrata* DC., provenientes das coletas do final do verão (MR02) e do outono (MR03).

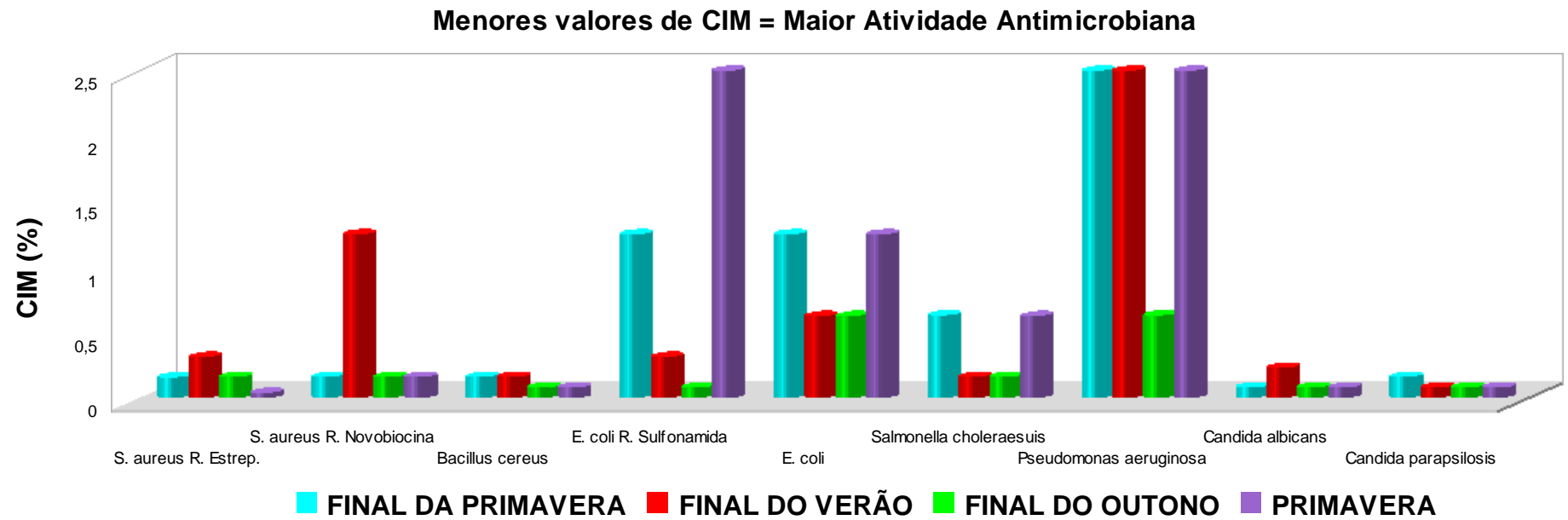
Os melhores resultados para a *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB268) foram 0,08% para o óleo obtido das folhas secas de *M. alagoensis* O. Berg e 0,63% para o óleo obtido das folhas da *Myrcia rostrata* DC coletadas no final do outono (MR03).

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de óleo essencial de *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC., testadas frente às bactérias supracitadas podem ser melhor visualizados nas Figuras 81 e 82. Nestes gráficos é possível perceber que os testes com as bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* foram os que apresentaram as maiores oscilações no período sazonal avaliado, com os menores valores de CIM (0,08% e 0,16%, respectivamente) para a amostra de *Myrcia alagoensis* O. Berg obtida no final da primavera, e máximos para as coletas nas demais estações (5% para as duas bactérias). No caso da *Myrcia rostrata* DC as maiores variações sazonais da atividade antimicrobiana também puderam ser observadas nos testes frente às duas bactérias Gram negativas, a *Escherichia coli* resistente à sulfonamida e a *Pseudomonas aeruginosa*, com valores mínimos de CIM de 0,08% e 0,63%, respectivamente, e máximos de 2,5%.



**Figura 81:** Variação Sazonal da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg contra Bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e Leveduras. MAFF - *M. alagoensis* folhas frescas; MAFS - *M. alagoensis* folhas secas; MAP - *M. alagoensis* coleta preliminar; MA01 – coleta do final da primavera; MA02 - coleta do final do verão; MA03 - coleta do final do outono e MA04 - coleta da Primavera.

Fonte: SILVA, 2010.



**Figura 82:** Variação Sazonal da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de *Myrcia rostrata* DC. contra Bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e Leveduras.

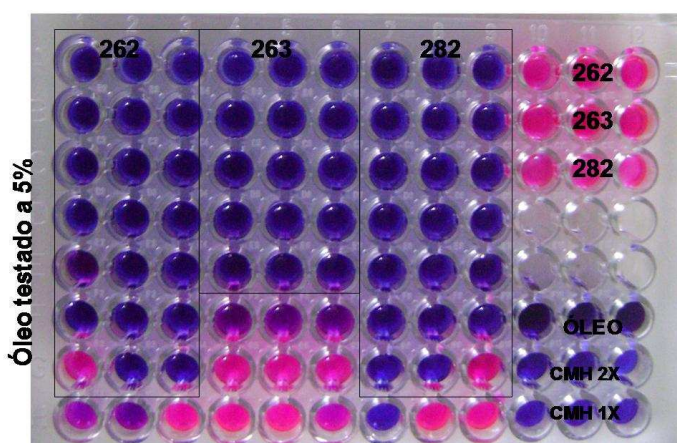
**Fonte:** SILVA, 2010.

Para as leveduras, o óleo testado numa concentração inicial de 10% não inibiu o crescimento das mesmas. Assim, os óleos foram testados numa concentração inicial de 30%, para que a CIM fosse determinada. Os dados estão expostos nas Tabelas 11 e 12.

As leveduras *Candida albicans* (CCMB266) e *Candida parapsilosis* (CCMB288) foram inibidas em concentrações inferiores a 0,12% pelos óleos essenciais das folhas de *M. alagoensis* O. Berg coletadas no outono e na primavera. Para os óleos de *Myrcia rostrata* DC., provenientes do material vegetal coletado em todas as estações do ano, com exceção do outono, a inibição ocorreu na concentração de 0,08%.

O antifúngico Nistatina, testado a 2 mg/mL, e usado como controle positivo, inibiu tanto a *Candida albicans* (CCMB266) quanto a *Candida parapsilosis* (CCMB288) até a última diluição, a qual foi equivalente a uma concentração de 0,008 mg/mL. Na concentração inicial de 2 mg/mL, a Nistatina teve ação fungicida até a linha H, a qual correspondeu a uma concentração de 0,008 mg/mL.

Para as amostras, nas quais a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada (Figura 83), foi realizado o plaqueamento dos poços nos quais a inibição do crescimento dos microrganismos foi detectada. A inibição foi indicada pela coloração azul dos poços, já o crescimento, pela coloração rósea.



**Figura 83:** Microdiluição em caldo do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. com determinação da Concentração Inibitória Mínima.

**Foto:** SILVA, 2010.

**Tabela 11:** Valores em (mg/mL) da CIM para o antifúngico Nistatina e em (%) da CIM e da CFM para as amostras de óleo essencial obtidas de *Myrcia alagoensis* O. Berg.

| LEVEDURAS                   | CÓDIGOS | NISTATINA<br>a 2 mg/mL<br>CIM | <i>Myrcia alagoensis</i> O. Berg |      |       |      |      |      |       |      |
|-----------------------------|---------|-------------------------------|----------------------------------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|                             |         |                               | MA01                             |      | MA02  |      | MA03 |      | MA04  |      |
|                             |         |                               | CIM                              | CFM  | CIM   | CFM  | CIM  | CFM  | CIM   | CFM  |
| <i>Candida albicans</i>     | CCMB266 | //                            | 0,47                             | 0,94 | <0,12 | 0,94 | 0,94 | 1,88 | 0,47  | 3,75 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | CCMB288 | //                            | 0,31                             | 0,63 | <0,04 | 0,63 | 0,31 | 0,63 | <0,12 | #    |

(//) Indica CIM e CBM inferiores a 0,008 mg/mL (última concentração da diluição em série); (#) Indica Fungicida até 0,12%. MAFF - *M. alagoensis* folhas frescas; MAFS - *M. alagoensis* folhas secas; MAP - *M. alagoensis* coleta preliminar; MA01 – coleta do final da primavera; MA02 - coleta do final do verão; MA03 - coleta do final do outono e MA04 - coleta da Primavera.

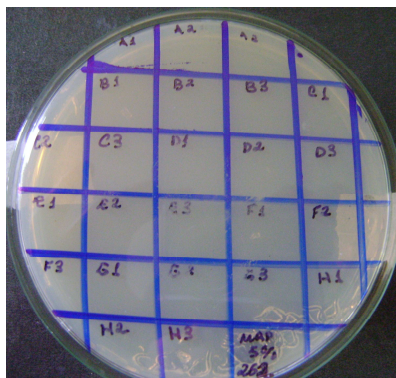
**Tabela 12:** Valores em (mg/mL) da CIM para o antifúngico Nistatina e em (%) da CIM e da CFM para as amostras de óleo essencial obtidas de *Myrcia rostrata* DC.

| LEVEDURAS                   | CÓDIGOS | NISTATINA<br>a 2 mg/mL<br>CIM | <i>Myrcia rostrata</i> DC. |     |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------------|---------|-------------------------------|----------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|                             |         |                               | MR01                       |     | MR02 |      | MR03 |      | MR04 |      |
|                             |         |                               | CIM                        | CFM | CIM  | CFM  | CIM  | CFM  | CIM  | CFM  |
| <i>Candida albicans</i>     | CCMB266 | //                            | 0,08                       | 2,5 | 0,23 | 1,25 | 0,08 | 0,63 | 0,08 | 1,25 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | CCMB288 | //                            | 0,16                       | 5   | 0,08 | 2,5  | 0,08 | 5    | 0,08 | 1,25 |

(//) Indica CIM e CBM inferiores a 0,008 mg/mL. MR01 – coleta do final da primavera; MR02 - coleta do final do verão; MR03 - coleta do final do outono e MR04 - coleta da Primavera.

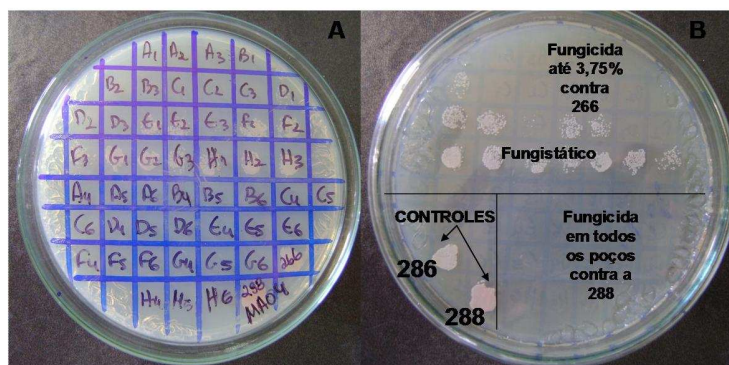
Os resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as amostras dos óleos essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC., estão expostos ao lado dos respectivos valores da CIM, nas Tabelas 09 a 12.

Todas as amostras de óleo essencial testadas exibiram atividade bactericida ou fungicida contra os microrganismos testados, em concentrações que variaram de 0,02% a 5% (Figuras 84 e 85). Exceto as amostras da espécie *Myrcia alagoensis* O. Berg coletadas no final do verão, outono e inverno, assim como a amostra de óleo obtida das folhas secas da coleta preliminar realizada em 2007, que apresentaram apenas atividade bacteriostática contra as bactérias *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 09).



**Figura 84:** Placa de Determinação da CBM para o óleo essencial da *Myrcia alagoensis* O. Berg, testado numa concentração inicial de 5% contra a *Staphylococcus aureus* (CCMB262), cepa resistente à estreptomicina e à diidroestreptomicina, evidenciando ação bactericida em todas as concentrações testadas.

**Foto:** SILVA, 2010.



**Figura 85:** Determinação da CFM para o óleo essencial de *Myrcia alagoensis* O. Berg obtido das folhas coletas na primavera. Em A, poços identificados na frente da placa de Petri e em B a Determinação da CFM no fundo da mesma placa.

**Fotos:** SILVA, 2010



Em resumo, os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana revelaram que todas as amostras de óleos essenciais exibiram um amplo espectro de ação. Tendo em vista que, todas as cepas bacterianas, tanto Gram positivas quanto Gram negativas, tiveram seu crescimento inibido em concentrações inferiores a 2,5%; assim como, as duas leveduras do gênero *Candida*, que foram inibidas em concentrações de óleo inferiores a 1%.

As bactérias Gram positivas apresentaram os menores valores de CIM, em um número maior de amostras. Esta maior sensibilidade observada das bactérias Gram positivas quando comparada à das Gram negativas frente aos óleos essenciais está de acordo com o descrito na literatura, pois segundo Holley e Patel (2005) a membrana dual apresentada pelas bactérias Gram negativas forma um envelope complexo, protegendo-as contra a ação de agentes antimicrobianos.

Cerqueira e colaboradores (2007) pelo método da microdiluição em caldo com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontraram para a *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilicina e para a *C. albicans*, valores de CIM respectivamente iguais a 0,25%; 0,25% e 0,125%, para os óleos obtidos da *Myrcia myrtifolia*, coletada no município de Salvador-BA. Comparando-se os valores da CIM encontrados no trabalho supracitado com aqueles obtidos para algumas amostras dos óleos essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg e *Myrcia rostrata* DC., nota-se que a atividade antimicrobiana de algumas amostras de óleo essencial utilizadas na presente pesquisa, supera o resultado do trabalho publicado em 2007, em 92,4% para a bactéria *S. aureus* e em 37,6% para a *Candida albicans*.

Embora o mecanismo de ação dos compostos terpênicos, constituintes dos óleos essenciais, ainda não esteja totalmente elucidado, a atividade observada pode ser atribuída à lipofilicidade destas substâncias, que por permearem a membrana celular dos microrganismos, podem desestabilizar a estrutura da célula bacteriana. Além disso, alguns terpenos são conhecidos pela capacidade de captarem oxigênio e atuarem sobre o caminho metabólico da fosforilação oxidativa da célula microbiana, auxiliando assim também na atividade observada (COWAN, 1999; BREHM-STECHER et al., 2003)

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho propôs avaliar a interferência da sazonalidade na composição química qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais de *Myrcia alagoensis* O. Berg, *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. e *Myrcia rostrata* DC., bem como analisar a atividade antimicrobiana destes óleos frente a alguns microrganismos.

Os resultados obtidos revelaram que diferenças no ambiente circundante, como alterações no índice de pluviosidade e na disponibilidade média de água de solo, propiciadas pela sazonalidade, podem atuar interferindo tanto no rendimento dos óleos essenciais como na sua composição química.

Foram notadas diferenças, tanto no conjunto dos constituintes químicos presentes em cada amostra de óleo essencial, como no percentual de cada constituinte em relação ao total de compostos identificados. A análise química também revelou uma predominância de sesquiterpenos em todas as amostras das três espécies de *Myrcia* DC. estudadas.

Os dados obtidos na presente pesquisa assemelharam-se àqueles disponíveis na literatura para a maioria das espécies americanas da família Myrtaceae, e para as espécies do gênero *Myrcia* DC. já estudadas até o presente momento.

Com relação à avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* pelo método da microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima, os resultados foram bastante significativos. Todas as amostras de óleo essencial foram capazes de inibir tanto o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, como o de leveduras, em concentrações inferiores a 2,5% e 1%, respectivamente. Além disso, a ação destes óleos foi bactericida e fungicida para quase a totalidade das amostras de óleo essencial analisadas.

## 7 REFERÊNCIAS

ABELSON, P. H. Medicine from plants. *Science* 247, n. 4942, p. 513, 1990. *apud* LUCCHESI, Angélica Maria; *et al.* **Plantas da caatinga**: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido), 2006. v. 4. 297p.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Allured Publishing Corporation©: Carol Stream, Illinois-USA, 2007. 804p.

ADATI, R. T.; FERRO, V. de O. Volatile Oil Constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 18, p. 691-692, 2006.

ANDRADE, J. M. T. **Antropologia etnobotânica**. Paris, 8p. datilografado, 1989 *apud* MIGUEL, Marília Dallarmi; MIGUEL, Obdulio Gomes. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Tecmedd, 2004. 116p.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. das G. B.; SILVA, A. C. M. Constituents of the Essential Oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg. *Journal of Essential Oil Research*. v. 18, p. 93-94, 2006.

APEL, M. A., *et al.* **Investigação da Atividade Antimicrobiana de algumas espécies de Myrtaceae**. XV SIMPÓSIO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. Águas de Lindóia, São Paulo, SP. p. 51. 14 a 17 de outubro de 1998.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. Essential Oil Composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. *Journal of Essential Oil Research*. v. 16, p. 321-322, 2004.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia hyemalis* and *Eugenia stigmatica*. Part VI: Section Biflorae. *Journal of Essential Oil Research*. v. 16, p. 437-439, 2004.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. Volatile Constituents of *Eugenia mattsii* Legr (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 17, p. 284-285, 2005.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Composição Química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 402-407, 2006.

AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

ARZE, J. B. L.; JEAN, F. I.; GAGNON, H.; COLLIN, G.; GARNEAU, F. X.; PICHETTE, A. Essential Oils from Bolivia. VII. Myrtaceae: *Myrcianthes osteomeloides* (Rusby) McVaugh and *Myrcianthes pseudomato* (Legrand) McVaugh. *Journal of Essential Oil Research*. v. 17, p. 64-692, 2005.

ASSAREH, M. H.; JAIMAND, K.; REZAEI, M. B. Chemical Composition of the Essential Oils of six *Eucalyptus* species (Myrtaceae) from South West of Iran. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 08-10, 2007.

AUGUSTO, F. **Cromatografia a gás**: Curso em diapositivos. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Chemkeys: Liberdade para aprender. Jul., 2000. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografia-a-gas-curso-em-diapositivos/>>. Acesso em: 14.01.2008.

BENEDUM, J. **Phytotherapie der Antike**. In: Loew D, Rietbrock N (Hrsg) *Phytopharmaka IV, Forschung und klinische Anwendung*. Dr. D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1998. *apud* SCHULZ, Volker; HANSEL, Rudolf; TYLER, Varro E. **Fitoterapia racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4. ed. Barueri, SP: Editora Manole, 2002. 386p.

BERTOLUCCI, S. K. V.; CAPPELLE, E. R.; PINHEIRO, R.C. **Manipulação de fitoterápicos**. Lavras, MG: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2001.

BEYLIER, M. F. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfum Flavor.*, 4(2), 23-26 (1979) *apud* GBENOU, J. D.; MOUDACHIROU, M.; CHALCHAT, J. C.; FIGUÉREDO, G. Chemotypes in *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (niauli) from Benin using Multivariate Statistical Analysis of their Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 101-104, 2007.

BEZERRA, J. L., et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16 (Supl.), p. 631-637, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso em: 14.01.2008.

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia**: Fundamentos e Perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002. 829p.

BRASIL. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Legislação Federal. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/legis.htm>>. Acesso em: 23.07.2007.

BRITO, J. O. **Goma-Resina de Pinus e Óleos Essenciais de Eucalyptus: destaques na área de produtos florestais não-madeireiros**. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2002. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecprodutos/gomaeoleos.asp>> Acesso em: 26.06.2007.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apitone. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 47, p. 3357-3360, 2003.

BROPHY, Joseph J.; GOLSACK, Robert J. Leaf oils of the genera *Barongia*, *Mitranthia*, *Sphaerantia* and *Ristantia* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 15, p. 226-230, 2003.

BROPHY, Joseph J.; GOLSACK, Robert J. The leaf oils of the Australian species of *Decaspermum* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 17, p. 611-613, 2005.

BROPHY, Joseph J.; GOLSACK, Robert J. Leaf oil of *Backhousia enata* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 26-27, 2007.

BRUNETON, Jean. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A., 1991. 594p.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, J. A. **Fitoquímica e Química de Produtos Naturais**. Lavras, MG: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2001. 67p.

CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspetos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L. **Morfoanatomia de Plantas Mediciniais**. Lavras, MG: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2000.

CERQUEIRA, M. D de.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. de O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 8, p. 998-1003, 2007.

CHAGAS, A. C. de S., et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 39, n. 5, 2002.

CHEN, Hsin-Chun; SHEU, Ming-Jen; LIN, Li-Yun; WU, Chung-May. Chemical Composition of the leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 345-347, 2007.

CHRISTIAN, G. D.; O'REILLY, J. E. **Instrumental Analysis**. 2. ed. S.I.: Allyn and Bacon, 1986. p. 658-765. *apud* FERRI, Pedro Henrique. **Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais**. In: **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. DI STASI, Luiz Cláudio. São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 130-156.

CIOLA, Remolo. **Introdução à cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: Edgard Blücher, Editora da Universidade de São Paulo, 1973. 231p.

CORRÊA, Anderson Domingues; BATISTA, Rodrigo Siqueira; QUINTAS, Luis Eduardo, M. **Plantas Mediciniais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ: Vozes, 2003. 6. ed. 247p.

CORRÊA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R. **A Química de Mirtáceas Brasileiras: O óleo essencial de *Pseudocaryophyllus pabstianus***. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 42, p.127-128, 1970.

Disponível em: <<http://www.prossiga.br/ottogottlieb>>. Acesso em: 16.12.2006.

CORRÊA, R. G. C., GOTTLIEB, O. R., KOKETSU, M., MOURA, L. L., MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais de espécies do gênero *Pseudocaryophyllus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 44, p. 307-309, 1972. Suplemento. Trabalho apresentado ao 5º Congresso Internacional de Óleos Essenciais, Rio de Janeiro, 1971.

COSTA, Aloísio Fernandes. **Elementos da Flora Aromática: O Laboratório de Farmacognosia no estudo dos óleos essenciais de Portugal e Angola**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1975. 295p.

COSTA, Aloísio Fernandes. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002a. v. 1. 1031p.

COSTA, Aloísio Fernandes. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002b. v. 3. 992p.

COUTINHO, I. D.; POPPI, N. R. Identification of the Volatile Compounds of leaves and flowers in guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg). *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 405-407, 2007.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 12, p. 564-582, 1999.

CRAVEIRO, Afranio Aragão; et al. Universidade Federal do Ceará. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 209p.

CUNHA, Antônio Proença da. **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente**. Disponível em: <[www.antoniopcunha.com.sapo.pt](http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt)>. Acesso em: 05.12.2007.

DE KRAKER, J. W.; FRANSSEN, M. C. R.; De GROOT, A.; KÖNIG, W. A.; BOUWMEESTER, H. (+)-Germacrene A Biosynthesis: The Committed Step in the Biosynthesis of Bitter Sesquiterpene Lactones in Chicory. *Journal Plant Physiology*, 1998, 117: 1381-1392.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. John Wiley & Sons, Ltd. UK, 2002.

DI STASI, Luiz Cláudio. **Plantas medicinais: Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.

DUARTE, A. R.; COSTA, A. R. T.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Changes in Volatile Constituents during fruit ripening of wild *Eugenia dysenterica* DC. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 30-32, 2008.

DUNIAU, Marie Christine Monique. **Plantas Medicinais:** da magia à ciência. Rio de Janeiro: Brasport, 2003. 146 p.

ELDIN, Sue; DUNFORD, Andrew. **Fitoterapia na atenção primária à saúde.** São Paulo, SP: Manole, 2001. 163p.

FARIA, Terezinha de Jesus. **Processos de Separação e Purificação de Fármacos.** In: **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular:** um curso prático. ANDREI, César Cornélio; FERREIRA, Dalva Trevisan; FACCIONE, Milton; FARIA, Terezinha de Jesus. Barueri, SP: Manole, 2003. p. 01-32.

FERRI, P. H. et al. Changes in Volatile Constituents During Fruit Ripening of Wild *Eugenia dysenterica* DC. *Journal of Essential Oil Research.* v. 20, p. 30-32, 2008.

FERRI, Pedro Henrique. **Química de Produtos Naturais:** Métodos Gerais. In: **Plantas medicinais:** Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. DI STASI, Luiz Cláudio. São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

FISCHER, D. C. H.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. H. Essential Oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research.* v. 17, p. 499-500, 2005.

FRANCO, J., NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, v. 15(3) p. 191-194, 2005.

GALLO, M. B. C., et al. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 17, n. 2, 2006.

GBENOU, J. D.; MOUDACHIROU, M.; CHALCHAT, J. C.; FIGUÉRÉDO, G. Chemotypes in *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (niauli) from Benin using Multivariate Statistical Analysis of their Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research.* v. 19, p. 101-104, 2007.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, p. 509-530, 2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade:** aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; et al. Rio Grande do Sul: Editora da UFSC, 5 ed., p. 14-15, 2004.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 12, n. 6, p. 639-657, 1995 *apud* VON POSER, Gilsane Lino; MENTZ, Lilian Auler. **Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS, Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 5. ed., p. 13-28, 2004.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862p.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. v. 22, p. 273-292, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). **Flora das Restingas do Litoral Norte da Bahia - Costa dos Coqueiros e Salvador**. Projeto Flora-Fauna. UE/BA-HERBÁRIO RADAMBRASIL. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/levantamento/inventario.shtm>>. Acesso em: 19.08.2007.

INSTITUTO DE GEOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA/IGEO-UFBA. **Cartografia de Solos do Campus II da Universidade do Estado da Bahia e da Área da Estação Experimental da EBDA do município de Alagoinhas-BA**. 1999. 46p.

INMET/INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Embrapa Informática Agropecuária. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario?uf=BA>>. Acesso em: 13 de julho de 2009.

IUCN. **Plants in danger. How do we know?** Gland. Switzerland and Cambridge. 1986. *apud* VIEIRA, Roberto Fontes et al. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002. 184p.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer, 1999 *apud* SOBRAL, M. **A Família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Editora UNISINOS, 2003.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006. 632p.

JAWETZ, Ernest; MELNICK, Joseph Lewis; ADELBERG, Edward A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 611p.

JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons**. E. B. Verlag©: Hamburg-Germany, 1998. 658p.



LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006. 632p.

LIMA, M. E. L., et al. **Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Espécies da Família Myrtaceae nativas da Mata Atlântica**. Libro de resúmenes de la V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, p. 97. Editora da Universidade do Uruguai, 2005. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/publi/banco/index?codprojeto+241>>. Acesso em: 04.08.2007.

LIMA, R. K. **Caracterização Química e Bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LIMA, N. P.; CERQUEIRA, S. H. F.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G. Composition and Chemical Variation of the Essential Oil from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. and *Eugenia* sp. (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 223-225, 2008.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. 593p.

LIMBERGER, R. P. et al., Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LIMBERGER, R. P.; SIMÕES-PIRES, C. A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Essential Oil of *Marlierea* species. *Journal of Essential Oil Research*. v. 16, p. 479-482, 2004.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, 2002. 512 p.

LUCHESE, Angélica Maria; et al. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido), 2006. v. 4. 297p.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K; ZIEGLER, A.; BIEGER, D. **Color Atlas of Pharmacology**. Thieme Flexibook. 3. ed. 1996. 386 p.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1987 *apud* DI STASI, Luiz Cláudio. **Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1987 *apud* SANTOS, R. I. dos. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Editora da UFRGS/Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 5. ed., p. 403-434 2004.

MATOS, Francisco José de Abreu. **As Plantas das Farmácias Vivas: álbum de gravuras para identificação das principais plantas medicinais do projeto farmácias vivas.** Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1997. 57p.

MATSUDA, H.; NORIHISA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines: Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. *Chemical Pharmaceutical Bull.* v. 50, p. 429-431, 2002.

MATTOS, Sérgio Horta; INNECCO, Renato; MARCO, Cláudia Araújo; ARAÚJO, Aurilene Vasconcelos. **Plantas Medicinais e Aromáticas Cultivadas no Ceará: Tecnologia de Produção e Óleos Essenciais.** Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 110 p.

MCNAIR, Harold M.; MILLER, James M. **Basic Gas Chromatography: Techniques in Analytical Chemistry.** John Wiley & Sons Scientific, Inc: New York, 1998. 104p.

MEDEIROS, J. R.; MEDEIROS, N.; MEDEIROS, H.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Composition of the bioactive Essential Oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from the Azores. *Journal of Essential Oil Research.* v. 15, p. 293-295, 2003.

MELO, R. M., et al. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 179-183, 2007.

MENDONÇA, R. C.; *et al.* **Flora Vascular do Cerrado.** In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF: Embrapa-Cerrados, 1998. p. 289-556. *apud* VIEIRA, Roberto Fontes et al. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002. 184p.

MIGUEL, Marília Dallarmi; MIGUEL, Obdulio Gomes. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** São Paulo: Tecmedd, 2004. 116p.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** Approved Standard – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, Wayne, Pennsylvania-USA, 2003.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras.** Norma Aprovada. 2. ed. NCCLS document M27-A2, Wayne, Pennsylvania-Estados Unidos, 2002.

OGUNWANDE, Isiaka A.; OLAWORE, Nureni O.; ADELEKE, Kasali A.; KONIG, Wilfried A. Chemical Composition of the Essential Oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Journal of Essential Oil Research.* v. 15, p. 297-301, 2003.

OLIVEIRA, A. M., et al. Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16 (Supl.), p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 15, p. 39-43, 2005.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGUERO, J.; MARBOT, R. Leaf Oils of *Psidium cymosum* Urb. and *Psidium sartorianum* Niedz. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. v. 15, p. 187-188, 2003.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGUERO, J.; MARBOT, R. Essential Oil of *Eugenia melanadenia* Krug et Urb. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. v. 15, p. 256-258, 2003.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; MARBOT, R.; MARTÍ, M. P. Leaf Oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. v. 16, p. 370-371, 2004.

PINO, J. A.; CLARA, E.; QUIJANO, C. Volatile Constituents of camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK. McVaugh) Leaves. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 205-207, 2008.

PINTO, J. E. B. P. et al. **Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares**. Lavras-MG: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2001. p. 07-10.

POIANA, M.; PISCOPO, A.; DE LUCA, S.; ROMEO, F. V. Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 373-379, 2008.

PORTAL SOS MATA ATLÂNTICA. Disponível em:  
<<http://www.sosmataatlantica.org.br/index.php?section=info&action=mata>>. Acesso em: 11 de junho de 2009.

RADULOVIĆ, N.; LAZAREVIĆ, J.; RISTIĆ, N.; PALIĆ, R. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochem. Syst. Ecol.* v. 35, p. 196-208, 2007.

RAJ, G.; GORGE, V.; PRADEEP, N. S.; SETHURAMAN, M. G. Volatile Constituents and Antibacterial Activity of *Eugenia rottleriana* Wight et Arn. Leaf Oil. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 588-590, 2007.

RAMANOELINA, P. A. R.; BIANCHINI, J. P.; GAYDOU, E. M. Main Industrial niauli (*Melaleuca quinquenervia*) Oil Chemotype Productions from Madagascar. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 261-266, 2008.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REIS, M. S. dos; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e Domesticação de Plantas Medicinais**. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; et al. Editora da UFSC, Rio Grande do Sul, 5 ed., p. 44, 2004.

RIZZINI, Carlos Toledo. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: Aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Âmbito Cultural Edições Ltda.,1996. 747p.

ROBBERS, James E.; SPEEDIE, Marilyn K.; TYLER, Varro E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372p.

RODRIGUES, A.G.; SANTOS, M. G. dos. **Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS: a Política do Ministério da Saúde**, 2007. Disponível em: <[www.ibpm.org.br/principal.shtml](http://www.ibpm.org.br/principal.shtml)>. Acesso em 12.06.2007.

ROSSI, Flávia; ANDREAZZI, Denise B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 118p.

RUSSO, E. M. K.; REICHELT, A. A. J.; FURLANETTO, R. P.; MOISES, R. C. S.; KASAMATSU, T. S.; CHACRA, A. R. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1990, 23, 11. *apud* CERQUEIRA, M. D de.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. de O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 8, p. 998-1003, 2007.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 48p. *apud* MATTOS, Sérgio Horta; INNECCO, Renato; MARCO, Cláudia Araújo; ARAÚJO, Aurilene Vasconcelos. **Plantas Medicinais e Aromáticas Cultivadas no Ceará: Tecnologia de Produção e Óleos Essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 110 p.

SATO, Sunao. **Produção de Antibióticos**. p. 101-124. In: LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotechnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. 593p.

SANTOS, Alberdan S.; ALVES, Sérgio de M.; FIGUEIREDO, Francisco J. C.; NETO, Olinto G. Da R. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Comunicado Técnico 99. Belém, PA. Nov, 2004. Embrapa/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

SCHULZ, Volker; HANSEL, Rudolf; TYLER, Varro E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4. ed. Barueri, SP: Editora Manole, 2002. 386p.

SEFIDKON, F.; BAHMANZADEGAN, A.; ASSAREH, M. H. Effect of distillation methods and harvesting times on the essential oil and cineole content of *Eucalyptus dealbata*. *Chemistry of Natural Compounds*, Tehran-Iran, v. 44, n. 2 p. 250-253, 2008.

SILVA, A. do N., et al. **Estudos Florísticos num remanescente de Floresta Secundária no Município de Alagoinhas-BA: A Família Myrtaceae.** In: 54º Congresso Nacional de Botânica, 2004. Viçosa, MG. Livro de Resumos da Sociedade Botânica do Brasil.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1979. 299 p.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** SIMÕES, C. M. O.; et al. Rio Grande do Sul: Editora da UFRS, 5 ed., 2004. 1102p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; et al. Rio Grande do Sul: Editora da UFRS, 5 ed., p. 467-495, 2004.

SKORUPA, L. A.; VIEIRA, R. F. **Coleta de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas.** In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. Fundamentos para coleta de germoplasma vegetal. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2002. *apud* VIEIRA, Roberto Fontes et al. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002. 184p.

SOBRAL, M. **A Família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul.**, p. 15-17, São Leopoldo, RS: Editora UNISINOS, 2003.

SOUZA FILHO, A. P. S., et al. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006. Disponível em: <<http://revistas.cpd.ufv.br/pdaninhaweb/?pagina=detalhePublicacao&cod=788>>. Acesso em: 10.06.2007.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; ITO, I. Y.; SALVADOR, M. J. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 75-78, 2008.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L. Essential Oil Composition of *Campomanesia adamantium* (Camb) O. Berg. *Journal of Essential Oil Research*. v. 20, p. 424-425, 2008.

TEUSCHER, E. Pharmazeutische Biologie. Braunschweig: Vieweg, 1990 *apud* SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; et al. Rio Grande do Sul: Editora da UFRS, 5 ed., p. 467-495, 2004.

TITTON, E. C. F.; BELO, R. A. S.; SIQUEIRA, F. S.; SILVA, G.; KHOURI, S. **Avaliação de Biofilme de *Candida spp.* em cateter venoso central por Cultura Quantitativa e Microscopia Eletrônica de Varredura.** In: XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade Vale do Paraíba: São José dos Campos-SP, 2009.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920p.

TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 386p.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; SALLYWON, A.; LANDRUM, L. R. The Essential Oil of *Mosiera ehrenbergii* (O. Berg.) Landrum (Myrtaceae) originally from Mexico and *M. longipes* (O. Berg.) Small from Florida. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 01-02, 2007.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. de; MORENO, P. R. H. Composição Química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, p. 805-810, 2006.

VALNET, J. *Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes*, Maloine, S.A. Paris (1984) *apud* GBENOU, J. D.; MOUDACHIROU, M.; CHALCHAT, J. C.; FIGUÉRÉDO, G. Chemotypes in *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (niauli) from Benin using Multivariate Statistical Analysis of their Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, p. 101-104, 2007.

VIEIRA, Roberto Fontes et al. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas**: Resultados da 1ª Reunião Técnica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002. 184p.

VIEIRA, T. R., et al. Chemical constituents from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 4, 2004.

VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S.; SANTANA, A. I.; SOLÍS, P. N.; GUPTA, M. P. Constituents and Biological Activity of the Essential Oil of *Eugenia acapulcensis* Steud. *Journal of Essential Oil Research*. v. 16, p. 384-386, 2004.

VON POSER, G. L.; et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 1829-1832, 1996 *apud* VON POSER, Gilsane Lino; MENTZ, Lilian Auler. **Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Editora da UFRGS/Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 5. ed., p. 75-89, 2004.

VON POSER, Gilsane Lino; MENTZ, Lilian Auler. **Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; et al. Editora da UFRGS/Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 5. ed., p. 75-89, 2004.

WEBER, Berthold; HARTMANN, Beat; STÖCKIGT, Detlef; KOHLENBERG, Birgit; SCHIMDT, Claus O.; BERTRAM, Heinz-Jürgen; Hölischer Bernd. Extensive study on

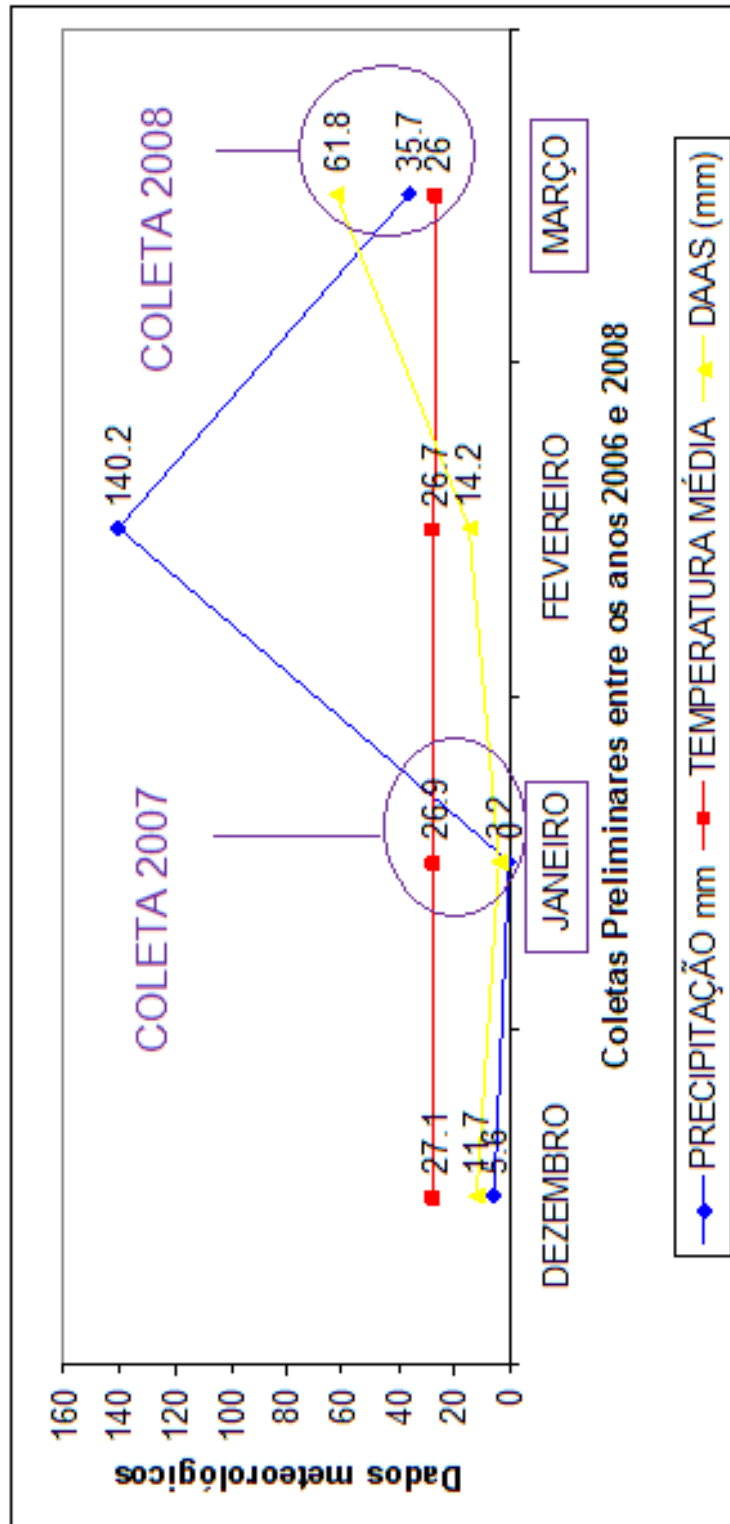
the minor constituents of the Essential Oil of *Eucalyptus dives* Schau. Type. *Journal of Essential Oil Research*. v. 18, p. 607-610, 2006.

## APÊNDICE A – CÓDIGO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL.

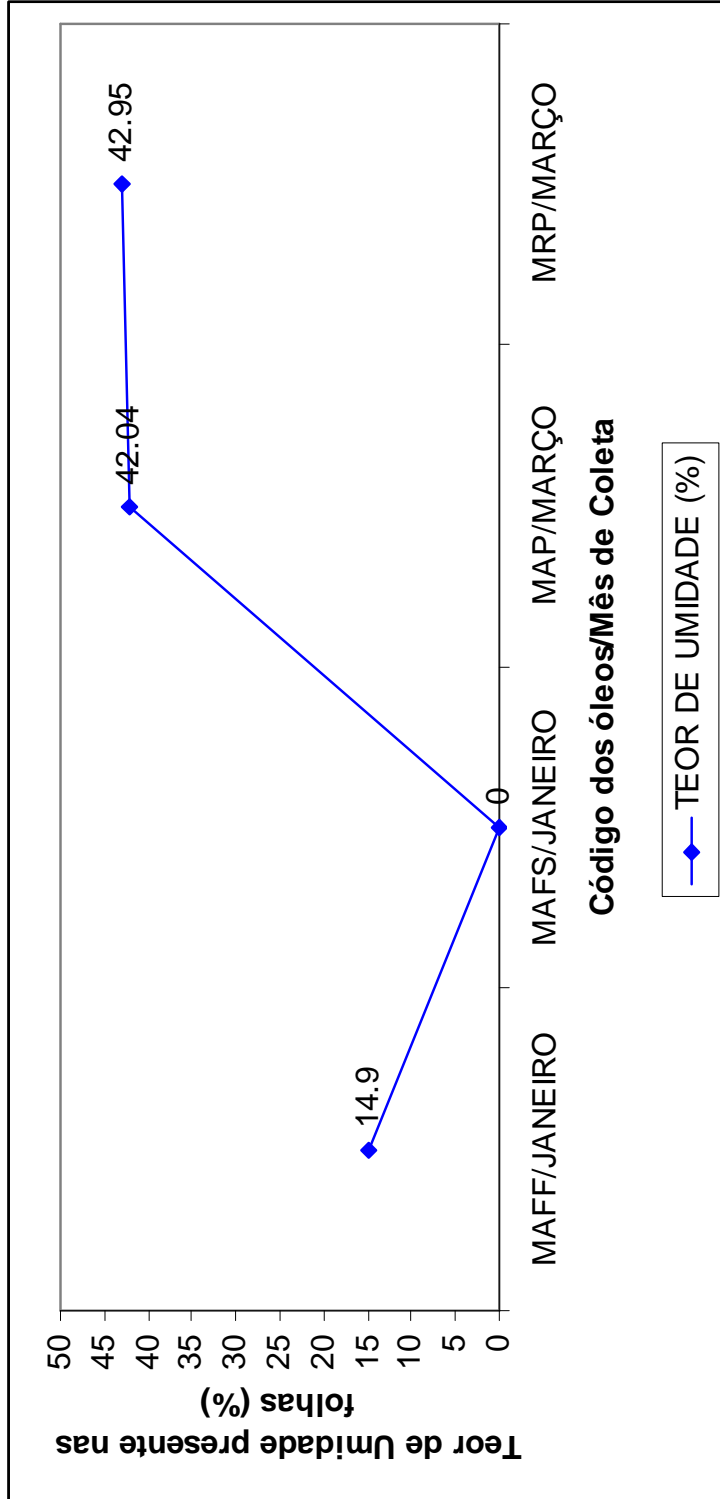
| DATA DAS COLETAS                      | ESPÉCIES                                  | CÓDIGO DOS ÓLEOS |
|---------------------------------------|---|------------------|
| 15 de janeiro de 2007                 | <i>Myrcia alagoensis</i> (Folhas Frescas) | MAFF             |
|                                       | <i>Myrcia alagoensis</i> (Folhas Secas)   | MAFS             |
| 10 de março de 2008                   | <i>Myrcia alagoensis</i> (Preliminar)     | MAP              |
|                                       | <i>Myrcia rostrata</i> (Preliminar)       | MRP              |
| 15 de dezembro de 2008<br>(Coleta 01) | <i>Myrcia alagoensis</i>                  | MA01             |
|                                       | <i>Myrcia guianensis</i>                  | MG01             |
|                                       | <i>Myrcia rostrata</i>                    | MR01             |
| 21 de março de 2009<br>(Coleta 02)    | <i>Myrcia alagoensis</i>                  | MA02             |
|                                       | <i>Myrcia guianensis</i>                  | MG02             |
|                                       | <i>Myrcia rostrata</i>                    | MR02             |
| 15 de junho de 2009<br>(Coleta 03)    | <i>Myrcia alagoensis</i>                  | MA03             |
|                                       | <i>Myrcia guianensis</i>                  | MG03             |
|                                       | <i>Myrcia rostrata</i>                    | MR03             |
| 25 de setembro de 2009<br>(Coleta 04) | <i>Myrcia alagoensis</i>                  | MA04             |
|                                       | <i>Myrcia guianensis</i>                  | MG04             |
|                                       | <i>Myrcia rostrata</i>                    | MR04             |



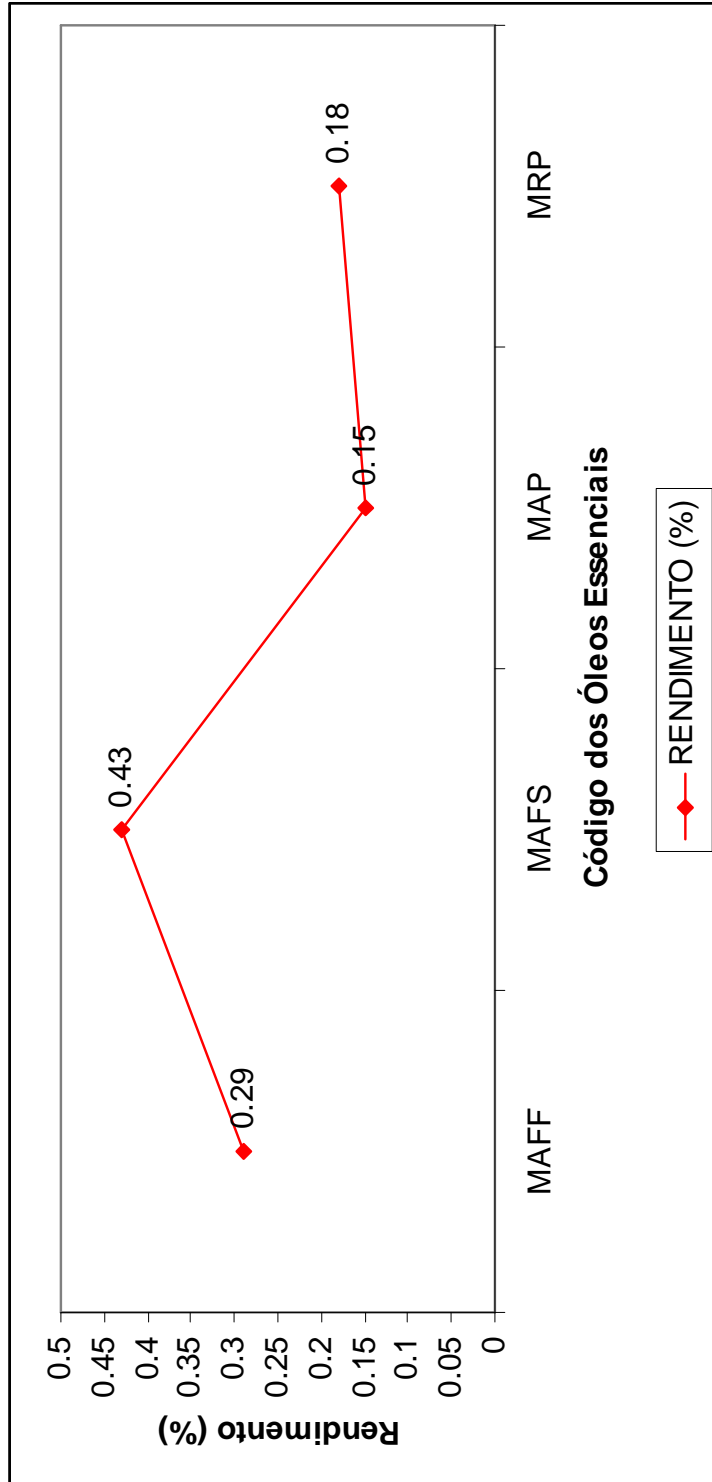
APÊNDICE B – DADOS CLIMATOLÓGICOS (COLETAS PRELIMINARES)



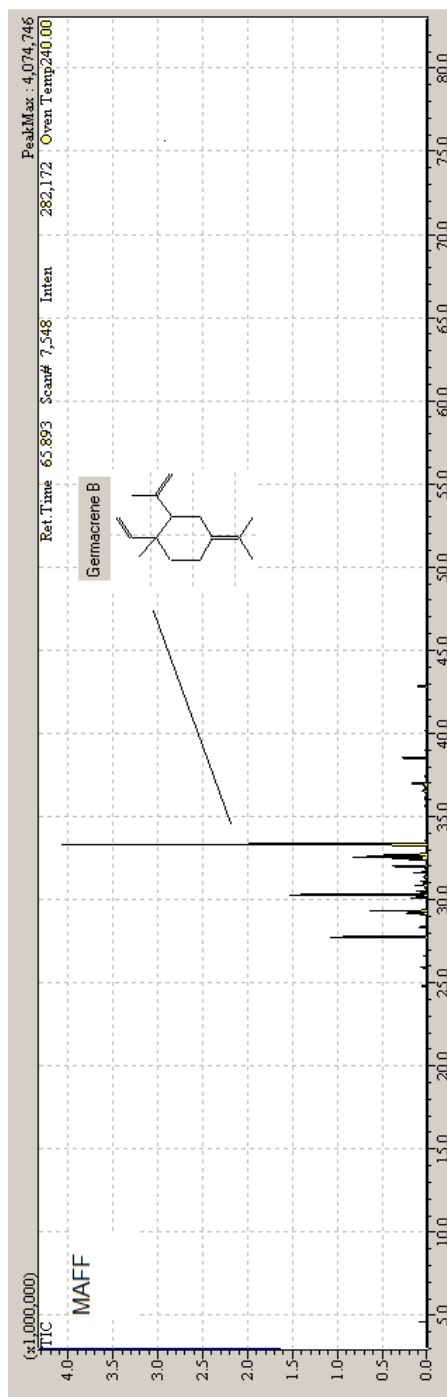
**APÊNDICE C – TEOR DE UMIDADE PRESENTE NAS FOLHAS (COLETAS PRELIMINARES)**



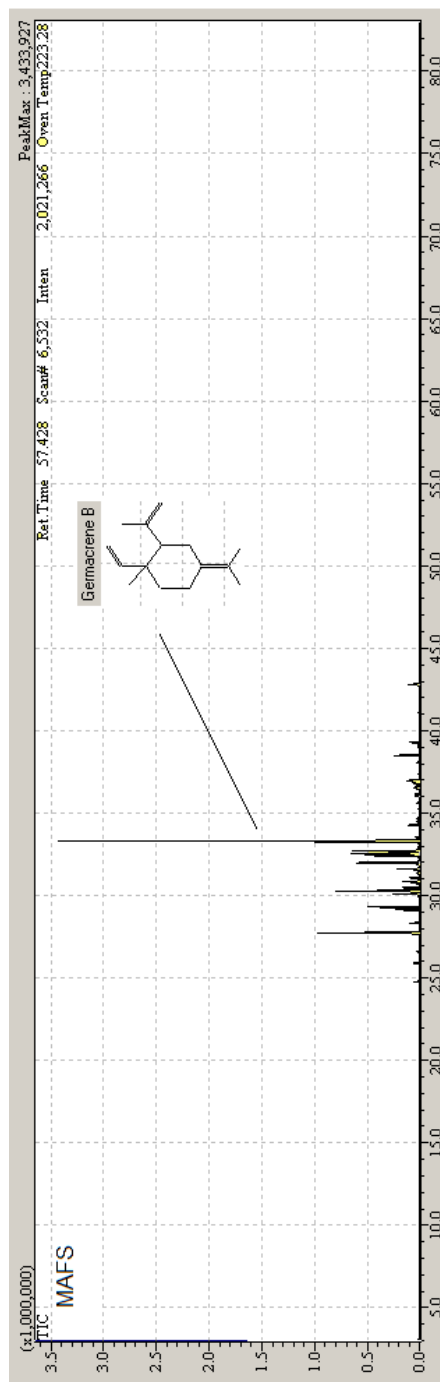
APÊNDICE D – RENDIMENTO DOS ÓLEOS (COLETAS PRELIMINARES)



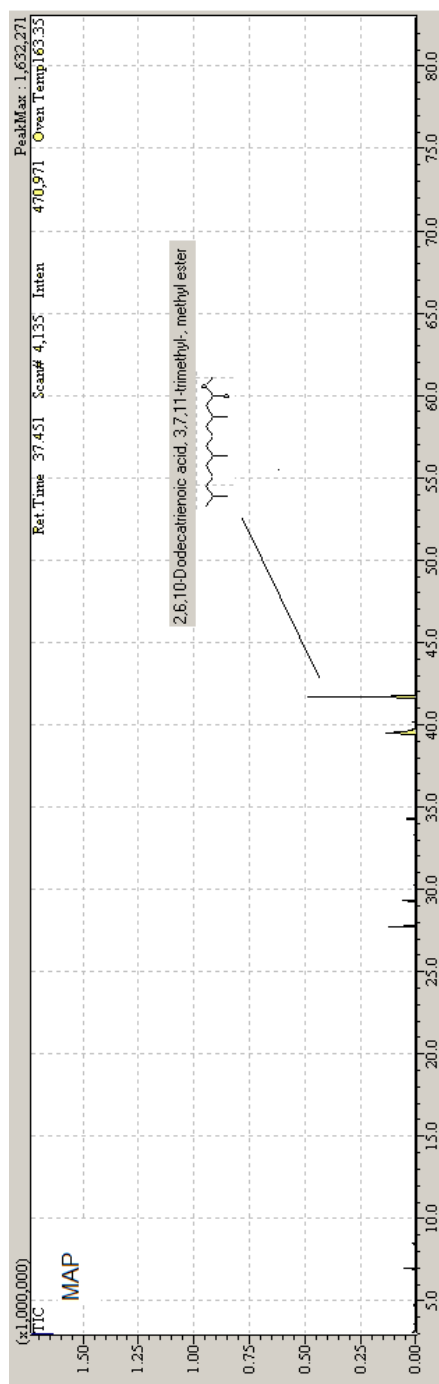
## APÊNDICE E – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS FRESCAS DE *M. alagoensis* O. BERG



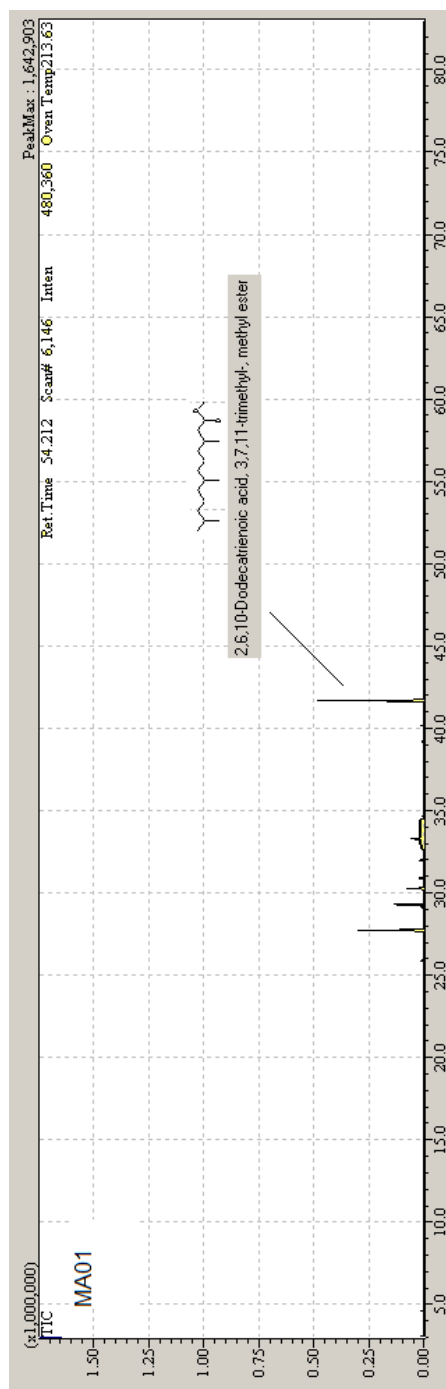
## APÊNDICE F – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS SECAS DE *M. alagoensis* O. BERG



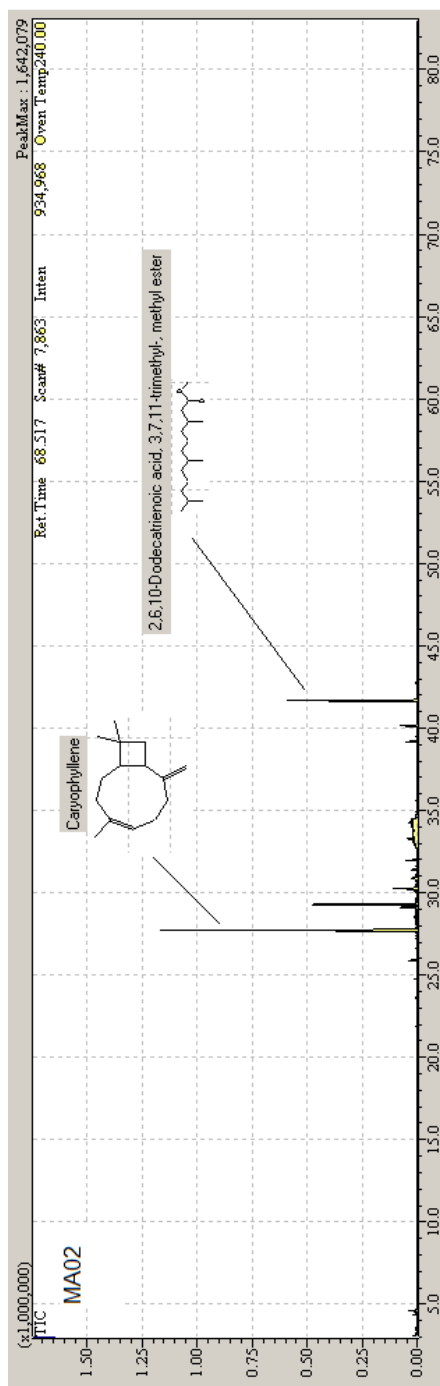
APÊNDICE G – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. algoensis* O. BERG PROVENIENTES DA COLETA PRELIMINAR.



APÊNDICE H – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. alagoensis* O. BERG PROVENIENTES DA COLETA 01.

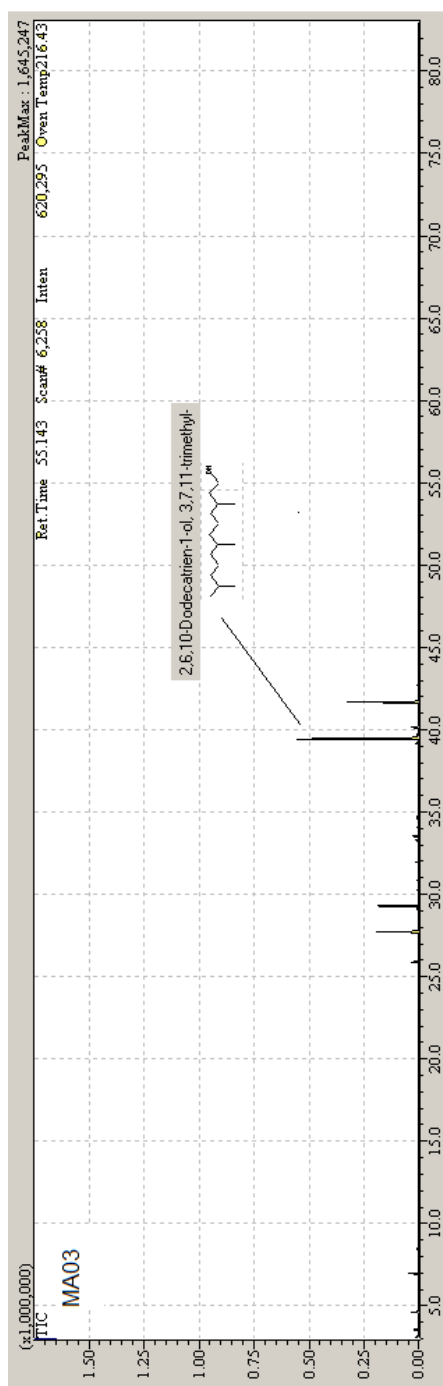


**APÊNDICE I – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. alagoensis* O. BERG PROVENIENTES DA COLETA 02.**

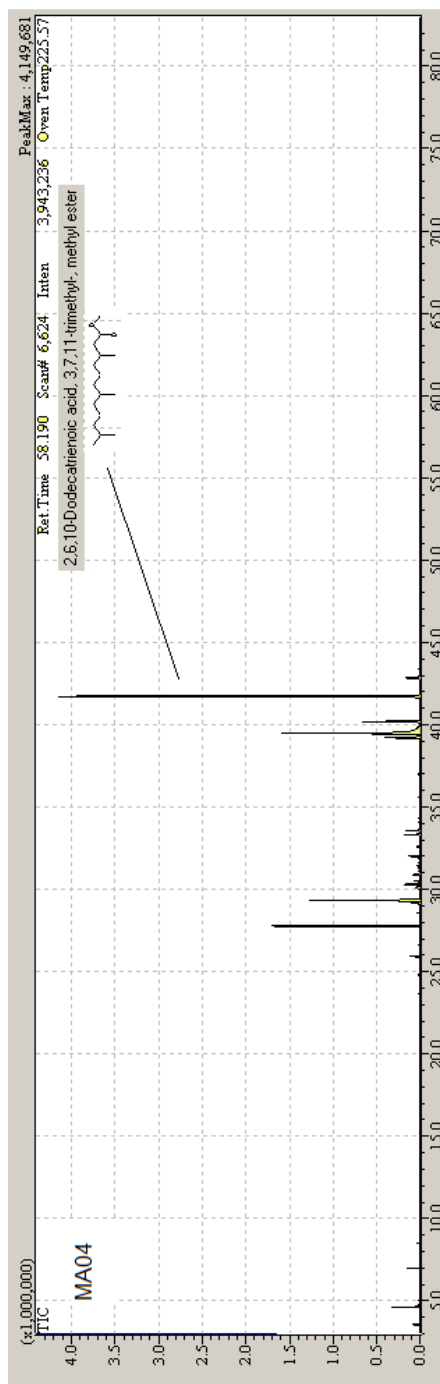




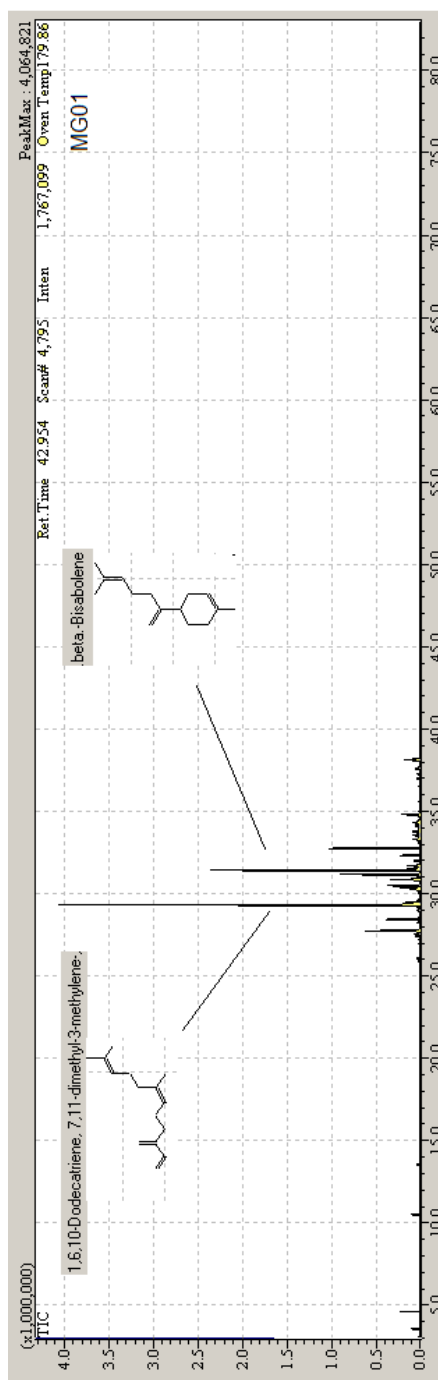
APÊNDICE J – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. alagoensis* O. BERG PROVENIENTES DA COLETA 03.



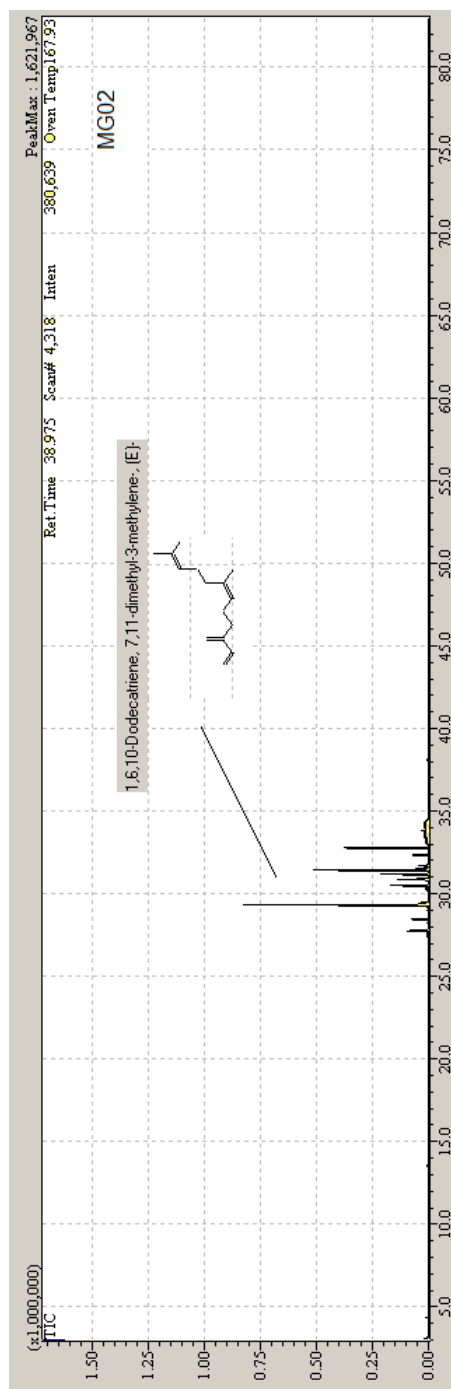
APÊNDICE K – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. alagoensis* O. BERG PROVENIENTES DA COLETA 04.



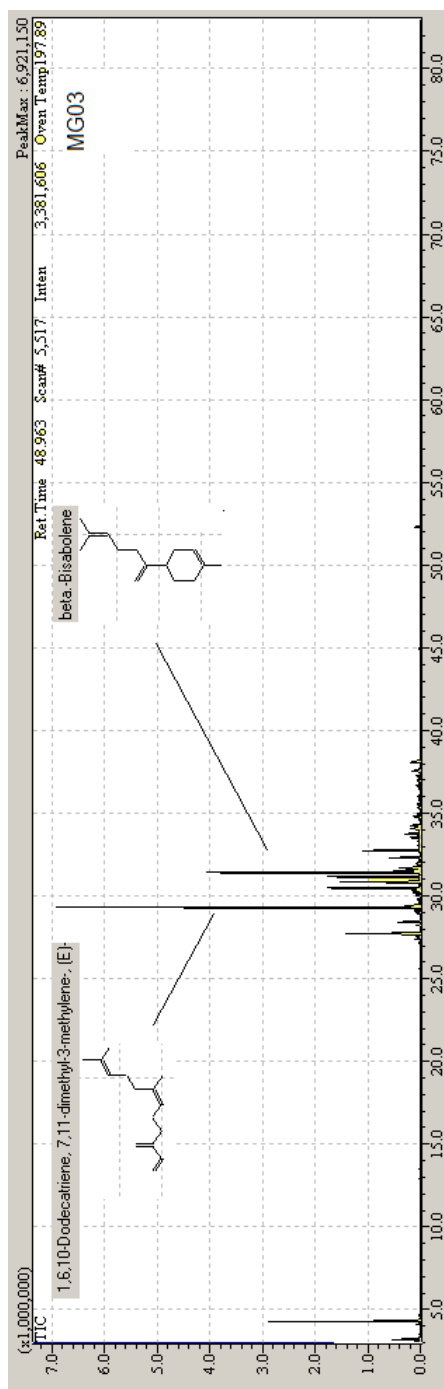
APÊNDICE L – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. guianensis* (AUBL.) DC. PROVENIENTES DA COLETA 01.



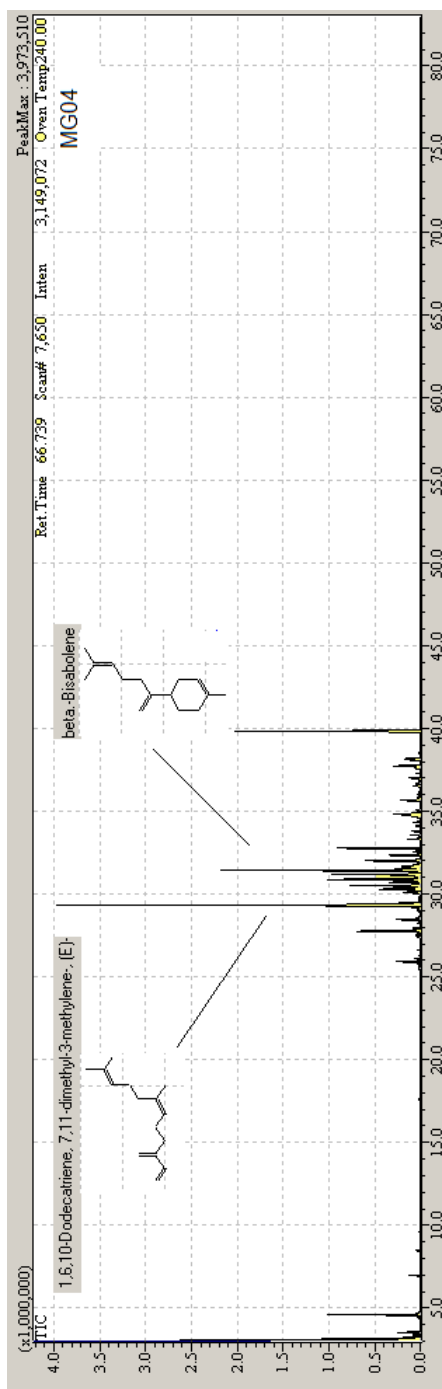
APÊNDICE M – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. guianensis* (AUBL.) DC. PROVENIENTES DA COLETA 02.



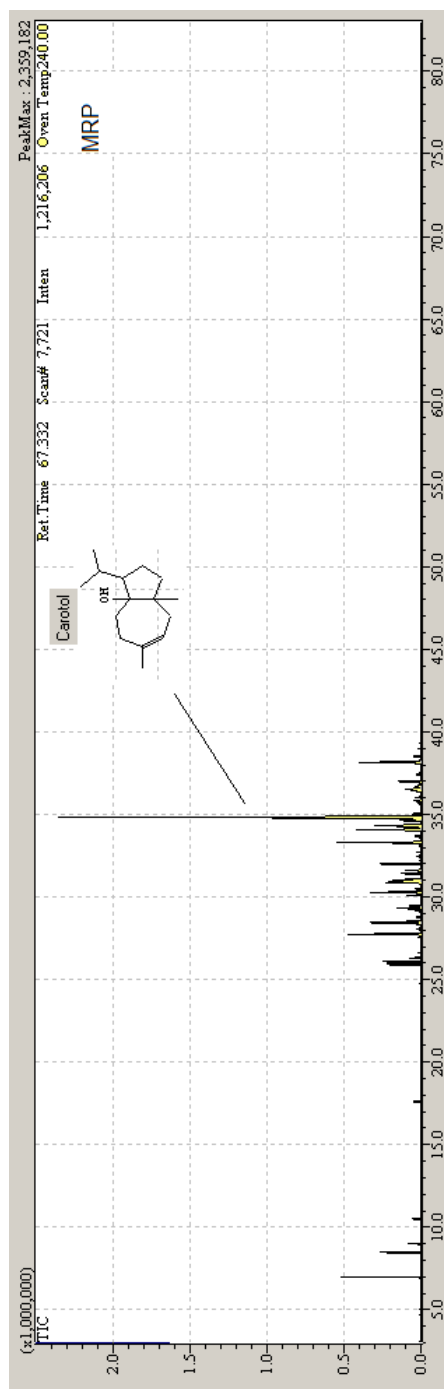
APÊNDICE N – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. guianensis* (AUBL.) DC. PROVENIENTES DA COLETA 03.



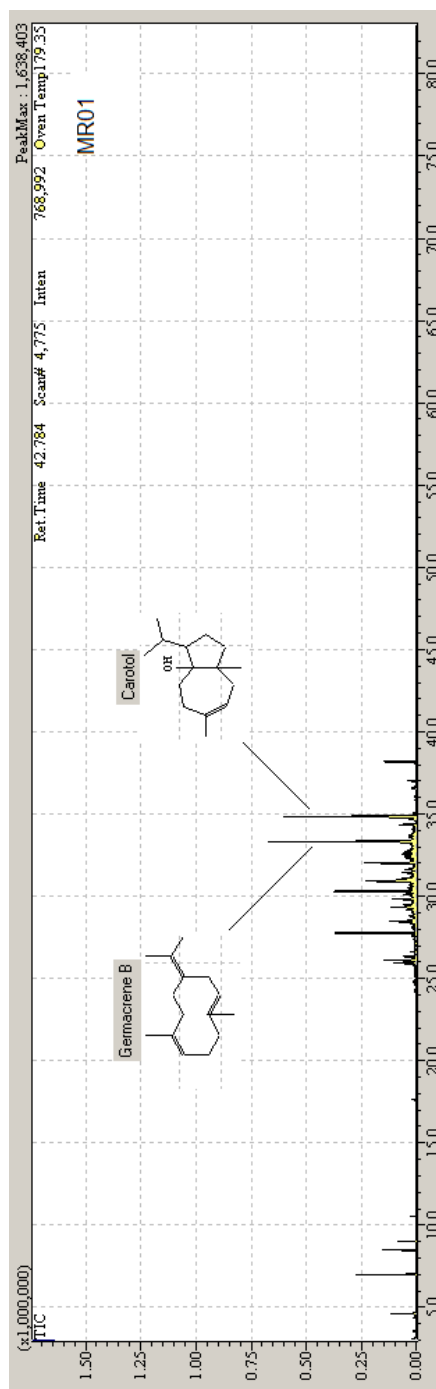
APÊNDICE O – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. guianensis* (AUBL.) DC. PROVENIENTES DA COLETA 04.



APÊNDICE P – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. rostrata* DC. PROVENIENTES DA COLETA PRELIMINAR.

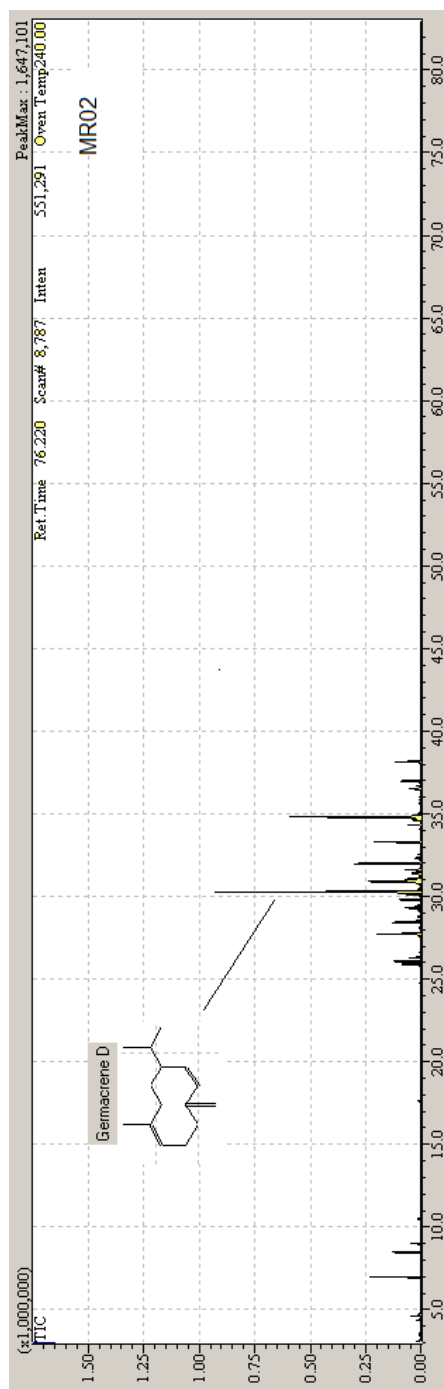


APÊNDICE Q – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. rostrata* DC. PROVENIENTES DA COLETA 01.

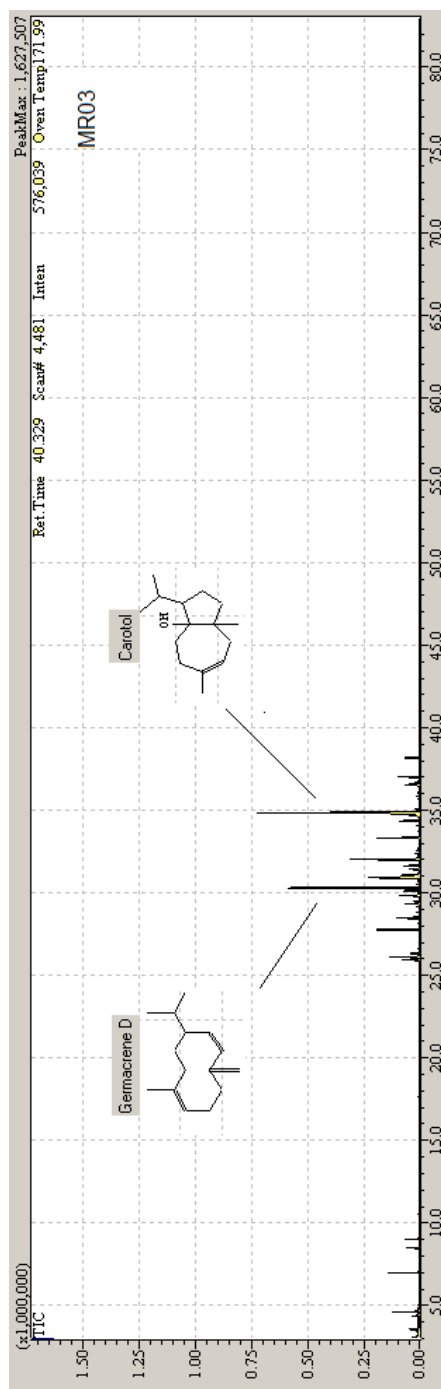




APÊNDICE R – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. rostrata* DC. PROVENIENTES DA COLETA 02.



APÊNDICE S – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. rostrata* DC. PROVENIENTES DA COLETA 03.



APÊNDICE T – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *M. rostrata* DC. PROVENIENTES DA COLETA 04.

