

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE
ESPÉCIES VEGETAIS CONTRA A LEISHMANIOSE**

EDINILZE SOUZA COELHO OLIVEIRA

Manaus
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDINILZE SOUZA COELHO OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE
ESPÉCIES VEGETAIS CONTRA A LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Amazonas como requisito necessário
para a obtenção do título de Mestre
em Química, área de concentração
em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Co-orientadora: Dra. Ana Claudia Fernandes Amaral

Manaus
2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Oliveira, Edinilze Souza Coelho

O48i Investigação química e farmacológica de espécies vegetais contra a leishmaniose / Edinilze Souza Coelho Oliveira. - Manaus: UFAM, 2012.

187 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Co-orientadora: Prof^a Dra. Ana Claudia Fernandes Amaral

1. Óleos essenciais 2. Leishmaniose 3. Análise cromatográfica I. Silva, Jefferson Rocha de Andrade (Orient.) II. Amaral, Ana Claudia Fernandes (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 665.52:616.993.161(043.3)

*Esta dissertação é dedicada aos meus queridos pais
Edimilson Veloso Coelho e Dulcinalva Souza Coelho e ao
meu amado esposo
Hilquias Trindade Oliveira.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu eterno Deus pelo amor, graça e força a mim concedidos para vencer mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva pela confiança, credibilidade e orientação. Imensamente grata.

À Dr. Ana Claudia Fernandes Amaral pelas contribuições a este trabalho.

A Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos (FIOCRUZ-RJ) pelas análises.

À Dr. Leonor L. Leon pela contribuição nos testes de *Leishmania* e citotoxicidade no Laboratório de Imunologia (FIOCRUZ-RJ) realizados em conjunto com Gêrzia Machado. Obrigada querida pela paciência.

Ao Dr. Emerson Silva Lima pela contribuição nos ensaios antioxidantes no Laboratório de Ciências Farmacêuticas, UFAM – AM.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Ao Programa Casadinho (CNPq) e ao Programa de Pós-graduação em Química da UFAM pela colaboração para o estágio na Fundação Oswaldo Cruz – RJ.

Aos meus pais Edimilson Veloso Coelho e Dulcinalva Souza Coelho por tanto amor e dedicação. Obrigada por me ensinar o verdadeiro caminho a seguir. Nossa ligação e amor são eternos.

Ao meu amado esposo Hilquias. Querido, a sua compreensão, companheirismo e paciência me ajudaram para a realização desta pesquisa.

As minhas irmãs Ednalva, Elinalva, Eliziane e aos meus sobrinhos, obrigada, pois mesmo de longe estão torcendo por mim.

À família do meu esposo e aos meus amigos Danielle Magalhães, Cilene Sá e Raimundo Nonato. Obrigada pelas orações e incentivo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, UFAM, Junior Carvalho, Fernanda Souza, André, Aimêe Oliveira, Eliana Bianco, Jackeline, Mayane, Filipe Mourão, Lorena Cursino e, em especial, Dominique Moura, obrigada querida pelo companheirismo e amizade, a sua força é contagiante.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA

Certamente que a tua bondade e o teu amor ficarão comigo enquanto eu viver.

Salmo 23.6

RESUMO

Oliveira, E. S. C. **Investigação química e farmacológica de espécies vegetais contra a leishmaniose**. 2012. 187f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das mais graves infecções existentes, por causa da sua alta capacidade de produzir deformidades. Os medicamentos existentes são de elevada toxicidade e o parasita tem apresentado resistência a esses medicamentos. Pesquisas científicas tem comprovado o potencial antiparasitário de extratos e substâncias isoladas de espécies vegetais. Este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de óleos essenciais das folhas de três espécies da família Myrtaceae: *Eugenia patrisii*, *Marlierea umbraticola* e *Myrciaria floribunda*, duas espécies da família Myristicaceae: *Viola mollissima* e *V. theiodora*, uma espécie da família Annonaceae: *Bocageopsis multiflora* e uma espécie da família Lauraceae: *Endlicheria bracteolata*, ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM. As coletas foram realizadas em dois períodos correspondentes ao inverno (abril) e verão (setembro). As análises dos óleos essenciais de *E. patrisii*, *M. floribunda*, *B. multiflora* e *V. mollissima* por CG-EM evidenciaram alta porcentagem de sesquiterpenos, enquanto que os óleos de *M. umbraticola* e *V. theiodora* apresentaram monoterpenos como constituintes majoritários. Já o óleo essencial das folhas frescas de *E. bracteolata* apresentou um diferencial quando extraído no mês de abril. Um precipitado foi observado durante a extração e quando analisado por CG-EM apresentou um perfil cromatográfico com cerca de 73,7% de sesquiterpenos oxigenados. Entretanto, o óleo da estação seca apresentou sesquiterpenos hidrocarbonetos como constituintes principais. O material sólido obtido de *E. bracteolata* foi purificado, e o guaiol foi identificado por EM, RMN e comparação com dados descritos da literatura. O estudo com o cerne de *V. mollissima* levou a obtenção de um precipitado do extrato hexano e ao isolamento das neolignanas carinatina e deidrodieugenol. Concernente aos ensaios farmacológicos, os óleos essenciais e extratos de baixa polaridade foram testados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Nesse contexto, o óleo de *V. mollissima* exibe maior atividade (CI₅₀ de 19,7 µg/mL) e a neolignana carinatina apresenta menor atividade com valor de CI₅₀ de 53,9 µg/mL. Em relação aos óleos das demais espécies, os

óleos essenciais de *B. multiflora* e de *M. umbraticola* foram os mais ativos com CI_{50} de 14,8 e 21,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os extratos que demonstraram maior atividade sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade em macrófagos não parasitados, sendo o óleo de *V. mollissima* o mais tóxico com CI_{50} de 17,16 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao padrão pentamidina ($CI_{50} = 24,40 \mu\text{g/mL}$), enquanto que o óleo de *B. multiflora* apresentou menos toxicidade com CI_{50} de 42,71 $\mu\text{g/mL}$. Quando avaliados frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, todos os óleos apresentaram elevada toxicidade em relação ao padrão lapachol ($CL_{50} = 10,47 \mu\text{g/mL}$), sendo o óleo essencial de *E. bracteolata* o mais tóxico com CL_{50} de 0,53 $\mu\text{g/mL}$. A avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH demonstrou que os óleos apresentaram atividade abaixo de 28%. Em contrapartida, a neolignana deidrodieugenol e o precipitado obtido de *V. mollissima*, apresentam atividade bastante pronunciada com $CI_{50} = 10,68$ e $CI_{50} = 6,87 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Palavras-chave: Óleos essenciais, análise cromatográfica, leishmaniose, terpenóides, neolignanas.

ABSTRACT

Oliveira, E. S. C. **Chemical and pharmacological investigation of plant species against leishmaniasis**. 2012. 187f. Dissertation – Graduation Program in Chemistry, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Leishmaniasis is considered by the World Health Organization as one of the most severe infections, due to have high capacity to produce deformities. The existing drugs are highly toxic and the parasites have been showed resistance to these drugs. Scientific researches have been proven the antiparasitic potential of extracts and compounds isolated from plant species. The subject of this work is to obtain essential oils from leaves of three species of from Myrtaceae: *Eugenia patrisii*, *Marlierea umbraticola* and *Myrciaria floribunda*, two species from Myristicaceae: *Virola mollissima* and *V. theiodora*, one specie from Annonaceae: *Bocageopsis multiflora* and one specie from Lauraceae: *Endlicheria bracteolata*, collected at the Adolpho Ducke Forest Reserve, Manaus, AM. The collections were performed in two periods: winter (April) and summer (September). The analysis of essential oils of *E. patrisii*, *M. floribunda*, *B. multiflora* and *V. mollissima* by GC-MS showed a high percentage of sesquiterpenes, while oils *M. umbraticola* and *V. theiodora* presented the monoterpenes as main constituents. The essential oil of the fresh leaves from *E. bracteolata* presented a differential when extracted in the month of April. There was observed the precipitate during the extraction and when analyzed by GC-MS showed a chromatographic profile of about 73.7% oxygenated sesquiterpenes. However, the oil of the dry season showed the hydrocarbons sesquiterpene as major constituents. The solid material obtained from *E. bracteolata* was purified, and guaiol was identified by MS, NMR and comparison with the literature data. The study with the heartwood from *V. mollissima* led to obtain a precipitate of the hexane extract and isolation of neolignans carinatin and dehydrodieugenol. Concerning the pharmacological tests, essential oils and extracts of low polarity were tested on the promastigotes of *Leishmania amazonensis*. In this context, the oil *V. mollissima* showed high activity (IC₅₀ of 19.7 µg/mL). The neolignan carinatina showed lower activity with value IC₅₀ of 53.9 µg/mL. The essential oils from *B. multiflora* and *M. umbraticola* were the most active with IC₅₀ of 14.8 and 21.1 µg/mL, respectively. The extracts that showed highest activity on promastigotes from *L. amazonensis* were subjected to the cytotoxicity analysis in non-infected macrophages, and oil from *V. mollissima* was the most toxic with IC₅₀ of 17.16 µg/mL

compared to standard pentamidine ($IC_{50} = 24.40 \mu\text{g/mL}$), while the oil from *B. multiflora* showed less toxicity with $IC_{50} = 42.71 \mu\text{g/mL}$. When evaluated against brine shrimp *Artemia salina*, all the oils exhibited high toxicity compared to standard lapachol ($LC_{50} = 10.47 \mu\text{g/mL}$), being the essential oil from *E. bracteolata* the most toxic with LC_{50} of $0.53 \mu\text{g/mL}$. The antioxidant activity evaluation against the radical free DPPH below 28% of activity to the essential oils. In contrast, the neolignan deidrodieugenol and precipitate obtained from *V. mollissima*, exhibit high antioxidant activity with $IC_{50}=10.68$ and $IC_{50}=6.87 \mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: Essential oils, chromatographic analysis, leishmaniasis, terpenoids, neolignans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) <i>Leishmania</i> – Forma flagelada ou promastigota e (b) <i>Leishmania</i> – Forma aflagelada ou amastigota.....	23
Figura 2 - (a) Lesão ulcerada por LTA; (b) Leishmaniose cutaneomucosa; (c) Forma cutânea disseminada e (d) Lesão não ulcerada.....	24
Figura 3 - Mosquito palha.....	25
Figura 4 - Ciclo biológico da leishmaniose.....	26
Figura 5 – Medicamentos usados para tratamento da leishmaniose.....	27
Figura 6 - Formação de compostos fenilpropanóides.....	29
Figura 7 - Mecanismo de reação de alguns monoterpenos.....	30
Figura 8 - Exemplos de sesquiterpenos.....	31
Figura 9 - Folhas de (a) <i>Eugenia patrisii</i> , (b) <i>Marlierea umbraticola</i> , (c) <i>Myrciaria floribunda</i> , (d) <i>Virola mollissima</i> , (e) <i>Virola theiodora</i> , (f) <i>Bocageopsis multiflora</i> e (g) <i>Endlicheria bracteolata</i>	37
Figura 10 - Gráfico de chuva acumulada mensal x número de dias com chuva.....	50
Figura 11 - CCD dos óleos essenciais de <i>Eugenia patrisii</i> com os padrões <i>trans</i> -cariofileno e guaiol	51
Figura 12 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Eugenia patrisii</i> na estação chuvosa.....	55
Figura 13 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Eugenia patrisii</i> na estação chuvosa.....	56
Figura 14 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Eugenia patrisii</i> na estação seca.....	57
Figura 15 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Eugenia patrisii</i> na estação seca.....	58
Figura 16 - Espectro de massas correspondente ao pico 37 do cromatograma da Figura 15.....	59
Figura 17 - CCD dos óleos essenciais de <i>Myrciaria floribunda</i> com os padrões óxido de cariofileno e guaiol.....	62
Figura 18 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Myrciaria floribunda</i> na estação chuvosa.....	67

Figura 19 - Espectro de massas do 1,8-cineol.....	68
Figura 20 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Myrciaria floribunda</i> na estação seca.....	69
Figura 21 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Myrciaria floribunda</i> na estação seca.....	70
Figura 22 - CCD dos óleos essenciais de <i>Marlierea umbraticola</i> com os padrões óxido de cariofileno e guaiol	71
Figura 23 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Marlierea umbraticola</i> na estação chuvosa.....	75
Figura 24 - Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma da Figura 23.....	76
Figura 25 - Espectro de massas referente ao pico 5 do cromatograma da Figura 23.....	76
Figura 26 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Marlierea umbraticola</i> na estação seca.....	77
Figura 27 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Marlierea umbraticola</i> na estação seca.....	78
Figura 28 - CCD dos óleos essenciais de <i>Virola mollissima</i> e <i>Virola theiodora</i>	87
Figura 29 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Virola mollissima</i> na estação chuvosa.....	89
Figura 30 - Espectro de massas referente ao pico 16 do cromatograma da Figura 29.....	90
Figura 31 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Virola mollissima</i> na estação seca.....	91
Figura 32 - Cromatograma de íons totais do óleos essencial das folhas secas de <i>Virola mollissima</i> na estação seca.....	92
Figura 33 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Virola theiodora</i> na estação seca.....	98
Figura 34 - Espectro de massas do monoterpeneo β -felandreno.....	99
Figura 35 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Virola theiodora</i> na estação seca	100
Figura 36 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Virola theiodora</i> na estação chuvosa.....	101
Figura 37 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Virola theiodora</i> na estação chuvosa.....	102

Figura 38 - Cromatograma por CCD do EBVMHex e do VMHex, (a) absorção no UV/VIS 254 nm, (b) 366 nm e (c) revelação com vanilina sulfúrica 10%.....	105
Figura 39 - (a) e (b) Bandas de absorção no UV e (c) Cromatograma de CLAE de EBVMHex registrado a 280nm.....	106
Figura 40 - Espectro de massas de sub-2-8-11.....	107
Figura 41 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de sub-2-8-11.....	108
Figura 42 - Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de sub-2-8-11.....	110
Figura 43 - Espectro de DEPT 90 (CDCl ₃ , 100 MHz) de sub-2-8-11.....	111
Figura 44 - (a) Banda de absorção no UV e (b) Cromatograma de CLAE de VMHex a 266 nm.....	113
Figura 45 - Cromatograma de íons totais de VMHex.....	114
Figura 46 - Espectro de massas de VMHex.....	115
Figura 47 - RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) substância majoritária de VMHex.....	116
Figura 48 - RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.....	118
Figura 49 - DEPT 90 (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.....	119
Figura 50 - DEPT 135 (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.....	120
Figura 51 - CCD dos óleos de <i>Bocageopsis multiflora</i> com os padrões óxido de cariofileno, bisabolol e guaiol.....	126
Figura 52 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Bocageopsis multiflora</i> na estação chuvosa.....	130
Figura 53 - Espectro de massas do composto β-bisaboleno.....	131
Figura 54 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Bocageopsis multiflora</i> na estação seca.....	132
Figura 55 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de <i>Bocageopsis multiflora</i> na estação seca.....	133
Figura 56 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Endlicheria bracteolata</i> na estação chuvosa.....	139
Figura 57 - Espectro de massas do pico 31 do cromatograma da Figura 56.....	140
Figura 58 - Espectro de massas do pico 37 do cromatograma da Figura 56.....	141
Figura 59 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Endlicheria bracteolata</i> na estação seca.....	145
Figura 60 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de <i>Endlicheria</i>	

<i>bracteolata</i> na estação seca.....	146
Figura 61 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de Eb1ff-sólido-parte I.....	151
Figura 62 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de Eb1ff-sólido-parte II.....	152
Figura 63 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de Eb1ff-sólido.....	154
Figura 64 - Espectro de DEPT 90 (CDCl_3 , 100 MHz) de Eb1ff-sólido.....	155
Figura 65 - Espectro de DEPT 135 (CDCl_3 , 100 MHz) de Eb1ff-sólido.....	156
Figura 66 - Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> - visualização no microscópio.....	162

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção dos extratos hexano, diclorometano e metanol.....	40
Esquema 2 - Isolamento da substância sub2-8-11.....	41
Esquema 3 - Proposta de fragmentação do sesquiterpeno valenceno.....	59
Esquema 4 - Proposta da rota biossintética dos principais compostos presentes nos óleos de <i>Eugenia patrisii</i>	61
Esquema 5 - Proposta de fragmentação de 1,8-cineol	68
Esquema 6 - Proposta de fragmentação do α - e β -pineno	76
Esquema 7 - Proposta da rota biossintética dos monoterpenos dos óleos essenciais de <i>Myrciaria floribunda</i> e <i>Marlierea umbraticola</i>	79
Esquema 8 - Proposta de fragmentação do composto β -sesquifelandreno.....	90
Esquema 9 - Proposta de fragmentação do composto β -felandreno.....	99
Esquema 10 - Proposta da rota biossintética dos mono e sesquiterpenos principais dos óleos essenciais de <i>Virola mollissima</i> e <i>Virola theiodora</i>	104
Esquema 11 - Proposta de fragmentação do β -bisaboleno.....	131
Esquema 12 - Proposta de biossíntese dos compostos principais nos óleos de <i>Bocageopsis multiflora</i>	134
Esquema 13 - Proposta de fragmentação do guaiol.....	140
Esquema 14 - Proposta de fragmentação do 10- γ -epi-eudesmol.....	141
Esquema 15 - Proposta biossintética dos compostos dos óleos de <i>Endlicheria bracteolata</i>	149
Esquema 16 - Procedimento do teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	161
Esquema 17 - Proposta do mecanismo de reação de deidrodieugenol frente ao radical DPPH.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia patrisii</i>	50
Tabela 2 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Eugenia patrisii</i>	51
Tabela 3 - Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Myrciaria floribunda</i>	62
Tabela 4 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Myrciaria floribunda</i>	63
Tabela 5 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Marlierea umbraticola</i>	72
Tabela 6 - Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Virola mollissima</i>	86
Tabela 7 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Virola mollissima</i>	87
Tabela 8 - Rendimentos (%) dos óleos essenciais de <i>Virola theiodora</i>	93
Tabela 9 – Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Virola theiodora</i>	94
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da neolignana carinatina.....	112
Tabela 11 - Dados de ¹ H e ¹³ C da neolignana deidrodieugenol.....	121
Tabela 12 - Rendimento (%) dos óleos essenciais de <i>Bocageopsis multiflora</i>	126
Tabela 13 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Bocageopsis multiflora</i>	127
Tabela 14 - Rendimento (%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Endlicheria bracteolata</i> ...	138
Tabela 15 - Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>Endlicheria bracteolata</i>	142
Tabela 16 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do sesquiterpeno guaiol.....	157
Tabela 17 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais das espécies vegetais.....	164
Tabela 18 - Atividade antioxidante de EBHexVm, VMHex e deidrodieugenol.....	165
Tabela 19 - Resultados do teste de toxicidade frente <i>Artemia salina</i> dos óleos essenciais..	167
Tabela 20 - Resultados leishmanicida e citotoxicidade dos óleos das espécies.....	169
Tabela 21 - Atividade leishmanicida de EBVMHex, VMHex, deidrodieugenol e carinatina de <i>Virola mollissima</i>	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC - Cromatografia em Coluna
CCD - Cromatografia de Camada Delgada
CCDC – Cromatografia de Camada Delgada Comparativa
CI₅₀ - Concentração inibitória média
CG-DIC - Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização por Chama
CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa
CLAE - DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – detector de arranjo de diodos
CL₅₀ – Concentração letal média
d – duplete
DCM - diclorometano
dd - duplo duplete
ddt - duplo duplo triplete
DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMAP - *Dimethylallyl pyrophosphate* (pirofosfato de dimetilalil)
DMSO - Dimetilsufóxido
DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DXP - *Deoxyxylulose 5-phosphate* (Deoxixilulose-5-fosfato)
EBVMHex - Extrato bruto hexano de *Virola mollissima*
FF - folha fresca
FPP – *Farnesyl pyrophosphate* (pirofosfato de farnesil)
FS - folha seca
GPP - *Geranyl pyrophosphate* (pirofosfato de geranil)
ha - hectare
Hex - hexano
INMET - Instituto Nacional de Meteorologia
IPP – *Isopentenyl pyrophosphate* (pirofosfato de isopentenil)
J - constante de acoplamento
LPP - *Linalyl pyrophosphate* (pirofosfato de linalil)
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose visceral

m – multipleteo

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo de tetrazolina

MVA - *Mevalonic acid* (Ácido mevalônico)

m/z - massa/carga

NPP - *Nerolidyl pyrophosphate* (pirofosfato de nerolidil)

OMS - Organização Mundial de Saúde

ppm - partes por milhão

RF - *Retardation factor*

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono treze

s - singleteo

SFM - Sistema fagocitário mononuclear

TMS - Tetrametilsilano

UV - Ultravioleta

VMHex - precipitado do extrato hexano de *Viola mollissima*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	21
1. Introdução	22
1.1. Leishmaniose.....	22
1.2. Óleos essenciais.....	28
2. Objetivos.....	34
3. Materiais e métodos.....	36
3.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	36
3.2. Extração dos óleos essenciais.....	37
3.3. Identificação dos componentes.....	38
3.4. Obtenção dos dados meteorológicos.....	38
3.5. Especificação de materiais e métodos.....	38
3.6. Obtenção dos extratos de <i>Virola mollissima</i>	40
3.7. Fracionamento do extrato hexano do cerne de <i>V. mollissima</i> Warb.....	41
CAPÍTULO II - ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DAS ESPÉCIES <i>Eugenia patrisii</i> Vahl, <i>Marlierea umbraticola</i> Kunth O. Berg e <i>Myrciaria floribunda</i> (H. West ex Willd.) O. Berg (Myrtaceae).....	42
1. Introdução.....	43
1.1. Gênero <i>Eugenia</i>	45
1.2. Gênero <i>Marlierea</i>	46
1.3. Gênero <i>Myrciaria</i>	49
2. Resultados e discussão.....	50
2.1. Óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia patrisii</i>	50
2.2. Proposta de rota biossintética dos sesquiterpenos nos óleos de <i>Eugenia patrisii</i>	60
2.3. Óleos essenciais das folhas de <i>Myrciaria floribunda</i>	62
2.4. Óleos essenciais das folhas de <i>Marlierea umbraticola</i>	71
2.5. Proposta de rota biossintética dos monoterpenos nos óleos de <i>Myrciaria floribunda</i> e <i>Marlierea umbraticola</i>	78
CAPÍTULO III - ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES <i>V.</i> <i>mollissima</i> (A. DC.) Warb e <i>V. theiodora</i> (Spruce ex Benth.) Warb. E ESTUDO FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE EXTRATOS DE <i>V. mollissima</i> (MYRISTICACEAE).....	80

1. Introdução.....	81
1.1. Gênero <i>Virola</i>	83
2. Resultados e discussão.....	86
2.1. Óleos essenciais das folhas de <i>Virola mollissima</i>	86
2.2. Óleos essenciais das folhas de <i>Virola theiodora</i>	93
2.3. Proposta de rota biossintética dos terpenóides nos óleos de <i>Virola mollissima</i> e <i>Virola theiodora</i>	103
2.4. Estudo fitoquímico do cerne de <i>Virola mollissima</i>	105
CAPÍTULO IV - ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DA ESPÉCIE <i>Bocageopsis multiflora</i> (Mart.) R.E.Fr. (ANNONACEAE).....	122
1. Introdução.....	123
2. Resultados e discussão.....	125
CAPÍTULO V - ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DA ESPÉCIE <i>Endlicheria bracteolata</i> (Meisn.) C. K. Allen (LAURACEAE).....	135
1. Introdução.....	136
2. Resultados e discussão.....	138
CAPÍTULO VI - ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	158
1. Introdução.....	159
2. Materiais e métodos.....	160
2.1. Ensaio antioxidante.....	160
2.2. Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i>	160
2.3. Ensaio leishmanicida e citotoxicidade em macrófagos.....	161
3. Resultados e discussão.....	163
3.1. Atividade antioxidante.....	163
3.2. Atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	167
3.3. Atividade leishmanicidade e citotoxicidade em macrófagos.....	168
CONCLUSÃO.....	171
REFERÊNCIAS.....	172

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

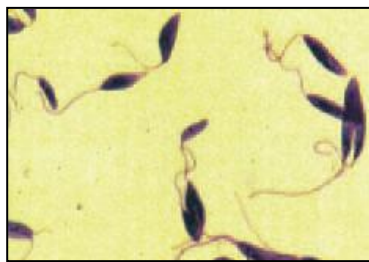
1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

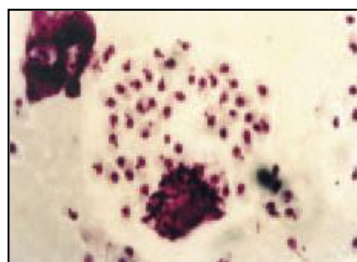
As doenças tropicais negligenciadas afetam cerca de um bilhão de pessoas no mundo. A maior parte desses indivíduos é pobre e marginalizada e vive em áreas rurais dos países de baixa renda. Nos últimos anos, a atenção tem sido voltada para essas doenças tanto como questão de saúde pública quanto questão de direitos humanos (WHO, 2009). Além do sofrimento físico e psíquico que causam, essas doenças infligem um enorme fardo econômico sobre as comunidades afetadas, devido à perda de produtividade e custos elevados associados com cuidados em longo prazo (HUNT, 2007).

Nesse contexto, a leishmaniose tem se destacado como uma das principais doenças tropicais: mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e existem 2 milhões de novos casos a cada ano. Além disso, estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco e a doença afeta as populações mais pobres em 88 países, sendo 72 países em desenvolvimento e 13 entre os menos desenvolvidos (WHO, 2012).

A leishmaniose é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, que agrupa espécies de protozoários unicelulares, parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae. São encontrados nas formas flageladas promastigotas (Figura 1a), no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota (Figura 1b), semiflagelo livre, parasito intracelular dos hospedeiros vertebrados (NEVES, 2000).



(a)



(b)

Figura 1: (a) *Leishmania* – Forma flagelada ou promastigota e (b) *Leishmania* – Forma aflagelada ou amastigota. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Segundo o Ministério da Saúde (2011) foram notificados 21981 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil no ano de 2010, com o maior número de casos registrados nas regiões norte (7108) e nordeste (8911).

No Brasil são reconhecidas pelo menos sete espécies de *Leishmania* responsáveis por doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, enquanto a *L. (L.) chagasi* é responsável pela doença visceral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, a vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (DO VALE e FURTADO, 2005).

A LTA caracteriza-se por feridas na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo. Tardamente, podem surgir feridas nas mucosas do nariz, da boca e da garganta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Essa forma de leishmaniose é conhecida como “ferida brava” (BVS, 2007). A forma cutânea localizada é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas (Figura 2a); a forma cutâneo mucosa é caracterizada por lesões agressivas nas mucosas que afetam as regiões nasofaríngeas (Figura 2b); a forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática (Figura 2c) e, a forma difusa apresenta lesões nodulares não ulceradas (Figura 2d) (NEVES, 2000).

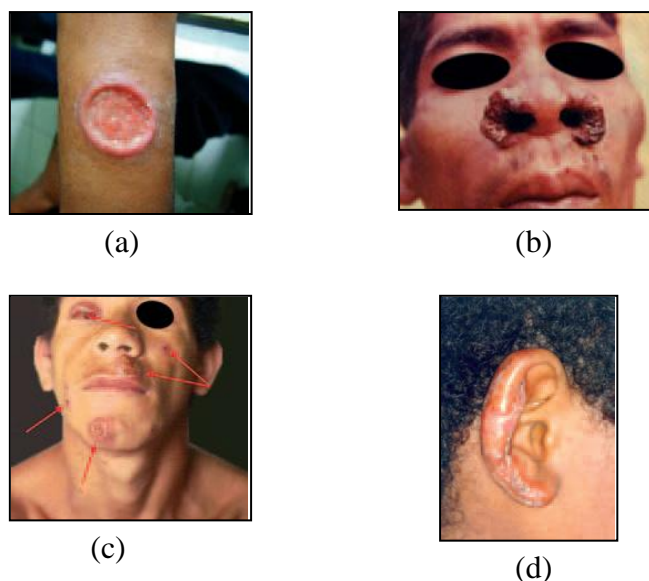


Figura 2: (a) Lesão ulcerada por LTA; (b) Leishmaniose cutaneomucosa; (c) Forma cutânea disseminada e (d) Lesão não ulcerada.

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é causada pela *L. chagasi*, um protozoário pertencente ao complexo *L. donovani* (CIMERMAN e CIMERMAN, 2001). É uma doença sistêmica, pois acomete vários órgãos internos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. Esse tipo de leishmaniose acomete essencialmente crianças de até dez anos. É uma doença de evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano (BVS, 2007).

No Brasil foram registrados 3852 casos de LV, sendo nas regiões norte (636 casos) e nordeste (1662 casos) as mais afetadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os insetos hematófagos (que se alimentam de sangue) conhecidos como flebótomos ou flebotomíneos do gênero *Lutzomya* são os que transmitem a doença. Medem de 2 a 3 milímetros de comprimento e devido ao seu pequeno tamanho são capazes de atravessar as malhas dos mosquiteiros e telas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Apresentam cor amarelada ou acinzentada e suas asas permanecem abertas quando estão em repouso. Seus nomes variam de acordo com a localidade, os mais comuns são: mosquito palha, tatuquira, birigüi, cangalhinha, asa branca, asa dura e palhinha. O mosquito palha (Figura 3) é mais encontrado em lugares úmidos, escuros, onde existem muitas plantas (BVS, 2007).



Figura 3: Mosquito palha.

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

A infecção do inseto pelo vertebrado ocorre quando a fêmea pica o vertebrado para exercer o repasto sanguíneo e juntamente com o sangue ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior, ou ao chegarem ao estômago, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas. Essas formas sofrem uma divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas, que também por processos sucessivos de divisão, multiplicam-se ainda no sangue ingerido (Figura 4) (CIMERMAN e CIMERMAN, 2001; NEVES, 2000).

A infecção do vertebrado ocorre durante o processo de alimentação do flebotomíneo (Figura 4). Na tentativa da ingestão do sangue, as formas promastigotas são introduzidas no local da picada. Rapidamente essas formas se transformam em amastigotas. Dentro do vacúolo fagocitário dos macrófagos, as amastigotas estão adaptadas ao novo meio fisiológico, e resistem à ação destruidora dos lisossomas, multiplicando-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. Esgotando sua resistência, a membrana do macrófago se rompe liberando as amastigotas no tecido, sendo novamente fagocitadas, iniciando no local uma reação inflamatória (NEVES, 2000). Na LV, as amastigotas invadem novos macrófagos, ocorrendo uma disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (CIMERMAN e CIMERMAN, 2001).

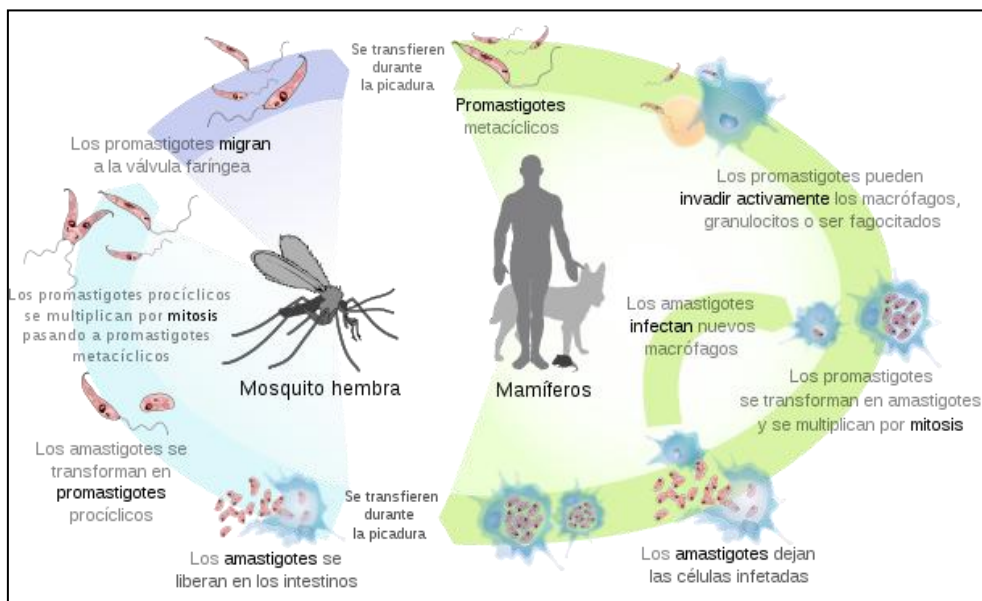


Figura 4: Ciclo biológico da leishmaniose.

FONTE: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Leishmaniasis_life_cycle_diagram-es.sevg> Acesso: 21 fevereiro 2012. Imagem com direito autoral livre para projetos.

Dentre os medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses (Figura 5) podem ser destacados os antimoniais pentavalentes, que causam efeitos colaterais adversos, e a anfotericina B sendo altamente efetiva no tratamento das leishmanioses resistentes aos antimoniais, mas o seu uso é limitado devido à toxicidade e alto custo (NEVES, 2000). Outro fármaco, a pentamidina que é uma diamina aromática também pode ser usada em leishmanioses resistentes aos antimoniais, mas o seu uso produz efeitos adversos como taquicardia, hipotensão, disfunção renal, entre outros. Além da toxicidade que os medicamentos antileishmania possuem, outro grave problema que dificulta o tratamento da doença recai no desenvolvimento de resistência do parasita (AEDO, 2007). Outros fármacos, tais como o pamoato de cicloguanila, sulfas, cetoconazol, itraconazol e aminoimidina constituem alternativas de tratamento. Alguns deles fazem parte da primeira opção terapêutica em determinado locais do mundo (CIMERMAN e CIMERMAN, 2001).

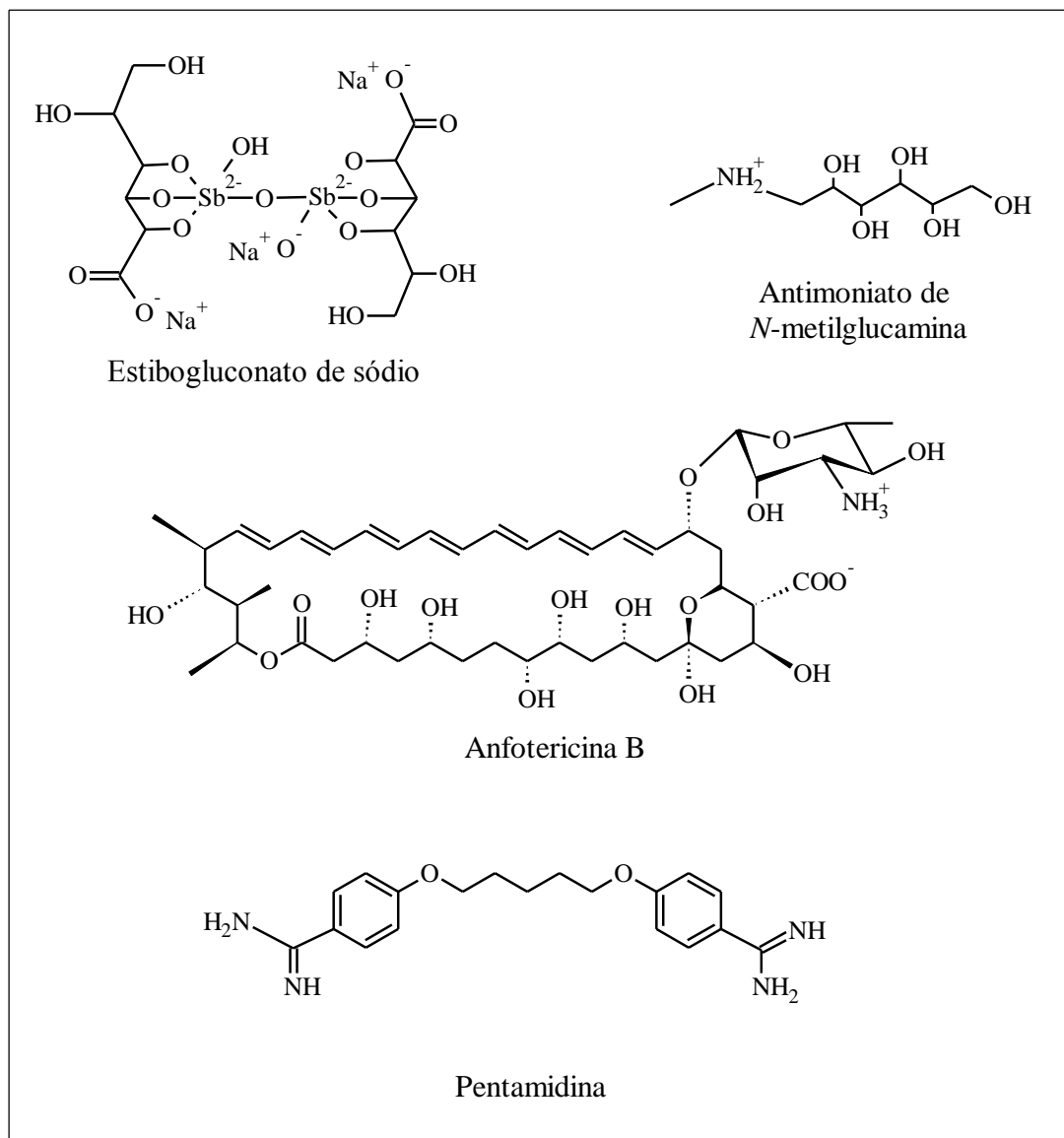


Figura 5: Medicamentos usados para tratamento da leishmaniose.

FONTE: GIL *et al.*, 2007.

Amplios estudos de novos medicamentos com atividade contra leishmanioses, incluindo substâncias naturais e sintéticas, tem sido realizados em todo o mundo (CROFT e YARDLEY, 2002; ROSA *et al.*, 2003) devido à toxicidade, os efeitos colaterais, custos dos medicamentos e da resistência que os parasitas mostram a esses medicamentos justificam a busca de alternativas terapêuticas.

1.2. Óleos essenciais

Desde a antiguidade, as plantas medicinais e seus preparados tem sido usados para tratar diferentes doenças (DO CARMO *et al.*, 2012) e diversos extratos já foram testados para avaliar a atividade anti-leishmania, sendo a maioria compostos exclusivamente por moléculas polares (MACHADO *et al.*, 2010), tais como alcalóides, lignanas, neolignanas, terpenos, chalconas e quinonas (KAYSER *et al.*, 2003). Porém, dentre 97 substâncias levantadas no trabalho de Chan-Bacab e Peña-Rodriguez (2001), apenas 2-*n*-propilquinolina, alcalóide das folhas de *Galipea longiflora* K. Krause (Rutaceae), está em fase clínica para o tratamento da leishmaniose cutânea (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRIGUEZ, 2001, FOURNET *et al.*, 1996). A maioria das substâncias ensaiadas *in vivo* apresentaram altos níveis de citotoxicidade e baixa atividade quando administradas em doses moderadas (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRIGUEZ, 2001; CHAGAS *et al.*, 2010). Contudo, tais esforços devem ser contínuos, pois a grande variabilidade de linhagens de *Leishmania* e o aparecimento de formas resistentes conduzem à necessidade de desenvolvimento de diferentes tipos de fármacos (CHAGAS *et al.*, 2010; FOURNET *et al.*, 1996).

Os óleos essenciais são compostos por uma diversidade de moléculas hidrofóbicas que oferecem vantagens peculiares, pois facilmente se difundem através das membranas celulares (EDRIS, 2007; MACHADO *et al.*, 2010) com possibilidade de virem a ser fitomedicamentos alternativos para o tratamento contra parasitas (DO CARMO *et al.*, 2012). Esses óleos possuem geralmente em sua composição derivados de fenilpropanóides e/ou terpenóides (SIMÕES e SPITZER, 2003).

Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico 1, e estes formam as unidades básicas dos ácidos cinâmico 2 e *p*-cumárico 3, os quais por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos 4 e/ou alilbenzenos 6 e, por meio de oxidações com degradações de cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos 5; e ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas 7 (figura 6) (SIMÕES e SPITZER, 2003).

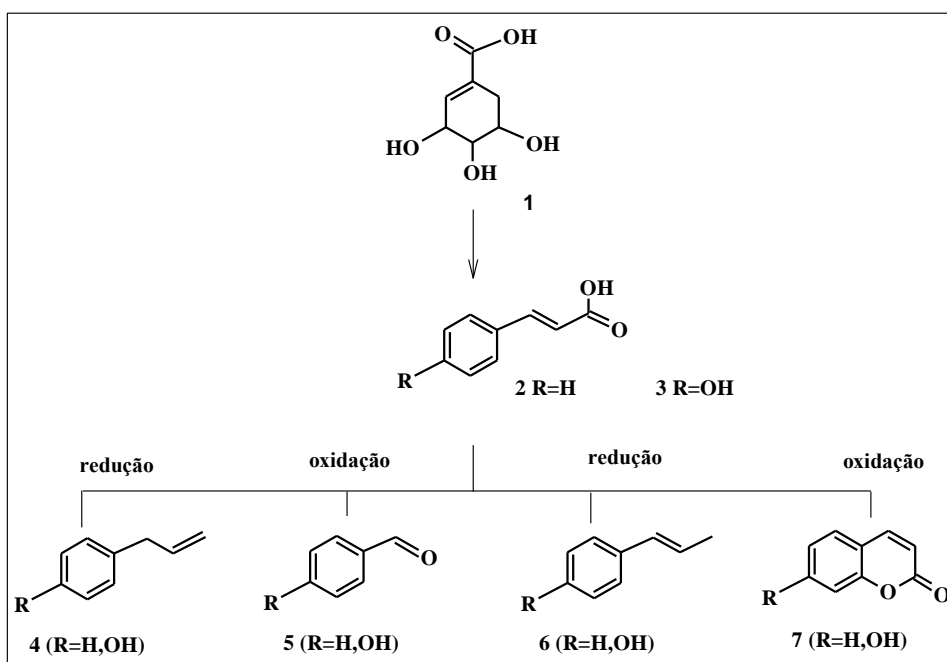


Figura 6: Formação de fenilpropanóides

FONTE: SIMÕES e SPITZER, 2003.

Os terpenóides constituem uma vasta família (LOBO e LOURENÇO, 2007) que contém uma diversidade de compostos estruturais (DEGENHARDT *et al.*, 2009), com cerca de 25.000 estruturas relatadas, e poucos foram investigados a partir de uma perspectiva funcional (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007).

Devido à diversidade estrutural dos terpenos, químicos de produtos naturais tem especulado a rota biossintética desses compostos (DEGENHARDT *et al.*, 2009). As enzimas conhecidas como sintases de terpenos, podem ser as responsáveis pela grande variedade estrutural dos mesmos. Estes catalisadores convertem os acíclicos difosfato de prenil e esqualeno em inúmeras formas cíclicas e acíclicas (DEGENHARDT *et al.*, 2009).

Existem duas vias biossintéticas para a formação dos precursores dos terpenóides, a formação do pirofosfato de 3,3'-dimetilalil (DMAP) e do pirofosfato de 3-isopentenila (IPP) que ocorre pela via do mevalonato (MVA), envolvendo o ácido (3R) – mevalônico como intermediário, e a via do 5-fosfato-1-deoxilulose (DXP), que está mais generalizada na natureza do que a do mevalonato (LOBO e LOURENÇO, 2007). Na via MVA, as reações biossintéticas ocorrem no citosol, enquanto a via DXP ocorre nos plastídios (DEWICK, 2002).

A condensação cabeça-cauda entre as unidades DMAP e IPP, catalizada pela enzima prenil-transferase, forma a cadeia de pirofosfato de geranyl (GPP) e seus isômeros pirofosfato de linalil (LPP) e pirofosfato de neril (NPP) que são os precursores dos monoterpênicos (figura 7) (DEGENHARDT *et al.*, 2009). A condensação desta cadeia em C10 com unidades de IPP originam sucessivamente as cadeias de pirofosfato de farnesil (C15), pirofosfato de geranylgeranyl (C20) e pirofosfato de geranyl-farnesil (C25), precursoras dos sesquiterpênicos, diterpênicos e sesterterpênicos, respectivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de pirofosfato de farnesil, e a de duas cadeias de pirofosfato de geranylgeranyl, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpênicos e dos tetraterpênicos (carotenóides), respectivamente (LOBO e LOURENÇO, 2007).

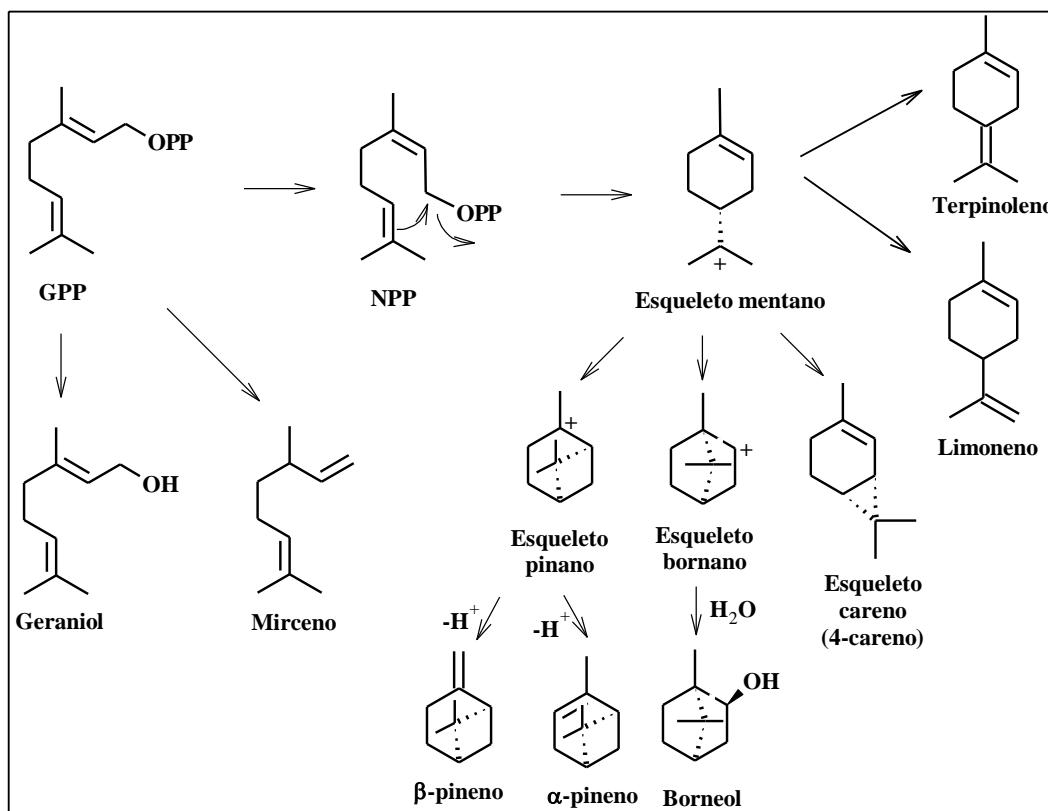


Figura 7: Mecanismo de reação de alguns monoterpênicos.

FONTES: DEGENHARDT *et al.*, 2009; LOBO e LOURENÇO, 2007.

A formação de sesquiterpênicos catalisada por difosfato de farnesil (FPP) ocorre de maneira pelo mesmo mecanismo de reação dos monoterpênicos. A presença de três ligações duplas aumenta grandemente a diversidade estrutural dos produtos (DEGENHARDT *et al.*,

2009). As variações estruturais dos sesquiterpenos (Figura 8) também são classificadas conforme os monoterpenos, podendo ser acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico), ou bicíclicos (γ -bisaboleno, β -selineno, trans-cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas. Em cada um desses subgrupos, classificam-se inúmeras substâncias, estimando-se cerca de 200 tipos de esqueletos carbônicos (SIMÕES e SPITZER, 2003).

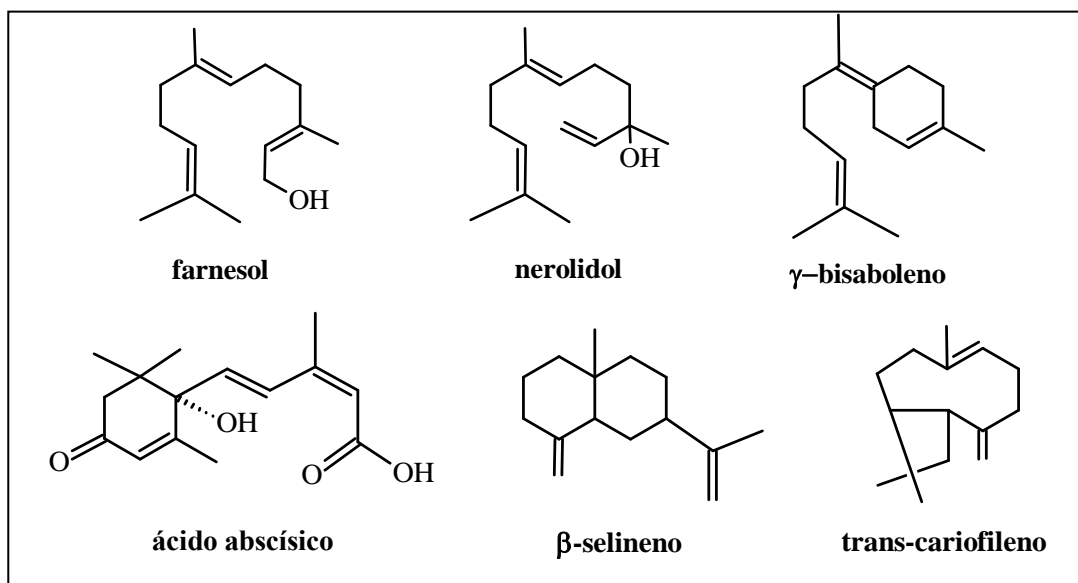


Figura 8: Exemplos de sesquiterpenos

FONTE: SIMÕES e SPITZER, 2003.

Estudos científicos tem demonstrado que os óleos essenciais apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como, analgésica, antimicrobiana, antitumoral, antimalárica, anti-inflamatória e cardiovascular, além da ação sobre o sistema nervoso central e gastro-protetora (APEL *et al.*, 2006).

Como exemplo de óleos essenciais com atividade antiparasitária, podemos citar o óleo essencial da espécie *Croton cajucara* Benth. que possui como principal constituinte o linalol, um álcool terpênico (LOPES *et al.*, 2000) que sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, em camundongos, apresentou doses letais de 4,3 e 15 ng/mL, respectivamente (ROSA *et al.*, 2003).

A avaliação *in vitro* do nerolidol, um sesquiterpeno presente em vários óleos essenciais de plantas, indicou atividade com CI_{50} de 85,22 e 67 μ M para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente (ARRUDA *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Aedo (2007) demonstrou que o limoneno é tóxico para promastigotas e amastigotas de *Leishmania* cultivados *in vitro*, e também é ativo na redução do parasitismo intracelular em macrófagos e tem atividade terapêutica em modelo experimental *in vivo* (ARRUDA, 2007).

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. apresentou CI_{50} de 135 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente. Análises por microscopia eletrônica mostraram que esse óleo essencial interfere na divisão celular das formas da *Leishmania*. O seu principal constituinte, o eugenol, apresentou CI_{50} de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as formas promastigotas (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006).

Apesar vários óleos essenciais com atividade antiparasitária (COSTA *et al.*, 2009; SANTIN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2011), existe, ainda, um grande número de espécies aromáticas cujos óleos não foram investigados quanto ao potencial farmacológico. Nesse contexto, a pesquisa por novas alternativas terapêuticas contra *Leishmania* tem sido intensa em virtude da agressividade do tratamento, sequelas nas pessoas acometidas e devido ao surgimento de resistência do parasita às terapias atuais.

Diante essas premissas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição química dos óleos essenciais obtidos de espécies vegetais das famílias Myrtaceae, Myristicaceae, Annonaceae e Lauraceae e investigar substâncias ativas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a composição química e atividade farmacológica de extratos obtidos de espécies vegetais selecionadas das famílias Myrtaceae, Myristicaceae, Annonaceae e Lauraceae.

Objetivos específicos

Obter por hidrodestilação, óleos essenciais de duas espécies de *Viola* e de uma espécie dos gêneros *Marlierea*, *Eugenia*, *Myrciaria*, *Bocageopsis* e *Endlicheria*.

Elaborar extratos de *V. mollissima*;

Analisar por técnicas cromatográficas os extratos obtidos das espécies selecionadas;

Realizar ensaios biológicos *in vitro* para avaliação do potencial citotóxico e contra leishmaniose dos óleos essenciais e extratos de *V. mollissima*;

Fracionar por cromatografia os extratos que apresentarem atividade biológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas frescas (1000g) das espécies *Eugenia patrisii* Vahl, *Marlierea umbraticola* Kunth O. Berg, *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.), *Virola mollissima* (A. DC.) Warb., *V. theiodora* (Spruce ex Benth.) Warb., *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R.E.Fr., *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) C. K. Allen (figura 9) foram coletadas em abril e setembro de 2010, no turno matutino. Uma coleta em junho de 2010 foi realizada do cerne de *V. mollissima*. Todas as coletas foram feitas na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada na rodovia Manaus-Itacoatiara – AM-010.

A Reserva está situada no divisor de águas de duas principais bacias de drenagem: um para o Rio Amazonas e o outro para o Rio Negro. O clima da região segue o tipo Af de Köppen, com temperatura média de 26°C (máxima 39 °C e mínima 19 °C). A precipitação anual varia de 1.900 a 2.300 mm, sendo a estação chuvosa de dezembro a maio e a estação seca de junho a novembro (PELD, 2012).

Todos os materiais vegetais foram obtidos de um mesmo indivíduo e coletados pelo parataxonomista José Edmilson da Costa Souza. As espécies foram identificadas e marcadas por GPS durante o Projeto Flora da Reserva Ducke e possuem exsiccatas depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA) sob os números 191686 (*M. umbraticola*), 189640 (*M. floribunda*), 189657 (*E. patrisii*), 190038 (*V. mollissima*), 232430 (*V. theiodora*), 179096 (*B. multiflora*) e 177277 (*E. bracteolata*).

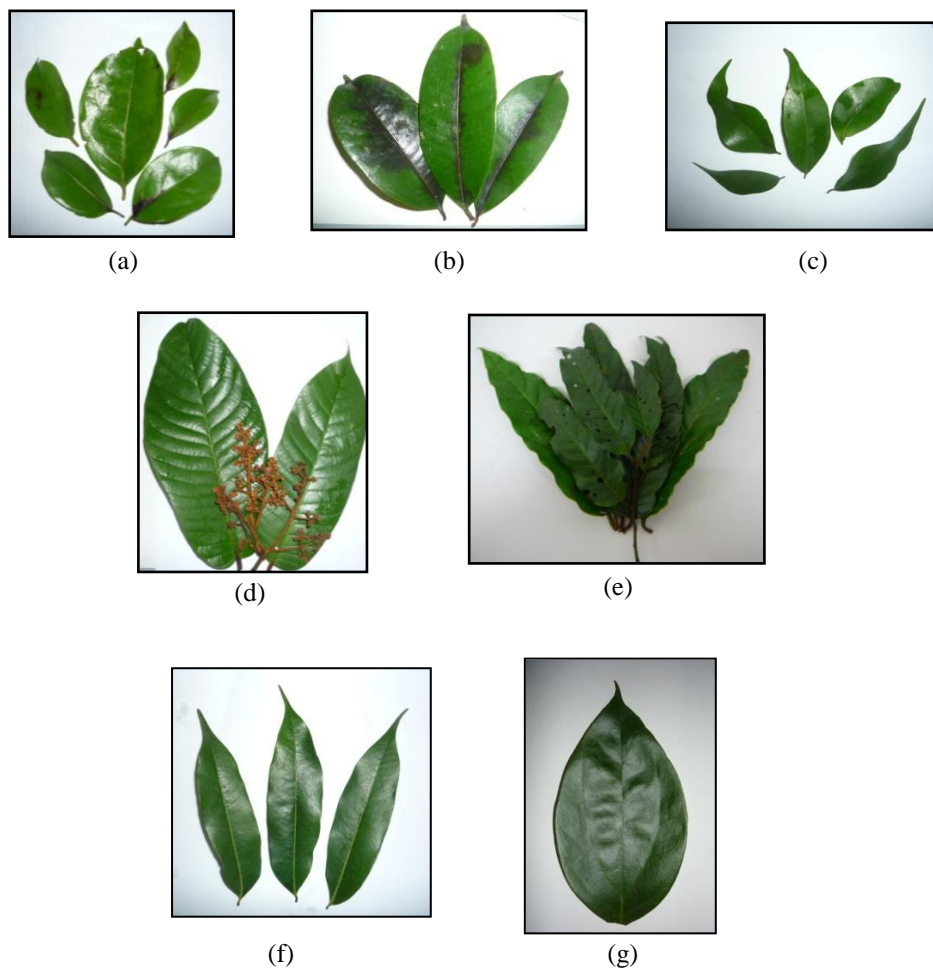


Figura 9: Folhas de (a) *Eugenia patrisii*, (b) *Marlierea umbraticola*, (c) *Myrciaria floribunda*, (d) *Virola mollissima*, (e) *Virola theiodora*, (f) *Bocageopsis multiflora* e (g) *Endlicheria bracteolata*.

3.2. Extração dos óleos essenciais

As folhas das espécies vegetais foram separadas manualmente e lavadas em água corrente. O material fresco (500g) foi seco em estufa de circulação por 4h a 35 °C e após esse período foi submetido a moagem em moinho de facas.

As folhas frescas/secas das espécies *E. patrisii* (400g), *Marlierea umbraticola* (400g), *Myrciaria floribunda* (300g), *Virola mollissima* (300g), *V. theiodora* (300g), *Bocageopsis multiflora* (300g) e *Endlicheria bracteolata* (300g) foram colocadas em um balão de fundo redondo de 5000 mL contendo água destilada (100g/1000mL). A hidrodestilação foi realizada durante 4 horas a 100 °C em sistema de vidro do tipo Clevenger sob refrigeração.

Aos óleos voláteis obtidos foi adicionado cerca de 1 mg de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e após centrifugação foram armazenados em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração. O cálculo do rendimento foi realizado pela relação massa do óleo obtido com a massa do material vegetal utilizado na extração.

3.3. Identificação dos componentes

Os óleos essenciais foram analisados no Laboratório de Farmanguinhos na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. A análise foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), foi realizado uma solução de 2mg/mL de cada óleo essencial em diclorometano. O cromatógrafo utilizado foi a gás HP 6890 com interface com um HP 5873, Detector de Massa Seletivo (energia de ionização de 70 eV), equipado com um DB-5MS, coluna capilar (30 m × de diâmetro interno 0,25 mm, espessura de filme 0,25 μm), usando He como gás de arraste (1,0 mL/min). As temperaturas do injetor e detector foram de 230 °C e 280 °C, respectivamente.

A identificação dos componentes foi baseada na comparação entre os índices de retenção, análise do padrão de fragmentação observado no espectro de massas e dados da literatura (ADAMS, 2009) e com as informações da biblioteca do aparelho, Wiley (275). Para comparação entre os tempos de retenção com os diferentes componentes obtidos da literatura, foi utilizado o índice de retenção de Kovats, que utiliza uma série de alcanos saturados de cadeia normal (ADAMS, 2009).

3.4. Obtenção dos dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de índice pluviométrico foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados foram utilizados, para fins de comparação das variações quantitativas e qualitativas observadas para os óleos essenciais das espécies em estudo.

3.5. Especificação de materiais e métodos

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e os experimentos em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram realizados em cromatoplasmas de alumínio com gel de sílica 60 com indicador de fluorescência F_{254} da Merck. As placas foram

visualizadas usando luz ultravioleta (UV 254 – 366 nm) e reveladas com solução de vanilina sulfúrica 10%.

Os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) sob pressão foram realizados utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (70 – 230 Mesh) da Aldrich.

As rotações ópticas foram medidas em 15 milímetros de células a 589 nm (linha D de sódio), com um polarímetro digital JASCO DIP-370.

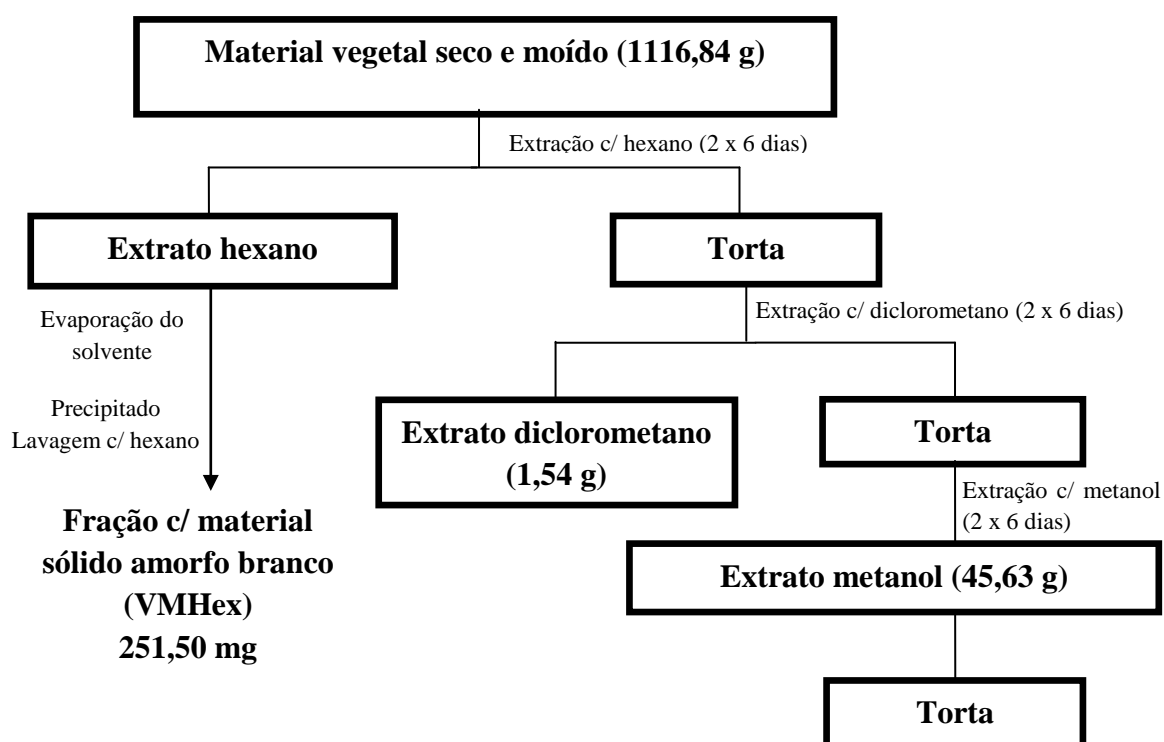
A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no equipamento Shimadzu LC-8Avp, degaseificador de solventes DGU-14A, injetor 10AF e detector SPD-10AVp. O volume de injeção empregado foi de 5 µL. A fase móvel utilizada para a análise do extrato hexano (EBVMHex) e o material sólido obtido de *V. mollissima* (precipitado VMHex) foi acetonitrila:água (50:50) e foi usada coluna de fase reversa.

Os espectros de RMN foram realizados no instrumento Bruker R-32 (400 MHz de ^1H e 100 MHz ^{13}C) usando TMS como padrão interno e solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).

3.6. Obtenção dos extratos de *Virola mollissima*

O cerne de *V. mollissima* foi lavado em água corrente, seco à sombra por 4 dias e moído. O processo de extração foi por maceração a frio por ordem crescente de polaridade, sendo obtidos, após remoção dos solventes, os extratos hexano, diclorometano e metanol.

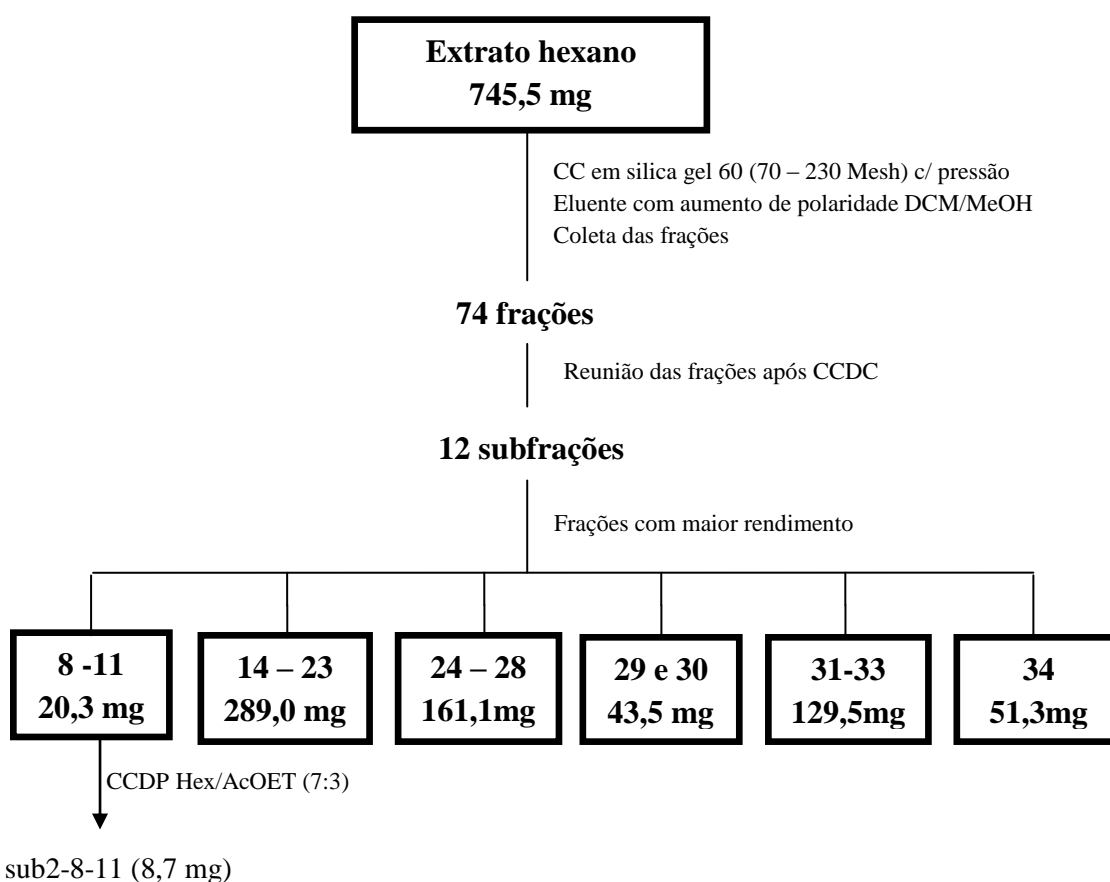
Vale a pena ressaltar que durante a obtenção do extrato hexano do cerne de *V. mollissima* foi observado à formação de um precipitado, o qual após a remoção do sobrenadante foi lavado várias vezes até resultar em um sólido amorfo de coloração branca (251,5 mg) (Esquema 1).



Esquema 1: Obtenção dos extratos hexano, diclorometano e metanol.

3.7. Fracionamento do extrato hexano do cerne de *Viola mollissima*

Após a evaporação dos solventes, o extrato bruto e a fração VMHex foram submetidos à CCD sílica gel 60 F₂₅₄ Merck e como fase móvel foi utilizado diclorometano/metanol a 1%. O extrato (745,5 mg) foi submetido a coluna cromatográfica em gel de sílica eluída com diclorometano:metanol em mistura crescente de polaridade, resultando em 74 frações, as quais foram analisadas por CCD e agrupadas em 12 frações de maior rendimento (esquema 2). A subfração de 8-11 (20 mg) foi fracionada por CCD preparativa (70:30 hexano/acetato de etila), fornecendo uma substância pura, codificada como sub2-8-11 (8,3 mg).



Esquema 2: Isolamento da substância sub2-8-11.

CAPÍTULO II

**ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS
DAS ESPÉCIES *Eugenia patrisii* Vahl, *Marlierea
umbraticola* Kunth O. Berg e *Myrciaria floribunda*
(H. West ex Willd.) O. Berg**

(MYRTACEAE)

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae pode ser destacada pelo grande potencial farmacológico a ser explorado. É constituída de 3000 espécies em 140 gêneros, distribuídos principalmente em regiões tropicais (DE SOUZA *et al.*, 1999).

Quatro gêneros são considerados os mais importantes na família: *Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Eugenia* e *Psidium* com representantes que estão amplamente distribuídas nas florestas brasileiras. Um número expressivo de suas espécies é cultivada por conta de seus frutos comestíveis, com finalidade ornamental, como fonte de madeira e lenha, ou precisamente como fonte de essências de valor comercial (SIANI *et al.*, 2000). Há inúmeras espécies frutíferas, algumas comercialmente importantes, como a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a jabuticaba (*Plinia cauliflora* Mart. Kausel), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), um dos tipos de araçazeiro (*Psidium widgrenianum* O. Berg.) e a azeitona ou jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) (DE SOUZA *et al.*, 1999).

Segundo Joly (1998), as plantas pertencentes à família são lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de dispersão alternada ou oposta e às vezes oposta cruzada, com estípulas muito pequenas. Folhas com pontuação (glândulas oleíferas, cauliflora frequente). De modo geral, as flores das Mirtáceas são homogêneas, pouco variando entre os gêneros. Possuem 4-5 pétalas e sépalas distintas ou o cálice é inteiro e rasga-se na abertura, ou caliptrado abrindo-se em capuz. São polistêmones, dando à flor um aspecto de escova. A maioria tem flores brancas, mas podem ocorrer flores amareladas, róseas ou levemente azuladas. A inflorescência e o hipanto podem ser verdes ou amarelados, glabos ou pilosos, os pêlos variando de brancos ou prateados a marrons ou dourados. No fruto, os eixos da inflorescência podem ser verdes, marrons ou vermelhos (DE SOUZA *et al.*, 1999).

As espécies da família são utilizadas na medicina caseira como, por exemplo, *P. guajava* (goiabeira) e *E. uniflora* (pitangueira) são utilizadas contra diarreia. *Myrcia citrifolia* (Aubl.) Urb. e *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. para problemas estomacais e diabetes e *Eugenia florida* DC. é utilizada para o tratamento do câncer. Outras espécies possuem alto teor vitamínico, principalmente vitamina C como a *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (camu-camu) (DE SOUZA *et al.*, 1999). Segundo a literatura, extratos das folhas de *P. guajava* apresentaram atividade antimicrobiana (DE LIMA *et al.*, 2010).

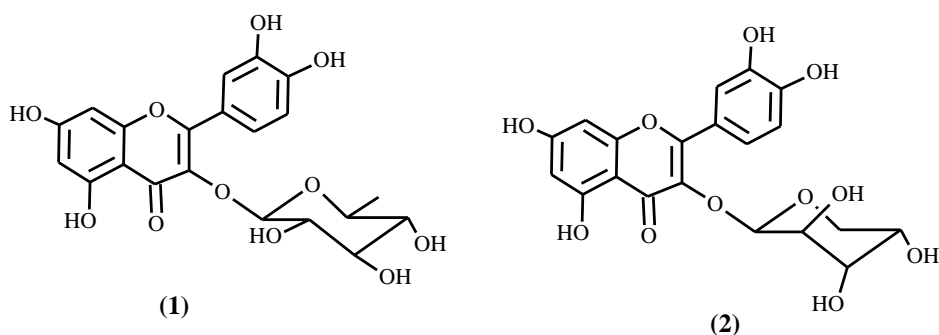
A infusão obtida das folhas verdes de *Eucalyptus citriodora* Hook. é utilizada no tratamento de diversas doenças, por exemplo, asma, afecções catarrais, adenites, bronquite,

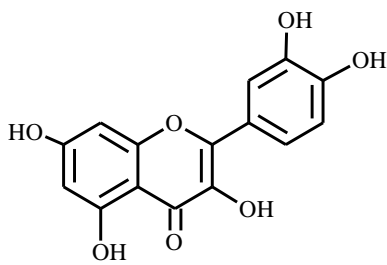
coqueluche, coriza, cistite, catarro da bexiga, disenteria, diabetes, febre, gripe, dentre outras (BALBACH, 1986 *apud* CERQUEIRA, 2002).

Os óleos essenciais de 17 espécies do gênero *Myrcia* foram estudados e detectou-se a predominância de sesquiterpenóides (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

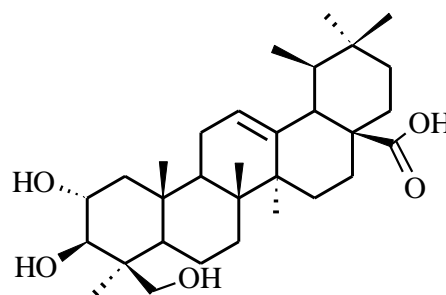
Os óleos essenciais de espécies de *Myrcia* do Rio Grande do Sul foram analisados por CG-DIC e CG-EM. Os óleos de espécies, *M. richardiana* (O. Berg) Kiaersk, *M. arborescens* O. Berg, *M. selloi* (Spreng.) N. Silveira, *M. oligantha* O. Berg, *M. rostrata* DC., *M. lajeana* D. Legrand, *M. obtecta* (O. Berg) Kiaersk, *M. pubipetala* Miq. e *M. hatschbachii* D. Legrand apresentaram sesquiterpenos cíclicos, entre eles, o *trans*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol e α -cadinol. A série dos sesquiterpenos acíclicos foi bem representada por *M. lajeana* (32.1%), sendo 25,3% de *trans*-nerolidol acetato (LIMBERGER *et al.*, 2004).

Dentre as substâncias isoladas de Myrtaceae, podemos citar o estudo fitoquímico da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *M. guianensis* (Aubl.) DC., que resultou no isolamento dos flavonóides quercitrina (**1**), guaijaverina (**2**) e quercetina (**3**) e a fase diclorometano do extrato etanol do caule levou a obtenção do ácido arjunólico (**4**) e do ácido 3β -*trans*-*p*-oxicumaroil-2 α ,23-diidroxi-olean-12-en-28-óico (**5**). O ácido arjunólico e a quercetina apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e a quercitrina apresentou atividade frente à *Micrococcus luteus* (FEHLBERG *et al.*, 2009).

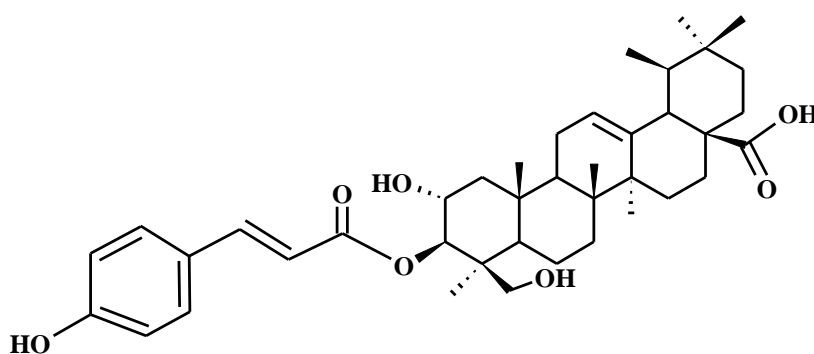




(3)



(4)



(5)

1.1. Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia*, também chamada de *Syzygium*, possui aproximadamente 600 espécies, das quais 400 podem ser encontradas no Brasil. Vinte e oito espécies do gênero *Eugenia* foram encontradas na reserva Florestal Adolpho Ducke que possui uma área de 10.000 ha perto da cidade de Manaus-AM (DE SOUZA *et al.*, 1999).

A espécie *E. patrisii* conhecida popularmente como ubaia é caracterizada por árvores de pequeno a grande porte, com raros arbustos, com predominância na Amazônia. Os frutos são bagas normalmente pouco carnosas, adocicados ou cítricos, geralmente são travosos, mas com potencial comestível (DE SOUZA *et al.*, 1999). Ainda não há descrição na literatura do uso dessa espécie para fins medicinais, contudo, estudos anteriores da família Myrtaceae e do gênero *Eugenia* mostram o grande potencial dessa família como fonte medicinal. Estudos farmacológicos com extratos brutos e compostos, comprovaram as atividades anti-inflamatória, antifúngica (FALCÃO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006), hipotensiva

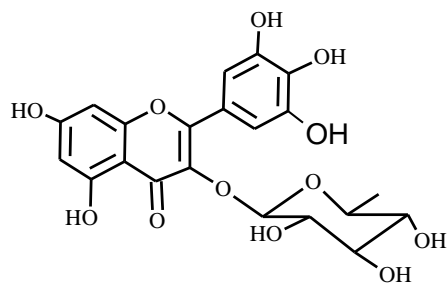
(CONSOLINI *et al.*, 1999), anti-hiperlipidemia (RAVI *et al.*, 2005) e antioxidante (VELAZQUEZ *et al.*, 2003).

Uma revisão descrita por Stefanello e colaboradores (2011) relata que os óleos essenciais de *Eugenia* spp. são caracterizados por grande diversidade química apresentando mais de 300 compostos. Em geral, existe uma predominância de sesquiterpenos cíclicos, juntamente com monoterpenos em pequenas porcentagens. Algumas poucas espécies produzem compostos alifáticos e aromáticos. O monoterpeno α -pineno e o sesquiterpeno trans-cariofileno são os compostos mais abundantes. Duas espécies apresentaram óleos com composição química diferente dos demais, a *E. stigmatica* DC., que contém apenas compostos alifáticos, sendo o ácido fisetérico (90,5%) o principal constituinte e o óleo de *E. confusa* DC. é rico em compostos aromáticos.

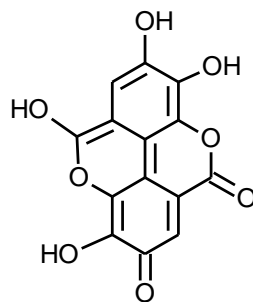
1.2. Gênero *Marlierea*

Na Amazônia brasileira, o gênero *Marlierea* está representada por 11 espécies: *Marlierea bipennis* (O. Berg) McVaugh; *M. caudata* McVaugh; *M. ensiformis* McVaugh; *M. ferruginea* (Poir.) McVaugh; *M. mcvaughii* B. Holst; *M. scytophylla* Diels; *M. spruceana* O. Berg; *M. subulata* McVaugh; *M. summa* McVaugh; *M. umbratica* (Kunth) O. Berg e *M. velutina* McVaugh) e uma pouco conhecida [*M. obumbrans* (O. Berg) Nied.], habitando principalmente em áreas de formações florestais. Os Estados Amazonas e Pará representam os dois principais centros de distribuição dessas espécies, sendo *M. spruceana* e *M. umbratica* as espécies mais comuns (DO ROSÁRIO e SECCO, 2006).

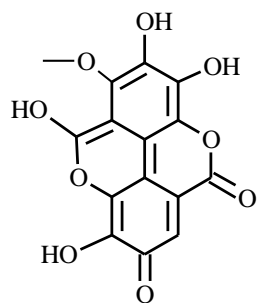
Alguns estudos do gênero *Marlierea* mostraram que essas plantas são ricas em constituintes bioativos, especialmente flavonóides. Nas folhas de *M. grandifolia* O. Berg, por exemplo, foi relatada a presença dos flavonóides quercetina, quercitrina e miricetina-3-O- α -ramnosídeo (**6**) e também os compostos fenólicos, como ácido elágico (**7**) e o ácido 3-O-metilelágico (**8**). Da fração hexânica das folhas de *M. schotti* (O. Berg) D. Legrand foram isoladas as flavonas tectocrisina (**9**), 6-metilTECTOCRISINA (**10**) e 8-metilTECTOCRISINA (**11**) (AMARAL *et al.*, 2001; MESSIAS, 2005; MESSIAS *et al.*, 2008). Das folhas de *M. tomentosa* Cambess. foram isolado os flavonóides quercitrina e isoquercitina (**12**) e os triterpenos α -amirina (**13**) e β -amirina (**14**).



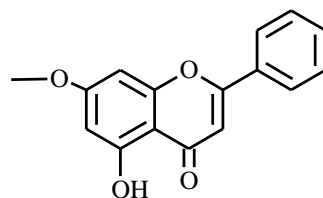
(6)



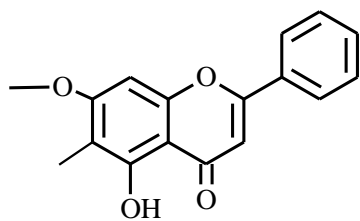
(7)



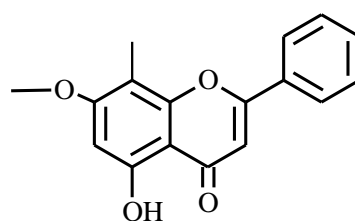
(8)



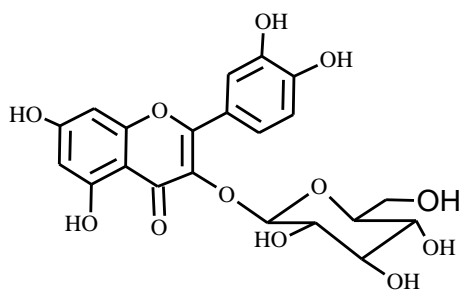
(9)



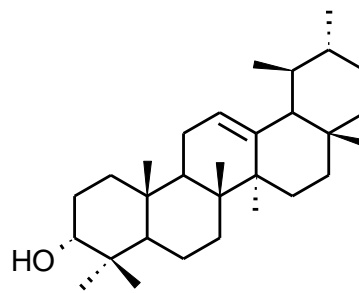
(10)



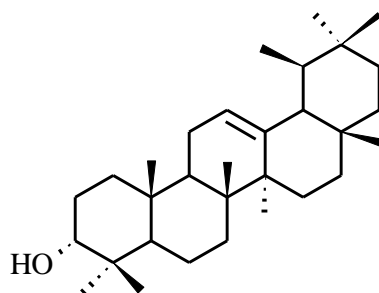
(11)



(12)



(13)



(14)

Os óleos essenciais obtidos das folhas de quatro espécies de *Marlierea* coletadas no sul do Brasil foram analisados por CG-EM. Vinte e cinco substâncias foram identificadas representando 84 – 97% do conteúdo total dos óleos. Os óleos das espécies *M. tomentosa*, *M. silvatica* e *M. obscura* são caracterizados por sesquiterpenos, principalmente os das vias de ciclização do cariofilano e germacrano. Os óleos de *M. tomentosa* e *M. silvatica* (Gardner) Kiaersk. foram semelhantes, com predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como trans-cariofileno e biciclogermacreno. O óleo essencial de *M. obscura* O. Berg. é rico em sesquiterpenos oxigenados (83,2%), sendo o óxido de cariofileno (37,2%) a substância mais abundante (LIMBERGER *et al.*, 2004).

A espécie *Marlierea umbraticola*, conhecida popularmente como goiabinha, é encontrada na Amazônia Central, Ocidental e Norte. São árvores de médio a grande porte que possuem ramos jovens, pecíolo esfoliantes, placas revolutas e alongadas irregulares (DE SOUZA *et al.*, 1999). Não há estudos na literatura sobre a composição química dos óleos essenciais de *M. umbraticola*.

1.3. Gênero *Myrciaria*

A espécie *Myrciaria floribunda* é encontrada do México e Caribe ao sul do Brasil. Arvoretas a árvores de grande porte possuem folhas pequenas, lâmina ondulada, com pontuações visíveis (DE SOUZA *et al.*, 1999).

A análise da composição química do óleo essencial das folhas de *M. floribunda* coletadas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – São Paulo, ao longo do período de março de 2005 a julho de 2007, apresentou como constituinte majoritário a acetofenona xantoxilina, cujos teores variaram bastante de 55 a 100% do óleo volátil, seguida dos sesquiterpenos oxigenados, óxido de cariofileno (1,4-28,5%) e espatulenol (2,1-27,5%) e dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos *E,E*- α -farneseno (3,2-11,1%) e trans-cariofileno (1,5-8,2%). O estudo por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) mostrou que não houve relação entre o estágio fenológico da espécie e a composição química dos seus óleos voláteis e o efeito da sazonalidade não foi o fator que influenciou na variação do constituinte majoritário (SOUZA, 2009).

Na análise por CG-EM do óleo essencial de *M. tenella* (DC.) O. Berg. apresentou como constituintes majoritários trans-cariofileno (25,1%) e espatulenol (9,7%) e o óleo essencial demonstrou atividade anti-inflamatória tanto *in vitro* quanto *in vivo* (APEL *et al.*, 2010). Já o óleo essencial dos frutos de *M. cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jaboticaba) coletados na cidade de Hidrolândia, Goiás, apresentou a predominância de sesquiterpenos (88,1%), sendo os constituintes principais, o γ -eudesmol (33,9%) e α -eudesmol (15,5%) (FORTES *et al.* 2011). Nos frutos das espécies foram encontrados quercetina, quercitrina, ácido elárgico, rutina e antocianinas (REYNERTSON *et al.*, 2006; 2008).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Óleos essenciais de *Eugenia patrisii*

O rendimento do óleo essencial obtido das folhas frescas de *E. patrisii* não foi alterado em função da sazonalidade (0,07%), no entanto foi observado que a produção de óleo foi maior das folhas secas do mês de abril, em que o índice pluviométrico foi mais elevado; 0,42% (Tabela 1), segundo dados pluviométricos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (Figura 10).

Tabela 1: Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia patrisii*

	Abril 2010	Setembro 2010
Folha fresca	0,07	0,07
Folha seca	0,42	0,29

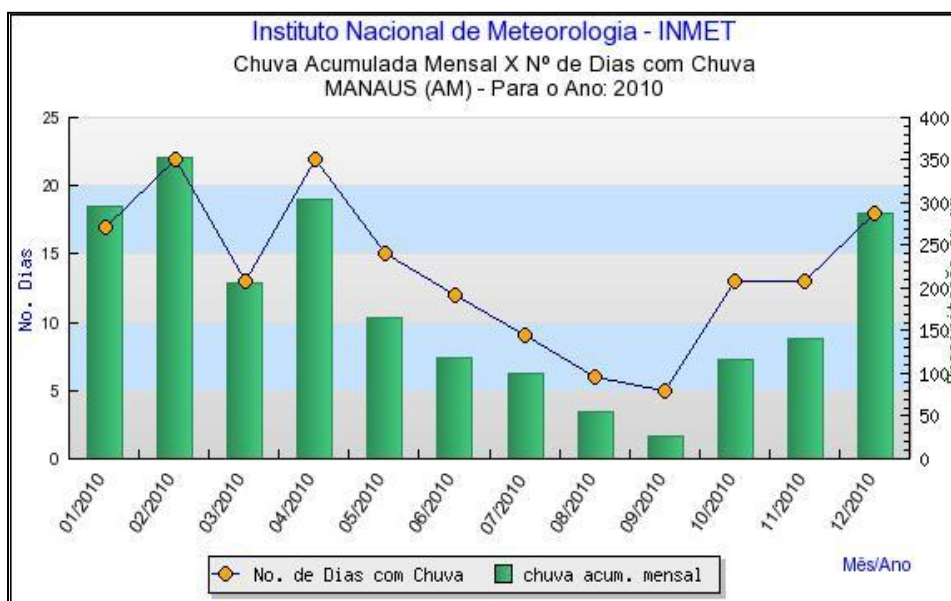


Figura 10: Gráfico de chuva acumulada mensal x número de dias com chuva.

FONTE: Retirado de <<http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Gráficos>> Acesso em 17 abril 2012.

A análise comparativa por CCD dos óleos obtidos da espécie com os padrões *trans*-cariofileno (E) e guaiol (G), solubilizados em diclorometano (1,0 mg/mL), usando como fase móvel tolueno/acetato de etila (98:02) e fase estacionária gel de sílica, mostrou que os óleos coletados em épocas diferentes possuem o mesmo perfil cromatográfico. As substâncias nos óleos de *E. patrisii* apresentaram o mesmo fator de retenção (Rf) do *trans*-cariofileno, mas não houve semelhança de Rf com o guaiol (Figura 11).

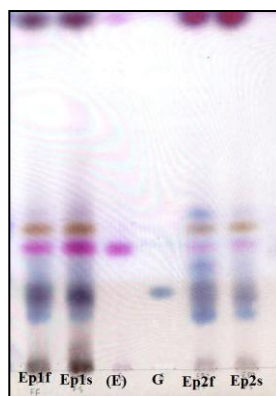


Figura 11: CCD dos óleos essenciais de *Eugenia patrisii* com os padrões *trans*-cariofileno e guaiol

Na Tabela 2 estão listados os constituintes dos quatro óleos coletados e analisados por CG-EM. No total, 81 componentes foram identificados e os resultados mostraram que os óleos de *E. patrisii* são ricos em sesquiterpenos.

Por meio da análise do cromatograma obtido por CG-EM foi possível identificar 91,60% de constituintes das folhas frescas e 90,98% das folhas secas dos óleos essenciais obtidos na época chuvosa. Enquanto que nos óleos coletados na época seca (setembro) foram identificados no cromatograma 85,76% de constituintes nas folhas frescas e 84,68% nas folhas secas.

Tabela 2: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia patrisii*

Constituintes	IR	Ep1ff	Ep1fs	Ep2ff	Ep2fs
Monoterpenos					
α -pineno	938	2,52	0,65	3,72	1,31
β -pineno	971	-	-	-	0,12

Sesquiterpenos					
δ -elemeno	1336	2,87	1,96	1,57	0,14
α -cubebeno	1347	0,44	1,43	-	-
α -ilangeno	1375	-	-	-	0,14
α -copaeno	1377	1,02	0,35	0,84	1,15
β -bourboneno	1387	-	-	-	0,29
β -cubebeno	1388	1,25	-	-	-
ciclosativeno	1389	-	-	-	0,28
β -elemeno	1390	-	1,32	1,75	1,17
sativeno	1391	2,00	-	-	2,65
cis- α -bergamoteno	1407	-	-	-	0,32
β -isocomeno	1408	-	-	2,41	-
α -gurjuneno	1409	11,22	12,51	-	0,60
longifoleno	1410	-	-	2,83	-
<i>trans</i> -cariofileno	1423	7,34	8,57	6,98	7,54
β -copaeno	1430	1,02	1,02	-	-
β -gurjuneno	1431	-	-	0,58	0,10
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1432	-	-	-	0,17
α -acoradieno	1433	-	-	-	0,34
α -guaiano	1435	0,74	0,96	-	0,84
aromadendreno	1439	-	-	-	0,55
6,9-guaiadieno	1442	-	-	-	0,92
cis-muurolo-3,5-dieno	1450	0,75	0,54	-	-
α -humuleno	1457	1,61	1,12	1,14	1,30
γ -muurolo	1476	1,20	1,36	-	1,43
α -amorfenno	1480	-	-	0,79	1,43
germacreno D	1483	9,83	5,83	2,33	3,10
γ -gurjuneno	1485	0,99	-	-	0,69
β -maalieno*	1488	-	-	1,22	-
δ -selineno	1492	-	-	-	0,31

cis- β -guaieno	1493	-	2,55	-	1,22
valenceno	1496	0,57	1,18	-	9,56
β -selineno	1497	2,29	3,65	5,68	3,20
α -selineno	1498	5,60	6,95	2,57	5,23
α -muuroleno	1500	-	-	-	0,61
epizonareno	1501	-	-	-	2,11
trans- β -guaieno	1502	0,77	-	2,33	-
viridifloreno	1503	-	3,03	1,27	-
premnaspirodieno	1505	-	1,00	-	1,81
β -bisabolene	1507	-	-	-	0,25
α -bulneseno	1509	2,33	-	-	-
γ -patchouleno	1512	1,88	1,87	-	-
γ -cadineno	1513	-	3,61	-	3,61
δ -cadineno	1519	3,04	4,98	1,84	-
α -panasinseno	1521	3,82	4,03	4,58	-
trans- γ -bisaboleno	1522	-	-	-	0,38
γ -selineno	1539	-	1,87	-	-
selina-3,7(11)-dieno	1543	0,72	1,33	2,58	-
ocidentalol	1550	-	-	-	0,22
trans-dauca-4(11),7-dieno	1556	-	-	1,16	-
germacreno B	1559	9,34	10,62	8,90	7,32
óxido de cariofileno	1582	-	-	-	1,92
cadina-1(10),6,8-trieno	1586	-	-	-	0,63
guaiol	1597	1,36	0,81	-	1,31
1,10-di-epi-Cubenol	1618	-	-	-	0,37
10-epi- γ -eudesmol	1622	-	-	-	1,60
γ -eudesmol	1625	4,55	-	-	-
selina-6-en-4-ol	1626	-	-	10,61	-
1-epi-Cubenol	1627	-	-	-	1,29
cis-cadin-4-en-7-ol	1635	-	-	-	3,90
epi- α -muurolol	1640	3,14	1,87	5,34	-

hinesol	1641	-	-	2,81	-
α -muurolol	1648	-	-	1,01	0,58
pogostol	1651	-	1,97	-	-
3-thujopsanona	1653	-	-	-	0,38
valerianol	1656	-	-	-	0,44
neo-intermedeol	1658	1,07	-	-	1,50
selin-11-en-4- α -ol	1659	2,24	1,40	3,38	1,95
cadaleno	1675	2,63	-	-	-
5-neo-cedranol	1684	-	-	-	1,90
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	1685	-	-	1,58	-
eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	1687	-	-	-	0,22
germacrona	1693	-	-	0,83	0,17
eudesma-7(11)-en-4-ol	1699	1,45	0,64	-	-
ciccolorenona	1759	-	-	-	0,38
α -costol	1773	-	-	-	0,30
11-acetoxieudesman-4- α -ol	1940	-	-	3,13	-
Classes de Terpenóides					
Monoterpenos hidrocarbonetos		2,52	0,65	3,72	1,43
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		75,27	83,64	53,35	64,18
Sesquiterpenos oxigenados		13,81	6,64	28,69	19,07
Total		91,60	90,98	85,76	84,68

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcanos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Ep1 (abril/2010) e Ep2 (setembro/2011). *HEUSKIN *et al.*, 2009.

Comparando os óleos essenciais da estação chuvosa das folhas frescas (Ep1ff) e secas (Ep1fs), o teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos foi maior em Ep1fs (83,64%) e o de sesquiterpenos oxigenados em Ep1ff (17,11%). Ambos os óleos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes e os mesmos constituintes principais (Figuras 12 e 13). Em Ep1ff e Ep1fs, o contituente principal foi o α -gurjuneno, com 11,22% e 12,51% respectivamente.

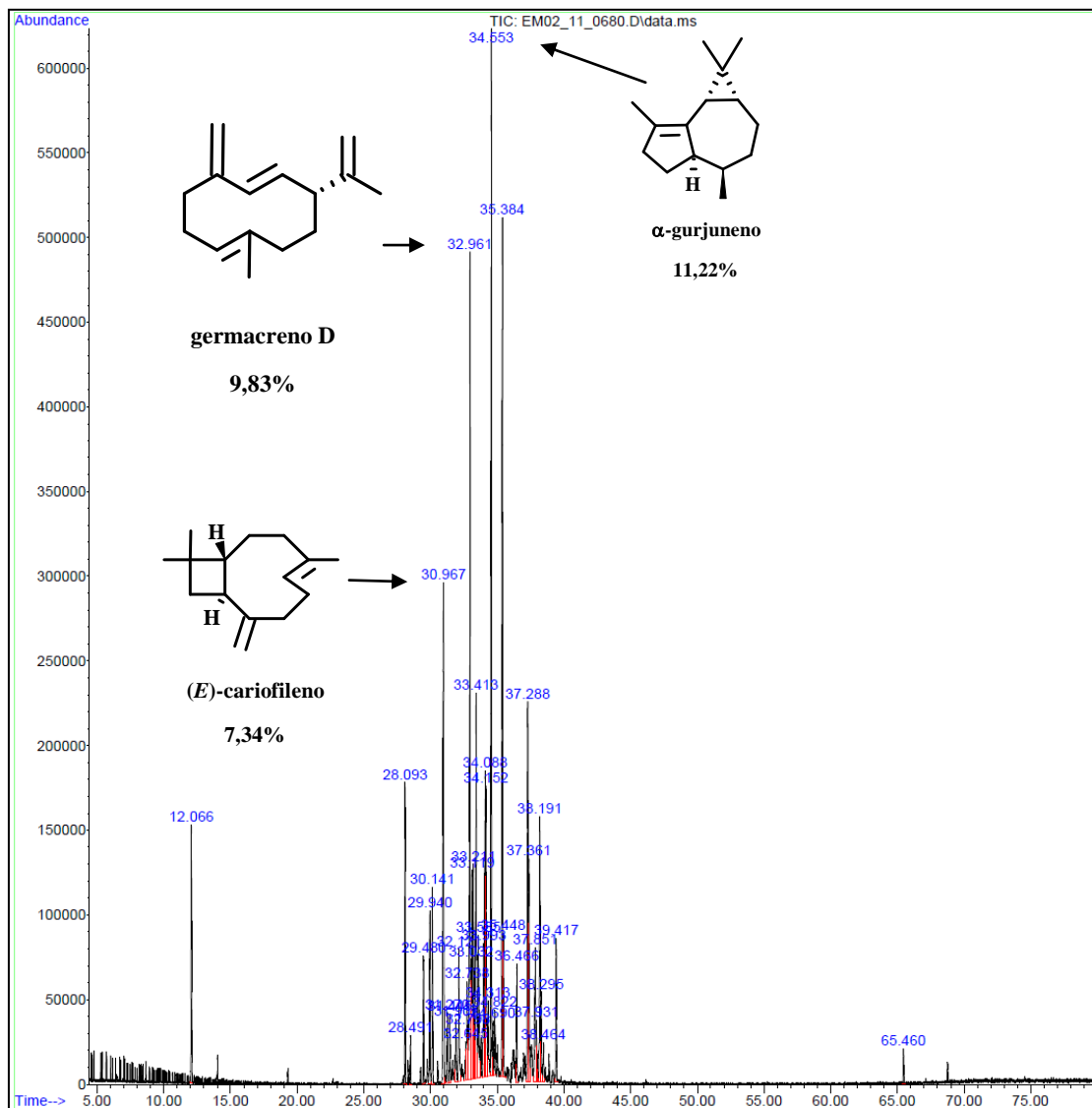


Figura 12: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Eugenia patrisii* na estação chuvosa.

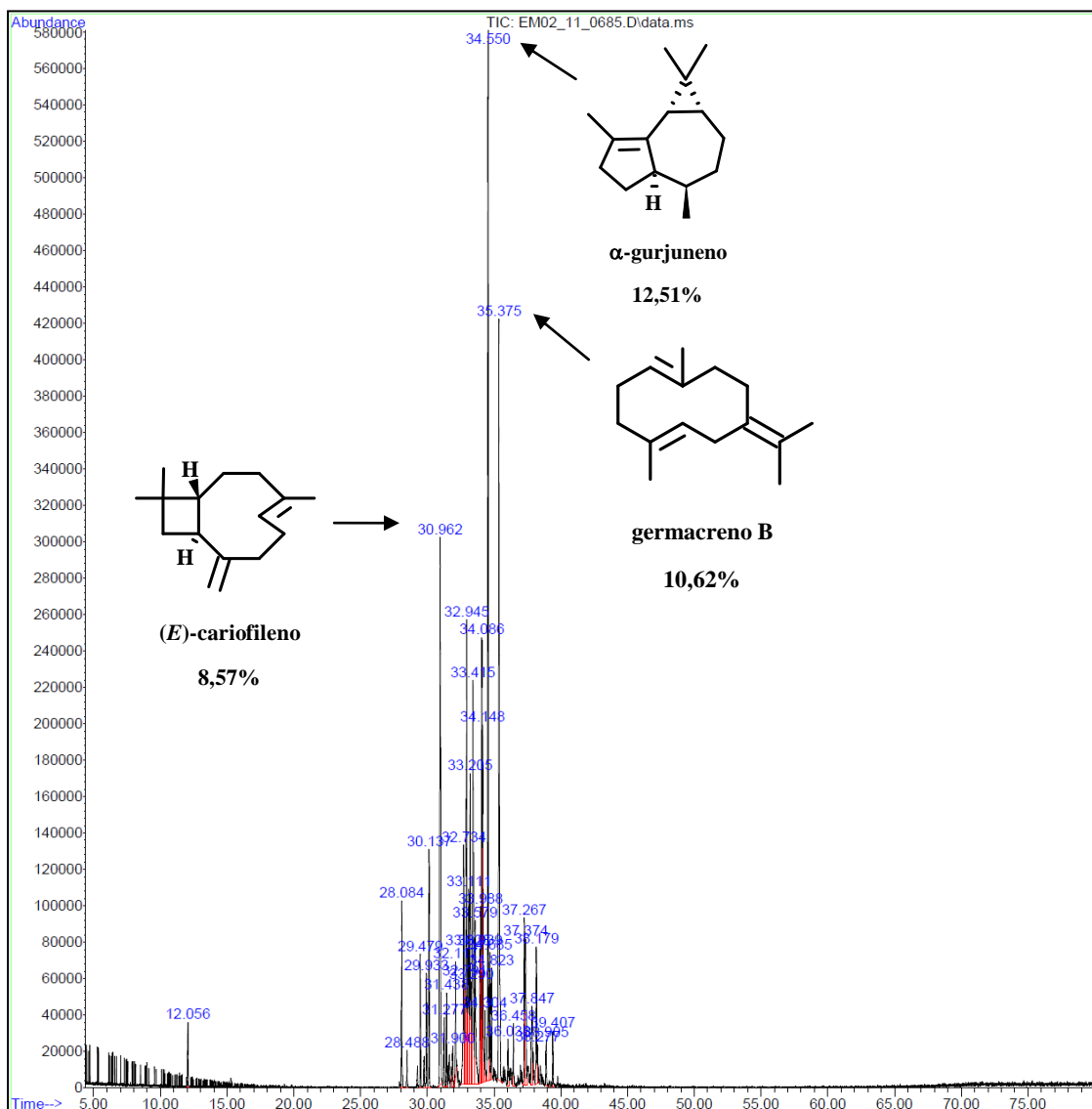


Figura 13: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Eugenia patrisii* na estação chuvosa.

Em relação aos óleos essenciais obtidos na estação seca, os sesquiterpenos hidrocarbonetos (64,18%) estão em maior proporção no óleo das folhas secas, com o valenceno (9,56%) e o *trans*-cariofileno (7,54%) em maior abundância. Já nas folhas frescas, há um aumento significativo de sesquiterpenos oxigenados (28,69%), sendo os constituintes mais abundantes os sesquiterpenos, selina-6-en-4-ol (10,61%) e o germacreno B (8,90%). Os cromatogramas de CG-EM dos dois óleos obtidos estão apresentados nas Figuras 14 e 15.

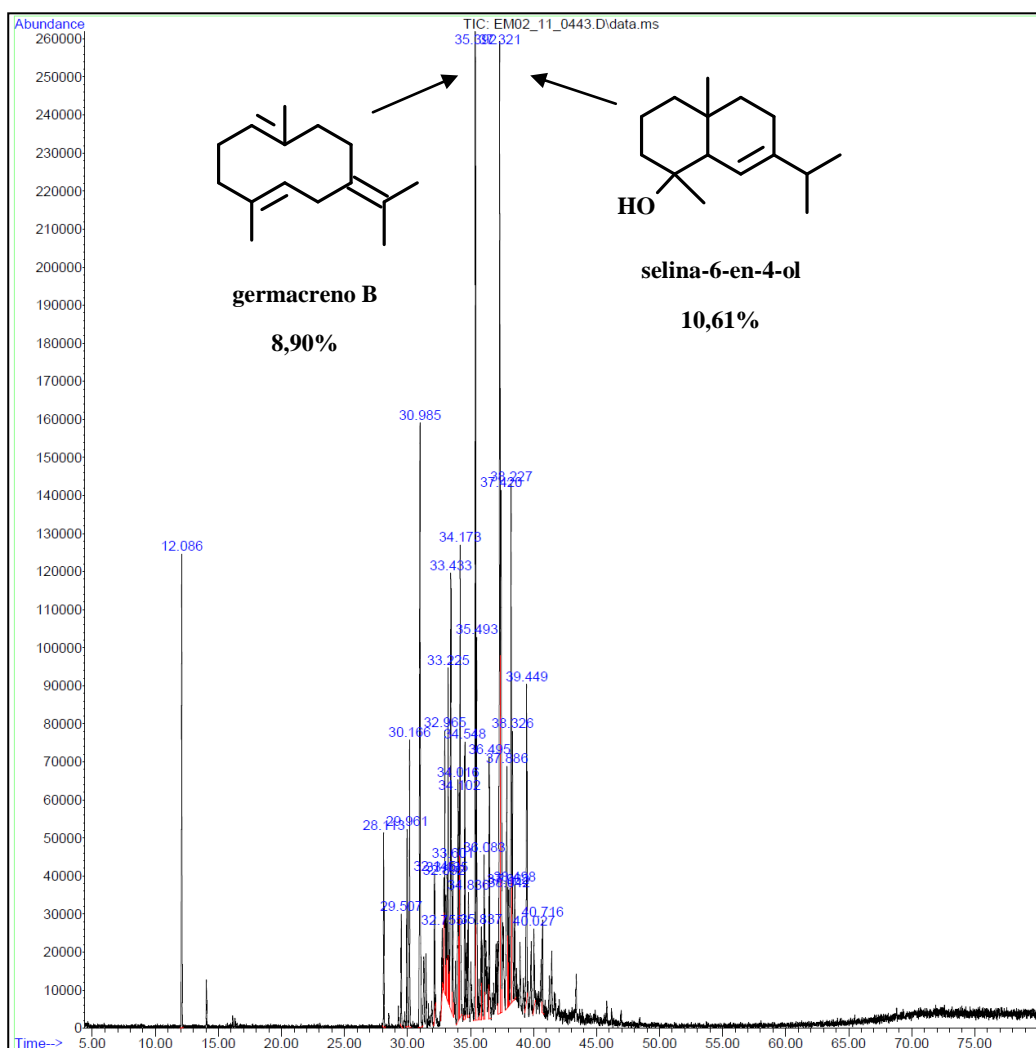


Figura 14: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Eugenia patrisii* na estação seca.

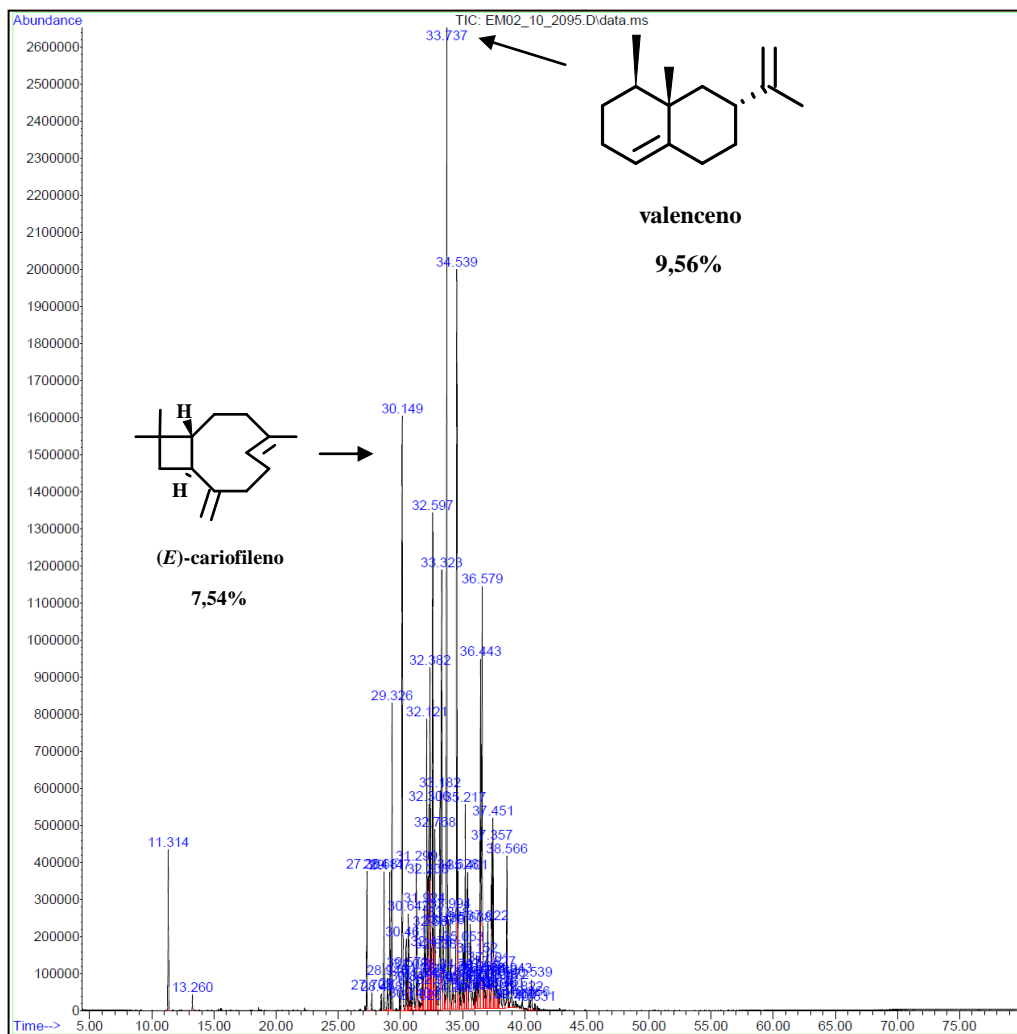


Figura 15: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Eugenia patrisii* na estação seca.

O pico 37, com tempo de retenção de 37,73 minutos, (Figura 15), apresentou íon molecular de 204 daltons, sugerindo a fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. Na Figura 16, o padrão de fragmentação observado é característico do valenceno, conforme comparação com a literatura e biblioteca do sistema CG-EM (ADAMS, 2009). O pico m/z 189 [M-15] deve-se a perda de grupo metila resultante de uma segmentação α alílica. Enquanto que o pico m/z 161[M-15-18] resultou da perda de eteno (C_2H_4) conforme a fragmentação retro Diels-Alder que produz um cátion radical de um dieno e um alceno neutro (Esquema 3) (PAVIA *et al.*, 2010).

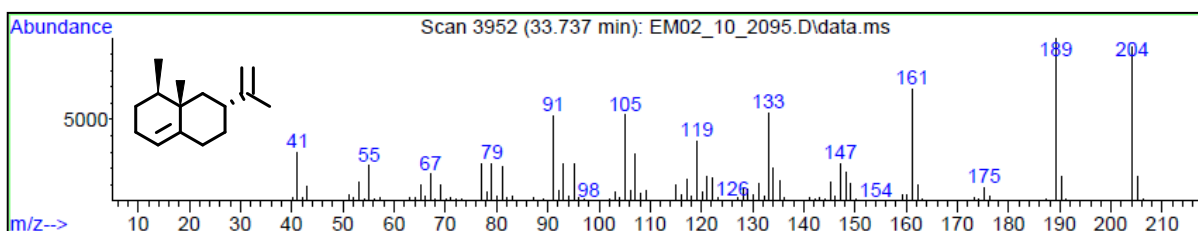
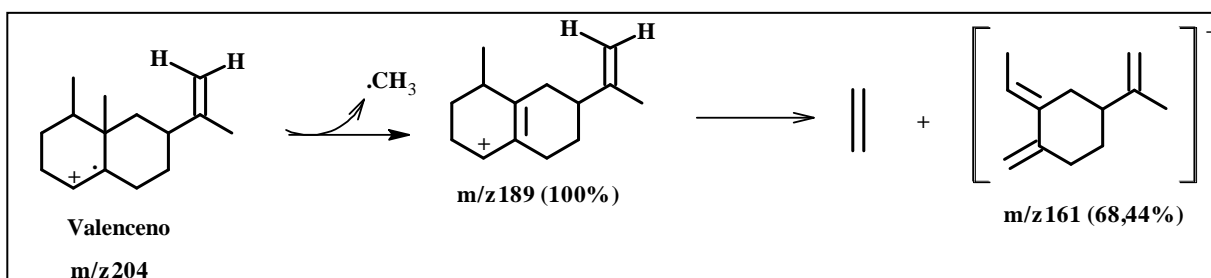


Figura 16: Espectro de massas correspondente ao pico 37 do cromatograma da Figura 15.



Esquema 3: Proposta de fragmentação do sesquiterpeno valenceno.

Pereira e colaboradores (2010) analisaram por CG-EM o óleo essencial de *E. patrisii* coletada na restinga da praia de Marieta, no município de Maracanã-Pará. O óleo essencial dessa localidade também apresentou abundância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (89,93%), mas os constituintes majoritários foram o *trans*-cadina-1,4-dieno (16,52%), o *trans*-muurola-3,5-dieno (13,28%) e o *trans*-cariofileno (11,07%), diferentes dos constituintes principais encontrados nos óleos deste trabalho. Entretanto, os sesquiterpenos germacreno B e germacreno D foram detectados assim como nos óleos de *E. patrisii* coletados em Manaus. Na análise de outros óleos de espécies deste gênero, como *E. flavescens* e *E. protenta*, mostrou o germacreno D em proporções significativas de 14,95% e 15,06%, respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2010), maiores que as dos óleos analisados nesse trabalho.

Vários fatores podem ter influenciado na diferença da composição do óleo de *E. patrisii*, visto que tem-se relatado que a época da colheita, fontes geográficas, o horário, o modo de secagem do material vegetal e fatores ambientais, como umidade, água, solo e herbivoria também podem influenciar sobre a composição e o teor do óleo essencial (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; SILVA *et al*, 2003).

2.2. Proposta de rota biossintética dos sesquiterpenos nos óleos de *Eugenia patrisii*

A possível rota biossintética dos sesquiterpenos encontrados nos quatro óleos essenciais de *E. patrisii* é apresentada no Esquema 4.

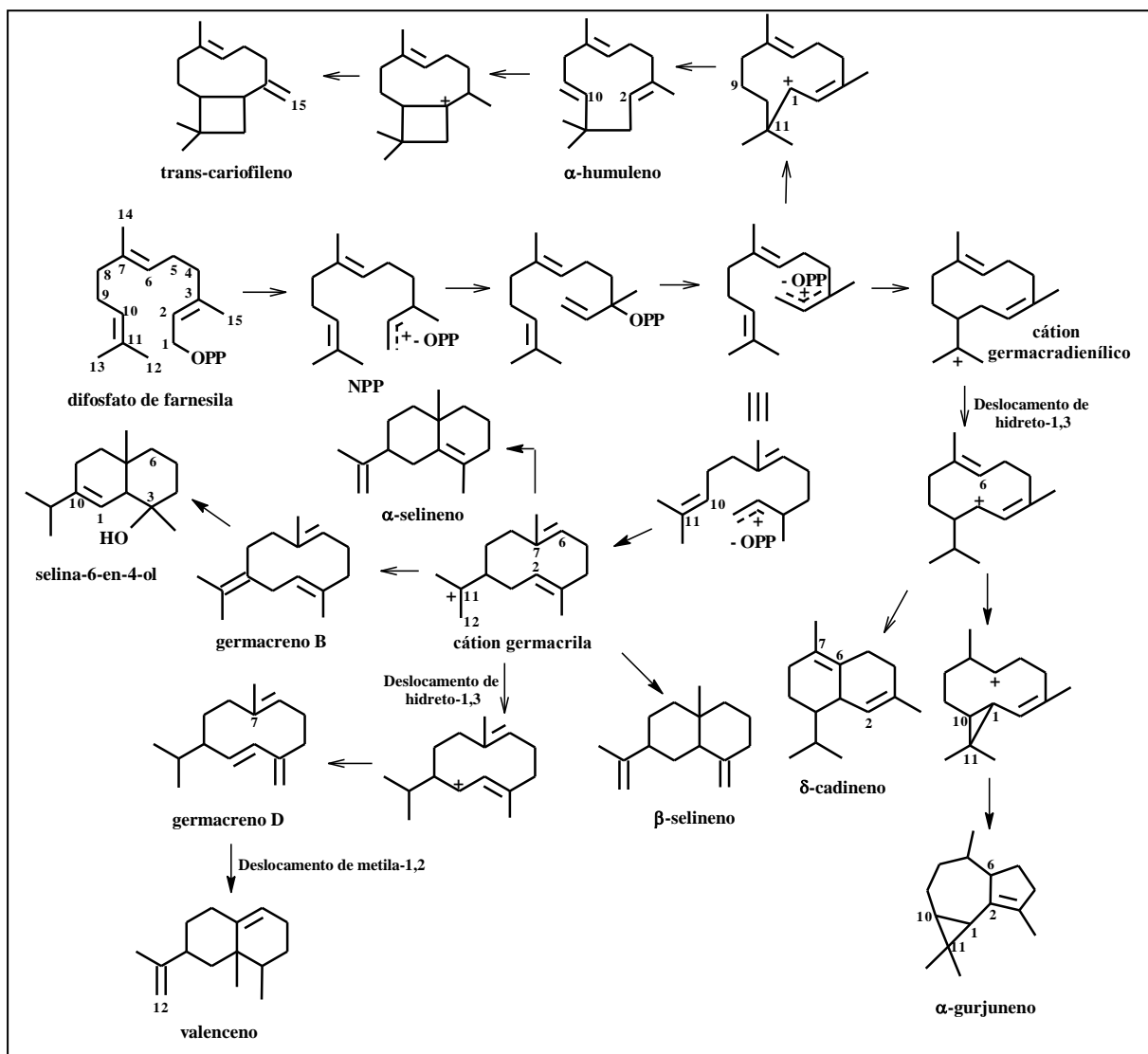
A formação dos sesquiterpenos tem início com a ionização do difosfato de farnesila (precursor dos sesquiterpenos). A migração do grupamento difosfato de C1 para C3 resulta no pirofosfato de nerolidil (NPP) (DEWICK, 2002). A ciclização do cátion NPP entre C11-C1, associado à desprotonação de C9, leva a formação do α -humuleno. Quando esta ciclização vem acompanhada da formação de uma ligação adicional entre C2-C10, além da desprotonação de C15 forma-se o *trans*-cariofileno (DE BARROS *et al.*, 2009).

A ionização direta do NPP e sua subsequente ciclização entre C10-C1 leva à formação do cátion germacril. A saída de um próton leva a formação direta do germacreno B e um deslocamento intramolecular de hidreto, conduz a formação do germacreno D.

A partir do cátion germacril por meio da desprotonação em C2 e C12, seguida da formação de ligação intramolecular entre C7 e C2 leva a formação do α -selineno.

A protonação do constituinte germacreno B em C2 devido à hidratação em C3 forma-se a ligação entre C7 e C2. A desprotonação em C1 e a captura de hidreto em C11 leva a formação do composto selina-6-en-4-ol. O deslocamento de metila-1,2 em C7 e a desprotonação em C12 formam o valenceno.

A ciclização do isômero do NPP entre C10-C1 conduz a formação do cátion germacradienílico. A sequência de reações envolvendo deslocamento intramolecular de hidreto, ciclização entre C6 e C1 leva à formação do δ -cadineno. A ciclização entre C11 e C1 e a desprotonação em C6 leva a formação do α -gurjuneno.



Esquema 4: Proposta da rota biossintética dos principais constituintes presentes nos óleos de *Eugenia patrisii*.

FONTE: DE BARROS *et al.*, 2009.

2.3. Óleos essenciais das folhas de *Myrciaria floribunda*

A comparação dos rendimentos dos óleos essenciais das folhas de *M. floribunda* referente às duas épocas distintas, mostrou que o teor de óleo foi maior na estação seca (0,24%). Entretanto, o maior rendimento do óleo (0,52%) foi obtido das folhas secas (Tabela 3). A rotação óptica do óleo de Mf1ff é de $[\alpha]_D^{25} = + 12,4^\circ$ (MeOH).

Tabela 3: Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de *Myrciaria Floribunda*.

	Abril 2010	Setembro 2010
Folha fresca	0,17	0,24
Folha seca	-	0,52

A análise comparativa por CCD, utilizando os padrões óxido de cariofileno (ox) e guaiol (G) nas mesmas condições descritas na página 51, mostrou que o óleo coletado na estação chuvosa (Mf1ff) não apresentou o mesmo perfil cromatográfico dos óleos coletados na estação seca (Mf2). Apenas o óleo de Mf1ff apresentou uma substância com o mesmo Rf do óxido de cariofileno (Figura 17). Contudo, nenhuma substância foi observada nos óleos de *M. floribunda* com o mesmo fator de retenção (Rf) do guaiol.

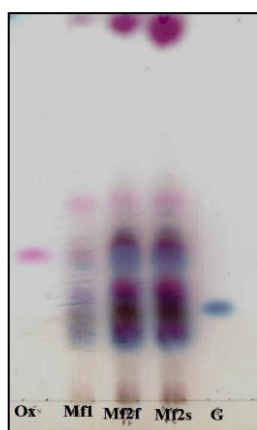


Figura 17: CCD dos óleos essenciais de *Myrciaria floribunda* com os padrões óxido de cariofileno e guaiol.

Por meio da análise do cromatograma obtido por CG-EM dos óleos essenciais obtidos das folhas de *M. floribunda* permitiu identificar o total de 91 constituintes. Na Tabela 4 estão relacionados os constituintes presentes nos três óleos, os quais apresentaram predominância de sesquiterpenos hidrocarbonetos, seguidos dos hidrocarbonetos monoterpênicos e oxigenados. Na comparação dos óleos das folhas frescas das duas estações foi verificado que não houve variação significativa no teor desses terpenos. Na amostra Mf1ff, os sesquiterpenos hidrocarbonetos foram observados na proporção de 37,94%, enquanto que em Mf2ff (setembro/folhas frescas) o teor foi de 32,62%. No entanto, a proporção de sesquiterpenos oxigenados no óleo coletado das folhas secas (Mf2fs) foi baixa (1,99%) em relação ao óleo coletado de Mf2ff (13,34%).

Além disso, não houve variação expressiva nos teores dos monoterpênicos hidrocarbonetos e oxigenados tanto em relação às épocas distintas quanto na extração dos óleos coletados das folhas frescas e secas (Tabela 4).

Tabela 4: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Myrciaria floribunda*

Constituintes	IR	Mf1ff	Mf2ff	Mf2fs
(2E)-hexenal	856	-	0,15	0,15
Monoterpenos				
α -pineno	938	13,15	18,45	19,17
canfeno	946	0,59	0,58	0,60
β -mirceno	988	0,49	0,46	0,48
α -felandreno	1002	-	0,33	-
ρ -cimeno	1024	-	0,26	0,27
1,8-cineol	1026	15,67	19,30	19,58
limoneno	1029	4,06	3,35	3,42
(E)- β -ocimeno	1036	-	0,26	-
γ -terpineno	1054	0,56	0,40	0,41
ρ -menta-3,8-dieno	1068	0,51	-	-
terpinoleno	1086	0,50	0,13	0,34
Borneol	1165	0,94	0,62	0,60
terpinen-4-ol	1174	0,56	0,46	0,46

α -terpineol	1186	4,65	3,87	3,89
Sesquiterpenos				
α -cubebeno	1347	-	0,45	0,43
isoledeno	1374	-	0,12	-
α -copaeno	1377	0,65	0,33	0,31
2-epi- α -funebreno	1380	-	0,45	-
β -cubebeno	1388	-	0,30	0,26
α -gurjuneno	1409	0,76	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1423	12,77	9,78	9,80
β -gurjuneno	1431	-	0,28	-
α -guaiano	1437	-	0,31	-
2-naftalenometanol	1439	0,86	-	-
aromadendreno	1441	0,64	0,47	0,42
6,9-guaiadieno	1442	-	0,38	-
multail-4(12)-eno	1445	-	0,32	-
α -humuleno	1453	1,32	0,90	0,91
9-epi- <i>trans</i> -cariofileno	1457	-	0,19	-
4,5-di-epi-aristolocheno	1471	-	0,09	-
γ -muuroleno	1472	-	0,45	0,48
amorfa-4,7(11)-dieno	1476	0,61	-	-
α -amorfeno	1480	1,09	0,88	0,66
germacreno D	1483	-	0,59	0,56
δ -selineno	1484	1,22	0,65	0,61
Cis-eudesma-6,11-dieno	1489	0,92	-	-
α -selineno	1493	3,51	2,48	2,43
valenceno	1496	1,19	1,20	1,22
β -selineno	1497	5,20	2,39	2,32
β -cadineno	1499	-	0,81	-
α -muuroleno	1500	-	0,13	-
epizonareno	1501	0,70	0,44	0,49
β -guaiano	1502	-	0,93	1,84

viridifloreno	1503	-	1,73	-
(Z)- γ -macrocarpeno	1512	0,43	-	-
γ -cadineno	1513	1,48	-	-
δ -cadineno	1515	1,59	0,71	0,74
α -panasinseno	1517	-	1,64	1,62
7-epi- α -selineno	1520	1,26	-	-
ligulóxido	1534	-	0,25	-
α -calacoreno	1539	1,56	2,50	-
selina-3,7(11)-dieno	1546	-	0,53	0,47
trans-nerolidol	1561	0,60	-	-
epi-biciclosesquifelandreno*	1569	1,04	-	-
cariolan-8-ol	1571	1,03	-	-
Álcool Cariofilenila	1574	-	0,45	-
óxido de Cariofileno	1580	-	0,63	-
globulol	1584	-	1,22	-
tujopsan-2- α -ol	1586	0,95	-	-
globulol	1590	0,86	-	-
viridiflorol	1592	0,83	0,41	-
cubeban-11-ol	1593	0,57	0,79	-
rosifoliol	1604	-	0,40	-
1,10-di-epi-cubenol	1618	0,66	1,75	-
10-epi- γ -eudesmol	1621	-	1,38	1,37
<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1632	-	1,05	-
epi- α -muurolol	1640	0,72	-	-
α -cadinol	1642	-	0,61	0,62
cubenol	1645	1,53	-	-
α -muurolol	1648	2,09	-	-
β -eudesmol	1649	1,80	3,12	-
pogostol	1651	-	0,70	-
α -eudesmol	1652	0,60	-	-
selin-11-en-4- α -ol	1658	1,33	-	-

neo-intermedeol	1660	4,54	-	-
intermedeol	1665	0,45	-	-
cadaleno	1670	-	0,19	0,21
11-acetoxieudesman-4 α -ol	1938	-	0,58	-
Classes de terpenóides				
Monoterpenos hidrocarbonetos		19,86	24,22	24,69
Monoterpenos oxigenados		21,82	24,25	24,53
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		37,94	32,62	25,78
Sesquiterpenos oxigenados		19,42	13,34	1,99
Outros compostos		-	0,15	0,15
Total		99,04	94,58	77,14

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcenos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Mf1 (abril/2010) e Mf2 (setembro/2010). *YU *et al.*, 2007.

Os constituintes majoritários nos três óleos foram os monoterpenos α -pineno, 1,8-cineol e o sesquiterpeno *trans*-cariofileno. Os teores desses constituintes em Mf1ff foram observados na proporção de 13,15%; 15,67% e 12,77%, respectivamente.

Em Mf2ff, o α -pineno foi detectado na porcentagem de 18,45%, 1,8-cineol 19,30% e *trans*-cariofileno 9,78%, enquanto que em Mf2fs os teores foram de 19,17%; 19,58% e 9,80%, respectivamente.

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais de *M. floribunda* do Estado do Amazonas foi diferente quando comparado com o óleo da espécie coletada em São Paulo, que teve como principais constituintes a xantoxilina, o óxido de cariofileno e o espatulenol (SOUZA, 2009). Entretanto, nos óleos obtidos das folhas e flores de *M. floribunda* coletada na Restinga de Jurubatida (RJ, Brasil), os monoterpenos foram os principais constituintes, sendo 1,8-cineol o componente principal (38,4%) nas folhas e flores (22,8%) (TIETBOHL *et al.*, 2012).

Os cromatogramas dos óleos de Mf1ff, Mf2ff e Mf2fs são apresentados nas Figuras 18, 20 e 21, respectivamente.

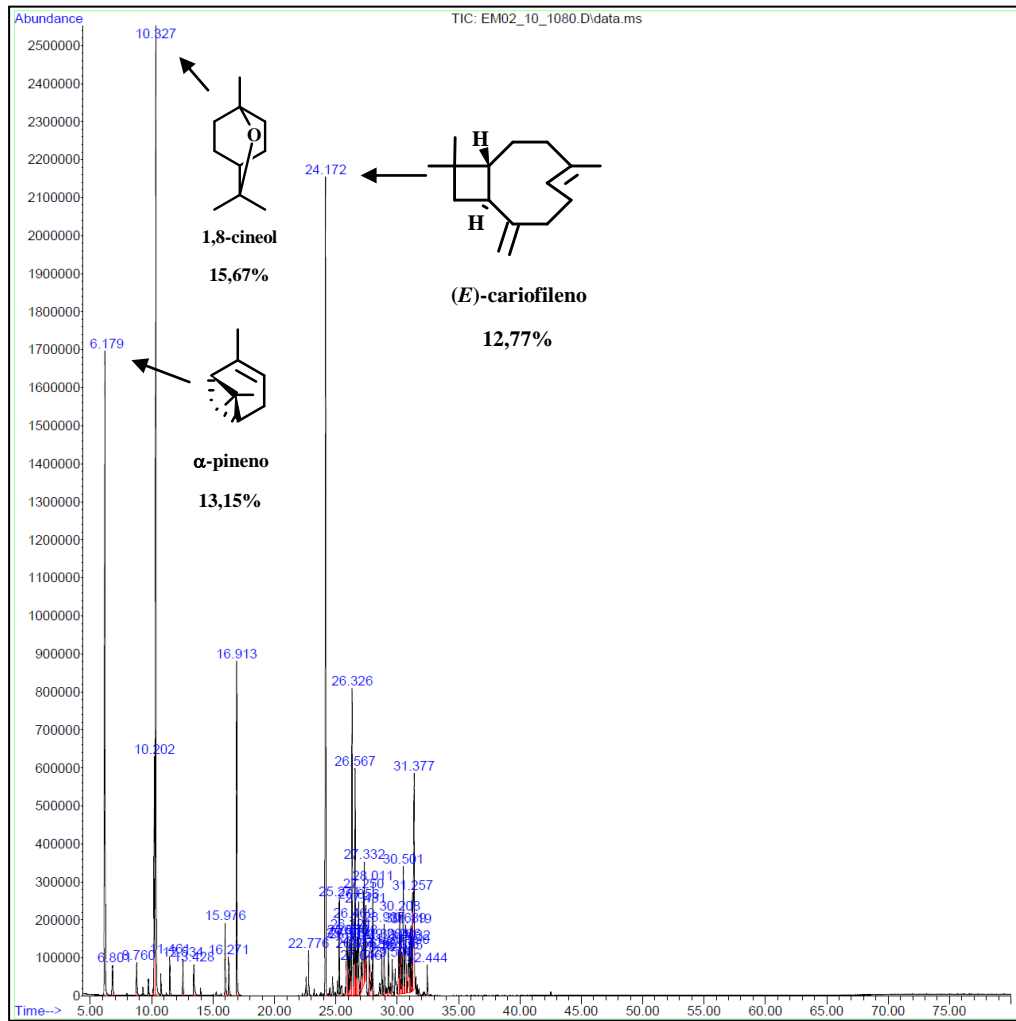


Figura 18: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Myrciaria floribunda* na estação chuvosa.

O espectro de massas do monoterpreno oxigenado 1,8-cineol ($C_{10}H_{18}O$) apresentou pico do íon molecular em m/z 154 $[M]^+$. Na Figura 19, o pico m/z 139 foi associado a uma provável perda de grupo metila. Já o pico base m/z 43 (M-15-9), foi descrito como à perda de C_7H_{12} (Esquema 5).

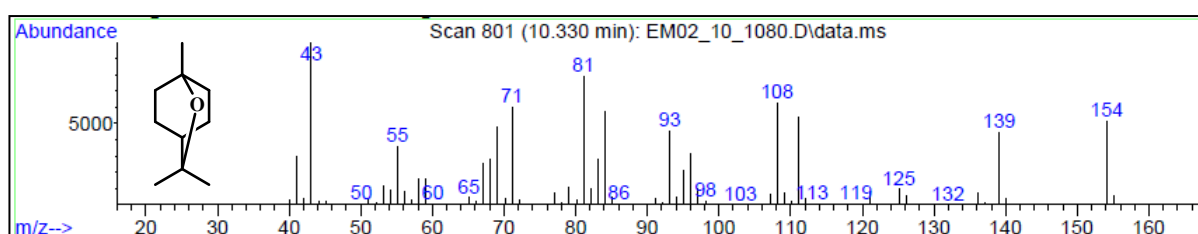
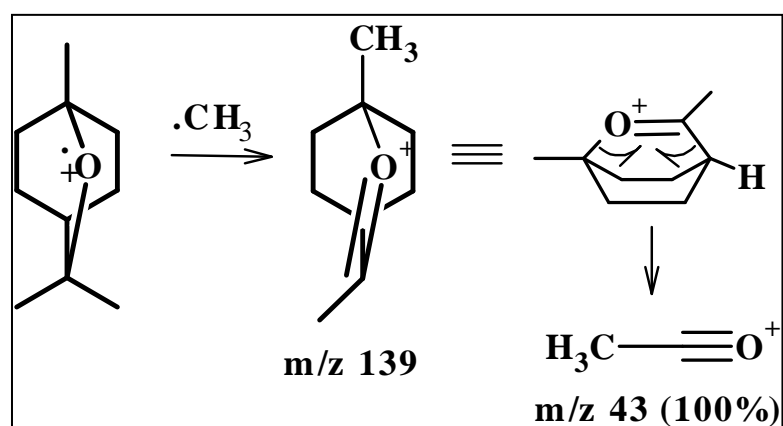


Figura 19: Espectro de massas do 1,8-cineol.



Esquema 5: Proposta de fragmentação de 1,8-cineol.

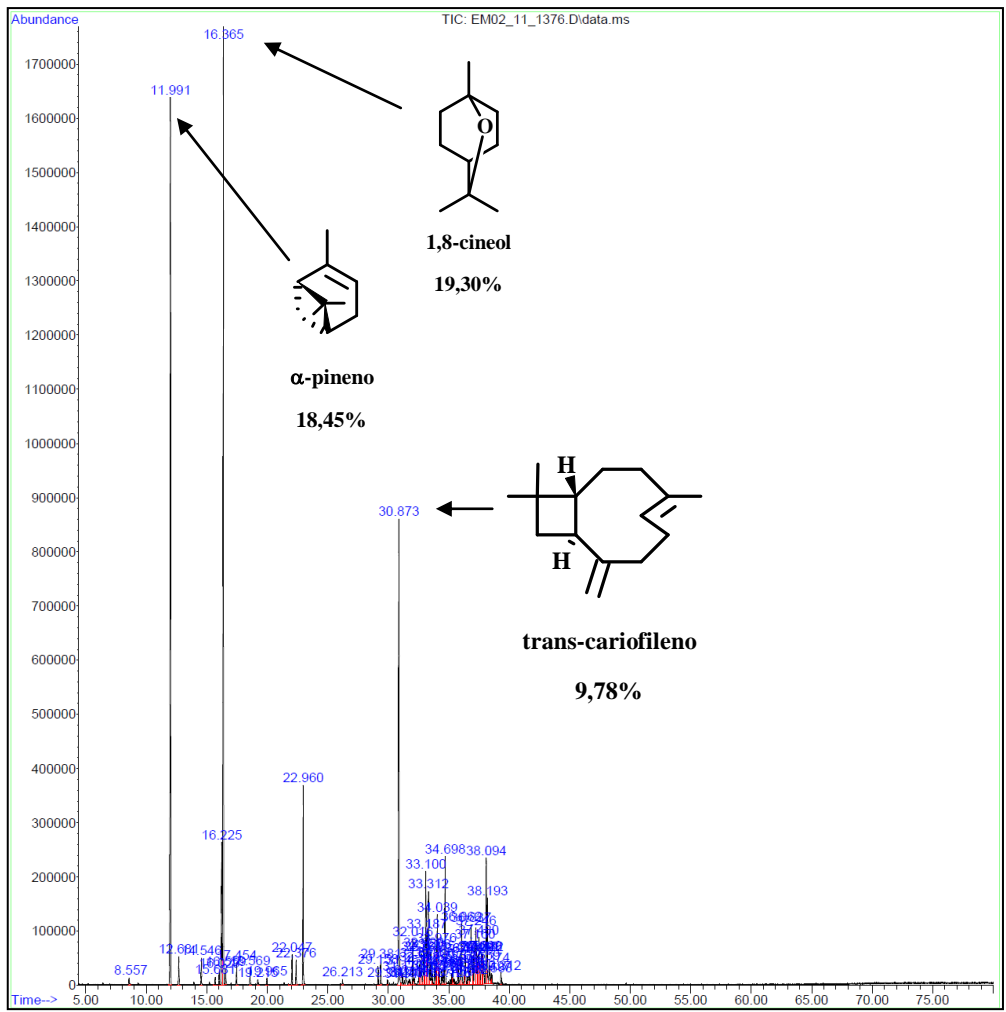


Figura 20: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Myrciaria floribunda* na estação seca.

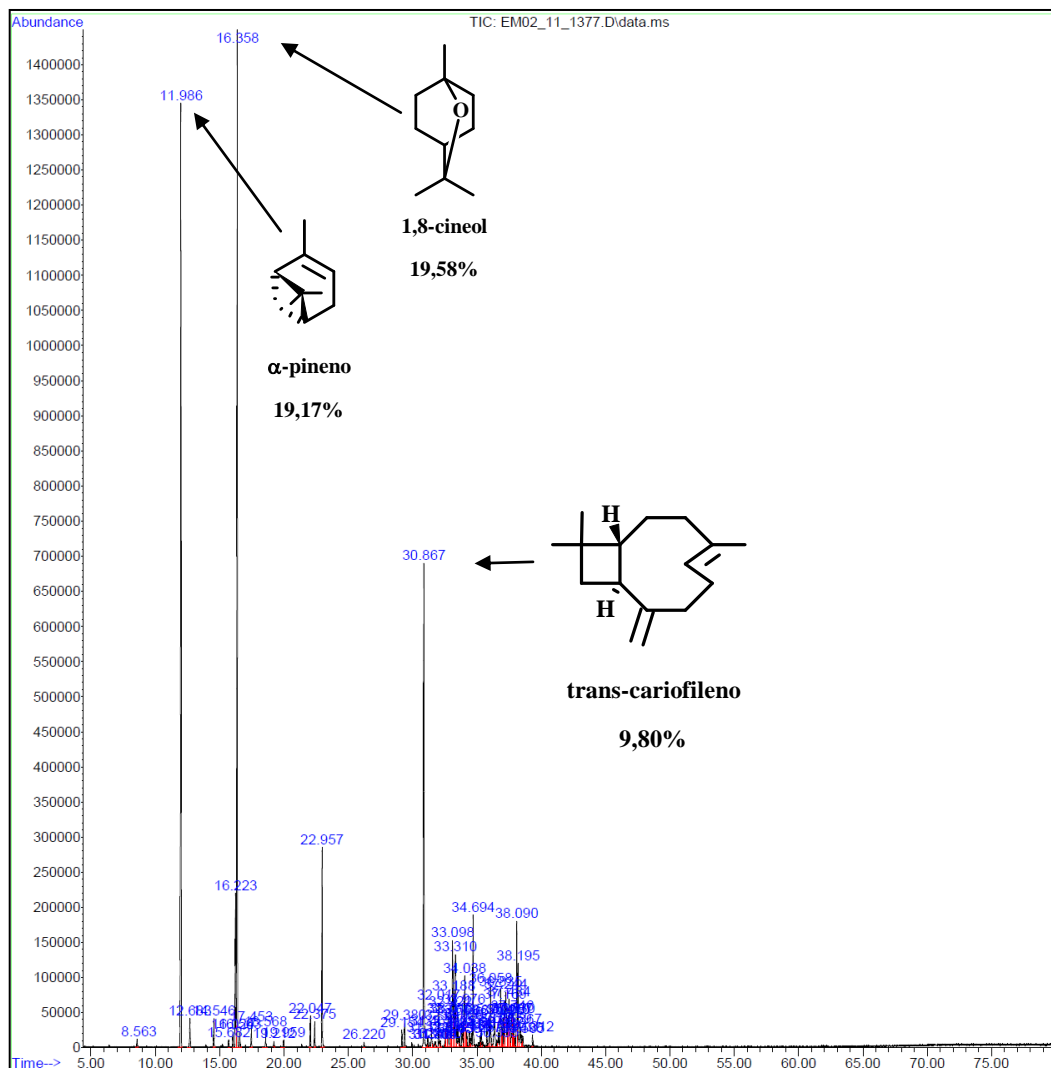


Figura 21: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Myrciaria floribunda* na estação seca.

2.4. Óleos essenciais das folhas de *Marlierea umbraticola*

Os óleos essenciais de *M. umbraticola* não apresentaram variação significativa no rendimento dos óleos coletados das folhas frescas na estação chuvosa (Mu1ff) para a estação seca (Mu2ff), os teores foram de 0,24% e 0,25%; respectivamente, enquanto que das folhas secas foi de 0,46% (Mu2fs).

Por meio da análise comparativa por CCD dos óleos essenciais de *M. umbraticola* com os padrões óxido de cariofileno (ox) e guaiol (G) nas mesmas condições apresentadas na página 51, os óleos de Mu1ff e Mu2ff apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, diferente do óleo de Mu2fs. Entretanto, os três óleos mostraram substâncias com o mesmo Rf do óxido de cariofileno, o que não foi observado em comparação com o guaiol (Figura 22).

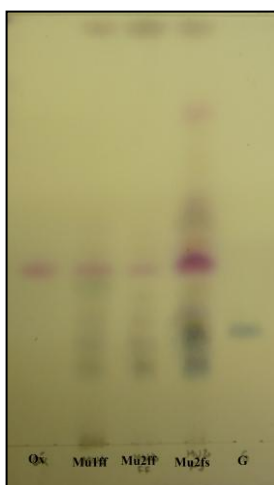


Figura 22: CCD dos óleos essenciais de *Marlierea umbraticola* com os padrões óxido de cariofileno e guaiol.

O total de 61 substâncias foi identificado no cromatograma obtido por análise no CG-EM (Tabela 5). Os monoterpenos foram os principais constituintes dos três óleos analisados e não houve grande variação nas porcentagens desses terpenos em relação às épocas de chuva e seca (vazante), no entanto a distribuição dos sesquiterpenos variou significativamente, estando em maior proporção (18,55%) no óleo coletado na época chuvosa (Mu1ff).

Os óleos obtidos das folhas frescas de *M. umbraticola* apresentaram em comum os monoterpenos α - e β -pineno e o sesquiterpeno *trans*-cariofileno como constituintes principais. No óleo de Mu1ff estes constituintes foram observados nas proporções de 26,93%; 38,50% e 6,08%, respectivamente. Em Mu2ff, o teor do α -pineno foi de 33,33%, do β -pineno

43,12% e 3,47% do *trans*-cariofileno. Enquanto que em Mu2fs os constituintes em abundância foram o α -pineno (30,08%), β -pineno (27,88%) e o α -terpineol (8,18%).

Na análise qualitativa por CCD, o sesquiterpeno óxido de cariofileno foi observado nos três óleos de *M. umbraticola*, entretanto na análise por CG-EM, apresentou-se na proporção de 6,13% somente no óleo de Mu2fs. Os cromatogramas de CG-EM de Mu1ff, Mu2ff e Mu2fs estão apresentados nas Figuras 23, 26 e 27, respectivamente. Este é o primeiro relato dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *M. umbraticola*.

Tabela 5: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Marlierea umbraticola*.

Constituintes	IR	Mu1ff	Mu2ff	Mu2fs
Monoterpenos				
α -tujeno	924	0,3	-	-
α -pineno	933	26,93	33,33	30,08
canfeno	949	0,32	0,44	0,57
sabineno	972	0,17	0,28	-
β -pineno	977	38,50	43,12	27,88
β -mirceno	988	1,36	1,33	-
α -felandreno	1002	-	0,43	0,20
α -terpineno	1014	0,23	0,23	0,16
limoneno	1028	3,49	3,38	2,81
γ -terpineno	1058	0,36	0,32	0,25
terpinoleno	1083	0,43	0,44	0,56
nopinona	1137	-	-	0,18
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	-	-	2,85
pinocarvona	1161	-	-	1,63
terpinen-4-ol	1178	0,52	0,46	0,65
α -terpineol	1192	1,88	1,74	8,18
verbenona	1203	-	-	0,27
Sesquiterpenos				
δ -elemeno	1335	0,30	-	-

α -cubebeno	1345	0,25	-	-
α -ilangeno	1373	0,11	0,28	-
α -copaeno	1377	0,38	-	0,42
β -cubebeno	1388	-	0,15	-
β -elemeno	1389	0,16	-	-
sibireno	1400	0,19	-	-
α -funebreno	1402	0,13	0,11	-
longifoleno	1407	0,26	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1416	6,08	3,47	1,80
β -gurjuneno	1426	0,12	0,10	-
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1432	0,16	-	-
aromadendreno	1441	0,14	-	-
<i>cis</i> -muurolo-3,5-dieno	1447	-	0,08	-
α -humuleno	1453	-	0,74	0,56
9- <i>epi-trans</i> -cariofileno	1464	0,57	0,07	-
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1469	0,13	0,09	-
α -amorfeno	1476	-	0,15	-
γ -muurolo	1478	0,23	-	-
amorfa-4,7(11)-diene	1481	1,16	-	-
germacreno D	1484	2,52	1,02	-
α -cupreneno	1495	-	0,21	-
valenceno	1496	0,19	-	-
β -selineno	1497	1,34	-	-
<i>trans</i> - β -guaiano	1502	-	0,07	-
viridifloreno	1503	-	0,13	-
δ -cadineno	1514	0,65	0,68	0,60
<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	1534	0,11	-	0,20
α -cadineno	1537	-	0,11	-
α -calacoreno	1539	-	-	0,22
germacreno B	1557	3,00	1,20	0,35
longicanfenilona	1562	-	-	0,40

maaliol	1566	0,15	-	-
espatulenol	1577	-	-	1,55
óxido de cariofileno	1580	-	-	6,13
τ -cadinol	1638	-	1,29	-
τ -muurolol	1642	2,02	1,09	-
α -muurolol	1644	0,58	0,33	-
α -cadinol	1654	2,43	-	-
longipinanol	1657	-	0,11	-
amorpha-4,9-dien-2-ol	1670	-	-	0,21
Classes de terpenóides				
Monoterpenos hidrocarbonetos		72,09	83,3	62,51
Monoterpenos oxigenados		2,40	2,20	13,58
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		18,55	8,84	4,15
Sesquiterpenos oxigenados		5,18	2,82	8,29
Outros compostos		-	-	0,18
Total		98,22	97,16	88,71

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcanos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Mu1 (abril/2010) e Mu2 (setembro/2010).

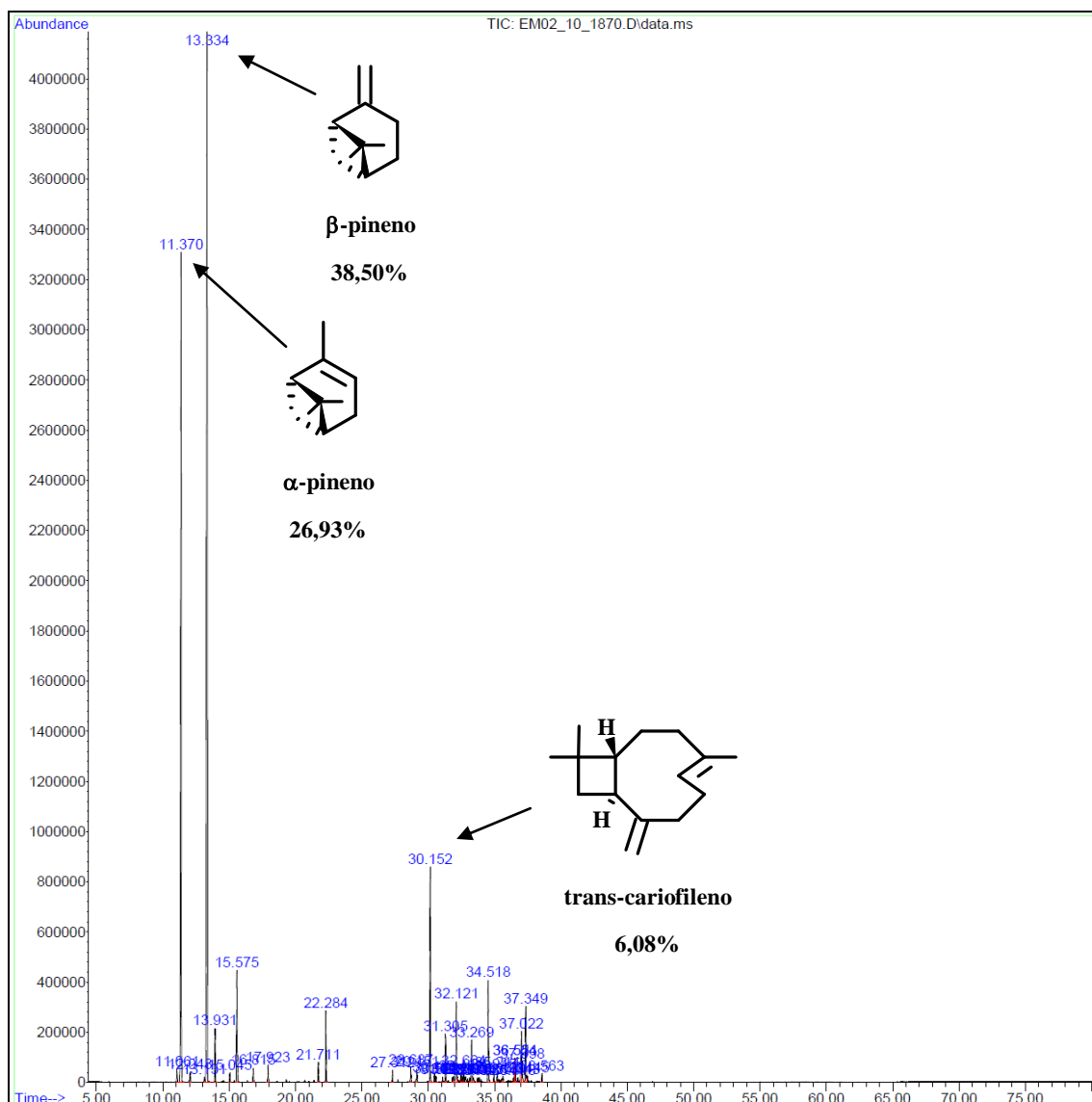


Figura 23: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Marlierea umbraticola* na estação chuvosa.

Os picos 2 e 5 no cromatograma da Figura 23 corresponderam, respectivamente, aos monoterpenos α - e β -pineno ($C_{10}H_{16}$) de massa molecular de 136 daltons, o que está de acordo com a literatura (ADAMS, 2009). As porcentagens da área foram de 26,93% e 38,50%, respectivamente. Os espectros de massas desses picos estão apresentados nas Figuras 24 e 25.

Na comparação dos dois espectros foi possível notar que as fragmentações são muito próximas e ambos os constituintes possuem o mesmo pico base com m/z 93 (C_7H_9), resultante

da perda do cátion isopropílico m/z 43 ($^+C_3H_7$) e heterólise de um par de elétrons (Esquema 6).

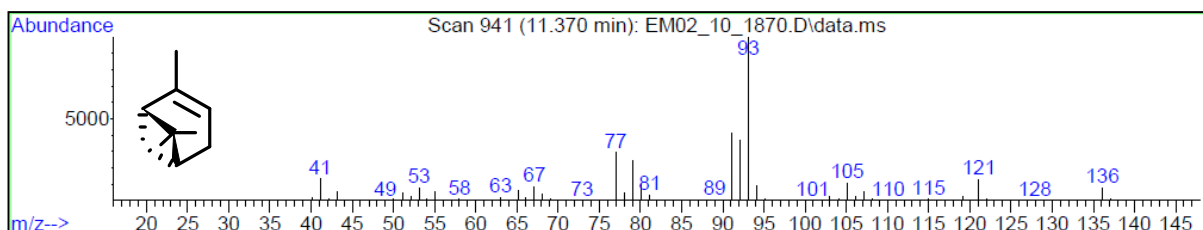


Figura 24: Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma da Figura 23.

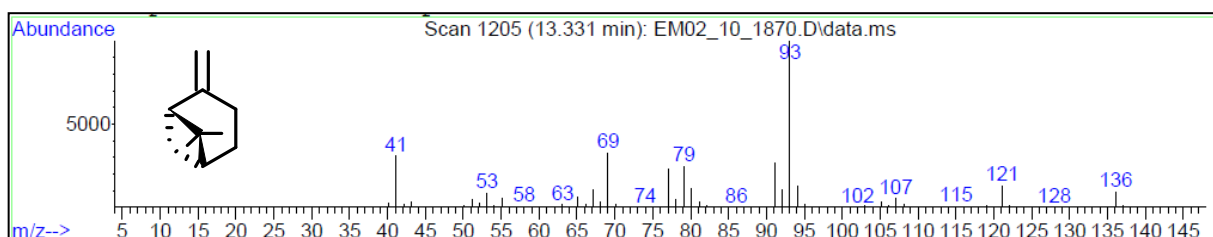
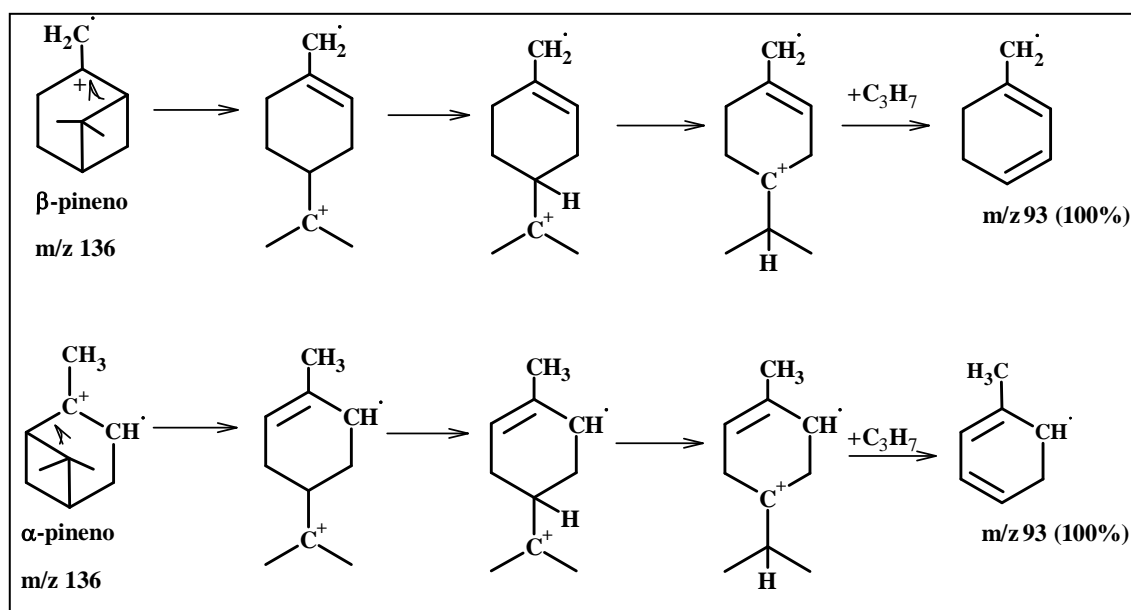


Figura 25: Espectro de massas referente ao pico 5 do cromatograma da Figura 23.



Esquema 6: Proposta de fragmentação do pico base m/z 93 do α - e β -pineno.

FONTE: KELLER, 2011.

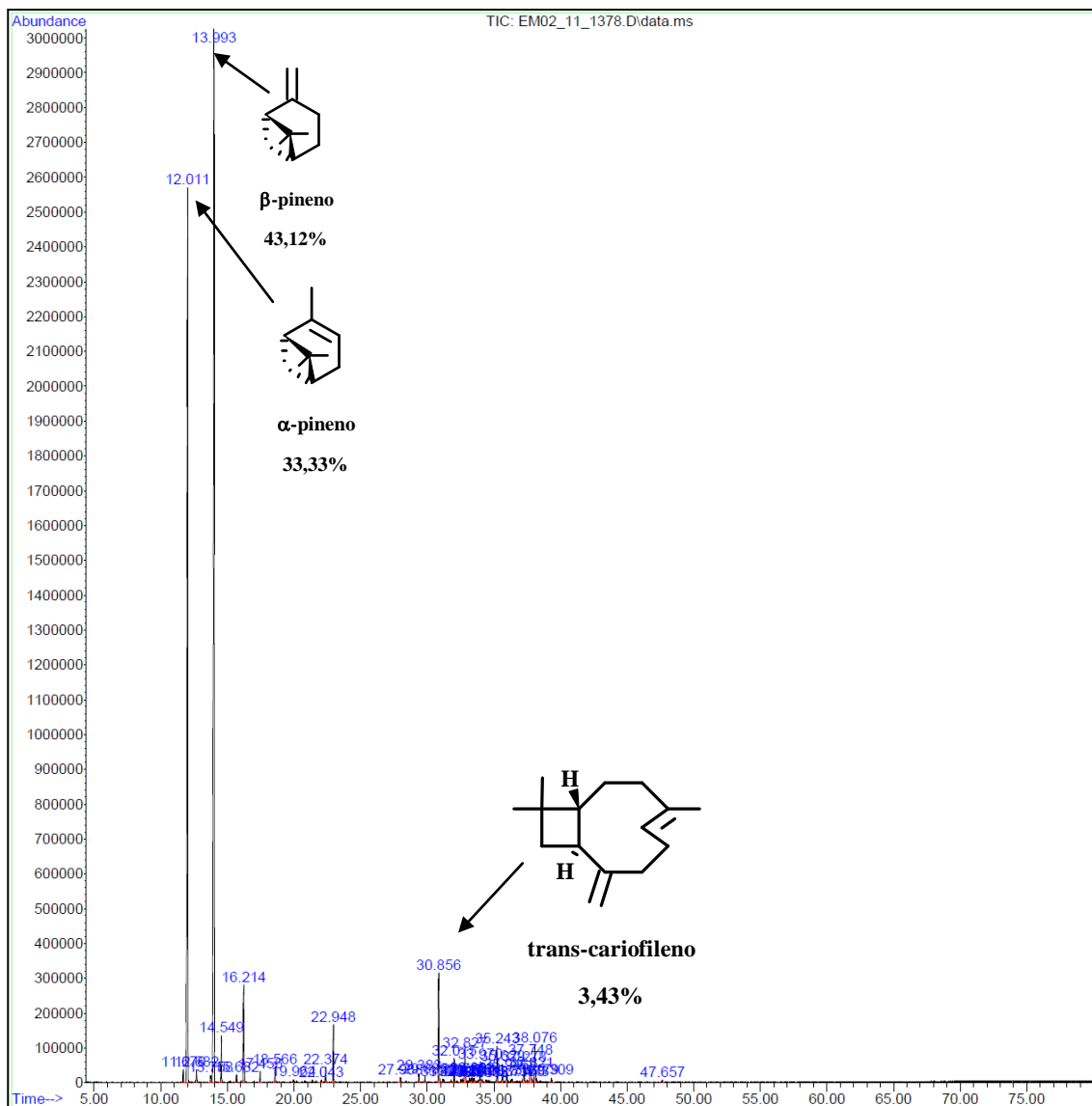


Figura 26: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Marlierea umbraticola* na estação seca.

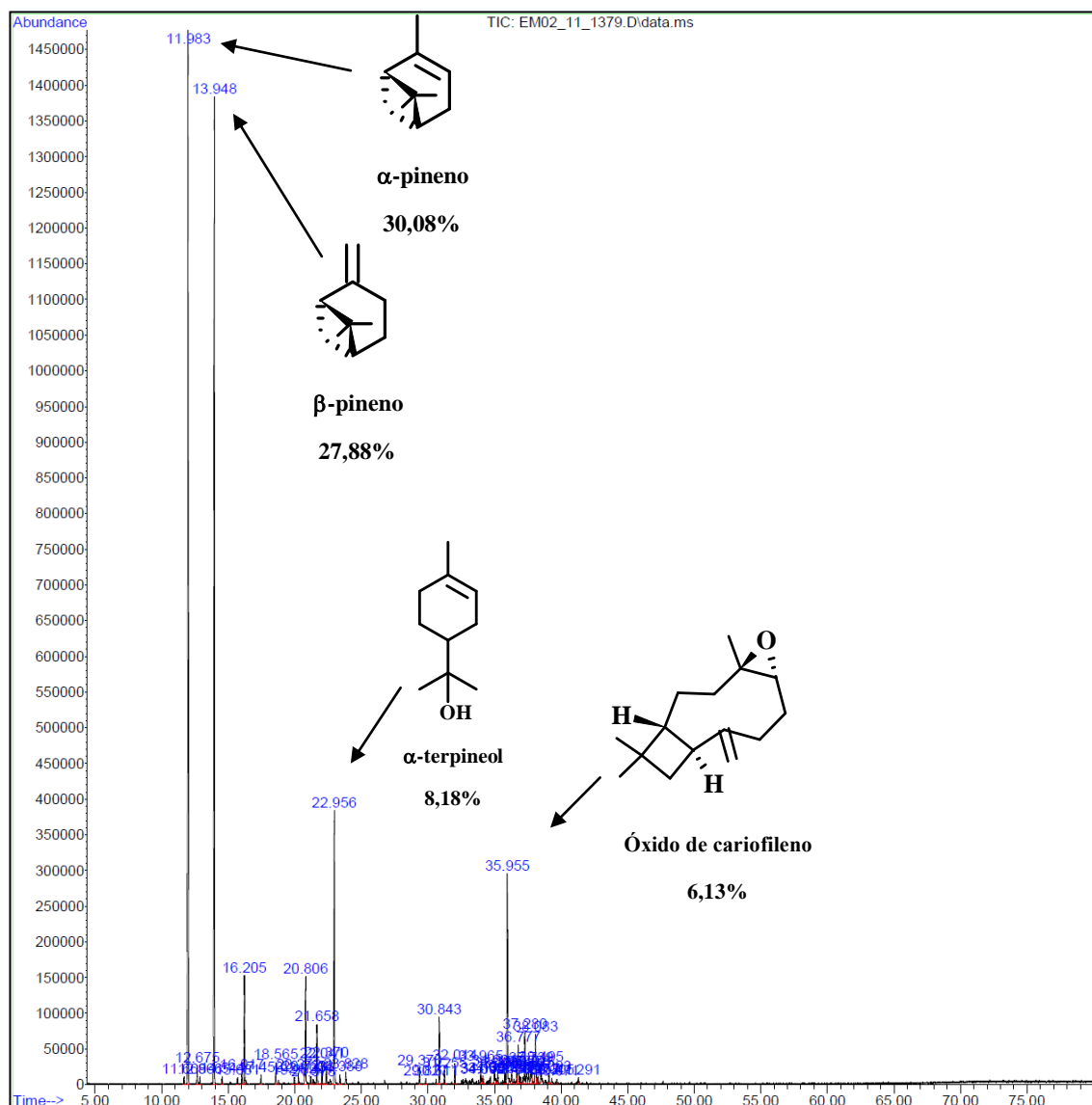


Figura 27: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Marlierea umbraticola* na estação seca.

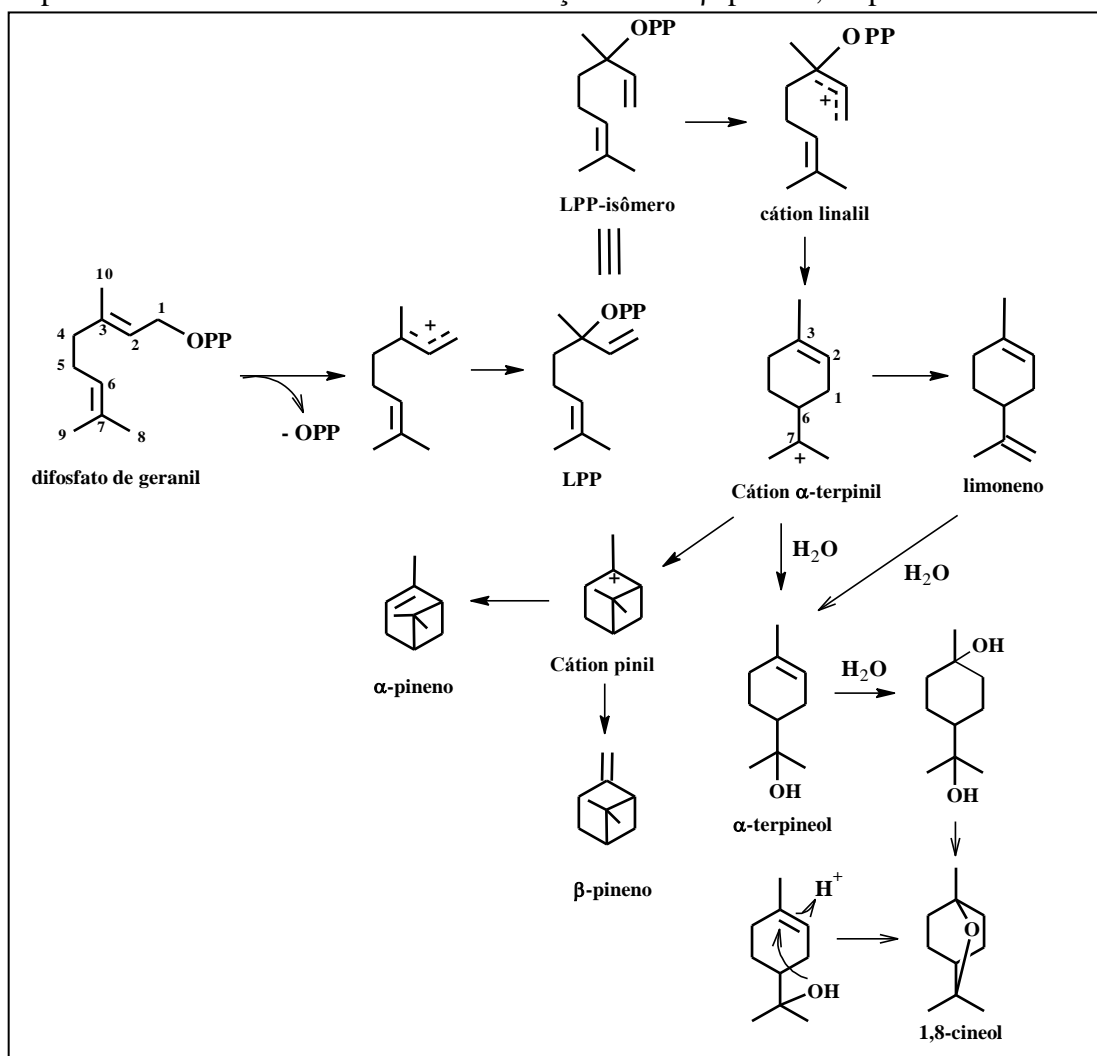
2.5. Proposta de rota biossintética dos monoterpenos nos óleos de *Myrciaria floribunda* e *Marlierea umbraticola*

Uma proposta biossintética dos principais monoterpenos presentes nos óleos essenciais de *M. floribunda* e *M. umbraticola* (Esquema 7) foi realizada com dados da literatura (CHEN *et al.*, 2004; DE BARROS, 2009; DEWICK, 2002; KAMPRANIS *et al.*, 2007).

A biossíntese dos monoterpenóides inicia-se quando o precursor difosfato de geranyl (GPP) ioniza-se. A isomerização do GPP, obtida com a migração do grupo difosfato (OPP) do

C1 para C3 resulta no difosfato linalílico (LPP). Através da ciclização do seu isômero entre C1 e C6, ocorre à formação do cátion α -terpinil, um intermediário para a biossíntese dos monoterpenos cíclicos (DEWICK, 2002). Um estudo experimental sugeriu que 1,8 cineol pode ser produzido por transformação química do limoneno e α -terpineol. A hidratação do limoneno forma o α -terpineol, que pode ser transformado em 1,8-terpino, e este gera 1,8-cineol (FARINÃ *et al.*, 2005). Outra proposta sugerida para a formação do 1,8-cineol é a ciclização adicional interna do oxigênio alcoólico do α -terpineol (CHEN *et al.*, 2004). A elucidação estrutural de uma síntese de 1,8-cineol, de *Salvia fruticosa* Mill., foi confirmada a partir da adição de água a um intermediário α -terpinil (KAMPRANIS *et al.*, 2007).

A ciclização eletrofílica do cátion α -terpinil origina o cátion pinil. A desprotonação do cátion pinil no C4 e/ou no C10 conduz a formação do α e β -pineno, respectivamente.



Esquema 7: Proposta da rota biossintética dos monoterpenos dos óleos essenciais de *Myrciaria floribunda* e *Marliera Umbraticola*.

FONTES: DEWICK, 2002; CHEN *et al.*, 2004; FARINÃ *et al.*, 2005; DE BARROS, 2009.

CAPÍTULO III

**ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS
DAS ESPÉCIES *Virola mollissima* (A. DC.) Warb. e
V. theiodora (Spruce ex Benth.) Warb. E ESTUDO
FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE EXTRATOS
DE *V. mollissima*
(MYRISTICACEAE)**

1. INTRODUÇÃO

A família Myristicaceae é constituída por 18 gêneros e cerca de 400 espécies, distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo: Ásia, Madagascar, África, América do Sul e Central. Cinco gêneros são endêmicos na América, com cerca de 80 espécies: *Virola* (40 spp.), *Iryanthera* (23 spp.), *Compsonaura* (12 spp.), *Osteophloeum* (1 spp.) e *Otoba* (1 spp.). O gênero de mais ampla distribuição geográfica, *Virola*, concentra o maior número de espécies na bacia amazônica, estendendo-se do norte até ao sul do México e Antilhas Menores, e no sul até o Rio Grande do Sul (VICENTINI e RODRIGUES, 1999).

As espécies de *Virola* são conhecidas popularmente na Amazônia pelo nome de ucuúba, e entre os ameríndios por “paricá” ou “epena”, enquanto que “ucuubarana e “ucuubapuña” são os vernáculos aplicados às espécies de *Iryanthera* e *Osteophloeum* (VICENTINI e RODRIGUES, 1999). “Paricá” ou “Kawabó” é o nome dado ao rapé preparado com tabaco e a resina, de *V. theiodora*, *V. elongata* e *V. calophylla*, um narcótico utilizado por várias tribos da região amazônica. Além disso, preparados de folhas, casca e resina de algumas espécies são usados pelos índios como veneno de cobra para flecha e no tratamento de diversas infecções de pele. Em função disso, a farmacologia de algumas espécies de Myristicaceae foi bem estudada e os constituintes químicos responsáveis pelos efeitos medicinais e tóxicos são conhecidos (VICENTINI e RODRIGUES, 1999). A análise destas plantas mostrou a presença de derivados triptamínicos (*N*-metiltriptaminas; triptamina; *N,N*-dimetiltriptamina; 5-metóxi-*N,N*-dimetiltriptamina) (SCHULTES, 1969 *apud* LOUREIRO *et al.*, 1989).

As sementes das miristicáceas apresentam elevado teor de triglicerídeos e ácidos graxos, especialmente o ácido mirístico (C14), daí a denominação popular de ucuúba, que significa árvore produtora de gordura. Portanto, das sementes é extraída e comercializada a “manteiga de ucuúba” usada como matéria-prima na fabricação de velas e cosméticos em geral (RODRIGUES, 1980).

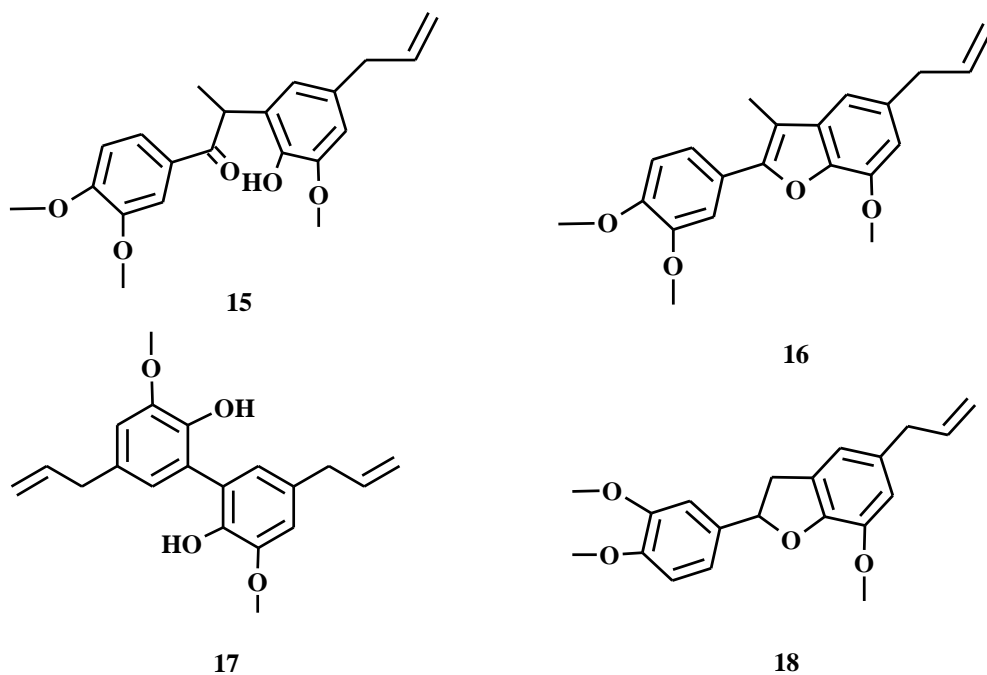
Algumas miristicáceas possuem reconhecido valor econômico. A noz-moscada e o macis são especiarias apreciadas na culinária de todo o mundo e consistem nas amêndoas e no arilo, respectivamente, da espécie de origem asiática *Myristica fragrans*. Dentre as miristicáceas amazônicas, a espécie *V. surinamensis* (Rol.) Warb. apresenta importante valor comercial madeireiro, sendo bastante empregada na produção de compensados, laminados e

na fabricação de caixas, palitos de fósforos, cabos de vassoura, celulose e papel. (RODRIGUES, 1980; MORAIS, 2008).

Os primeiros estudos fitoquímicos realizados com miristicáceas neotropicais surgiram na década de setenta, sendo conduzidos especialmente com a madeira do tronco e com as cascas de espécies de *Virola* e *Iryanthera*. Esses estudos levaram ao isolamento de substâncias pertencentes às classes de diarilpropanóides, flavonóides, lignanas, γ -lactonas e alcalóides dos tipos *N,N*-dimetiltriptamina e β -carbonila, sendo a estes últimos atribuídas as propriedades alucinógenas (MORAIS, 2008). Atualmente, existe registro para cerca de 230 constituintes químicos isolados de miristicáceas neotropicais, dentre os quais 50% correspondem a lignanas e neolignanas o que faz destas, as duas principais classes de metabólicos secundários da família Myristicaceae (MORAIS, 2008).

Os lignóides são micromoléculas cujo esqueleto é formado exclusivamente, ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico (C6 - C3)_n, sendo n restrito a poucas unidades, 1 a 3. Gottlieb e Yoshida (1984) definiram o termo lignana com base na sua origem biogenética, as lignanas são derivadas pela condensação oxidativa de álcoois cinâmílicos entre si ou com ácidos cinâmílicos e as neolignanas são derivadas pela condensação oxidativa de alifenóis e de propenilfenóis entre si ou cruzada.

Exemplos de neolignanas isoladas de *Virola carinata* estão a carinatona (**15**) e carinatina (**16**) (KAWANISH *et al.*, 1982); e de *Virola pavonis*, as neolignanas deidrodieugenol (**17**) e di-hidrocarinatina (**18**) (MORAIS, 2008), dentre outras.



Com o isolamento de lignanas e neolignanas das miristicáceas foram realizados ensaios biológicos apresentando atividades promissoras. Segundo McRae e Towers (1984) os lignóides apresentam atividades antitumoral, fungicida, antioxidante, anti-HIV e cardiovascular. A diversidade estrutural deste grupo resulta nas diferentes classes encontradas na natureza como as lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides, sendo as lignanas e neolignanas as principais classes.

1.1. Gênero *Virola*

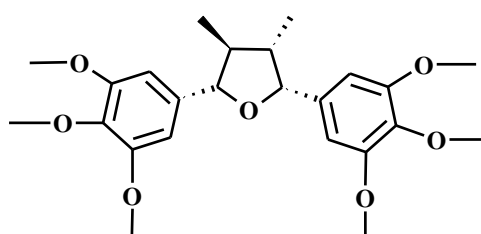
O gênero *Virola* é de grande interesse econômico principalmente no aproveitamento da madeira de várias espécies como a *V. oleifera* (Schott) A. C. Sm., *V. sebifera* (Aublet), *V. bicuhyba* (Schott ex. Sprenger) Warb, *V. subsessilis* (Benth) e *V. surinamensis* (Rol.). Esta última é a terceira espécie mais exportada para o mercado internacional de madeiras tropicais (ANGELO *et al.*, 2001).

No Brasil existem cerca de trinta e cinco (35) espécies de *Virola*, distribuídas na floresta neo-tropical, principalmente no Acre, Rondônia e Amazonas (Rio Uatuma e Balbina). São principalmente árvores medianas, mas também arbustos, arvoretas e árvores de dossel. Os galhos são plagiotrópicos (horizontais) e subverticilados no tronco com internós bem definidos; as folhas são alternas, dísticas, coriáceas, inteiras, sem estípulas e com pecíolo fortemente canaliculado, a casca interna exsuda uma seiva avermelhada, ou que em com o ar oxida para vermelho, exceto *Osteophloeum*, geralmente abundante e translúcida (VICENTINI e RODRIGUES, 1999).

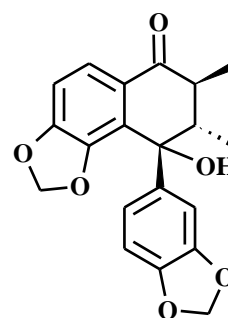
A espécie *V. molissima* ocorre em mata de terra firme, em lugares baixos, úmidos e solo argiloso. Apresenta frutificação entre setembro e dezembro e possui infrutescência de aproximadamente 40-80 mm de comprimento, 5-10 frutos por infrutescência, curto-pedicelados, subglobosos de 11-14 mm de diâmetro ou elipsóides de 30-35 mm de comprimento e 20-25 mm de largura, denso e persistentemente tomentosos, pericarpos até cerca de 2,0 mm de espessura (RODRIGUES, 1980). Drupa lenhosa ou coriácea, deiscente em duas valvas ou menos freqüentemente em uma, que expõem uma única semente grande, ruminada, envolta por um arilo vistoso, geralmente vermelho e carnoso. A cápsula que envolve a semente é coberta por pêlos ferrugíneos (VICENTINI e RODRIGUES, 1999). Seus ramos e folhas são cobertos por pêlos eretos ramificados, ferrugíneos e persistentes. Possuem nervuras secundárias de 15-30 pares, os pecíolos são de 3-8 mm em diâmetro. A base da folha

é cordada. *V. mollissima* possui odor desagradável no tronco e folhas, persistente quando seco (VICENTINI e RODRIGUES, 1999).

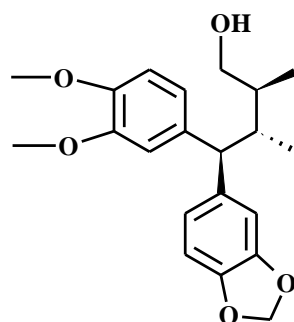
Um estudo realizado por Teixeira (2007) a partir de extratos de pericarpos, arilos, tegumentos e amêndoas dos frutos de *V. mollissima* foram isoladas as neolignan tetraidrofurânica (19), ariltetralônica (20) e diarilbutânica (21), dentre outras.



19



20

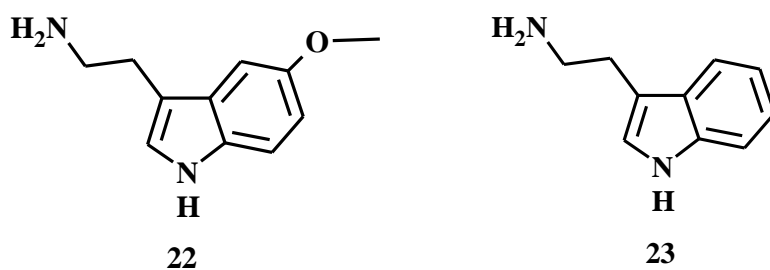


21

Virola theiodora, é conhecida popularmente como paricá e é encontrada como arvoretas a árvores de dossel. Possui indumento esbranquiçado não pontuado por pêlos ferrugíneos, denso em folhas novas e glabrescente. O pecíolo é delgado (1-2 mm em diâmetro), suas folhas possuem cartáceas de base obtusa a subcortada e abruptamente aguda, para onde convergem os pares basais de nervuras secundárias (9-20) pares (VICENTINI e RODRIGUES, 1999).

Tribos indígenas do Alto Orinoco fazem uma preparação alcalina da resina da casca de *V. theiodora*, para o “rapé” e veneno de flecha para caça (LOUREIRO *et al.*, 1989). Em 1967, uma expedição, chamada de “Alpha Helix Phase C.” no Amazonas e Rio Negro, conseguiu visitar várias tribos dos índios Waiká na Bacia do Rio Negro. Na ocasião foi registrado o

modo de preparo do rapé (denominado pelos índios de epená, nyakwána, yakee ou paricá) e comprovaram o uso de *V. theiodora* na preparação (BARATA, 1976). Um estudo fitoquímico demonstrou que a espécie é fonte de rapés alucinógenos e que contem nas cascas o 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (22) como o principal alcalóide e nas folhas o principal componente é a *N,N*-dimetiltriptamina (23), além de outros alcalóides indólicos. O epená preparado somente das cascas contém 11% de alcalóides (BARATA, 1976; VERPOORT e SVENDSEN, 1984). Este alto conteúdo de bases orgânicas explica porque a resina de *V. theiodora* é usada não só como rapé, mas como veneno de flechas (BARATA, 1976). Segundo Suffredini e colaboradores (2006) o extrato orgânico da espécie *V. theiodora* apresenta expressiva atividade bactericida.



Uma revisão bibliográfica realizada por Figueiró-Leandro e Citadini -Zanette (2008) sobre potencialidades medicinais de 145 espécies revelou que 31 apresentaram potencialidades medicinais com o uso para 64 patologias e 43 funções terapêuticas. Entre essas espécies estão *V. bicuhyba*, *V. surinamensis* e *V. oleifera*. Na medicina popular, a casca e o caule da *V. bicuhyba* são utilizados como adstringente, hemostática, contra diarreia, disenteria e para ulcerações (umbigo de criança). O caule, a casca e a semente da *V. surinamensis* são utilizados para adstringente, antidiarréica, leucorréia, umbigo ulcerado de criança, moléstia da pele, tumores, antireumática, cancro, para vias digestivas, asma, antídoto para veneno de cobra, estimulante, mau-hálito e para memória. A casca, folha e resina da *V. oleifera* são utilizadas para cólicas intestinais, inflamações, ferimentos, cicatrizantes, tosse, desinfetante oral, afta e hemorróida.

Os diferentes usos medicinais das espécies de Myristicaceae por pessoas locais e índios estimularam uma avaliação etnobotânica entre os índios Waiãpi que moram no oeste do estado do Amapá (LOPES *et al.*, 1999). Um dos usos etnofarmacológicos de *V. surinamensis* é o tratamento da malária com os componentes voláteis obtidos de suas folhas por meio da

inalação de vapor do óleo, que só é ativo na estação chuvosa (LOPES *et al.*, 1999). Já no Cerrado brasileiro, as cascas de *V. surinamensis* são usadas popularmente para inflamação e vários tipos de câncer (COSTA *et al.*, 2008a).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Óleos essenciais das folhas de *Virola mollissima*

Os óleos essenciais obtidos dessas espécies foram incolores e com odor forte. O rendimento dos óleos das folhas frescas de *V. mollissima* não sofreu variação significativa em relação às duas estações distintas. O óleo da estação chuvosa (Vm1ff) apresentou 0,14% de rendimento e o óleo do mês de setembro (Vm2ff) 0,15%; mas, o óleo das folhas secas (Vm2fs) foi o de maior rendimento, 0,68% (Tabela 6). A rotação óptica do óleo de Vm1ff é de $[\alpha]_D = -28,8^\circ$ ($c = 1,0$, MeOH, 27 °C).

Tabela 6: Rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de *Virola mollissima*

	Abril 2010	Setembro 2010
	Rendimento (%)	
Folha fresca	0,14	0,15
Folha seca	-	0,68

A análise por CCD utilizando os padrões *trans*-cariofileno (E) e óxido de cariofileno (ox) nas mesmas condições descritas no capítulo II (página 51), mostrou que os três óleos obtidos de *V. mollissima* possuem o perfil cromatográfico semelhante, e as substâncias presentes nos três óleos (destaque na placa) apresentaram o mesmo Rf dos sesquiterpenos utilizados como padrões. O *trans*-cariofileno foi observado como um dos constituintes majoritários nos óleos de *V. mollissima* (Figura 28).

A comparação por CCD dos óleos de *V. theiodora* mostrou que o óleo de Vt1fs (setembro/folha seca) foi diferente dos demais óleos, pois apresentou uma substância de coloração amarelo (destaque na placa) não observada nos outros óleos. Outro detalhe foi à presença do *trans*-cariofileno nos quatro óleos essenciais de *V. theiodora* (figura 28).

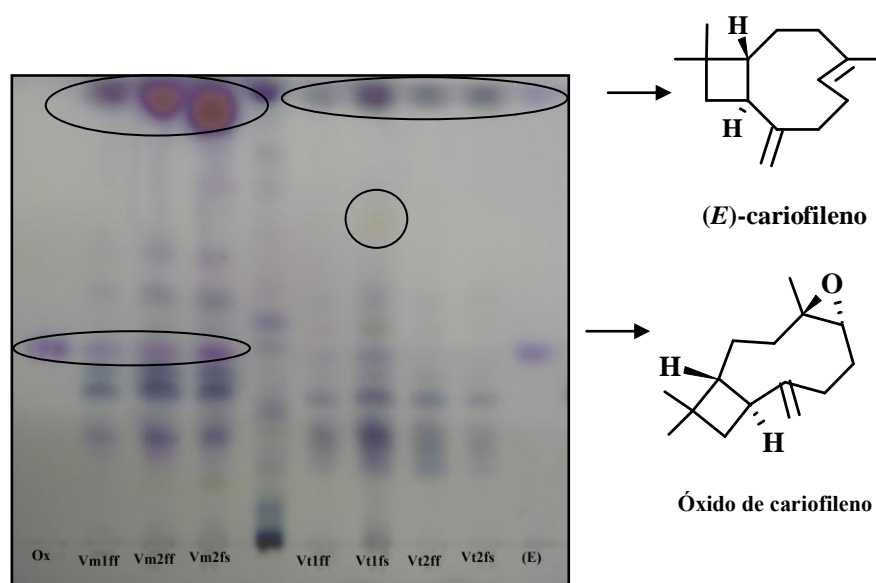


Figura 28: CCD dos óleos essenciais de *Virola mollissima* e *Virola theiodora*

A lista dos constituintes presentes nos óleos de *V. mollissima* está apresentada na Tabela 7. No total, 27 componentes foram identificados após a análise do cromatograma e espectros de massas obtidos por CG-EM e os resultados mostraram que os óleos essenciais da espécie são ricos em sesquiterpenos.

Tabela 7: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Virola mollissima*

Constituintes	IR	Vm1ff	Vm2ff	Vm2fs
Sesquiterpenos				
α -copaeno	1373	0,16	0,20	0,18
cis- α -bergamoteno	1409	10,98	11,18	10,97
2-epi- β -funebreno	1411	0,94	-	-
α -cedreno	1412	0,19	0,38	0,28
trans-cariofileno	1417	23,33	22,33	18,55
cis-tujopseno	1429	-	0,17	-
trans- α -bergamoteno	1430	17,36	17,80	19,93
cis- β -farneseno	1433	2,59	-	-
trans- β -farneseno	1449	2,72	1,07	1,11

α -humuleno	1454	5,72	7,84	7,54
β -santaleno	1457	0,28	0,35	0,39
sesquisabineno	1459	-	2,69	3,43
γ -curcumeno	1474	0,74	0,76	0,78
α -curcumeno	1478	4,15	4,22	6,07
α -amorfeno	1483	0,83	0,97	0,26
α -zingibereno	1491	1,09	1,09	0,83
β -bisaboleno	1504	4,30	4,02	5,25
β -sesquifelandreno	1521	14,14	13,11	18,40
álcool cariofilenila	1572	-	0,22	-
Rosifoliol	1602	-	0,20	-
pentanoato de citronelil	1624	-	0,12	-
α -acorenol	1630	0,24	0,19	-
gossonorol	1635	0,35	0,47	0,22
epi- β -bisabolol	1668	1,99	2,01	0,94
α -bisabolol	1682	5,23	4,69	2,01
5-neo-cedranol	1684	-	-	0,45
acetato-epi- α -bisabolol	1802	-	-	0,16
Classes de terpenóides				
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		89,52	88,18	93,97
Sesquiterpenos oxigenados		7,81	7,9	3,78
Total		97,33	96,08	97,75

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcanos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Vm1 (abril/2010) e Vm2 (setembro/2010).

A análise comparativa dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos constituintes presentes nos óleos de *V. mollissima*, mostrou que a época em que a espécie foi coletada não influenciou significativamente no teor de sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais extraídos. Nas folhas frescas coletadas na estação chuvosa (Vm1ff), o teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos foi de 89,52%, já nas folhas frescas coletadas na estação seca (Vm2ff) a proporção foi de 88,18% e de 93,97% nos óleos coletados das folhas secas (Vm2fs).

Como observado por CCD e CG-EM, o perfil químico dos óleos de *V. mollissima* foram semelhantes. O constituinte majoritário nos três óleos analisados foi o sesquiterpeno *trans*-cariofileno, que variou entre 18,55% - 23,33%. Seguido do *trans*- α -bergamoteno com teores de 17,36% a 19,93%; β -sesquifelandreno na proporção de 13,11% a 18,40% e *cis*- α -bergamoteno de 10,97 a 11,18%. Os cromatogramas dos óleos essenciais de *V. mollissima* estão apresentados nas Figuras 29, 31 e 32.

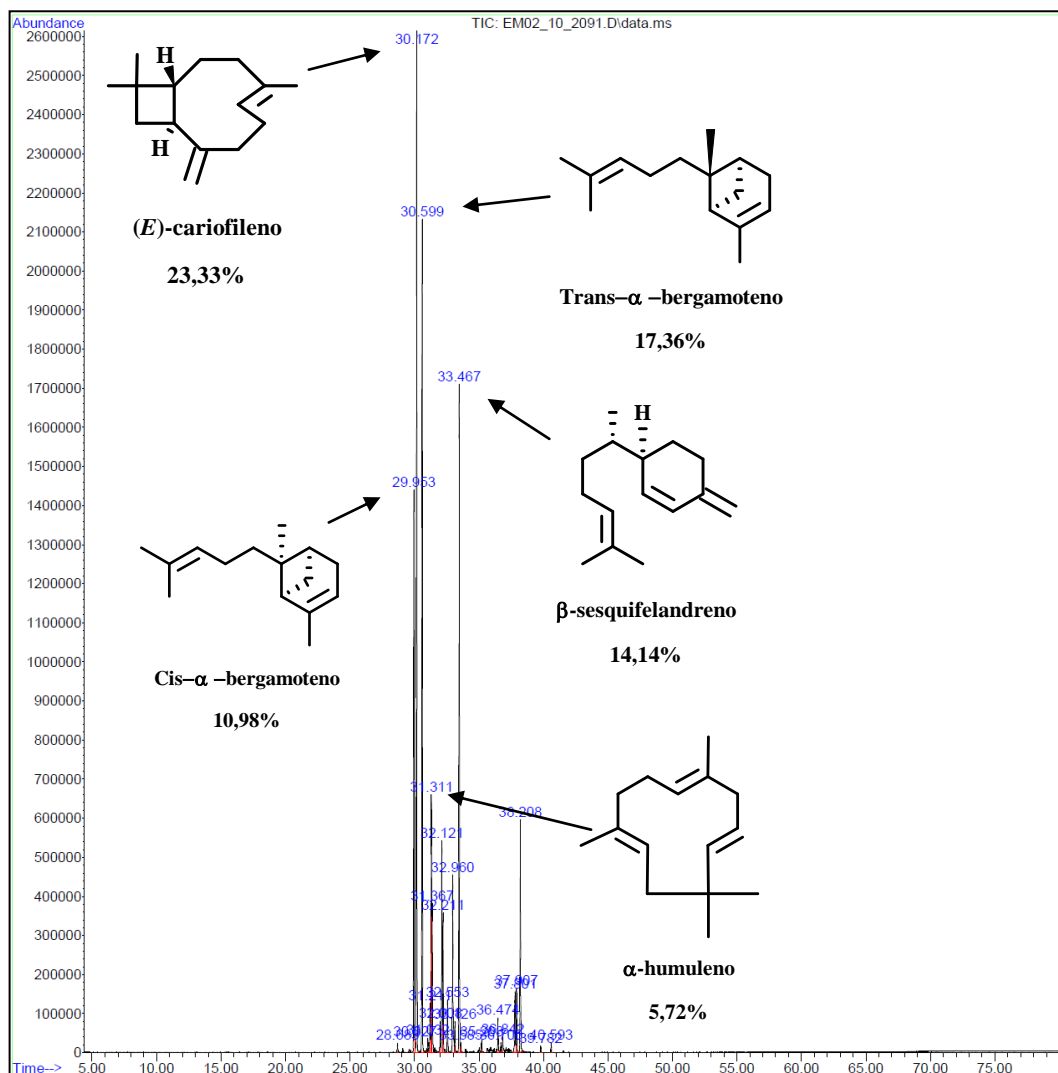


Figura 29: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Virola mollissima* na estação chuvosa.

O componente β -sesquifelandreno ($C_{15}H_{24}$) foi identificado por comparação dos espectros de massas com dados da biblioteca do aparelho e com dados da literatura (ADAMS, 2009). Este sesquiterpeno apresentou tempo de retenção de 33,4 min e porcentagem de 14,14% de área. No espectro de massa (figura 30) a partir do íon molecular de 204 daltons pode ser analisado o pico base m/z 69 [M-135], fragmento resultante de clivagem bialfílica da estrutura do sesquiterpeno (SILVERSTEIN, 2007). O pico m/z 93 (53,87%) refere-se a uma provável perda do grupo C_8H_{15} (Esquema 8).

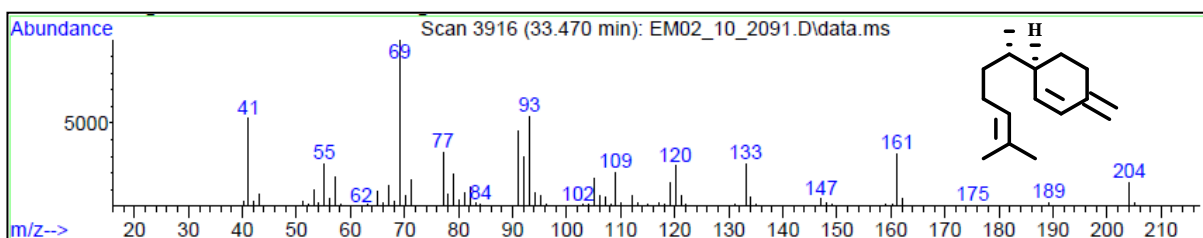
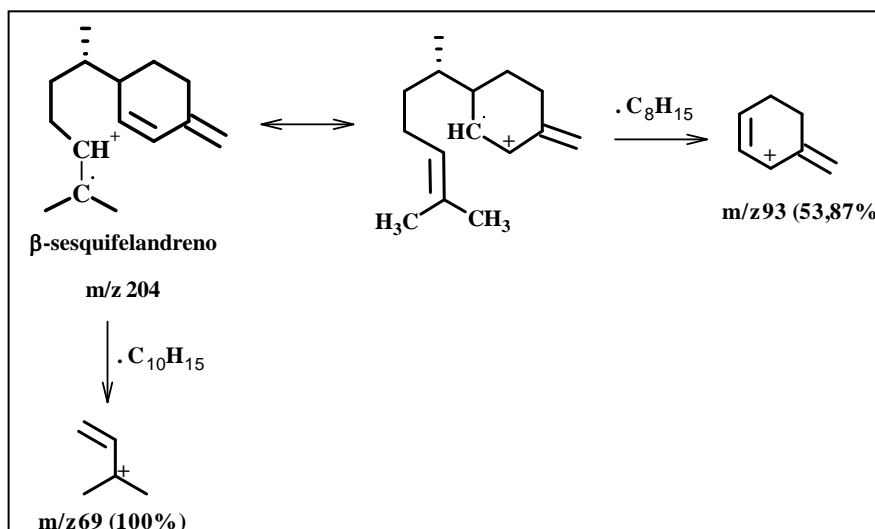


Figura 30: Espectro de massas referente ao pico 16 do cromatograma da Figura 29



Esquema 8: Proposta de fragmentação do composto β -sesquifelandreno.

FONTE: SILVERSTEIN, 2007.

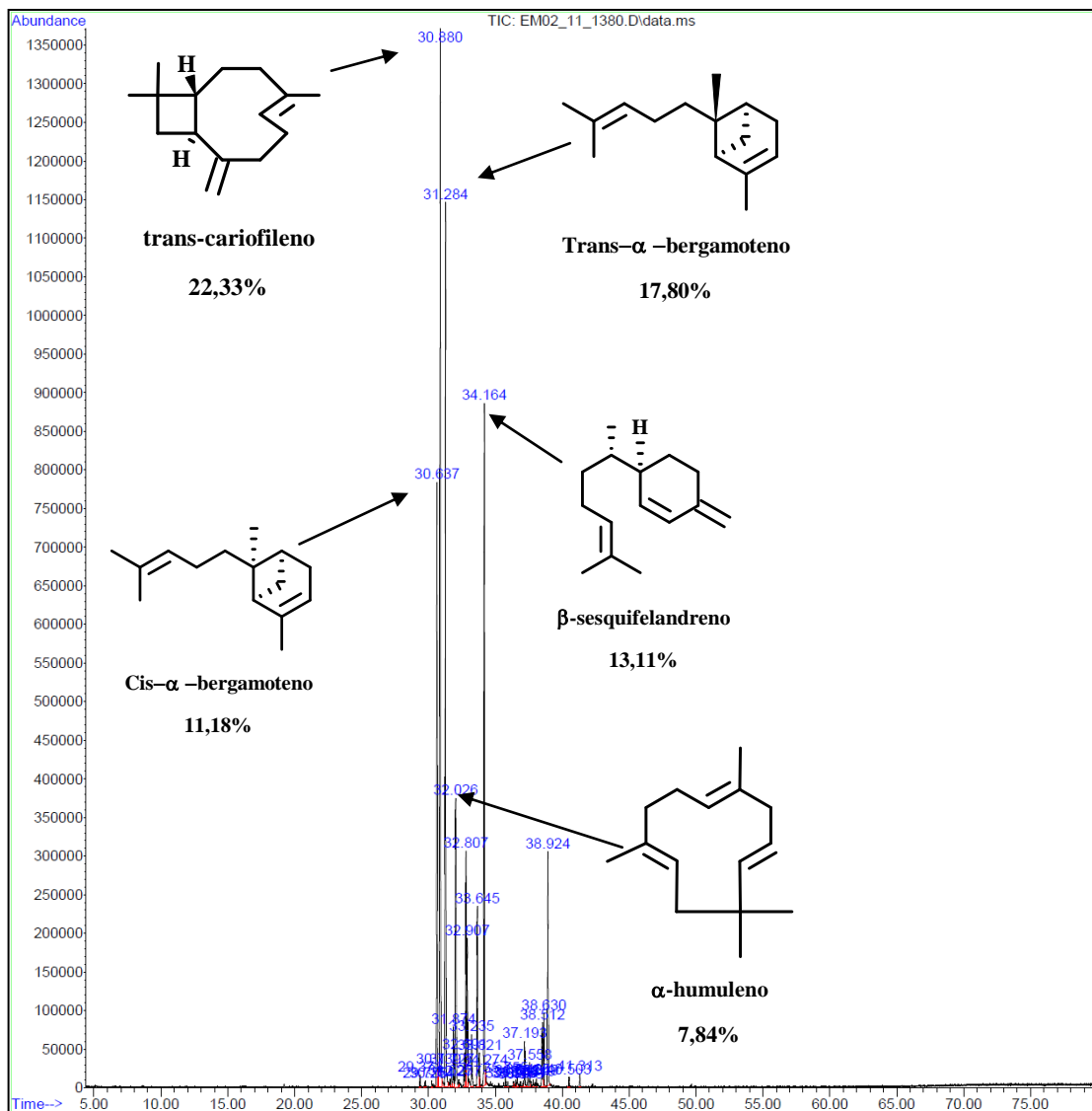


Figura 31: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Virola mollissima* na estação seca.

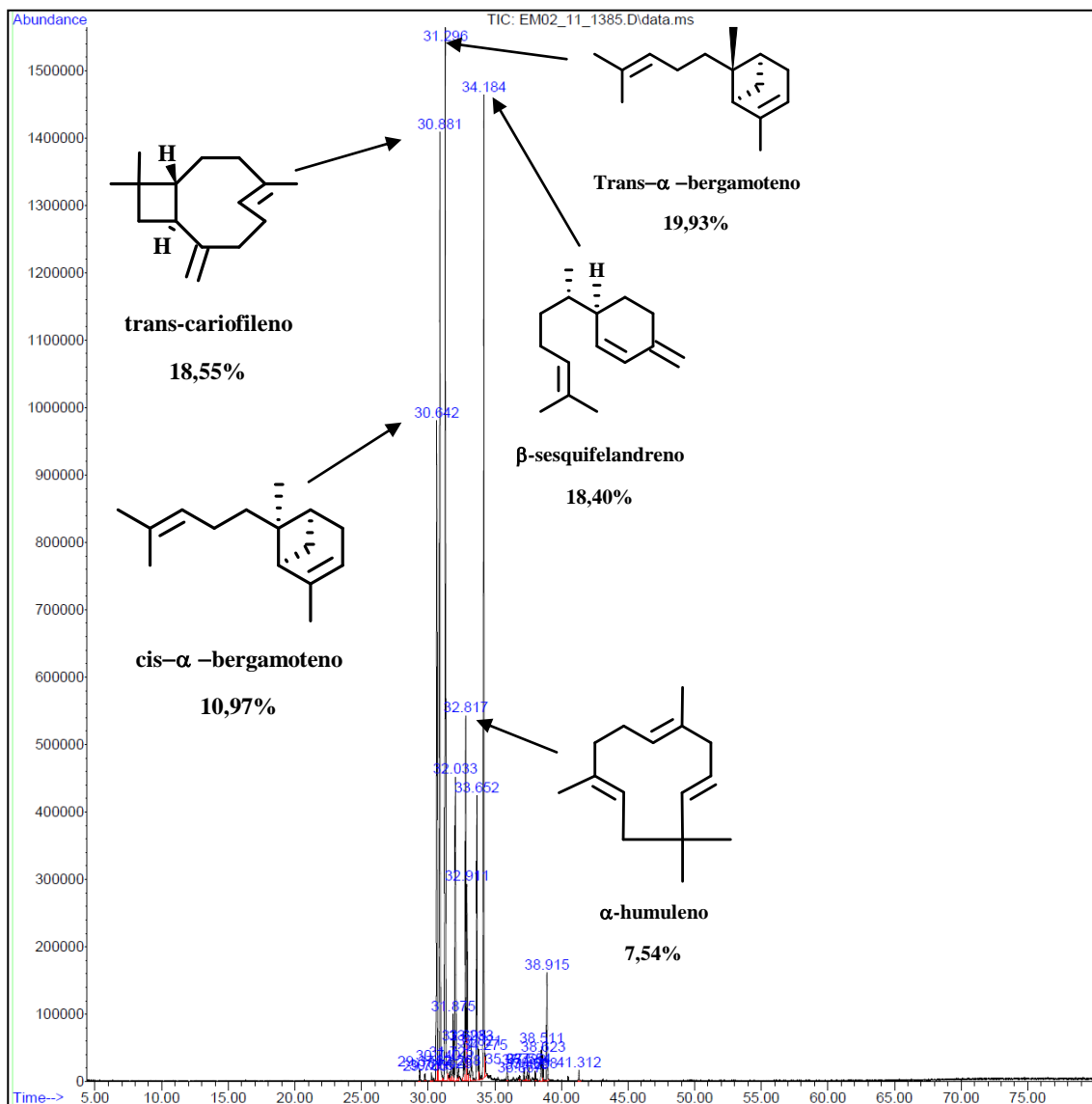


Figura 32: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Virola mollissima* na estação seca.

2.2. Óleos essenciais das folhas de *Virola theiodora*

O rendimento do óleo essencial de *V. theiodora* foi maior na estação chuvosa, tanto das folhas frescas quanto das secas, com rendimentos de 0,35% e 0,59%; respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8: Rendimentos (%) dos óleos essenciais de *Virola theiodora*

	Abril 2010	Setembro 2010
Folha fresca	0,35	0,20
Folha seca	0,59	0,55

Por meio da análise do cromatograma obtido por CG-EM dos óleos essenciais de *V. theiodora* foi possível identificar o total de 88 componentes, os quais estão listados na Tabela 9. Os óleos possuem os monoterpenos hidrocarbonetos como constituintes principais, seguidos dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Nos óleos das folhas frescas (Vt2ff) e nas folhas secas (Vt2fs) da estação chuvosa foram identificados 95,63% e 97,42% dos constituintes, respectivamente.

Os teores de monoterpenos em Vt2ff e Vt2fs foram de 78,12% e 32,65%, respectivamente. No caso de Vt2fs, os sesquiterpenos hidrocarbonetos foram majoritários e na proporção de 60,32%. Nos óleos das folhas frescas (Vt1ff) e folhas secas (Vt1fs) da estação seca os monoterpenos corresponderam à proporção de 63,80% e de 45,22%, respectivamente. O teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos para Vt1fs foi de 43,43%, proporcional ao valor encontrado para os monoterpenos.

Um decréscimo de 14,3% no teor dos constituintes mais voláteis, os monoterpenos, foi observado para o óleo das folhas frescas coletadas no mês de setembro onde foi observada menos precipitação e maior temperatura (Figura 10, página 50). Também em abril, assim como em setembro de 2010, a quantidade de monoterpenos foi menor nos óleos obtidos das folhas secas.

Tabela 9: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Virola theiodora*

Constituintes	IR	Vt1ff	Vt1fs	Vt2ff	Vt2fs
Monoterpenos					
α -pineno	935	19,71	15,70	21,24	9,63
canfeno	946	0,13	-	0,49	0,62
sabineno	972	0,32	0,10	-	-
β -pineno	979	21,40	16,84	22,37	9,50
Hidrocarboneto					
ciclohexano	986	-	0,29	-	-
Monoterpenos					
β -mirceno	990	3,58	1,89	4,85	1,97
α -felandreno	1005	0,70	0,33	1,36	-
α -terpineno	1017	0,15	0,12	0,40	-
ρ -cimeno	1024	-	0,19	-	-
β -felandreno	1032	16,53	9,41	24,00	10,05
trans- β -ocimeno	1049	0,83	0,30	2,32	0,88
γ -terpineno	1060	0,28	0,23	0,55	-
α -terpinoleno	1085	0,17	0,11	0,54	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	0,09	0,14	-	-
pinocarvona	1160	-	0,11	-	-
terpinen-4-ol	1174	0,28	0,28	0,52	-
α -terpineol	1186	-	-	-	0,87
mircenol	1192	0,61	-	-	-
Sesquiterpenos					
α -cubebeno	1344	0,42	0,54	0,57	0,91
α -copaeno	1373	2,01	3,54	-	4,59
isoleveno	1374	0,26	0,36	-	1,15
α -ilangeno	1376	0,60	0,61	1,44	-
β -bourboneno	1381	0,25	-	-	0,61
β -elemeno	1386	0,34	-	-	0,81

β -cubebeno	1387	-	-	-	1,61
7-epi-sesquitujeno	1388	0,71	1,18	-	-
sibireno	1400	0,23	-	-	0,60
cis- α -bergamoteno	1407	0,64	1,47	-	1,08
Isocariofileno	1408	-	-	-	0,71
β -funebreno	1413	-	0,56	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1419	0,57	0,73	-	1,30
cis-tujopseno	1429	-	0,16	-	-
β -copaeno	1430	0,19	0,37	-	-
β -gurjuneno	1431	0,63	0,37	1,48	-
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1432	0,71	1,46	-	1,27
α -guaiano	1435	1,46	2,71	1,08	3,55
aromadrendreno	1439	0,23	-	-	-
(<i>Z</i>)- β -farneseno	1440	-	0,18	-	-
6,9-guaiadieno	1442	-	0,25	-	-
α -humuleno	1453	0,36	0,27	-	0,56
α -patchouleno	1454	1,23	2,31	-	-
<i>trans</i> - β -farneseno	1456	0,30	0,27	-	-
cis- cadina-1(6),4-dieno	1461	-	0,21	-	-
ishwarano	1465	-	0,24	-	-
γ -gurjuneno	1469	0,19	0,94	-	-
10-epi- β -acoradieno	1474	0,29	-	-	-
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1475	-	0,38	-	-
germacreno D	1478	0,79	-	0,73	0,83
α -curcumeno	1479	-	0,51	-	-
γ -curcumeno	1481	0,20	0,31	-	-
α -amorfenno	1483	0,51	1,19	-	1,31
β -selineno	1490	4,51	9,64	3,86	11,97
<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	1493	-	0,35	-	0,82
γ -amorfenno	1495	-	-	-	1,85

α -selineno	1496	2,47	3,90	2,05	6,84
α -muuroleno	1500	-	0,29	-	-
α -bulneseno	1501	-	-	-	3,34
viridifloreno	1503	-	0,12	1,01	1,04
β -bisaboleno	1504	0,46	0,55	-	-
germacreno A	1508	0,75	-	-	-
γ -cadineno	1510	0,53	0,91	-	-
δ -cadineno	1518	1,35	2,59	1,28	4,44
β -sesquifelandreno	1524	0,96	1,18	0,64	2,83
trans-cadina-1,4-dieno	1530	0,21	0,38	-	0,82
γ -cupreneno	1532	-	0,23	-	-
α -cadineno	1538	-	-	-	0,69
selina-3,7(11)-dieno	1543	-	-	-	0,59
elemol	1548	0,15	-	-	-
trans-dauca-4(11),7-dieno	1556	-	1,26	-	-
germacreno B	1557	1,91	2,22	-	4,20
espatulenol	1574	0,50	0,77	-	-
globulol	1590	0,15	-	-	-
guaiol	1596	-	0,88	0,65	0,89
epi - α -muurolol	1640	-	0,94	-	-
β -acorenol	1643	0,57	-	-	0,80
α -muurolol	1644	-	-	0,71	-
pogostol	1651	0,27	-	-	-
α -cadinol	1653	0,94	-	-	-
selin-11-en-4- α -ol	1657	0,17	-	1,11	-
epi- β -bisabolol	1683	-	0,36	-	-
α -bisabolol	1685	1,37	0,55	0,38	0,54
8-cedren-13-ol	1688	0,85	-	-	-
(Z)- γ - Curcumen-12-ol	1728	-	1,14	-	-
acetato de α -bisabolol	1798	-	-	-	1,35

Classes de terpenóides				
Monoterpenos hidrocarbonetos	63,80	45,22	78,12	32,65
Monoterpenos oxigenados	0,98	0,53	0,52	0,87
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	26,54	43,43	14,14	60,32
Sesquiterpenos oxigenados	5,60	4,77	2,85	3,58
Outros compostos	-	0,29	-	-
Total	96,92	94,24	95,63	97,42

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcenos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Vt1 (setembro/2010) e Vt2 (Abril/2010).

Os monoterpenos α - e β -pineno e β -felandreno foram os constituintes principais nos quatro óleos obtidos de *V. theiodora*. No óleo de Vt2ff, as porcentagens desses monoterpenos foram de 21,24%; 22,37% e 24,00%, respectivamente. Em Vt1ff (estação seca), o teor do α -pineno foi 19,71%, do β -pineno (21,40%) e do β -felandreno (16,53%). No óleo coletado das folhas secas na estação chuvosa (Vt2fs), os teores foram 9,63%; 9,50% e 10,05%, respectivamente, enquanto que na estação seca (Vt1fs) o teor de α -pineno foi de 15,70%; 16,84% e 9,41%. Os sesquiterpenos comuns nos quatro óleos foram os α - e β -selineno, sendo os majoritários em Vt2fs na proporção de 6,84% e 11,97%, respectivamente. Os cromatogramas de CG-EM dos óleos essenciais de *V. theiodora* estão nas Figuras 33, 35, 36 e 37.

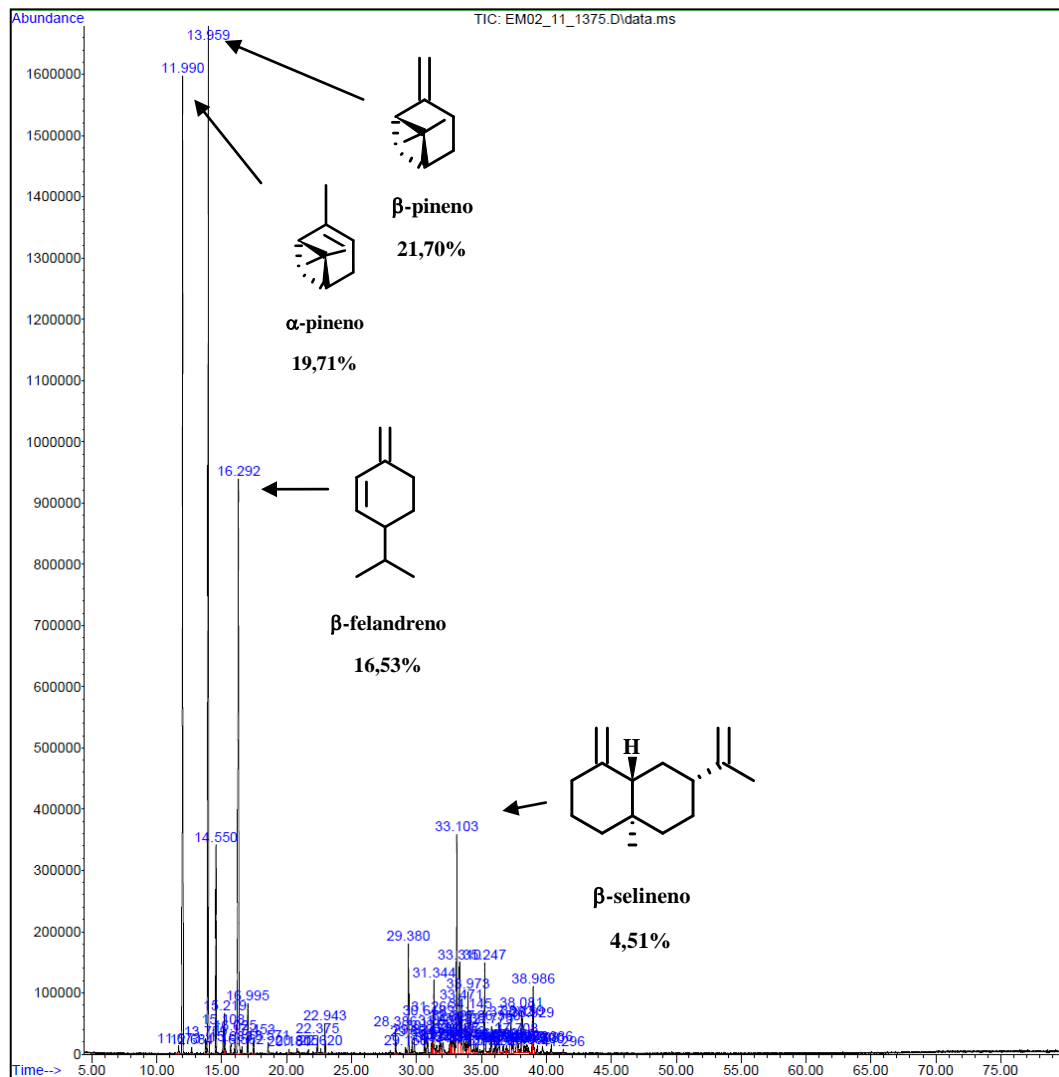


Figura 33: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Virola theiodora* na estação seca.

O pico 11 do cromatograma da Figura 33, com tempo de retenção de 16,29 min foi identificado como o monoterpene β -felandreno, após análise do espectro de massas da biblioteca do aparelho e dados da literatura (ADAMS, 2009).

O espectro de massas (Figura 34) apresentou íon molecular m/z 136 de baixa intensidade (20,88%) confirmando a fórmula $C_{10}H_{16}$.

O pico m/z 93 $[M-43]^+$ foi explicado no esquema 9 como uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$, seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A eliminação de dois hidrogênios forma um pico razoavelmente intenso m/z 91 $[M-43-2]$ e a perda de m/z 14 forma o pico m/z 77 $[M-45-14]$.

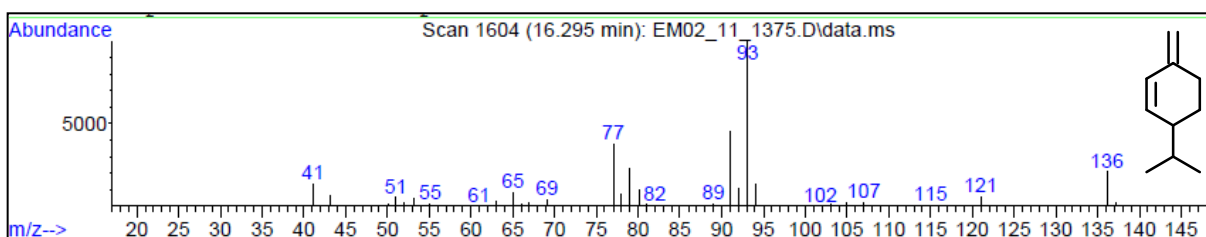
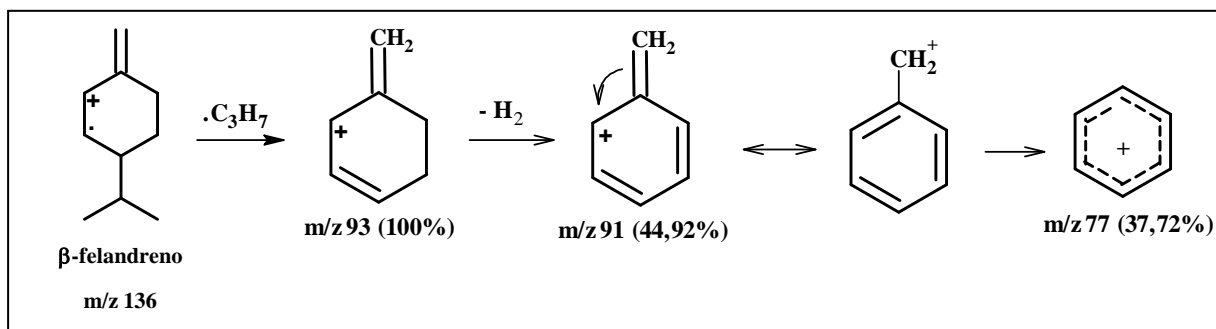


Figura 34: Espectro de massas do monoterpene β -felandreno.



Esquema 9: Proposta de fragmentação do constituinte β -felandreno .

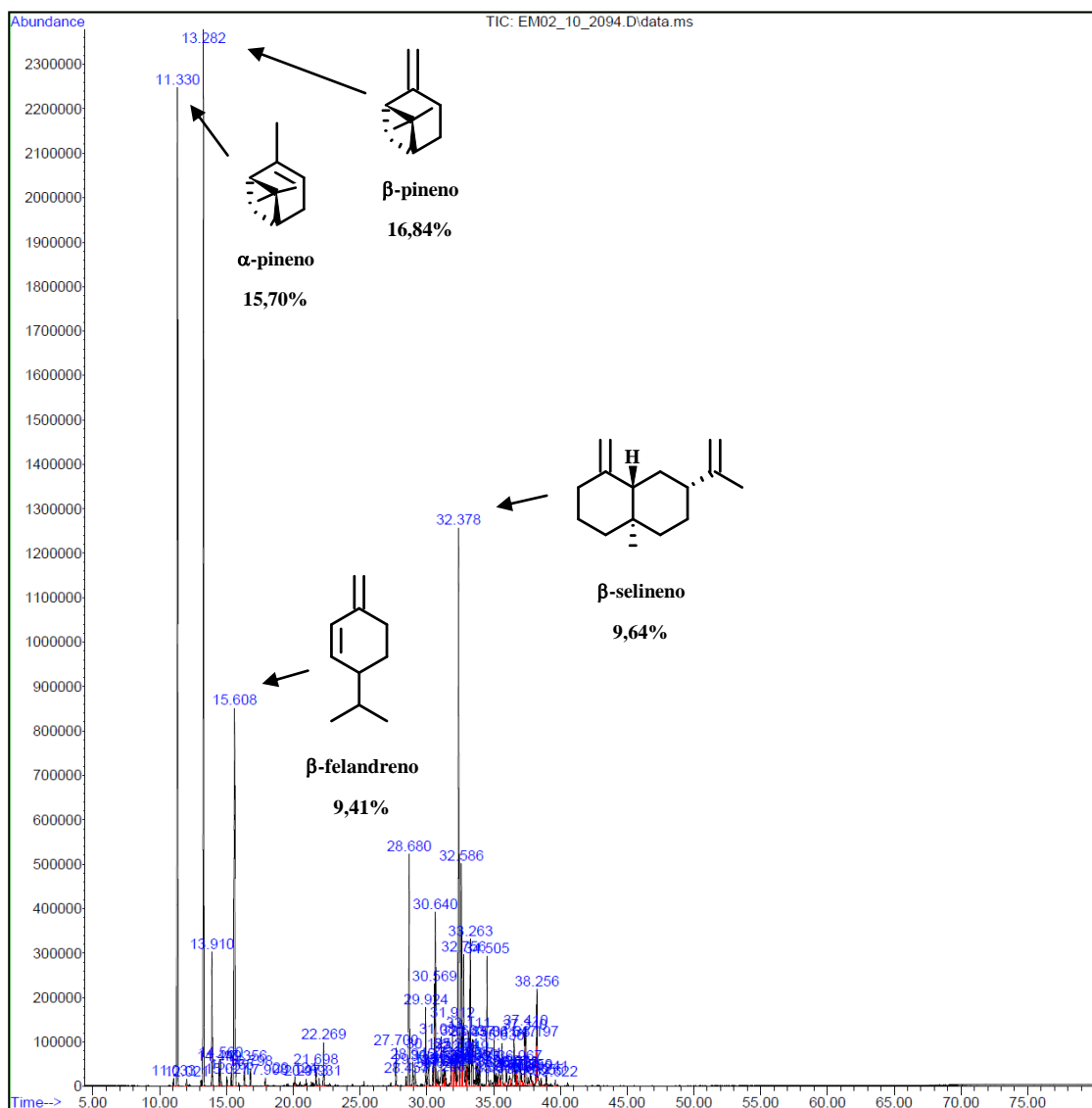


Figura 35: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Viola theiodora* na estação seca.

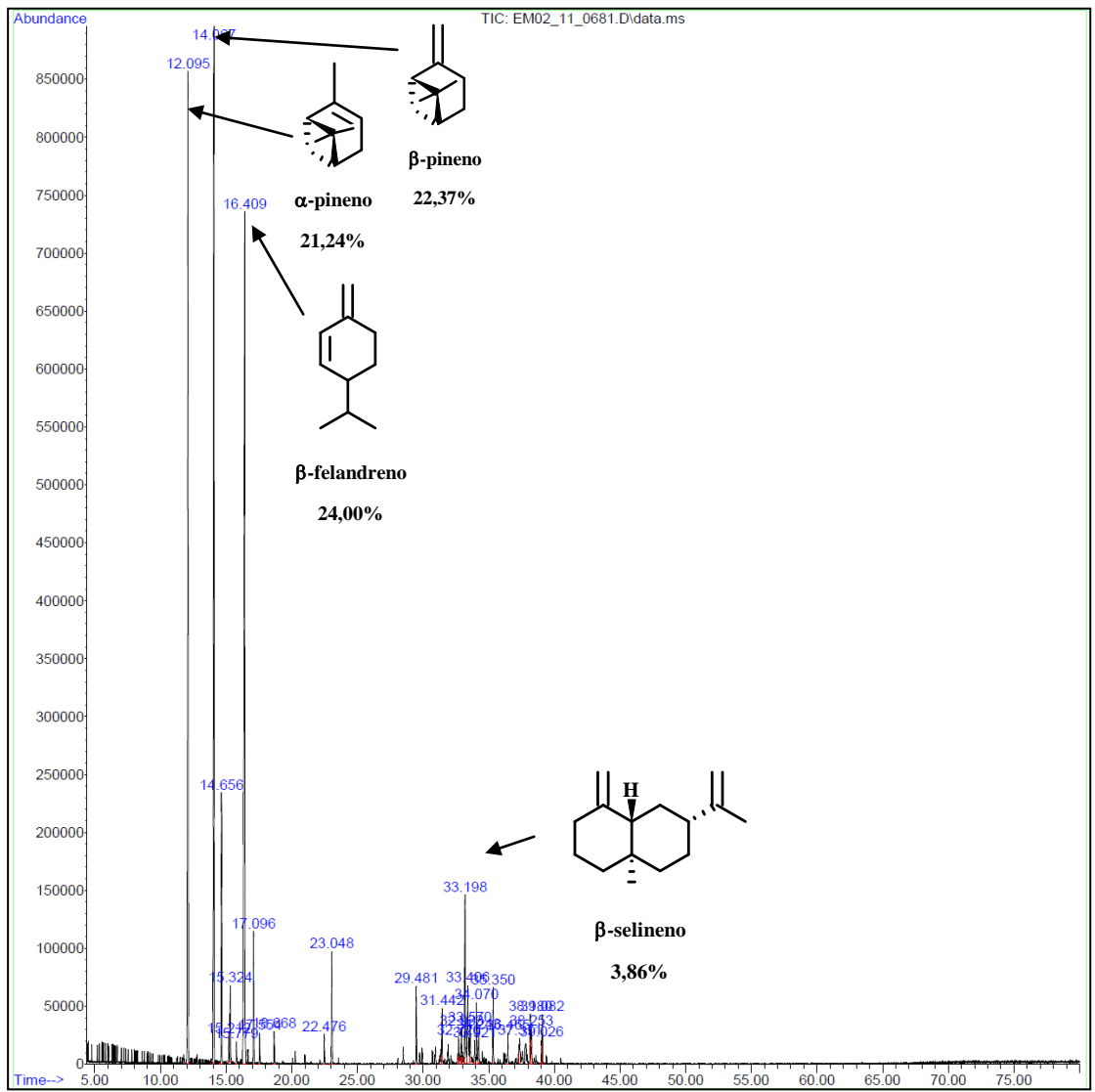


Figura 36: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Virola theiodora* na estação chuvosa.

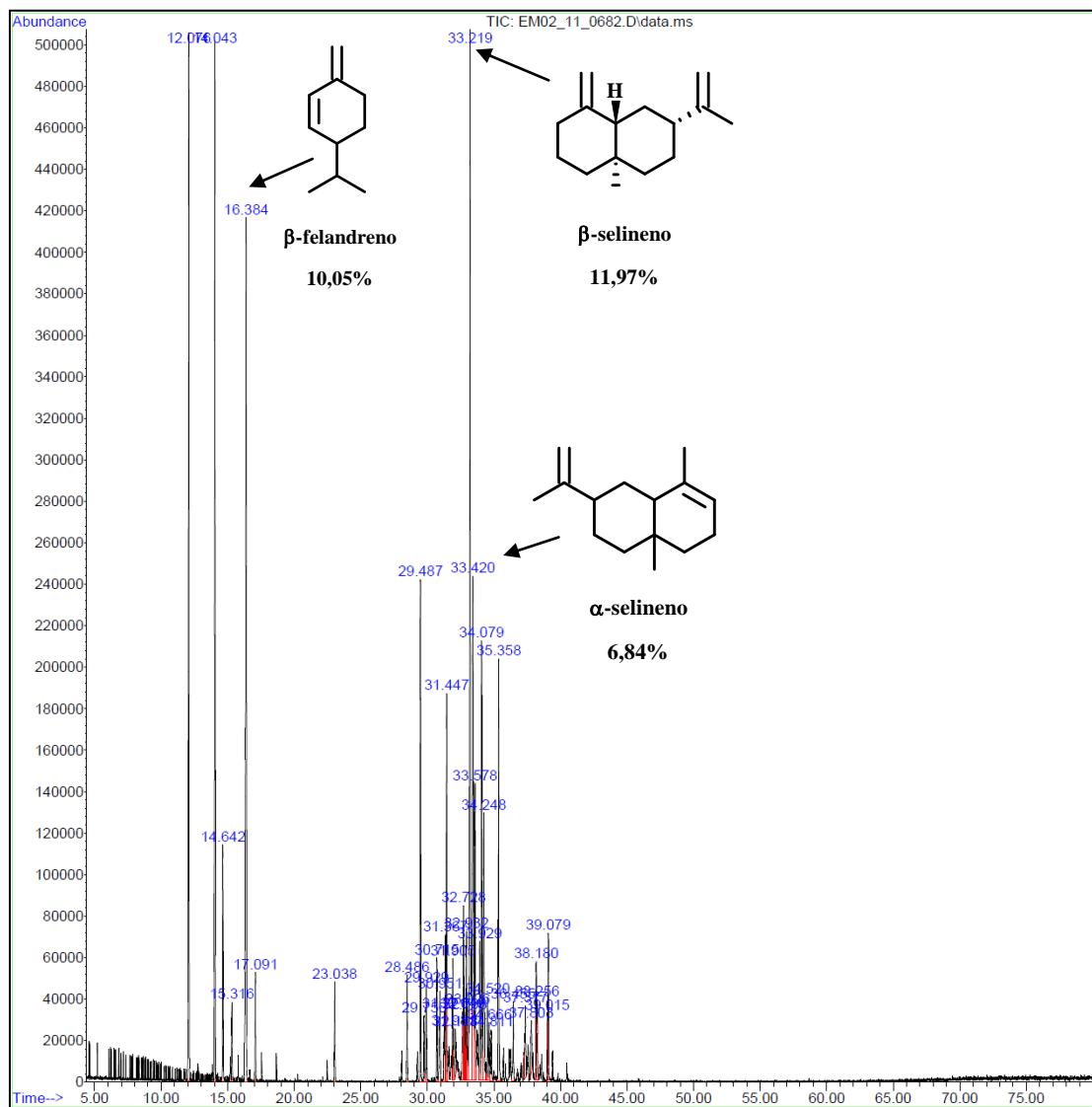


Figura 37: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Virola theiodora* na estação chuvosa.

2.3. Proposta de rota biossintética dos terpenóides nos óleos de *Virola mollissima* e *Virola theiodora*.

A possível rota biossintética, proposta com base na literatura, dos principais monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais de *V. mollissima* e *V. theiodora* é apresentada no esquema 10.

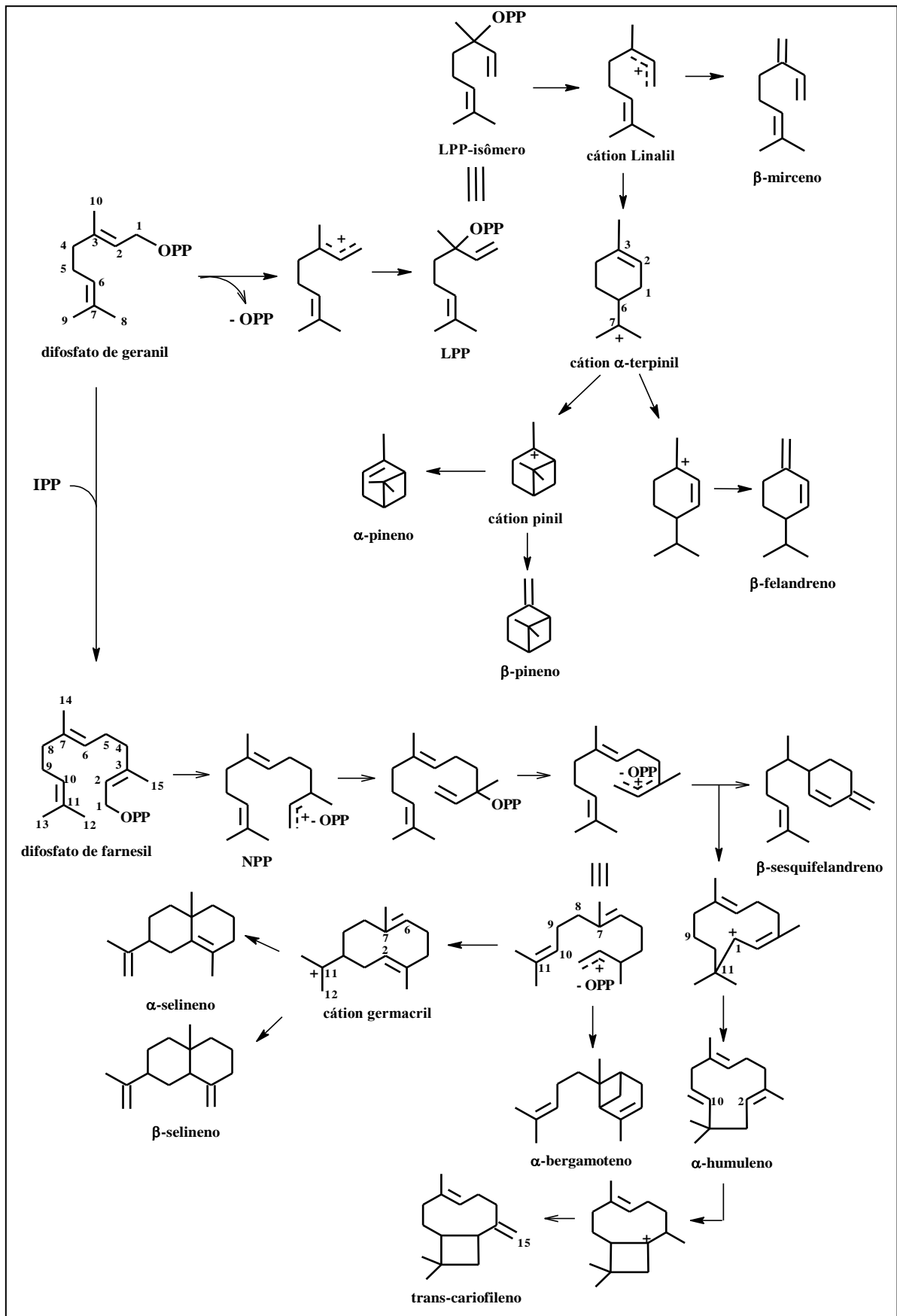
A partir do intermediário dos monoterpenos cíclicos, o cátion α -terpinila, obtido por meio da ionização do pirofosfato de geranyl (GPP) e posterior isomerização, o β -felandreno pode ser obtido por meio do rearranjo de Wagner-Meerwein de C1 a C7 do carbocátion terpinílico e posterior desprotonação em C10 (DEWICK, 2002).

A ionização do LPP (pirofosfato de linalil), gerado a partir da isomerização do GPP, resulta no cátion linalil e este por desprotonação em C10 forma o β -mirceno.

O cátion pinil, resultante da ciclização eletrofílica do cátion α -terpinil, origina α - e β -pineno.

Em adição de pirofosfato de isopentenil (IPP) a molécula GPP, gerando os precursores dos sesquiterpenos, pirofosfato de farnesil (FPP), por ionização e posterior isomerização do grupo difosfato de C1 para C3 (NPP) origina o β -sesquifelandreno, por ciclização eletrofílica e desprotonação em C15 (LOBO e LOURENÇO, 2007).

A partir do pirofosfato de nerolidil (NPP) e subsequente ciclização em C10 e C1 leva a formação do cátion germacrila, e por desprotonação em C3 e C11 origina β - e α -selineno, respectivamente.



Esquema 10: Proposta da rota biossintética dos mono- e sesquiterpenos principais dos óleos essenciais de *Virola mollissima* e *Virola theiodora*.

FONTE: DEWICK, 2002; LOBO e LOURENÇO, 2007.

2.1. Estudo fitoquímico do cerne de *Virola mollissima*

Considerando que os extratos hexano (EBVMHex) e metanol (EBVMMe) do cerne de *V. mollissima* foram testados frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (capítulo VI, página 158) e que o EBVMMe foi menos ativo ($CI_{50} \geq 350 \mu\text{g/mL}$), apenas o EBVMHex foi selecionado para o estudo fitoquímico.

O extrato hexano foi obtido após evaporação sob pressão reduzida. Durante o procedimento, houve a formação de precipitado denominado por VMHex. Ambas as amostras, EBVMHex e VMHex foram analisadas por CCD-gel de sílica (diclorometano/metanol 99:1). Após a eluição, os cromatogramas obtidos foram revelados sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (Figura 38 a, b). A presença de uma substância de coloração azul (cromatograma da Figura 38) foi observada no extrato hexano, sendo também uma das majoritárias em VMHex.

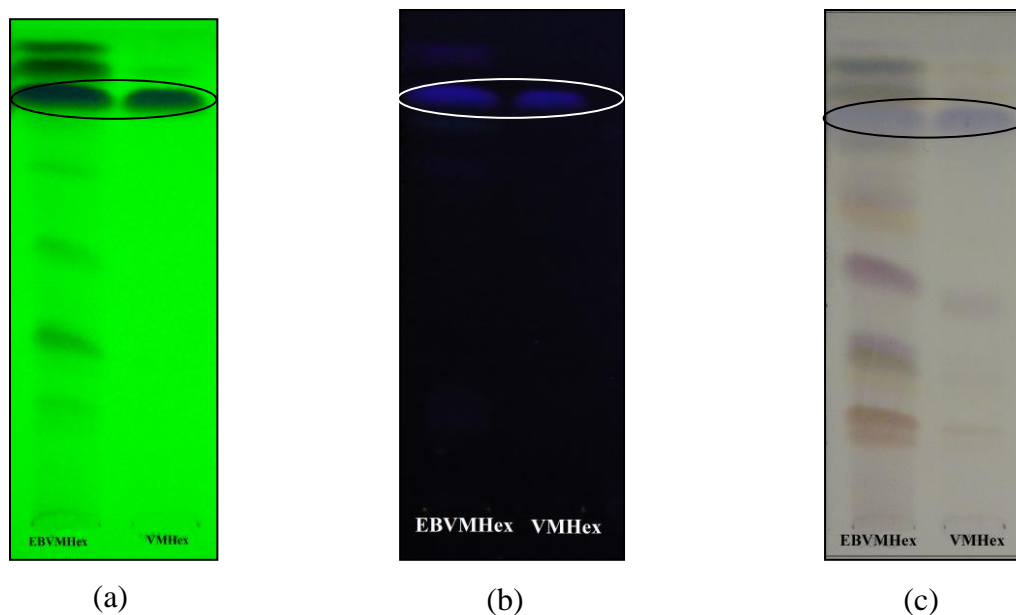


Figura 38: Cromatograma por CCD do EBVMHex e do VMHex, (a) absorção no UV/VIS 254 nm, (b) 366 nm e (c) revelação com vanilina sulfúrica 10%.

EBVMHex e VMHex foram, posteriormente, avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o Detector de Arranjo de Diodos (DAD) na concentração de 10 mg/mL dissolvidos em metanol grau HPLC. A análise por CLAE-DAD foi realizada conforme o método descrito em materiais e métodos na página 38.

O perfil cromatográfico de EBVMHex (igura 39) apresentou em 280nm, duas substâncias principais com tempo retenção (t_R) 30,01 e 32,13 min. Os picos apresentaram espectros na região do ultravioleta característicos de substância aromática, que segundo a literatura apresentam valores máximos de comprimento de onda de 269nm e 270nm (PAVIA *et al.*, 2010).

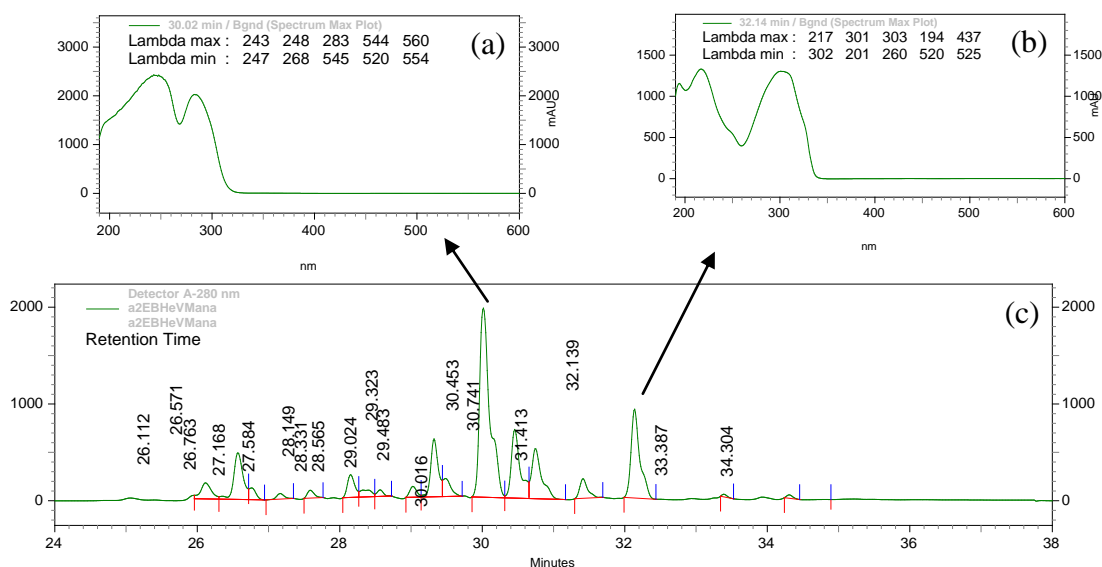


Figura 39: (a) e (b) Bandas de absorção no UV e (c) Cromatograma de CLAE de EBVMHex registrado a 280nm.

Após análise do perfil cromatográfico por CLAE, 745 mg de EBVMHex foram submetidos a coluna cromatográfica em gel de sílica, eluída com diclorometano:metanol em mistura crescente de polaridade, resultando em 74 frações. Essas amostras foram analisadas por CCD e agrupadas em 12 frações. A fração 7 apresentou uma substância (1 mg). O ensaio dessa amostra frente às formas de *L. amazonensis*, mostrou atividade. Outra fração, de 8-11 (20 mg), também apresentaram essa substância e foi fracionada por CCD preparativa (70:30 hexano/acetato de etila), conduzindo ao isolamento da substância codificada como sub2-8-11 (8,3 mg).

O espectro de massas de **sub2-8-11** (Figura 40) apresentou o pico m/z 338 (100%) como íon molecular e pico base, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_4$. A intensidade dos picos de maior fragmento foram m/z 323 (9,39%), resultado da perda de massa de 15 daltons, condizente com grupo metila (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

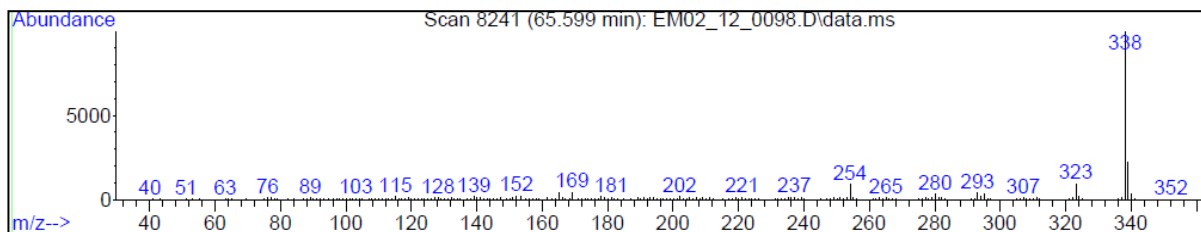


Figura 40: Espectro de massas de sub-2-8-11.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 41) apresentou um sinal para hidrogênio metílico em $\delta_{\text{H}} 2,41$ (s, 3H, H-9) e três sinais em $\delta_{\text{H}} 3,98$ (s, 3H, H-3), $\delta_{\text{H}} 3,93$ (s, 3H, H-4) e $\delta_{\text{H}} 4,02$ (s, 3H, H-3') de hidrogênios de grupos metoxílicos. Na região dos aromáticos, foram observados multipletos em $\delta_{\text{H}} 7,32-7,34$ (m, 2H, H-2 e H-6) e $\delta_{\text{H}} 6,96-6,93$ (m, 2H, H-5 e H-6'), e um singleto em $\delta_{\text{H}} 6,64$ (s, 1H, H-2'). Adicionalmente, um duplete foi observado em $\delta_{\text{H}} 3,50$ (d, 2H, H-7', $J=6,6$ Hz), um duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 5,1$ (dd, 2H, H-9', $J=10,3; 1,6$ Hz) e um duplo duplo triplete em $\delta_{\text{H}} 6,06$ (ddt, 1H, H-8', $J=6,6, 10,0, 16,9$).

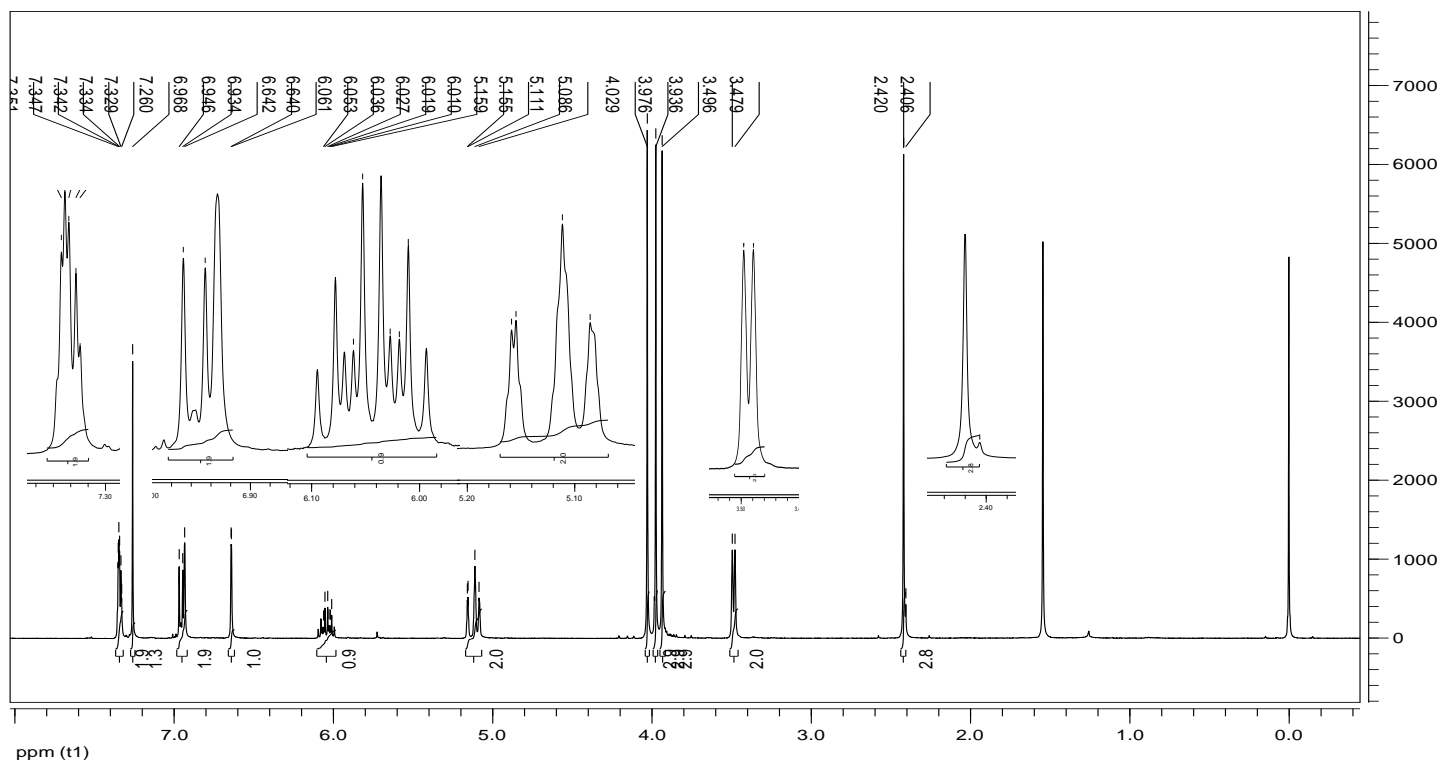


Figura 41: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de sub-2-8-11

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 90 (Figura 42 e 43) apresentaram 21 sinais, sendo nove carbonos não hidrogenados, seis de carbonos metínicos, dois de carbonos metilênicos e quatro de carbonos metílicos. O sinal em 9,8 ppm foi correlacionado ao carbono metílico na região dos alifáticos, correspondente ao carbono C-9. Três sinais em 56 ppm foram atribuídos a carbonos metoxílicos ligados ao anel aromático, enquanto que os sinais observados em 138,2 ppm e 115,8 ppm evidenciaram deslocamentos para carbonos metilênicos, correspondentes aos carbonos C-8 e C-9. Sinais de carbonos metínicos na região de carbonos aromáticos foram compatíveis com anel trissubstituído (δ_{C} 151,4 – 107,8) (PAVIA *et al.*, 2010).

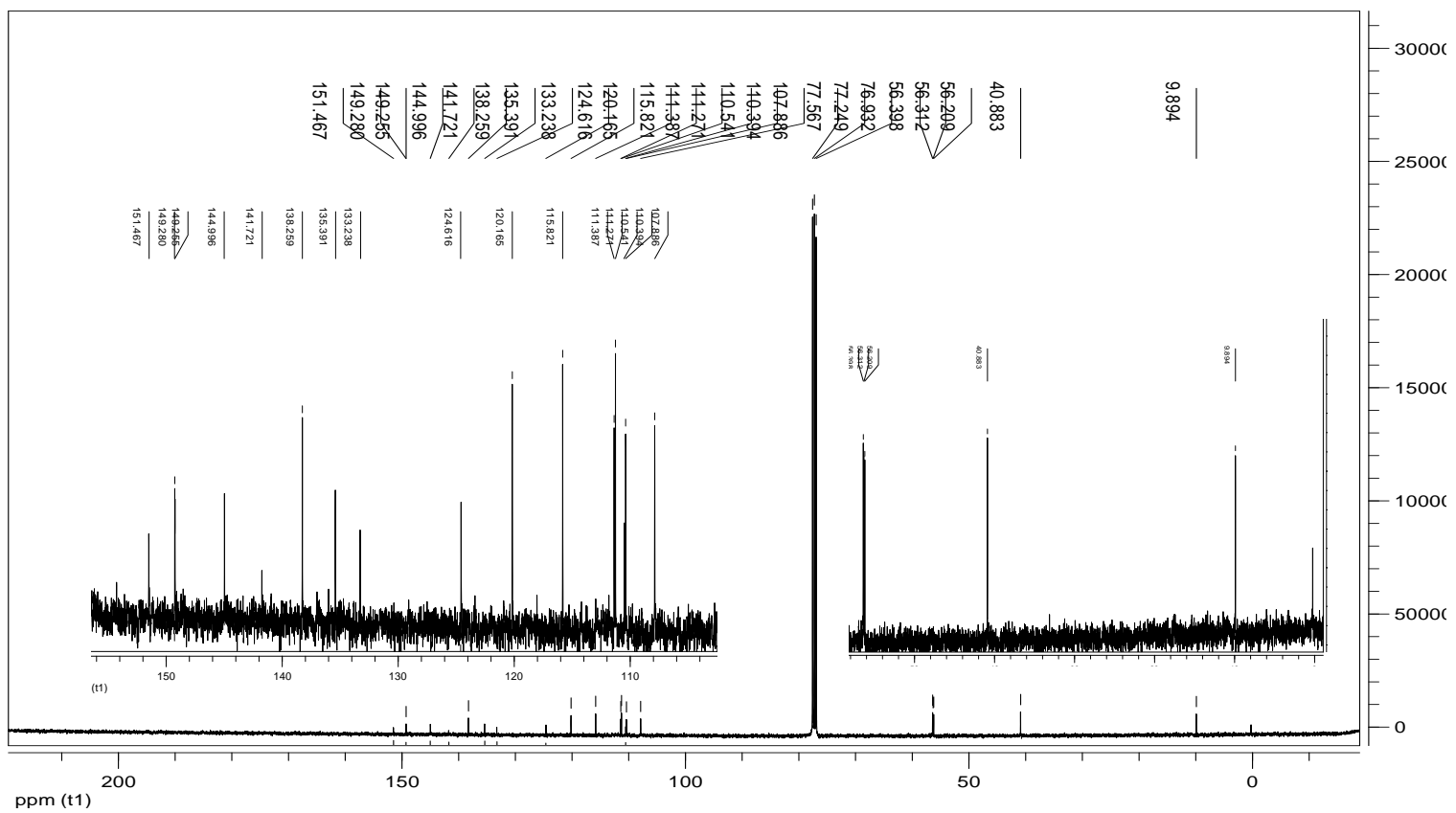


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de sub-2-8-11.

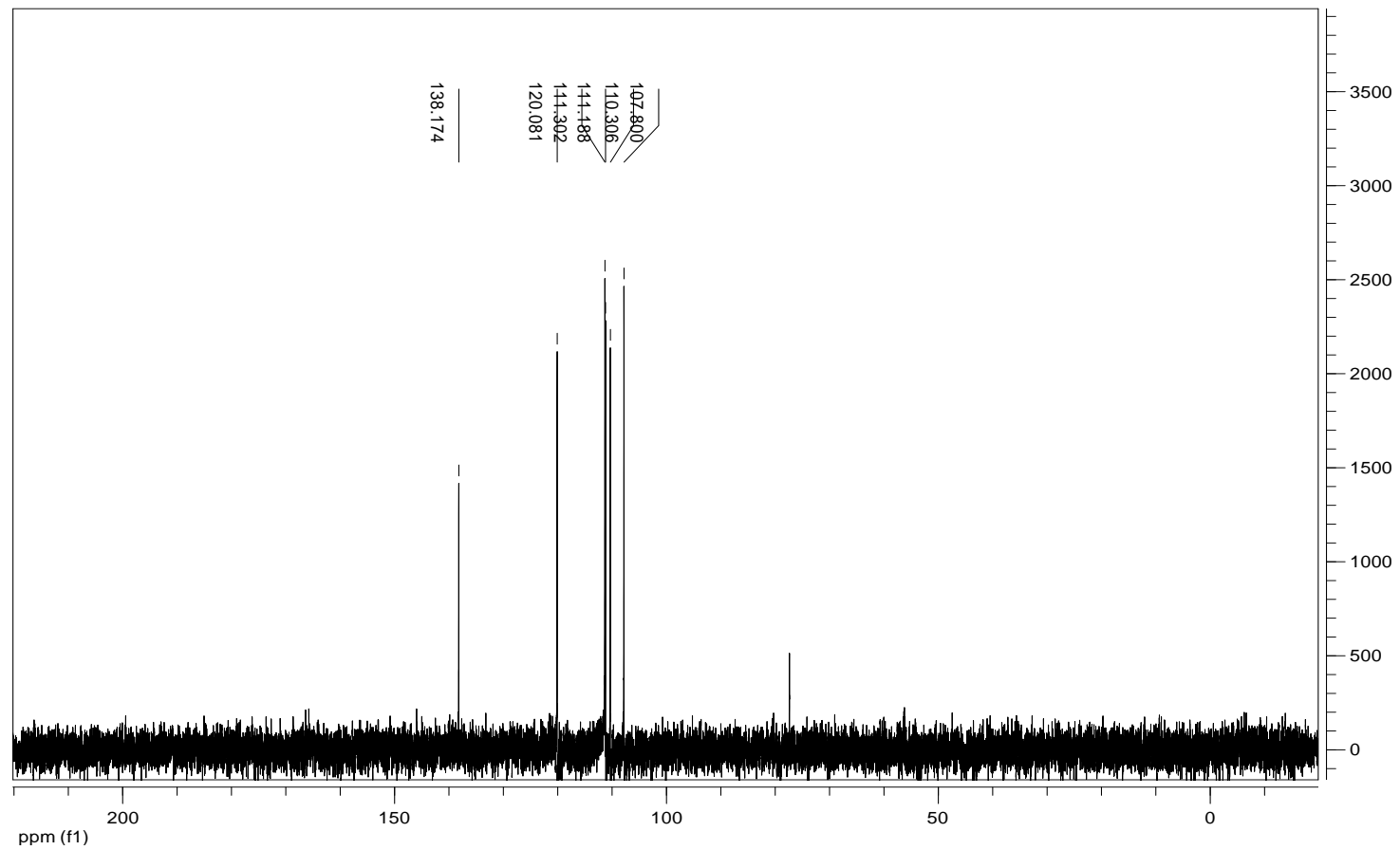
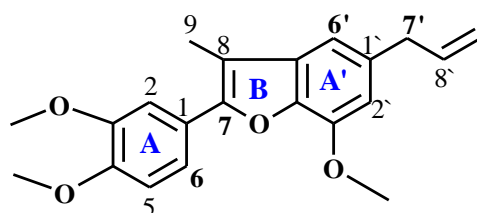


Figura 43: Espectro de DEPT 90 (CDCl₃, 100 MHz) de sub-2-8-11.

Os dados observados em RMN ^1H , ^{13}C (tabela 12) e CG-EM foram comparados aos descritos por Kawanishi *et al.* (1982) e Morais *et al.* (2009) e confirmaram a identificação da neolignana carinatina (tabela 10).



Carinatina

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da neolignana carinatina

Posição	^1H		^{13}C		
	δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)		δ (ppm)		
	Morais <i>et al.</i> , 2009		Kawanishi <i>et al.</i> , 1982	Morais <i>et al.</i> , 2009	
	1		1		
1	-	-	133,2	133,0	133,0
2	7,34 – 7,32 (m)	7,36 – 7,33 (m)	107,8	107,5	107,5
3	-	-	149,2	148,9	148,9
4	-	-	149,2	148,9	148,9
5	6,96 – 6,93 (m)	6,96 (d, 9,0)	110,3	110,9	110,9
6	7,34 – 7,32 (m)	7,33 – 7,37 (m)	120,1	119,9	119,9
7	-	-	151,4	151,2	151,2
8	-	-	110,5	110,3	110,3
9	2,41 (s)	2,43 (s)	9,8	9,3	9,6
1'	-	-	135,3	135,1	135,1
2'	6,64 (s)	6,65 (s)	111,2	110,0	110,0
3'	-	-	144,9	144,7	144,7

4`	-	-	141,7	141,5	141,5
5`	-	-	124,6	124,3	124,3
6`	6,93 – 6,96 (m)	6,94 (d, 1,2)	111,3	111,1	111,1
7`	3,50 (d, 6,65)	3,49 (d, 7,0)	40,8	40,6	40,6
8`	6,06 (ddt, 6,6, 10,0, 16,9)	6,06 (ddt, 6,6; 10,1; 16,7)	138,2	138,0	138,0
9`	5,1 (dd, 1,6; 10,33)	5,19 – 5,09 (m)	115,8	115,6	115,6
MeO-3	3,98 (s)	3,99 (s)	56,3	56,1	56,1
MeO-4	3,93 (s)	3,94 (s)	56,3	56,0	56,0
MeO-3`	4,02 (s)	4,03 (s)	56,1	55,9	55,9

O perfil cromatográfico da amostra VMHex por CLAE-DAD (Figura 44) em 266 nm mostrou uma substância principal com t_R 5,85 min, semelhante ao cromatograma obtido por CCD.

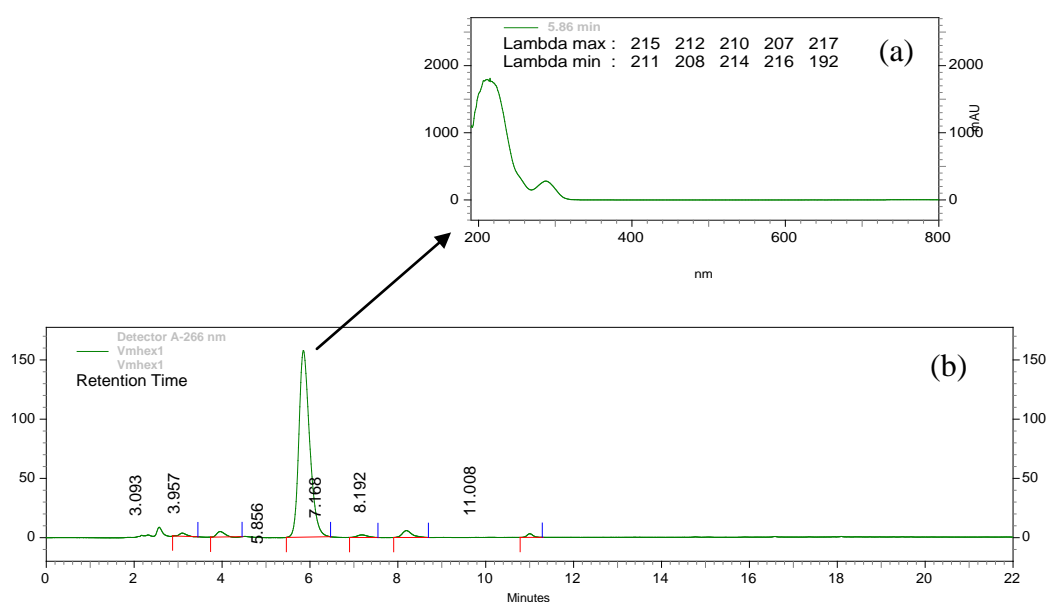


Figura 44: (a) Banda de absorção no UV e (b) Cromatograma de CLAE de VMHex a 266 nm.

A análise de VMHex por CG-EM mostrou uma substância principal em 38,82 min com 96,79% de área (Figura 45).

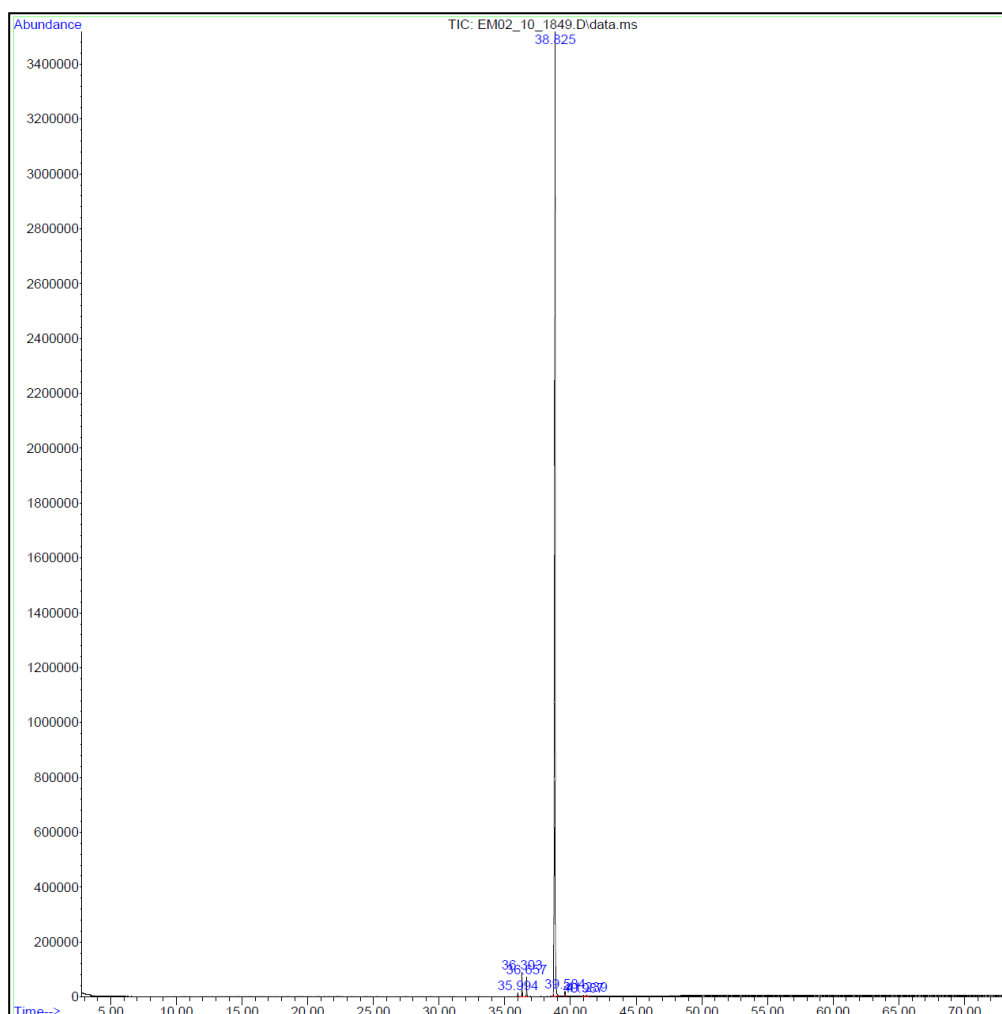


Figura 45: Cromatograma de íons totais de VMHex.

O espectro de massas (Figura 46) apresentou m/z 326 (100%) como pico base, compatível com a fórmula $C_{20}H_{22}O_4$. Os picos de maior intensidade foram m/z 297 (28,43%), relacionado à massa de 29, levando a suposição de perda de grupo metoxila e m/z 253 (19,82%) (BORTOLOMEAZZI *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

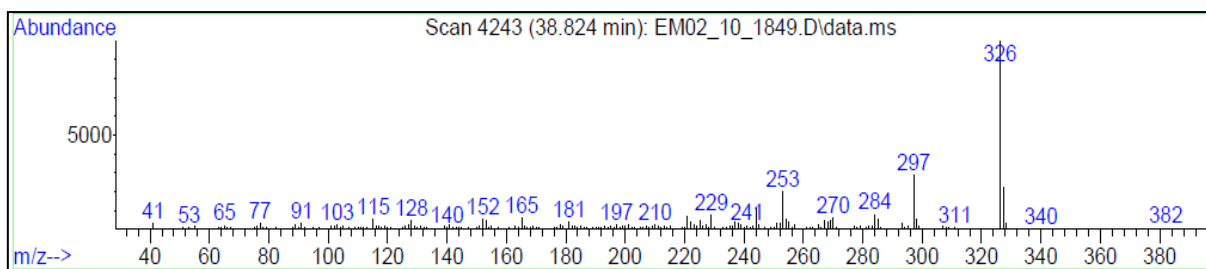
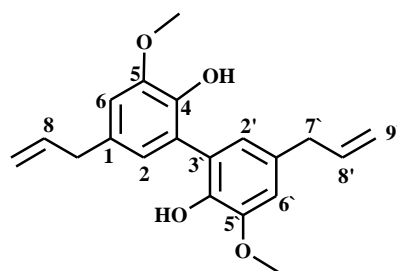


Figura 46: Espectro de massas de VMHex.

Por meio da CCD preparativa de VMHex (40 mg), utilizando o sistema de eluente hexano/acetato de etila (70:30), foi possível o isolamento da substância majoritária (20 mg). O espectro de RMN ^1H dessa substância (Figura 47) apresenta um sinal para hidrogênio metilênico em δ_{H} 3,36 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), um singlete em δ_{H} 3,90 (s, 3H) confirmando a presença de grupo metoxila, um multiplete em δ_{H} 5,0 – 5,1 (m, 1H) correspondente a hidrogênio metínico, um multiplete em δ_{H} 6,0 -5,9 (m, 1H) e um sinal em δ_{H} 6,72 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,75 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H) correspondentes a hidrogênios aromáticos.

Na análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 90 e 135 (Figuras 48-50) foi possível observar 10 sinais, sendo três carbonos metínicos, quatro carbonos não hidrogenados, dois carbonos metilênicos e uma metila. Um sinal em 56,2 ppm foi correspondente ao carbono metoxilíco. Os sinais em 110,8 ppm (C6-6 \prime) e 123,3 ppm (C2-2 \prime) foram atribuídos aos carbonos aromáticos contendo os hidrogênios na posição meta. O sinal em 132,1 ppm (C1-1 \prime) foi correlacionado ao carbono aromático quaternário tendo o grupo propileno como substituinte. O sinal 141,1 ppm (C4-4 \prime) e 147,4 ppm (C5-5 \prime) foram atribuídos aos carbonos tendo os grupos hidroxila e metoxila como substituintes, respectivamente. Enquanto que os sinais 137,8 ppm (C8-8 \prime) e 115,9 ppm (C9-9 \prime) foram atribuídos aos carbonos ligados por dupla ligação do grupo propenila e o sinal em 40,2 ppm (C7-7 \prime) foi relacionado ao carbono metilênico.

A comparação dos dados da literatura (BORTOLOMEAZZI *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2009) e os dados de RMN ^1H , ^{13}C (Tabela 11) e CG-EM obtidos conduziu a estrutura da neolignana deidrodieugenol como a substância majoritária de VMHex.



Deidrodieugenol

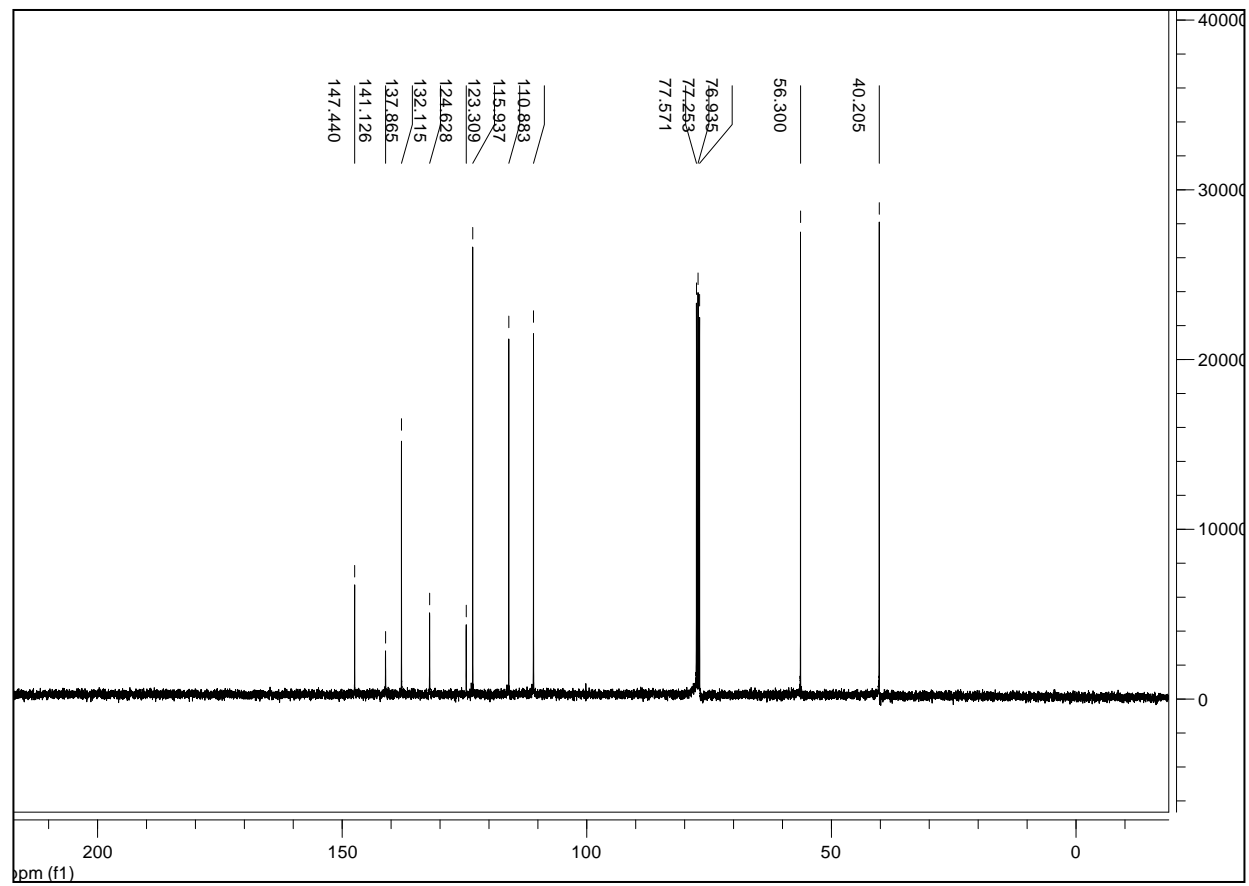


Figura 48: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.

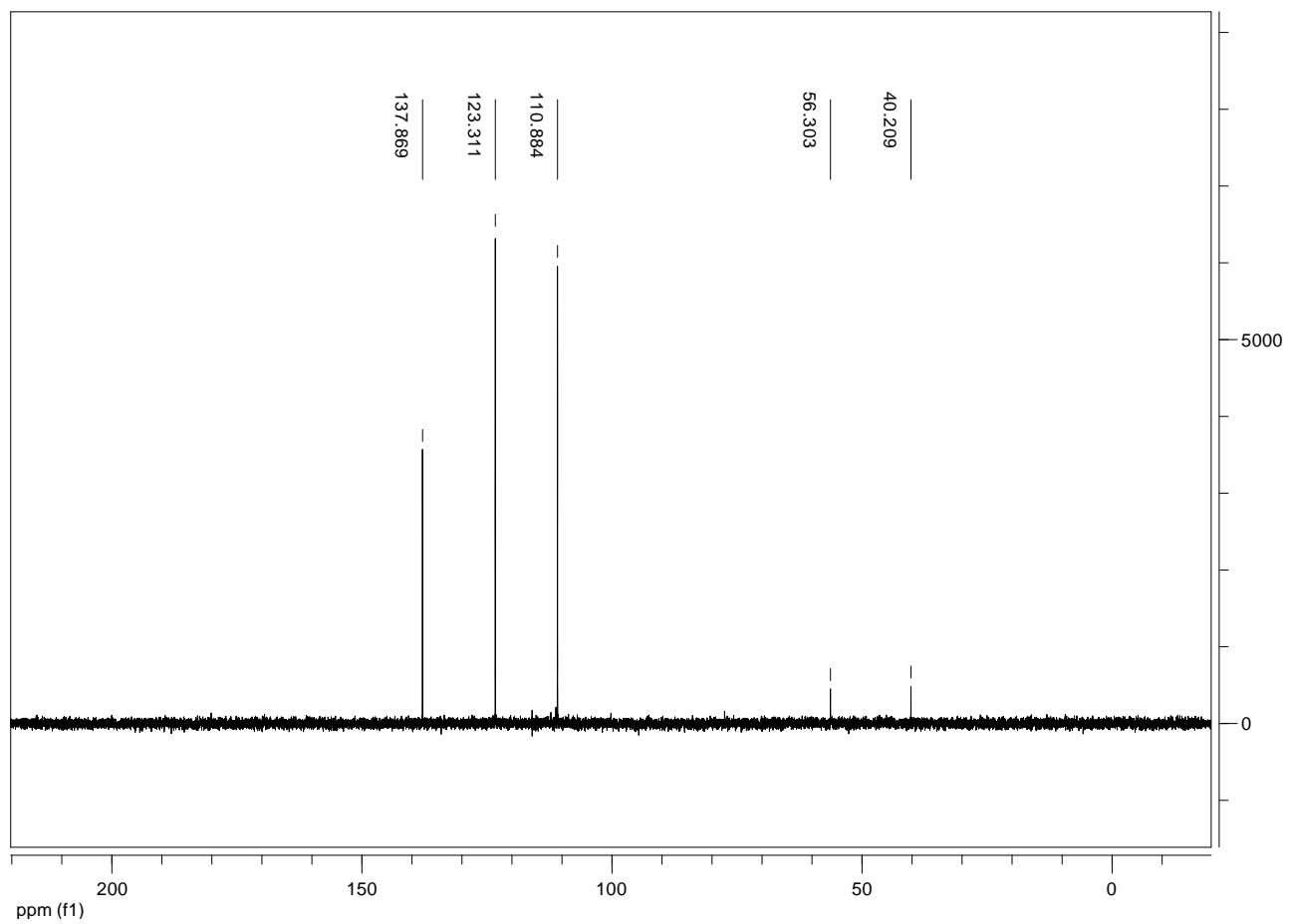


Figura 49: DEPT 90 (CDCl₃, 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.

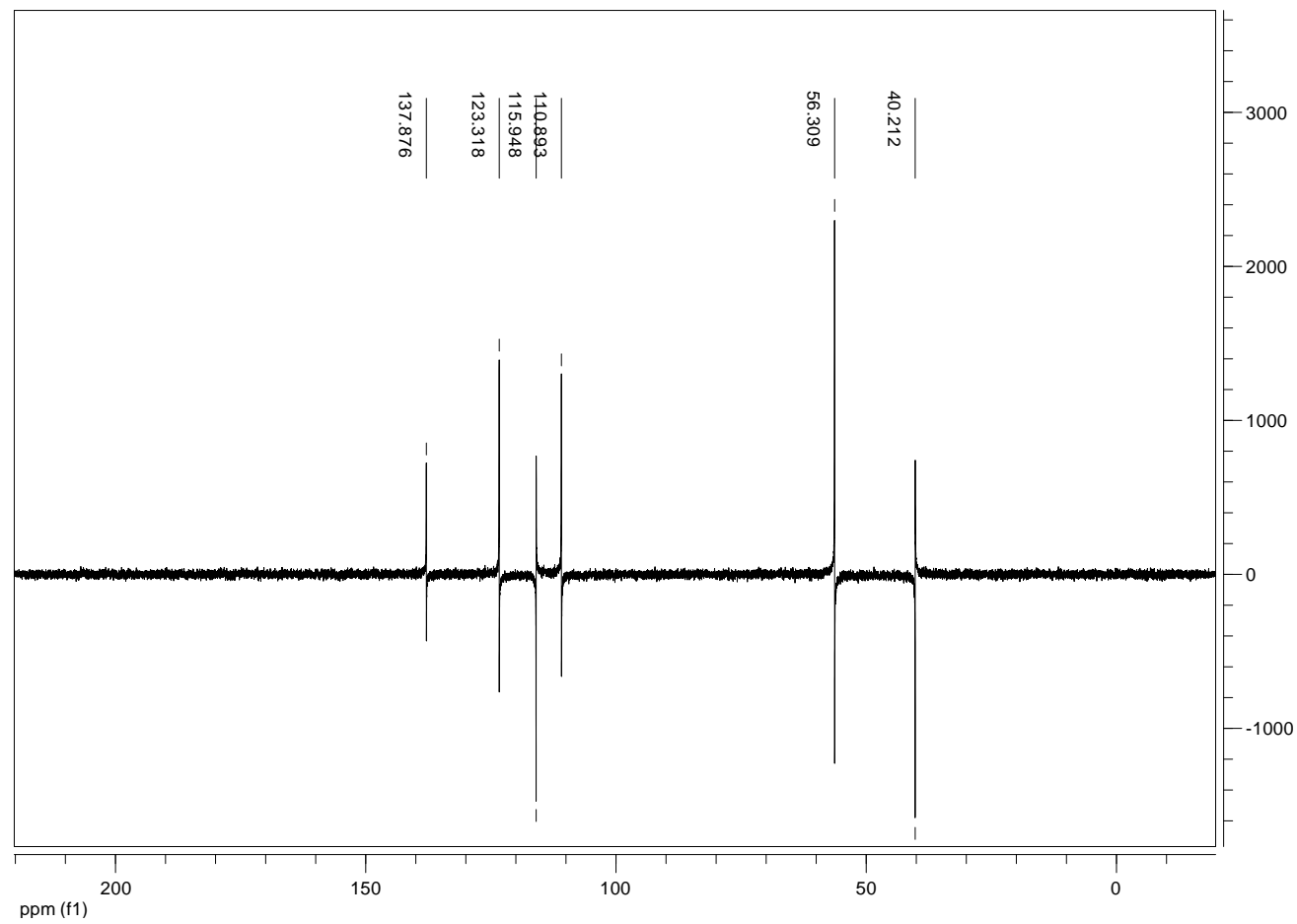


Figura 50: DEPT 135 (CDCl₃, 100 MHz) da substância majoritária de VMHex.

Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da neolignana deidrodieugenol

Posição	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)			^{13}C δ (ppm)		
	2	Morais <i>et al.</i> , 2009	Bortolomeazzi <i>et al.</i> , 2010	2	Morais <i>et al.</i> , 2009	Bortolomeazzi <i>et al.</i> , 2010
1/1'	-	-	-	132,1	131,9	131,8
2/2'	6,72 (<i>d</i> ; 1,7)	6,74 (<i>d</i> , 2,2)	6,72 (<i>d</i> ; 1,7)	123,3	123,1	123,0
3/3'	-	-	-	124,6	124,4	124,4
4/4'	-	-	-	141,1	140,8	140,8
5/5'	-	-	-	147,4	147,2	147,2
6/6'	6,75 (<i>d</i> ; 1,8)	6,76 (<i>d</i> , 2,2)	6,75 (<i>d</i> ; 1,9)	110,8	110,6	110,6
7/7'	3,4 (<i>d</i> ; 6,7)	3,37 (<i>d</i> ; 6,6)	3,36 (<i>d</i> ; 6,7)	40,2	39,9	39,9
8/8'	6,0 (<i>ddt</i> , 6,7; 10,0 e 16,8)	5,97 (<i>ddt</i> , 6,9; 10,2 e 17,1)	6,0 – 5,87 (<i>m</i>)	137,8	137,6	137,6
9/9'	5,13 - 5,08 (<i>m</i>)	5,17 – 5,05 (<i>m</i>)	5,18 – 5,01 (<i>m</i>)	115,9	115,7	115,6
MeO – 5/5'	3,90 (<i>s</i>)	3,92 (<i>s</i>)	3,89 (<i>s</i>)	56,3	56,0	56,0

CAPÍTULO IV

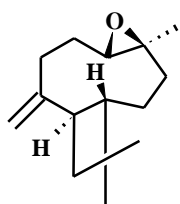
**ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS
DE *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R.E.Fr.
(ANNONACEAE)**

1. INTRODUÇÃO

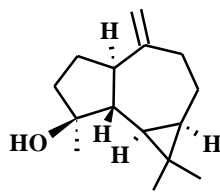
A família Annonaceae, na região neotropical, é representada por cerca de 40 gêneros e 650 espécies, com centros de distribuição na Amazônia e Guianas. Na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Amazonas, Brasil) foram catalogados 16 gêneros e 60 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999), os quais economicamente, são fontes significativas de frutos comestíveis, matéria-prima para cosméticos, perfumaria e plantas medicinais (CORRÊA, 1984).

Essa família possui uma enorme diversidade de constituintes químicos, que inicialmente foram divididos em dois grupos: substâncias alcalóidicas e não alcalóidicas, o que demonstra a importância dada inicialmente à presença de alcalóides (LÚCIO, 2011). A literatura tem demonstrado um grande número de constituintes não alcalóidicos, tais como polifenóis com ênfase aos flavonóides e outras substâncias aromáticas, terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpeno e triterpenos), bem como produtos do metabolismo primário que incluem carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, entre outros (COLMAN-SAZARITORIA *et al.*, 1994; LEBOEUF *et al.*, 1980; ; RINALDI, 2007; ROCHA *et al.*, 1981; RUPPRECHT *et al.*, 1990; SANTOS e SALATINO, 2000; SILVA, 2006).

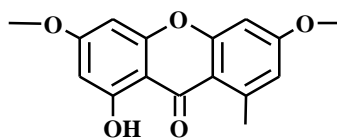
Como exemplo, podemos citar o estudo fitoquímico das cascas de *Guatteria blepharophylla* (Mart.) Mart. que forneceu 12 compostos, sendo dois sesquiterpenos, óxido de cariofileno (**24**) e espatulenol (**25**), uma xantona, liquexantona (**26**), uma mistura de esteróides, β -sitosterol (**27**) e estigmasterol (**28**), e sete alcalóides isoquinolínicos, *O*-metilmoschatolina (**29**), lisicamina (**30**), nornuciferina (**31**), liriodenina (**32**), isocoreximina (**33**), subsessilina (**34**) e isomoschatolina (**35**). O alcalóide liriodenina mostrou atividade significativa contra linhagens de células da mama (MCF-7, Michigan Cancer Foundation-7). A isomoschatolina apresentou atividade antifúngica similar ao controle positivo nistatina contra *Candida albicans* (COSTA *et al.*, 2011).



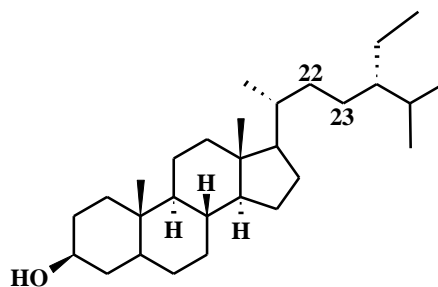
24



25

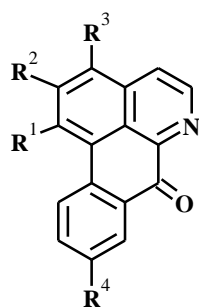


26



27

28 $\Delta^{22(23)}$



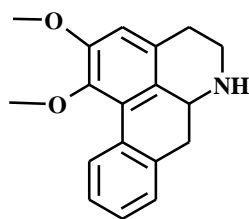
29 $R^1 = R^2 = R^3 = OCH_3; R^4 = H$

30 $R^1 = R^2 = OCH_3; R^3 = R^4 = H$

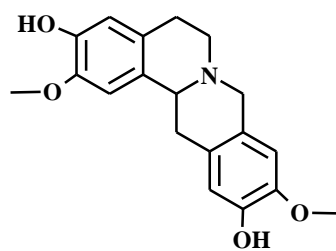
31 $R^1 = R^2 = OCH_2O; R^3 = R^4 = H$

32 $R^1 = R^2 = R^3 = OCH_3; R^4 = OH$

33 $R^1 = R^2 = OCH_3; R^3 = OH; R^4 = H$

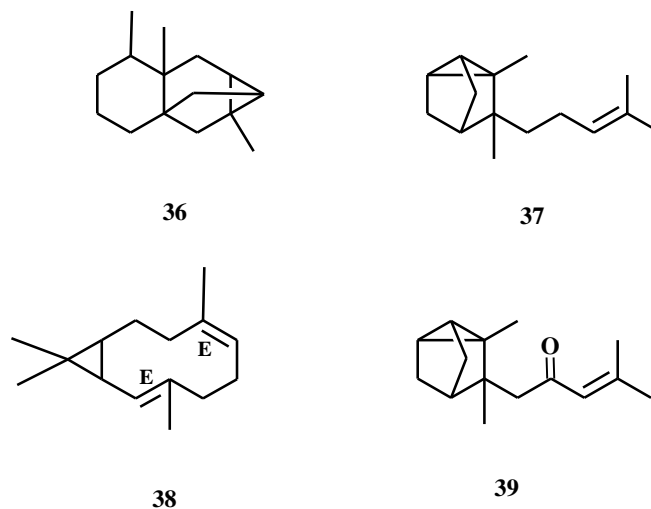


34



35

O óleo essencial das folhas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. foi submetido à cromatografia em coluna em sílica gel e suas frações foram submetidas a sucessivas CCD preparativas, resultando no isolamento dos compostos ishwarano (**36**), α -santaleno (**37**), biciclogermacreno (**38**), espatulenol, óxido β -cariofileno, α -santalen-11-ona (**39**) (CAROLLO *et al.*, 2005).



A espécie *Bocageopsis multiflora* (Mart) R. E. Fr. é vulgarmente conhecida como "envira" e "surucucu", e é usada para construção, reflorestamento, ferramentas e ornamentos (LORENZI, 2002).

Há escassez de trabalhos químicos referentes ao gênero e a espécie. Um estudo biológico de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia franciscana* realizado com extratos de *B. multiflora*, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou que o extrato metanol não possui toxicidade (QUIGNARD *et al.*, 2003).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bocageopsis multiflora é uma planta aromática que ocorre em toda a Amazônia, de preferência em floresta primária e floresce durante os meses de julho a setembro (LORENZI, 2002). A hidrodestilação das folhas coletadas em diferentes épocas (300g/extração) resultou em óleos essenciais de coloração verde-escuro e odor agradável.

Seus óleos essenciais apresentaram baixo rendimento na estação seca. Os rendimentos dos óleos obtidos das folhas frescas (Bm2ff) e secas (Bm2fs) foram de 0,04% e 0,27%,

enquanto no óleo oriundo das folhas frescas na estação chuvosa (Bm1ff) foi de 0,31% (Tabela 12). A rotação óptica do óleo de Bm1ff foi de $[\alpha]_D^{25} = 28,8^\circ$ (c=1, MeOH).

Tabela 12: Rendimento (%) dos óleos essenciais de *Bocageopsis multiflora*

	Abril 2010	Setembro 2010
Folha fresca	0,31	0,04
Folha seca	-	0,27

A análise por CCD utilizando os padrões bisabolol (B), óxido de cariofileno (Ox), *trans*-cariofileno (E) e guaiol (G) nas mesmas condições descritas no capítulo II (página 51), mostrou que os óleos obtidos da estação seca (Bm2) possuem uma substância em comum (destaque na placa) que não estava presente no óleo da estação chuvosa (Bm1ff). Na análise do cromatograma foi observado que os três óleos de *B. multiflora* apresentaram uma substância com o mesmo Rf do óxido de cariofileno. Entretanto, a comparação com os padrões bisabolol e guaiol mostrou que não existem nos óleos substâncias que possuem o mesmo Rf desses sesquiterpenos. O *trans*-cariofileno, por comparação com outras análises por CCD, pode ser a substância que mais eluiu na cromatoplaça (Figura 51).

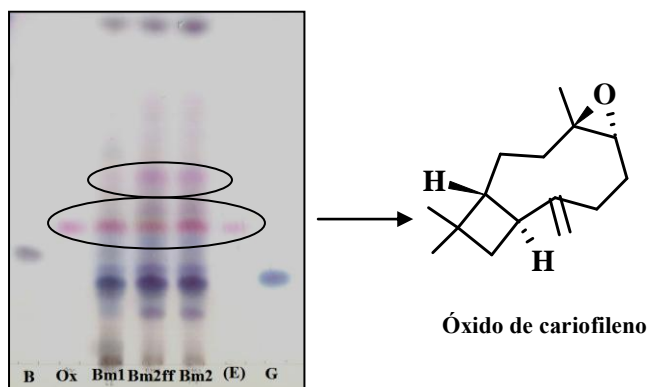


Figura 51: CCD dos óleos de *Bocageopsis multiflora* com os padrões óxido de cariofileno, bisabolol e guaiol.

Os resultados da análise dos óleos essenciais por CG-EM estão apresentados na Tabela 13. No total, foram identificados 28 componentes e os resultados mostraram que os óleos dessa espécie são ricos em sesquiterpenóides. Comparando os óleos das folhas frescas coletados nas estações distintas, foi verificado um decréscimo de 5,71% de sesquiterpenos hidrocarbonetos na segunda coleta, enquanto que em Bm1ff o teor foi de 48,57%, o de Bm2ff foi de 42,86%. A análise dos sesquiterpenos oxigenados nos dois óleos mostrou que houve um pequeno aumento para Bm2ff de 0,68%. A proporção desses constituintes em Bm1ff foi de 38,77%.

Tabela 13: Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas de *Bocageopsis multiflora*.

Constituintes	IR	Bm1ff	Bm2ff	Bm2fs
4-acetil-1-metilciclohexano	1169	1,00	2,46	1,04
Sesquiterpenos				
dideidro-cicloisolongifoleno	1317	0,48	0,67	1,08
α -copaeno	1377	4,34	3,97	4,25
β -bourboneno	1387	1,28	1,36	1,36
β -elemeno	1389	-	-	0,59
<i>trans</i> -cariofileno	1423	6,07	5,47	7,28
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1432	8,96	9,35	8,72
α -humuleno	1452	-	-	0,82
β -selineno	1489	3,37	-	3,51
α -selineno	1498	1,44	-	2,02
β -bisaboleno	1505	13,21	13,82	12,95
<i>cis</i> - α -bisaboleno	1506	2,73	3,10	4,94
δ -cadineno	1522	2,09	1,04	3,38
1s- <i>cis</i> -calamen	1528	1,73	1,03	1,84

α -calacoreno	1544	1,02	1,02	0,88
β -vetiveneno	1554	-	-	0,96
germacreno B	1559	-	-	1,63
espatulenol	1577	12,96	16,21	10,34
óxido cariofileno	1582	12,62	10,73	8,68
epóxido de humuleno II	1608	1,34	2,00	1,72
calareno	1638	1,85	2,03	1,53
cariofila-4(12),8(13)-dien-5-ol	1639	1,65	1,74	0,92
cubenol	1645	1,82	1,86	0,77
iso-espatulenol	1675	3,28	3,75	2,55
mustacona	1676	1,30	-	-
cariofilenol-II	1712	2,65	1,90	1,96
criptomeriona	1724	1,15	1,26	0,74
ácido hexadecanóico	1969	-	-	0,76
Classes de terpenóides				
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		48,57	42,86	57,74
Sesquiterpenos oxigenados		38,77	39,45	27,68
Outros compostos		1,00	2,46	1,80
Total		88,34	84,77	87,22

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcanos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Bm1 (abril 2010), Bm2 (Setembro/2010).

As Figuras 52, 54 e 55 apresentam os cromatogramas de CG-EM dos óleos de Bm1ff, Bm2ff e Bm2fs, respectivamente. Entre os sesquiterpenos hidrocarbonetos dos óleos de *B. multiflora*, *trans*-cariofileno, *trans*- α -bergamoteno e β -bisaboleno foram os constituintes. Em Bm1ff, o teor desses sesquiterpenos foi de 6,07, 8,96 e 13,21%, respectivamente. Em Bm2ff, a proporção do *trans*-cariofileno foi de 5,47%, do *trans*- α -bergamoteno (9,35%) e do

β -bisaboleno foi de 13,82%, enquanto que em Bm2fs foram encontrados na porcentagem de 7,28; 8,72 e 12,95%, respectivamente.

Esses resultados mostraram que mesmo em épocas distintas, a variação desses constituintes principais não foi significativa. Esse mesmo fato foi observado para os sesquiterpenos oxigenados majoritários nos óleos das três coletas, o espatulenol e óxido de cariofileno. Em Bm1ff, foram encontrados na proporção de 12,96 e 12,62%, enquanto que em Bm2ff, o teor foi de 16,21 e 10,73%, respectivamente.

Alguns dos constituintes químicos presentes nos óleos de *B. multiflora* tais como o *trans*-cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno, também já foram identificados em outras espécies da família Annonaceae dos gêneros *Annona*, *Duguetia* e *Guatteria* (COSTA *et al.*, 2008b; COSTA *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2011; VALTER *et al.*, 2008).

O pico 9 do cromatograma da figura 52, com tempo de retenção de 34,97 min foi relacionado ao sesquiterpeno β -bisaboleno (C₁₅H₂₄). Esse sesquiterpeno foi identificado após comparação com espectro de massas do aparelho e dados da literatura (ADAMS, 2009) e apresentou massa molecular igual a 204 daltons e área de 13,21% (Figuras 52 e 53).

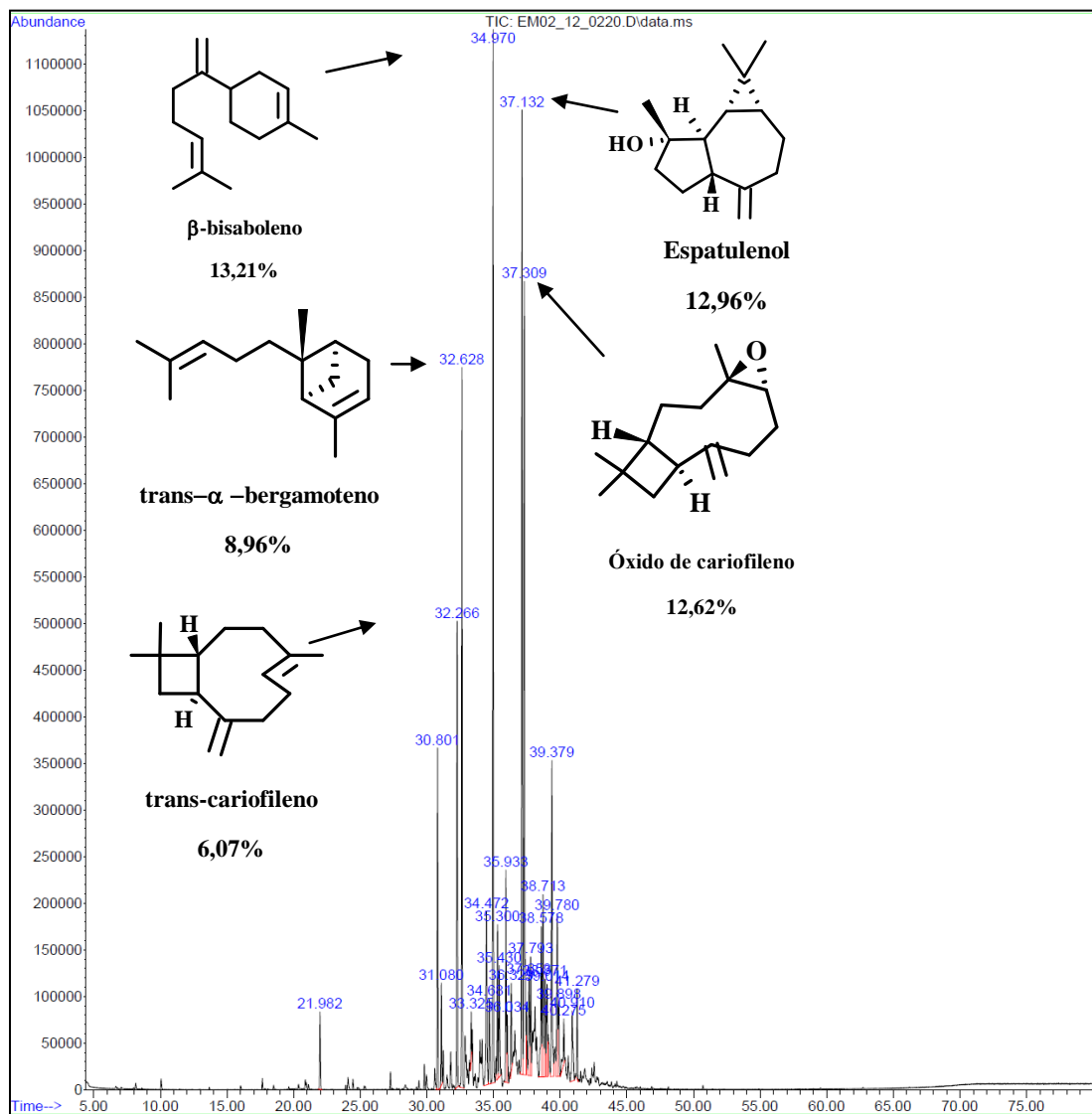


Figura 52: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Bocageopsis multiflora* na estação chuvosa.

No espectro de massas (Figura 53) foi observado o pico m/z 69 [M-135] correspondente à fórmula C_5H_9 resultante de clivagem bialfílica, mostrada no Esquema 11 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). O pico m/z 95 [M-109] é explicado como uma estrutura de fórmula C_7H_{11} resultante da perda de C_8H_{13} por clivagem, seguido do pico m/z 93 [M-109-2] proveniente da perda de dois elétrons.

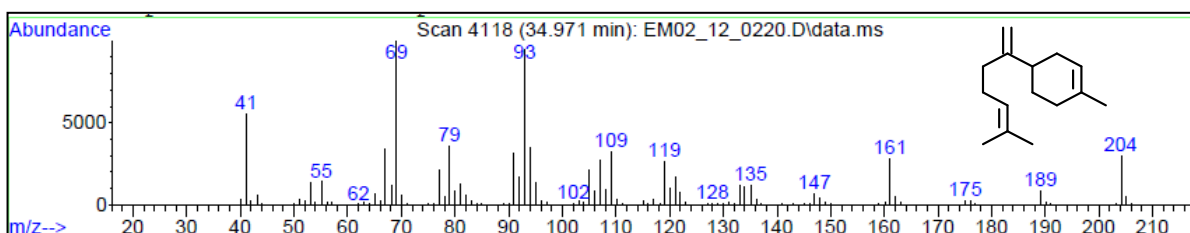
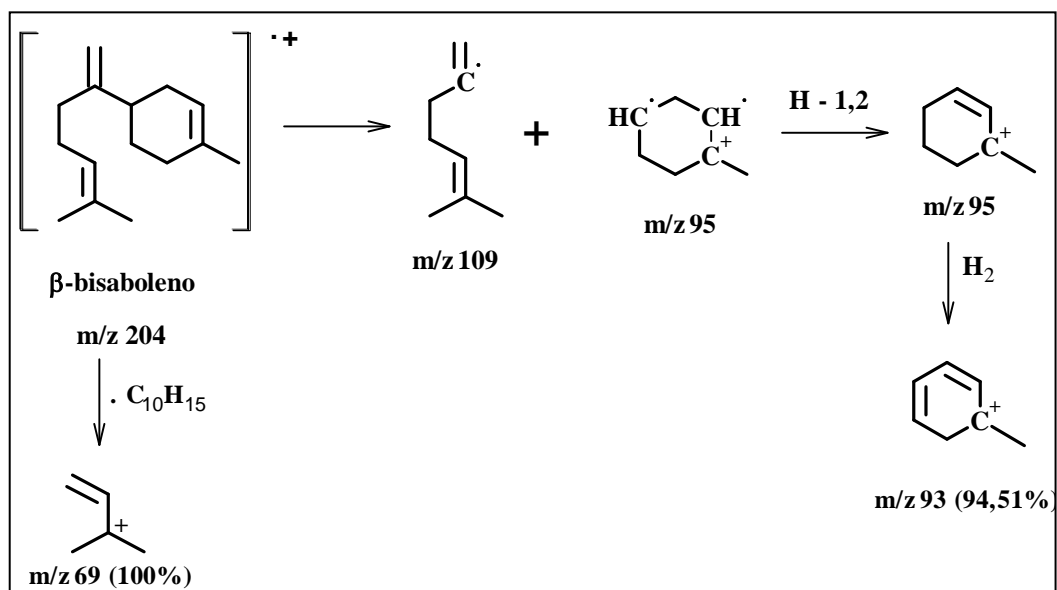


Figura 53: Espectro de massas do composto β -bisaboleno.



Esquema 11: Proposta de fragmentação do β -bisaboleno.

Fonte: SILVERSTEIN *et al.*, 2007.

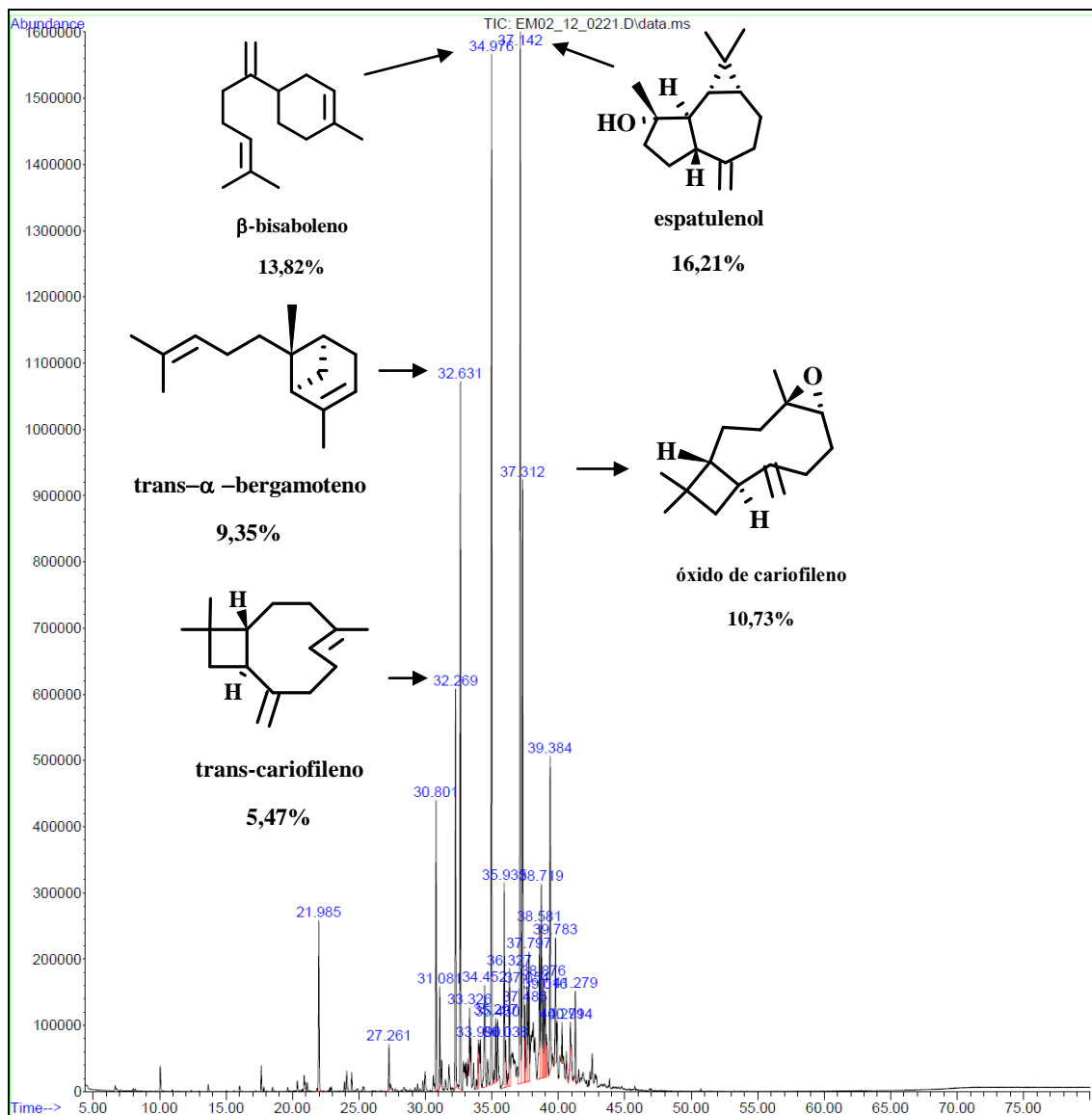


Figura 54: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Bocageopsis multiflora* na estação seca.

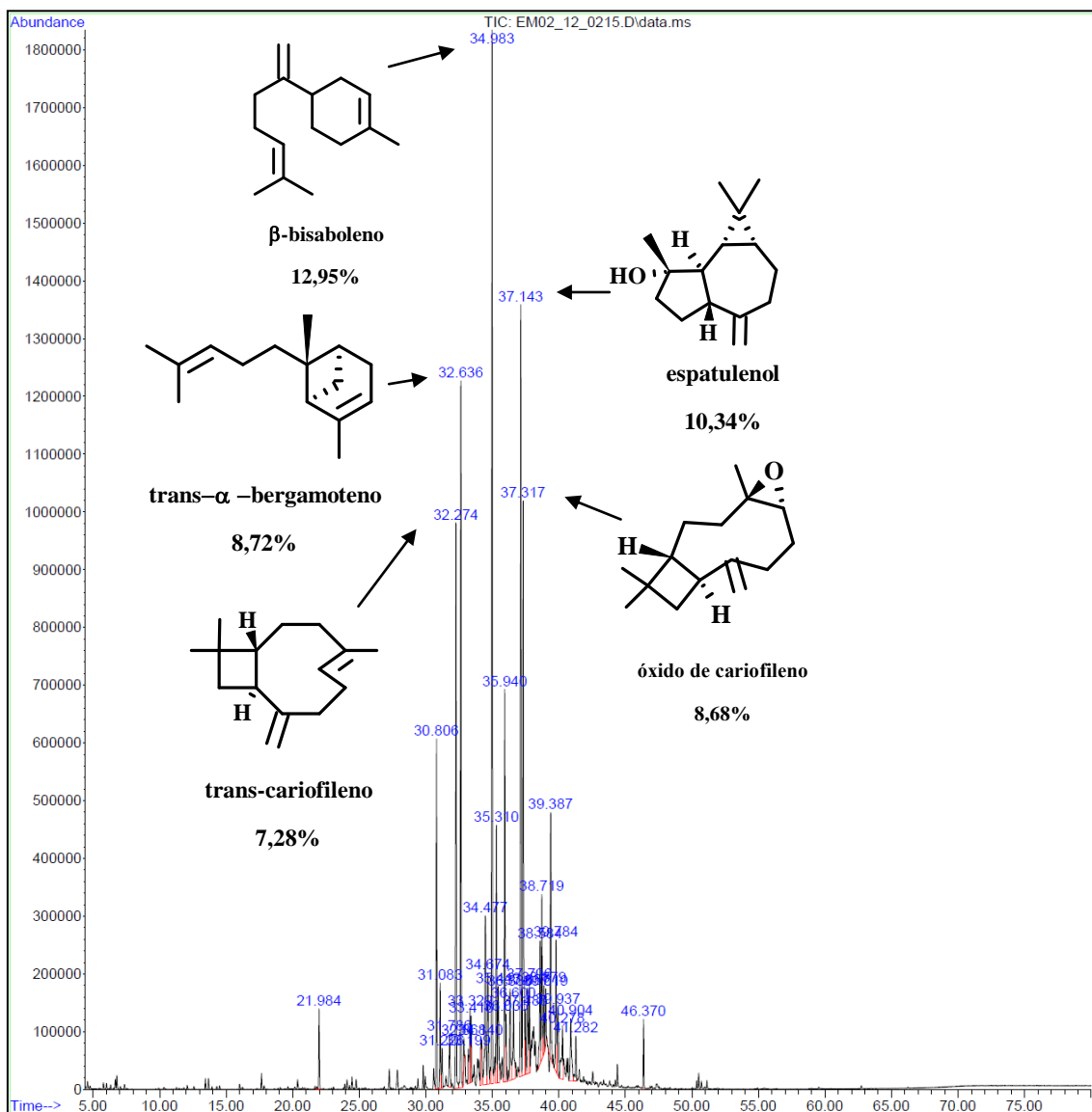
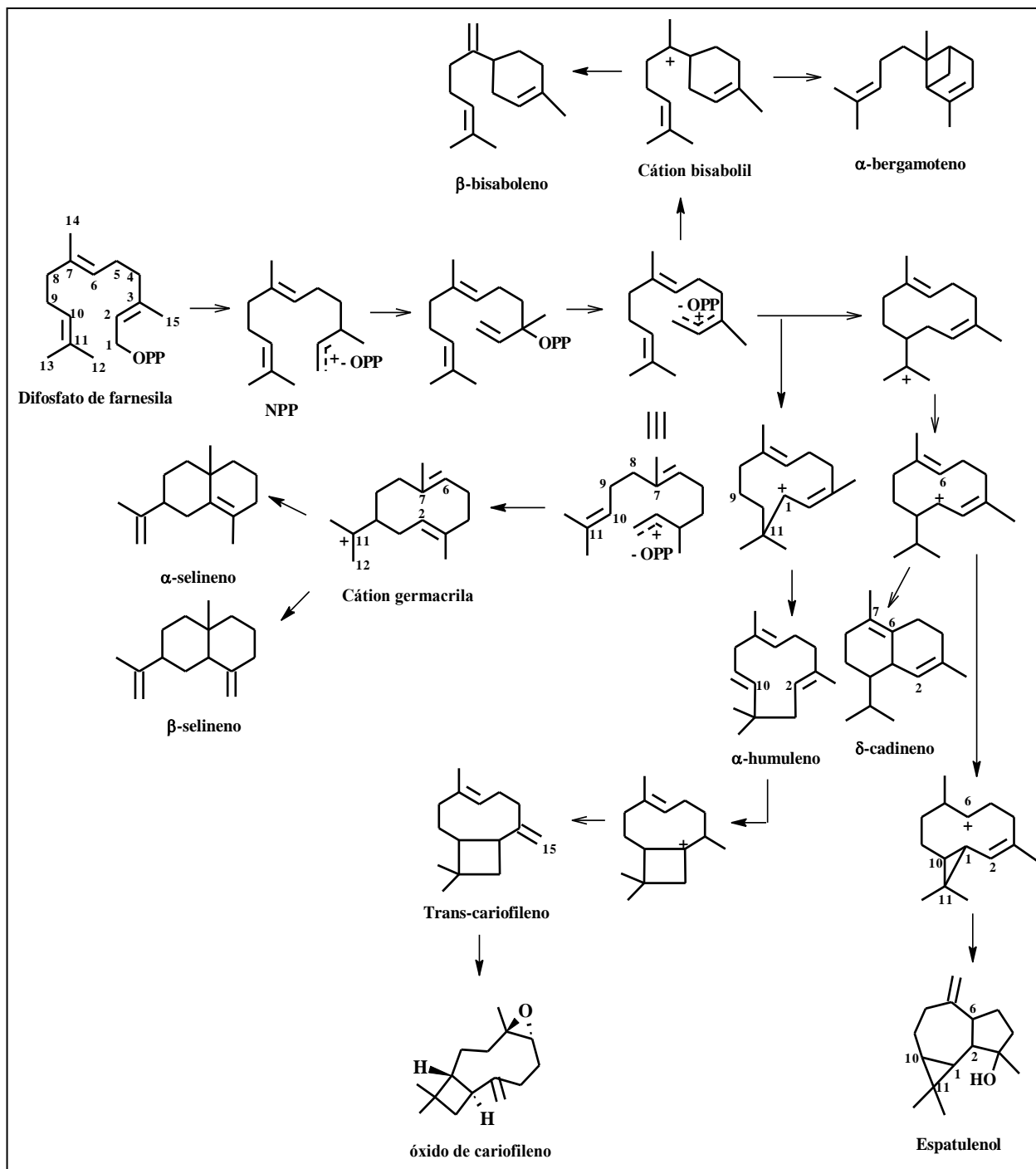


Figura 55: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Bocageopsis multiflora* na estação seca.

Com base na literatura, uma possível rota biossintética dos sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais de *B. multiflora* foi proposta no Esquema 12.

O difosfato de nerolidil (NPP), um intermediário do precursor dos sesquiterpenos (FPP), origina o cátion bisabolil por meio de clivagem eletrofílica entre C6 e C1 (DEWICK, 2002). O β -bisaboleno é resultante da desprotonação desse cátion em C14. Sallaud *et al.* (2009) sugeriram a formação do α -bergamoteno a partir da ciclização do cátion bisabolil em C7-C2 e desprotonação em C-4. A literatura sugere que o primeiro passo para a formação do

δ -cadineno é a ciclização C1-C10, seguido do fechamento do anel em C1-C6 (DEGENHARDT *et al.*, 2009). A possível formação do espatulenol pode ser desenvolvida a partir da ciclização em C1-10, C1-C11 e C6-C2, seguido de hidratação e desprotonação em C14. A oxidação do *trans*-cariofileno origina o óxido de cariofileno.



Esquema 12: Proposta de biossíntese dos compostos principais nos óleos de *Bocageopsis multiflora*.

Fonte: DEWICK, 2002; DEGENHARDT *et al.*, 2009; SALLAUD *et al.*, 2009.

CAPÍTULO V

ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS

DE *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) C. K. Allen

(LAURACEAE)

1. INTRODUÇÃO

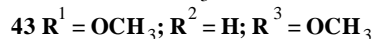
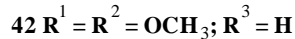
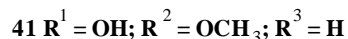
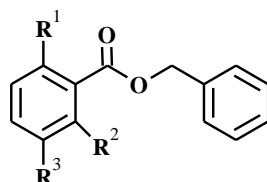
A família Lauraceae possui cerca de 2500 espécies distribuídas em 52 gêneros. Nas Américas há cerca de 29 gêneros e 900 espécies (VICENTINI *et al.*, 1999). A família é de grande importância econômica em todo o mundo e comum em florestas tropicais de altitude, com algumas espécies habitando em grandes altitudes, mas a grande diversidade ocorre nas terras baixas na Amazônia e América Central (VICENTINI *et al.*, 1999). Espécies de grande importância econômica são a *Persea americana* Mill. (abacate), *Cinnamomum verum* J. Presl (canela) e *Laurus nobilis* L. (louro). A casca do fruto ou do tronco de algumas espécies é utilizada como condimentos ou para fazer chá. Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies conhecidas popularmente como canela, sassafrás [*Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer] e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) (VICENTINI *et al.*, 1999; WERFF, 1991).

As espécies dessa família possuem alto valor comercial no mercado porque são aromáticas e produtoras de óleos essenciais (BRITO, 2009; MARQUES, 2001). A maioria das espécies é rica em metabólitos secundários, pertencentes a diferentes classes, tais como flavonóides, alcalóides do tipo aporfínico, benzilisoquinolínico e indólico, monoterpenos, sesquiterpenos, neolignananas e lignanas (GUTERRES, 2009; PABON e CUCA, *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais das espécies *Licaria canella* (Meisn.) Kosteim. e *A. canelilla* (Kunth) Mez da região amazônica apresentaram serem ricos em compostos benzênicos e baixos teores de monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA *et al.*, 2009). Já nos óleos essenciais de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees e *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán há uma predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (ALCÂNTARA *et al.*, 2010; DE ARAÚJO *et al.*, 2001). Nos óleos essenciais das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume coletada no município de Manaus, Amazonas, há a predominância do eugenol (60%) e nos óleos essenciais dos galhos foram identificados trinta e seis componentes, com predominância dos monoterpenos α - e β -pineno (9,9%; 3,5%); α -felandreno (9,2%); *p*-cimeno (6,2%); limoneno (7,9%); linalol (10,6%); os sesquiterpenos α -copaeno (3,3%); trans-cariofileno (6,7%); óxido de cariofileno (3,1%) e os alilbenzenos (*E*)-cinamaldeído (7,8%) e acetato de (*E*)-cinamila (9,7%) (LIMA *et al.*, 2005). O óleo essencial de *L. nobilis* foi caracterizado pela presença do monoterpeno oxigenado 1,8-cineol como constituinte principal (MULLER-RIEBAU *et al.*, 1997).

A espécie *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) C. K. Allen, popularmente conhecida como louro (FONSECA *et al.*, 2005), é uma árvore mediana frequentemente encontrada em solos arenosos no norte da América do Sul (VICENTINI *et al.*, 1999). As folhas maceradas, embebidas em água fria e espremidas em uma decocção fervendo serve como ingrediente numa mistura de curare feito pela tribo do Suriname, Tirio de Kwamala (DEFILIPPS *et al.*, 2004).

Este trabalho é o primeiro estudo de análise da composição química do óleo essencial das folhas desta espécie e há poucos estudos químicos com este gênero. Um estudo com *E. dysodantha* (Ruiz & Pav.) Mez (Peru) levou ao isolamento de quatro derivados de benzoato de benzila e que foram bioativos frente à *Artemia salina*: 2-hidroxibenzoato de benzila (**40**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de benzila (**41**), 2,6-dimetoxibenzoato de benzila (**42**) e 2,5-dimetoxibenzoato de benzila (**43**) (MA *et al.*, 1991).



2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrodestilação das folhas de *E. bracteolata* resultou em óleos incolores. Os rendimentos dos óleos voláteis da espécie estão representados na Tabela 14. As folhas da espécie foram coletadas em abril (Eb1) e setembro (Eb2) de 2010. Devido no mês de abril ter fornecido um bom rendimento de óleo a partir das folhas frescas, também foi extraído o óleo das folhas secas no mês de setembro.

A correlação dos dados (INMET, 2012) permitiu aferir que houve o favorecimento de maior produção de óleo das folhas nos meses de alta precipitação (Tabela 14). A rotação óptica do óleo de Eb1ff (folhas frescas) foi de $[\alpha]_D = 41,2^\circ$ ($c = 1$, MeOH, 27°C).

Tabela 14: Rendimento (%) dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Endlicheria bracteolata*

	Eb1	Eb2
Folha fresca	1,01	0,38
Folha seca	-	1,72

Eb1 (abril 2010), Eb2 (Setembro 2010)

Os resultados da análise cromatográfica dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas (ff) e secas (fs) de *E. bracteolata* estão apresentados na Tabela 15.

A análise por CG-EM permitiu a identificação acima de 94% dos constituintes dos óleos analisados de *E. bracteolata*. Um fato interessante foi a presença de um precipitado incolor durante o processo de extração e armazenamento do óleo extraído no mês de abril (Eb1).

A análise por CG-EM de Eb1ff mostrou um perfil cromatográfico diferente do óleo obtido na estação seca, com 73,75% de sesquiterpenos oxigenados, sendo os mais abundantes o guaiol (46,45%) e 10- γ -epi-eudesmol (17,91%) (Figura 56).

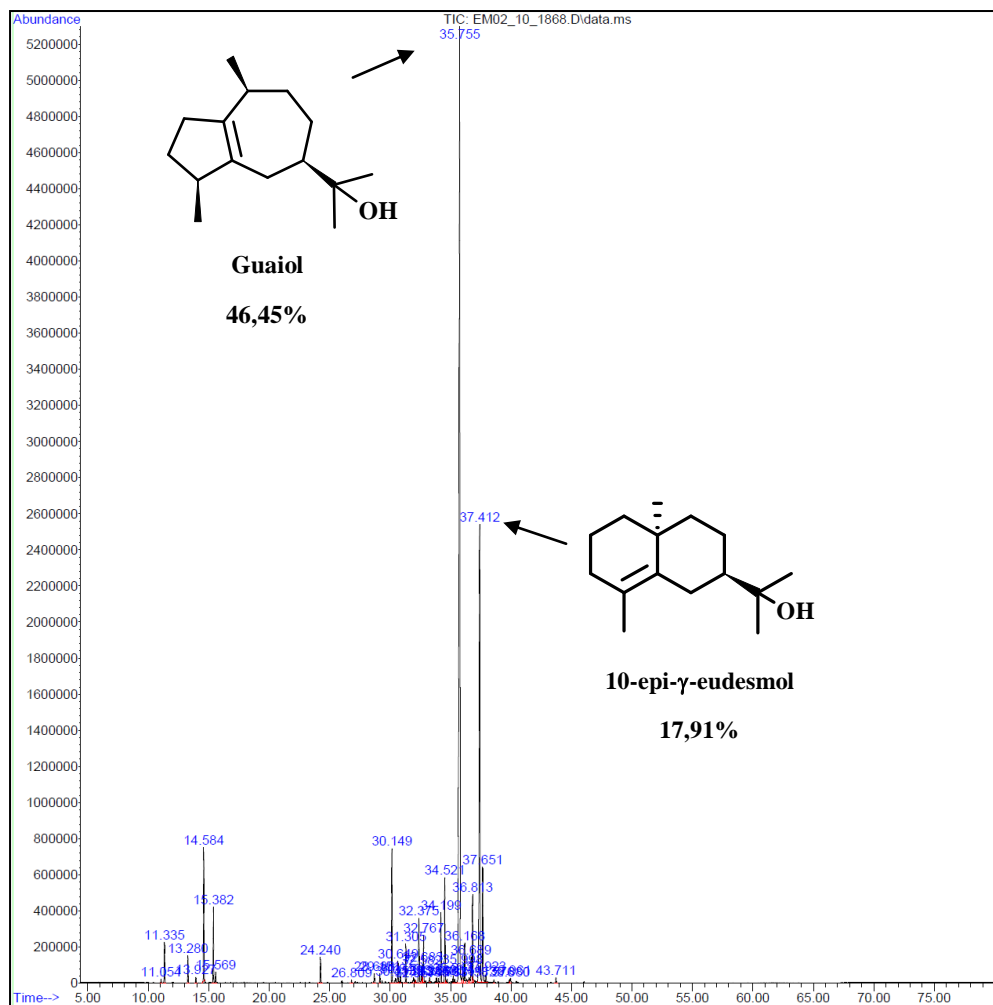


Figura 56: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Endlicheria bracteolata* na estação chuvosa.

No espectro de massas (Figura 57) do guaiol, foi observado o pico m/z 204 [M-18] correspondente à perda de água. Os álcoois terpênicos que contem grupo metila como ramificações mostram com frequência, um pico razoavelmente intenso em M-33 resultante da perda de CH_3 e H_2O , o que corresponde ao fragmento m/z 189 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A migração de hidreto 1,3 em m/z 204 e posterior perda do grupo CH_3 e C_2H_4 resultou no fragmento do pico base, m/z 161 (Esquema 13).

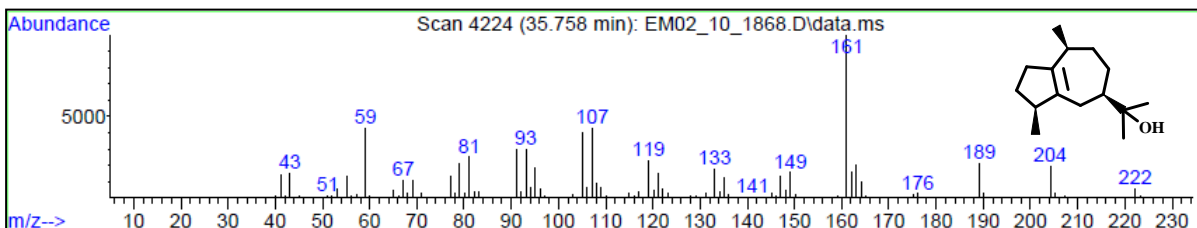
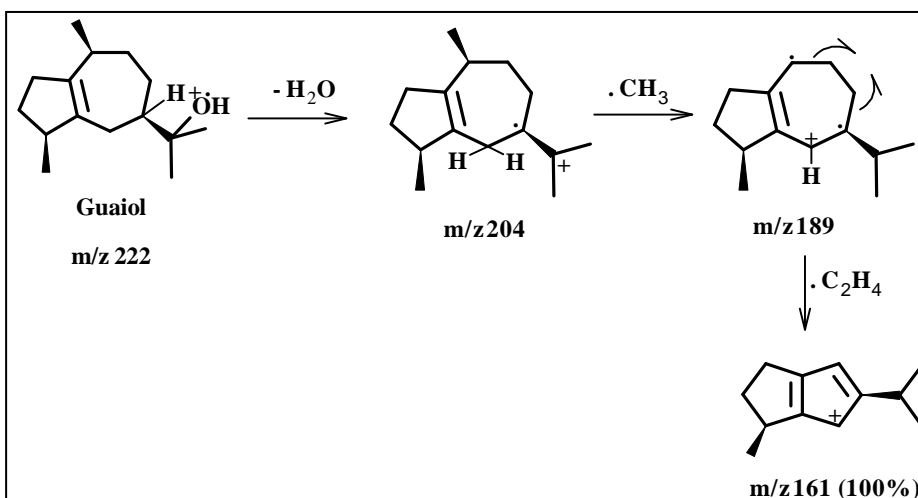


Figura 57: Espectro de massas do pico 31 do cromatograma da Figura 56.



Esquema 13: Proposta de fragmentação do guaiol.

O pico 37, com tempo de retenção de 37,41 min (Figura 56), correspondeu ao sesquiterpeno 10- γ -epi-eudesmol, de massa igual a 222 daltons, compatível com a fórmula molecular C₁₅H₂₆O. O sinal m/z 204 foi atribuído ao pico base proveniente da perda de água [M-18] (Figura 58). Um pico razoavelmente intenso em M-18-15 [m/z 189] pode ser explicado pela eliminação de água e posterior perda do grupo metila, originando um cátion radical estável. Já o pico m/z 161 [M-18-15] foi associado à perda de C₂H₄ (Esquema 14).

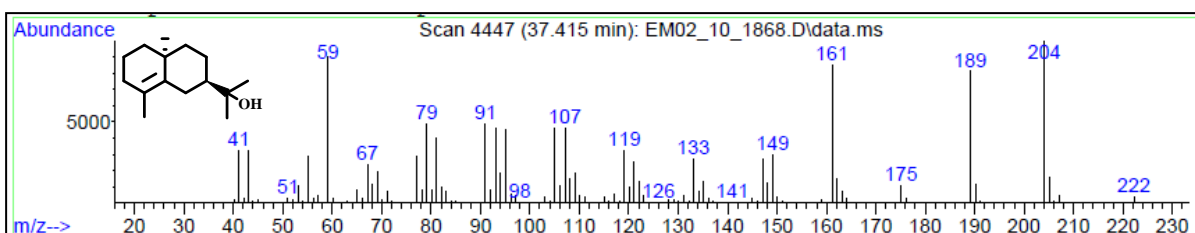
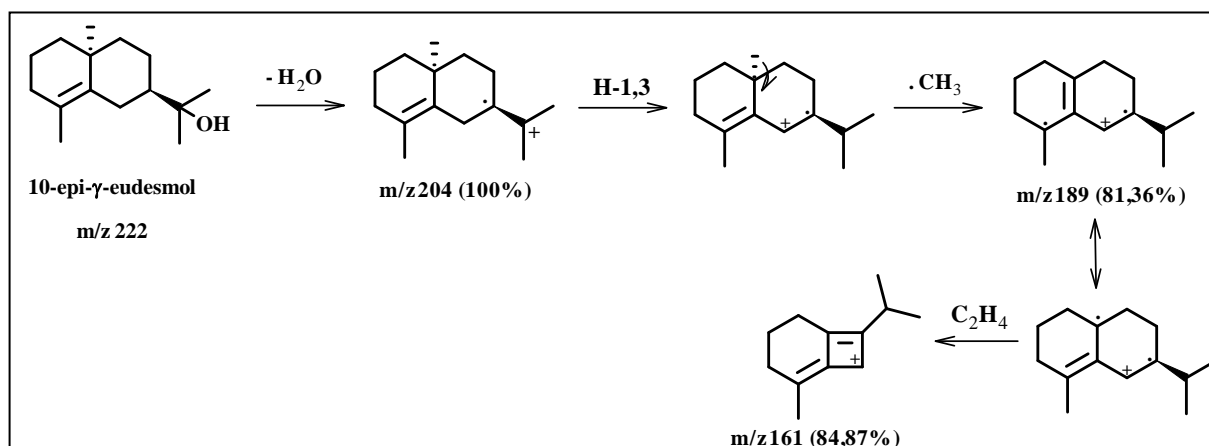


Figura 58: Espectro de massas do pico 37 do cromatograma da Figura 56.



Esquema 14: Proposta de fragmentação do 10- γ -epi-eudesmol.

Conforme a Tabela 15, os teores de sesquiterpenos hidrocarbonetos foram mais elevados na estação seca. Em Eb2ff, o teor foi de 81,50%, enquanto que em Eb2fs foi 94,60%. Os componentes majoritários em ambos os óleos foram o *trans*-cariofileno (21,21% - 23,23%), viridifloreno (17,53% - 16,88%) e α -bulneseno (13,72% - 21,06%). Os cromatogramas de CG-EM de Eb2ff e Eb2fs estão apresentados nas Figuras 59 e 60.

Tabela 15: Composição química (%) dos óleos essenciais de *Endlicheria bracteolata*

Constituintes	IR	Eb1ff	Eb2ff	Eb2fs
Monoterpenos				
α -tujeno	938	0,10	-	-
α -pineno	939	1,11	6,00	2,20
α -fencheno	952	-	0,12	-
canfeno	954	-	0,27	0,07
β -pineno	980	0,74	2,94	1,20
mirreno	992	0,13	0,28	-
α -felandreno	1009	3,45	-	-
ρ -cimeno	1024	1,98	-	-
limoneno	1030	0,28	0,63	0,15
γ -terpineno	1059	-	0,03	-
α -terpinoleno	1088	-	0,13	-
α -terpineol	1186	-	0,28	-
Sesquiterpenos				
isoleveno	1374	-	2,40	0,16
α -ilangeno	1375	-	0,14	0,16
α -copaeno	1377	0,24	2,59	2,89
β -patchouleno	1381	-	0,09	-
β -elemeno	1390	0,51	0,83	0,86
cipereno	1398	-	0,16	0,16
β -isocomeno	1408	-	0,39	-
β -ilangeno	1420	-	0,12	0,11
<i>trans</i> -cariofileno	1423	3,80	21,21	23,13
β -copaeno	1432	-	1,13	-
β -gurjuneno	1433	0,29	0,22	0,09
γ -elemeno	1436	0,18	-	-
α -guaieno	1438	0,58	6,40	7,44
aromadendreno	1441	0,21	0,17	0,16

premnaspirodieno	1451	0,23	-	2,52
α -humuleno	1454	-	2,27	2,49
amorfa-4,7(11)-dieno	1455	-	-	1,05
α -patchouleno	1456	-	2,08	-
allo-aromadendreno	1460	-	0,10	-
γ -selineno	1474	-	-	5,98
γ -gurjuneno	1477	-	0,89	0,54
germacreno D	1481	-	0,15	0,21
cis-eudesma-6,11-dieno	1489	-	-	0,44
β -selineno	1490	1,08	0,48	1,24
δ -selineno	1492	0,15	0,17	0,86
cis- β -guaieno	1494	-	-	0,51
viridifloreno	1496	0,10	17,53	16,88
α -selineno	1498	-	2,15	2,71
isodauceno	1499	0,51	-	-
α -muuroleno	1500	0,18	0,19	-
α -bulneseno	1512	1,30	13,72	21,06
δ -cadineno	1523	0,13	0,68	-
(z)-nerolidol	1532	-	0,23	0,23
trans-cadina-1,4-dieno	1533	-	-	0,18
α -cadineno	1538	-	0,04	2,77
selina-3,7(11)dieno	1542	0,14	0,05	-
elemol	1551	2,60	0,21	0,12
ocidentalol	1552	0,15	-	-
germacreno B	1556	3,03	4,83	-
álcool cariofilenil	1572	-	1,16	0,30
guaiol	1597	46,45	-	-
rosifoliol	1598	0,65	-	-
10-epi- γ -eudesmol	1622	17,91	0,32	-
γ -eudesmol	1632	0,99	0,32	-
α -muurolol	1646	-	0,31	-

pogostol	1651	-	1,87	-
α -eudesmol	1653	1,25	0,54	-
α -cadinol	1654	0,11	-	-
valerianol	1658	-	0,34	-
bulnesol	1671	3,75	-	-
Classes de terpenóides				
Monoterpenos hidrocarbonetos		7,79	10,40	3,62
Monoterpenos oxigenados		-	0,28	-
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		12,66	81,18	94,60
Sesquiterpenos oxigenados		73,86	5,30	0,65
Total		94,31	97,16	98,87

^aIR: Índice de Retenção baseado em uma série homóloga de n-alcanos. ff =folha fresca e fs = folha seca, Eb1 (abril/2010), Eb2 (Setembro/2010).

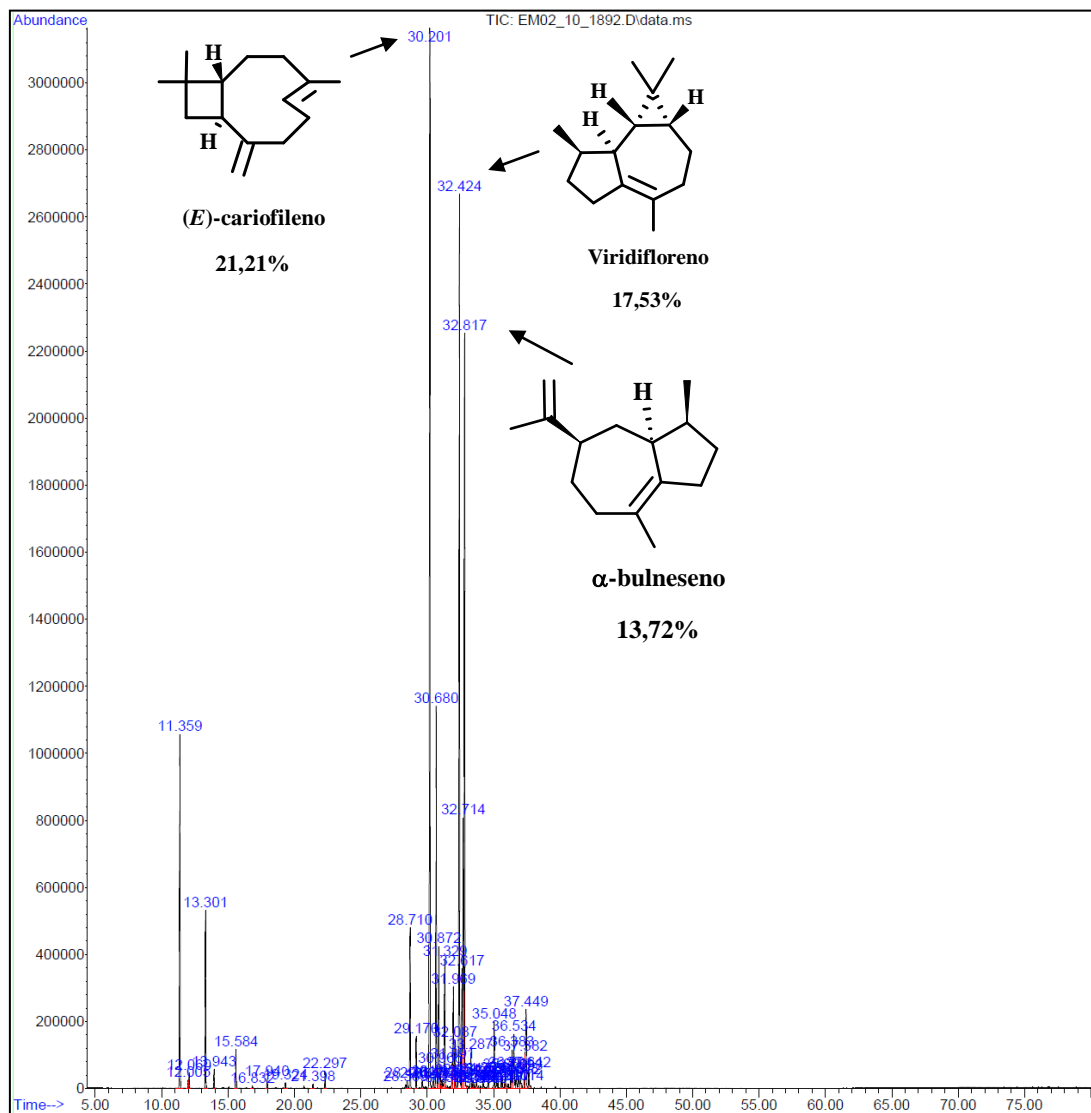


Figura 59: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas frescas de *Endlicheria bracteolata* na estação seca.

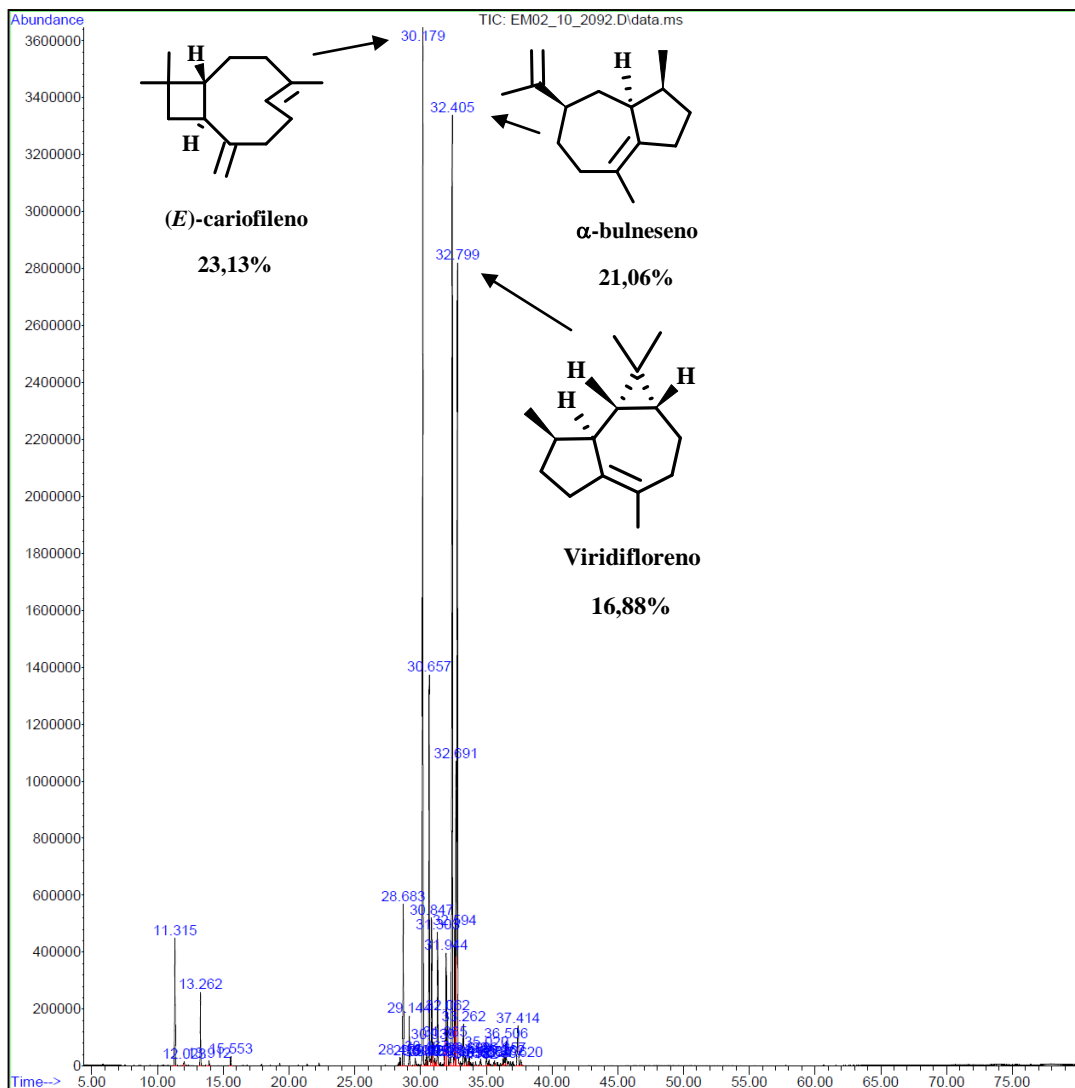


Figura 60: Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas secas de *Endlicheria bracteolata* na estação seca.

Algumas hipóteses podem justificar as diferenças observadas nos constituintes químicos dos óleos essenciais de *E. bracteolata*. Entre elas o fato de que as plantas, através de mecanismos de controle da rota biossintética, favorecem a produção de determinados constituintes, dependendo de suas necessidades (CHENG *et al.*, 2007). As condições climáticas também podem beneficiar a biossíntese de um constituinte terpenoídico de uma espécie vegetal, através do favorecimento de sua atividade enzimática (DE BARROS *et al.*, 2009).

Na observação visual das folhas coletadas em abril foi possível observar produção excessiva de microorganismos, aparentemente fungos, o que não foi observado nas folhas do mês de setembro onde ocorreu uma diminuição de microorganismos, provavelmente devido à temperatura mais elevada.

Esse fato pode contribuir na constituição dos componentes presentes no óleo obtido das folhas no mês de abril, devido a um mecanismo de resposta da planta, diretamente relacionado com sua defesa e proteção contra ataques por herbívoros ou infectada por fungo e bactéria (CHENG *et al.*, 2007). Na literatura há relatado que os tipos de defesa incluem estruturas físicas (tricomas e espinhos) e a acumulação de produtos químicos ou substâncias bioquímicas que tem atividade antibiótica ou de toxicidade (SOARES e MACHADO, 2007).

A presença do guaiol no óleo de *E. bracteolata* pode estar diretamente relacionada à defesa da planta contra microorganismos patogênicos, visto que a literatura comprovou que este sesquiterpênico é um eficaz antifúngico (RODILLA *et al.*, 2011).

Baseando-se no exposto, uma rota biossintética dos monoterpenos e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais de *E. bracteolata* foi elaborada com dados disponíveis na literatura e está apresentada no Esquema 15 (DEWICK, 2002; LOBO e LOURENÇO, 2007; TELASCREA *et al.*, 2007).

Os principais monoterpenos possuem estruturas dos tipos mentano e pinano originados a partir do cátion- α -terpinila (LOBO e LOURENÇO, 2007). Através do deslocamento de hidreto de C7 e C1 origina o carbocátion secundário felandril. Seguido do rearranjo de Wagner-Meerwein de C5 a C1 e perda de um próton em C4 forma o α -felandreno. O α e β -pineno surgem pela perda de diferentes prótons do cátion pinila, produzindo duplas ligações como cíclica ou exocíclica, respectivamente (DEWICK, 2002).

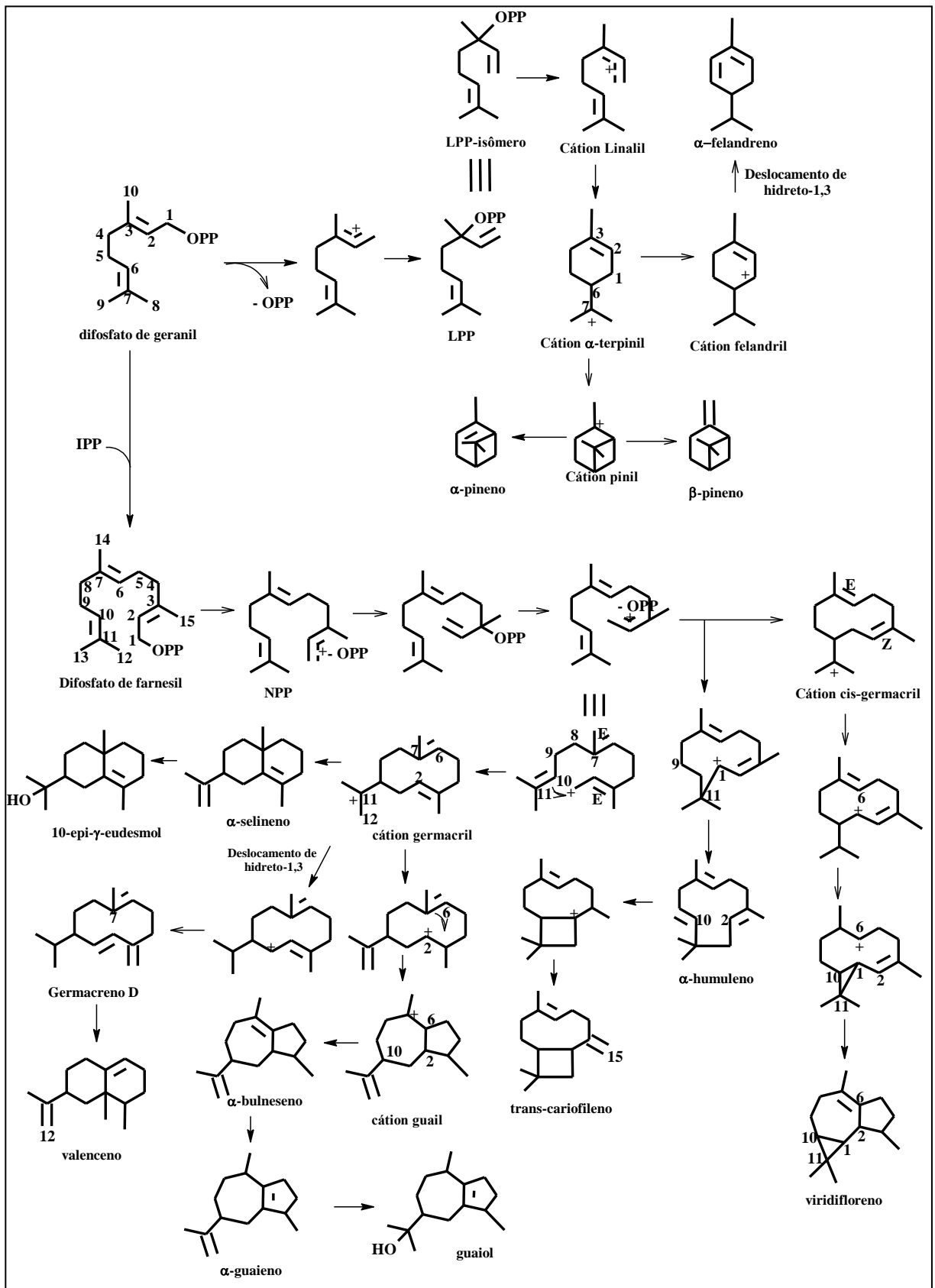
Concernente aos principais sesquiterpenos observa-se que pertencem a duas classes, a do tipo humuleno/cariofileno resultante da ciclização C1 a C10 do difosfato de farnesila

(precursor dos sesquiterpenos), e o tipo dos derivados do germacreno produzido pela ciclização C1 a C11 do precursor (TELASCREA *et al.*, 2007).

A partir do carbocátion intermediário germacrílico forma o α -selineno que seguido de hidratação gera o 10-epi- γ -eudesmol. O deslocamento de hidreto-1,3 do cátion germacril forma o germacreno D. Este com perda de próton em C12 e captura de próton C3 e C15, seguido de ciclização eletrofílica, e migração de grupo metil 1,2 em C7 e C2, forma o valenceno.

Com a perda de um próton em C2 e C12 do cátion germacrila e ataque intramolecular eletrofílico entre C6 e C2 gera o cátion guail, que por perda de um próton em C6 forma o α -bulneseno, seguido do α -guaieno e este por hidratação leva a formação do guaiol.

A partir do isômero do cátion germacril, a ciclização em C6-C2 e C11-C1 leva a formação do viridifloreno.



Esquema 15: Proposta biossintética dos compostos dos óleos de *Endlicheria bracteolata*.

Ao sólido pastoso de Eb1ff foi adicionado etanol/água (8:2) e a mistura resultante foi mantida no banho de ultrassom por 5min. Posteriormente, com a refrigeração da amostra, ocorreu a precipitação de um sólido cristalino, o qual foi filtrado e seco. O material obtido, codificado como Eb1ff-sólido, foi analisado por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 90 e 135.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 61 e 62) da amostra (Eb1ff-sólido) apresentou dois singletos para hidrogênio metílico em δ_{H} 1,16 (s, 3H) e δ_{H} 1,93 (s, 3H). Observou-se ainda sinais de dois dubletos em δ_{H} 0,95 (d, 3H, $J=6,85$) e δ_{H} 0,99 (d, 3H, $J=7,18$), um duplo duplo duplete em δ_{H} 1,29 (ddd, 1H, $J=4,88$; 9,55 e 13,92) e vários multipletos nas regiões entre δ_{H} 1,41 a δ_{H} 2,55 referentes aos hidrogênios metilênicos.

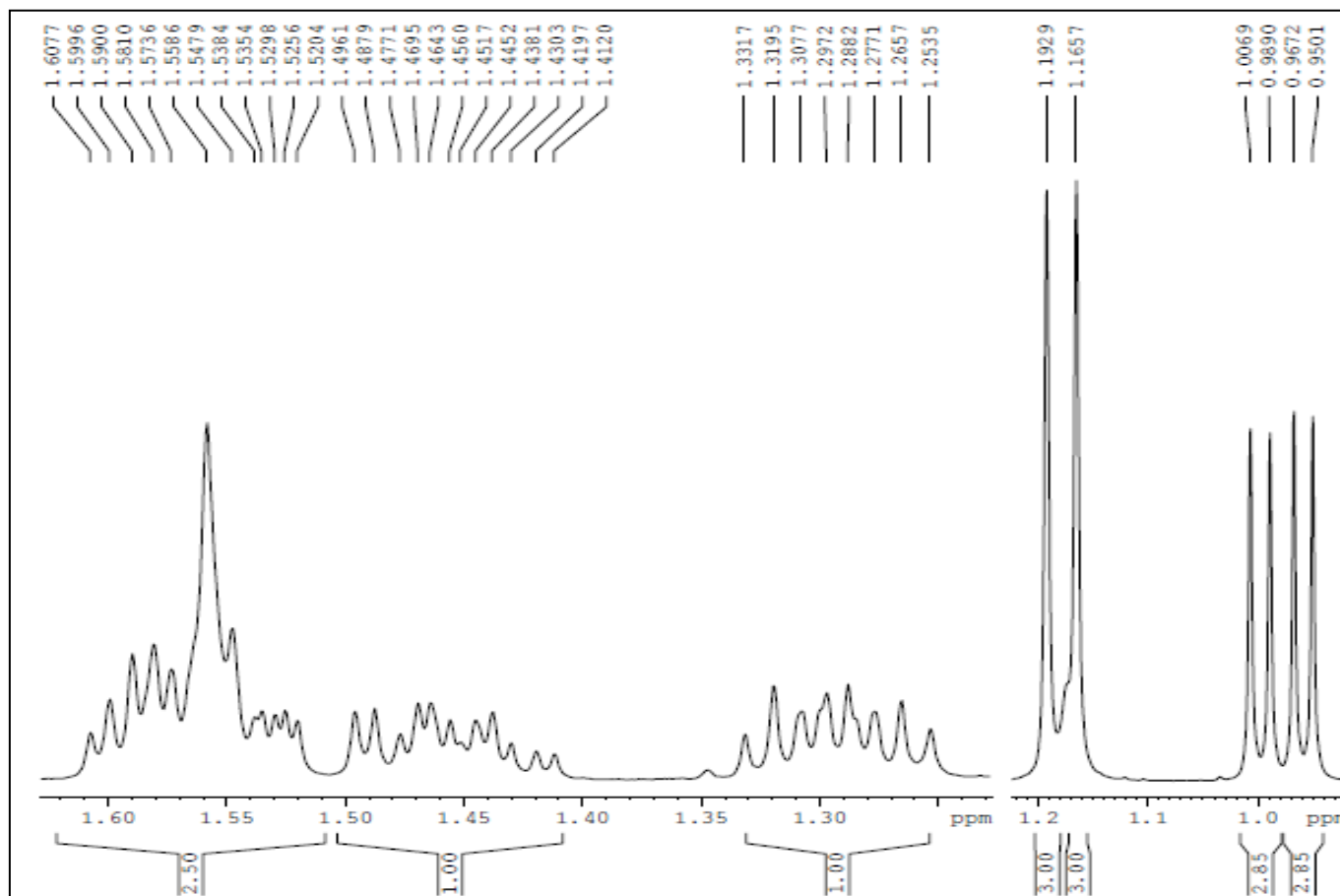


Figura 61: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de Eb1ff-sólido-parte I

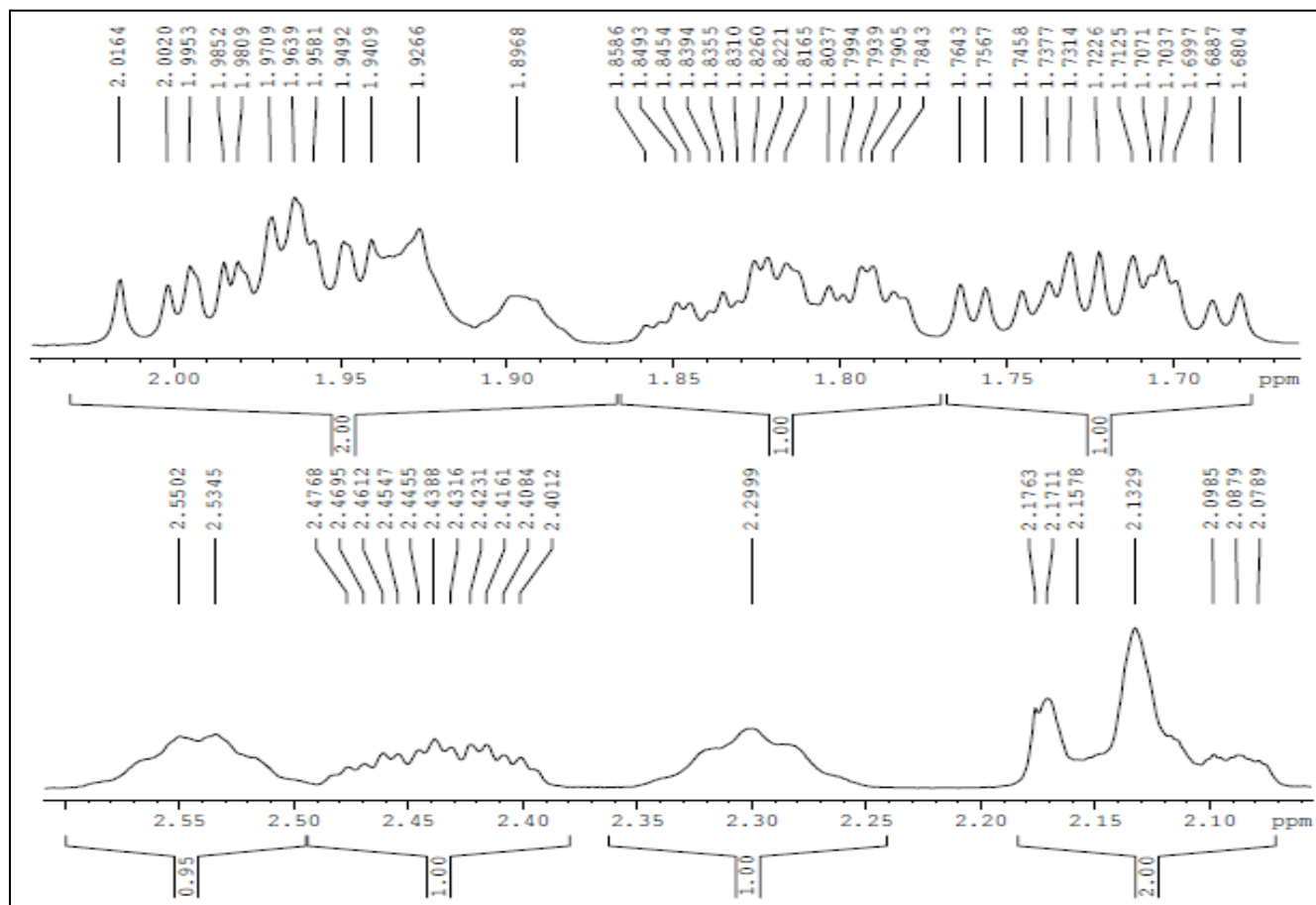


Figura 62: Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de Eb1ff-sólido-parte II

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 90 e 135 (Figuras 63-65) foram identificados 15 sinais, sendo três carbonos não hidrogenados, três de carbonos metínicos, cinco de carbonos metilênicos e quatro de carbonos metílicos. Os quatro primeiros carbonos foram observados 19,78; 19,86; 27,40 e 26,05 ppm e correlacionados aos carbonos metílicos. Os sinais 33,76; 46,34 e 46,64 ppm foram atribuídos aos carbonos metínicos. Os sinais para carbonos metilênicos foram observados em 27,36; 27,91; 31,02; 33,83 e 35,42 ppm. Os sinais observados em 138,90 e 140,07 ppm evidenciaram deslocamentos para carbonos quaternários ligados por dupla ligação. O sinal em 73,54 ppm é característico de carbono com grupo carbinólico e substituintes alquila.

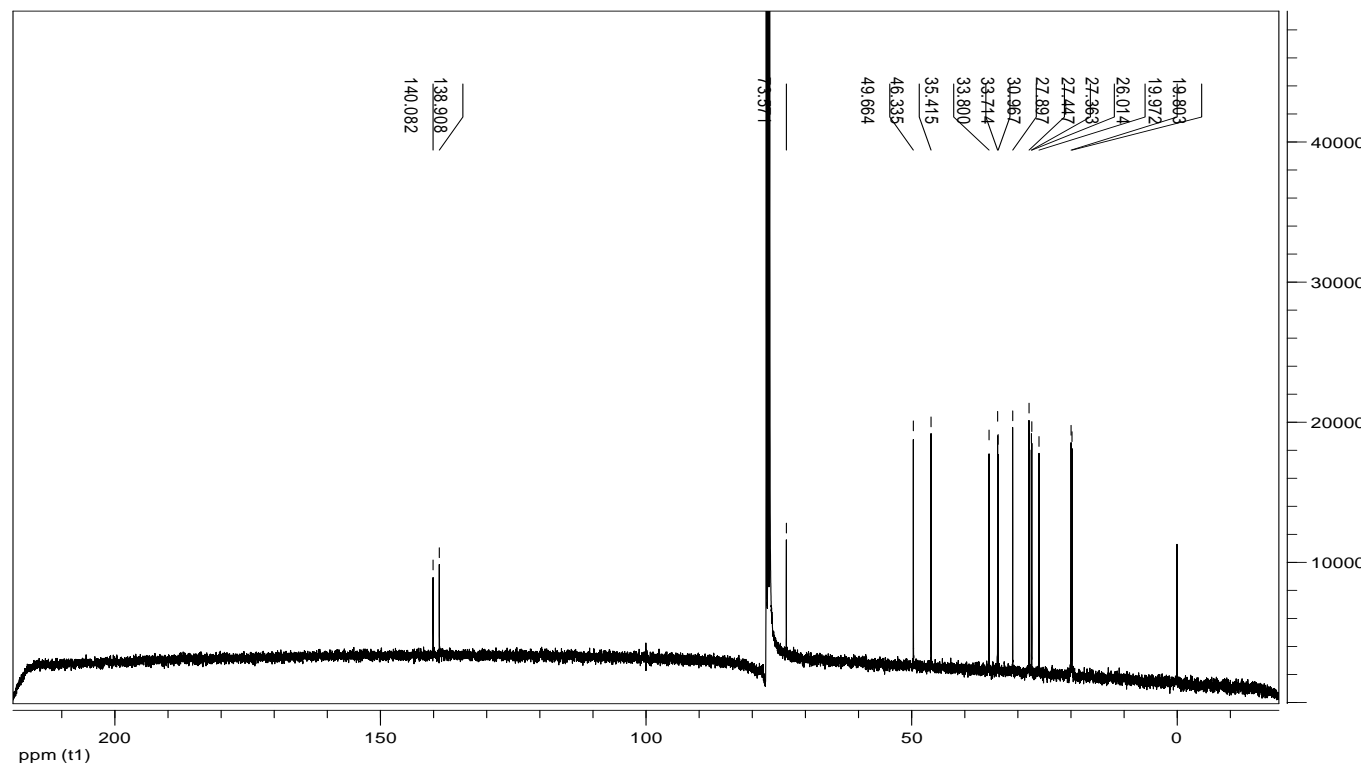


Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de Eb1ff-sólido.

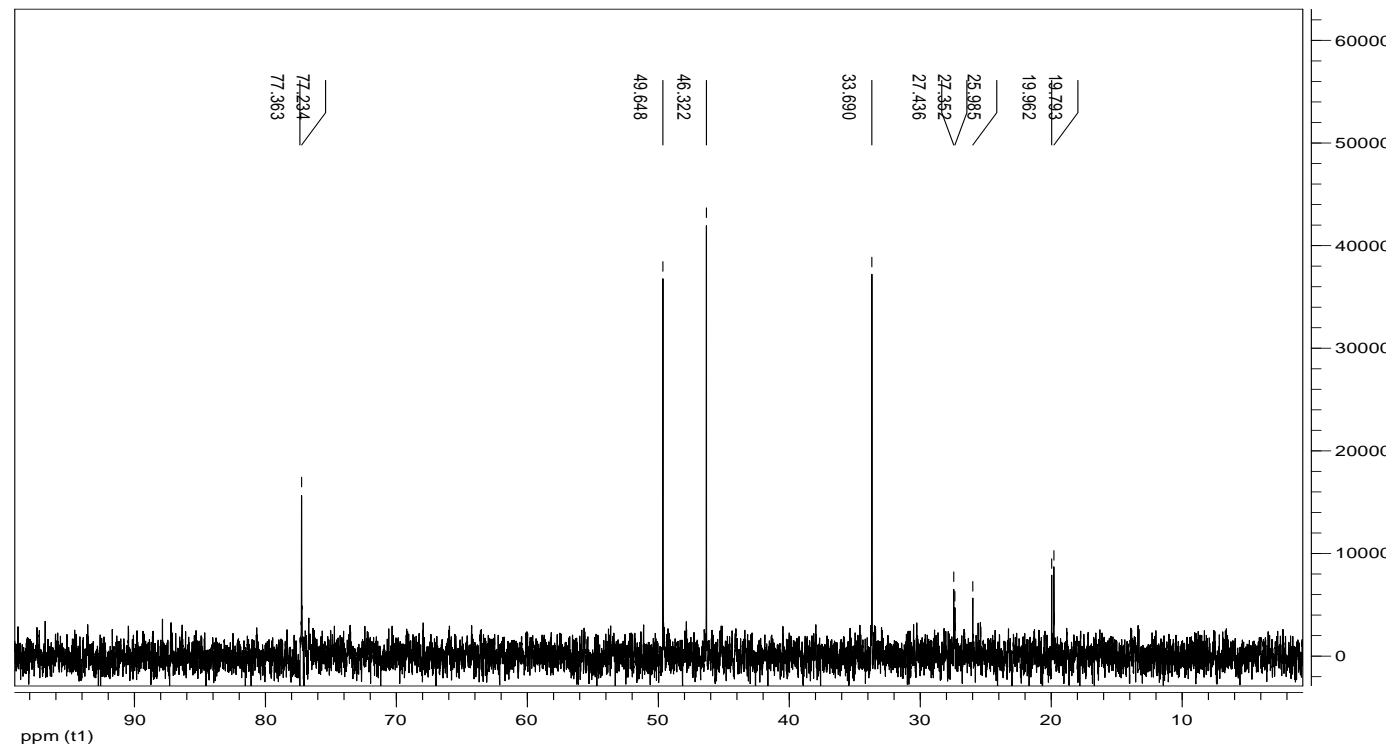


Figura 64: Espectro de DEPT 90 (CDCl₃, 100 MHz) de Eb1ff-sólido.

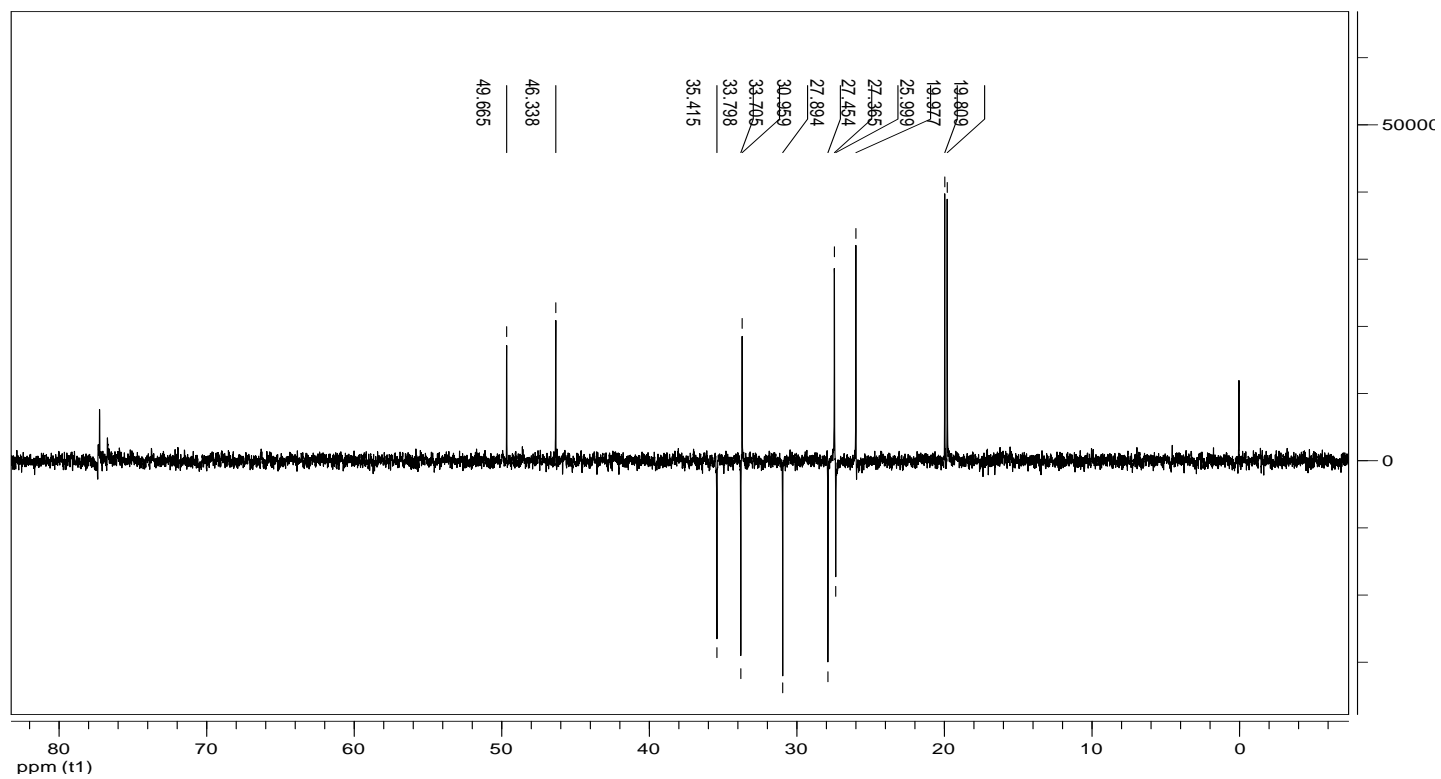
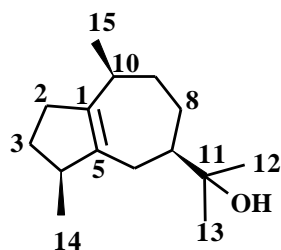


Figura 65: Espectro de DEPT 135 (CDCl₃, 100 MHz) de Eb1ff-sólido.

A comparação com os dados obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 16) e EM com os da literatura (RAHARIVELOMANA *et al.*, 1995) confirmaram a estrutura do sesquiterpeno guaiol.



Guaiol

Tabela 16: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do sesquiterpeno guaiol.

Posição	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)		^{13}C δ (ppm)	
	RAHARIVELOMANA <i>et al.</i> , 1995		RAHARIVELOMANA <i>et al.</i> , 1995	
	1		1	
1	-	-	140,08	140,05
2	2,40; 2,09	2,38; 2,05	35,41	35,42
3	1,97; 1,29 (ddd; 4,88; 9,55 e 13,92	1,95; 1,25	30,96	31,02
4	2,43	2,49	46,33	46,34
5	-	-	138,90	138,95
6	2,12; 1,85	2,10; 1,85	27,89	27,91
7	1,52	1,51	49,66	49,64
8	1,77; 1,45	1,71; 1,42	27,36	27,36
9	1,68; 1,55	1,68; 1,53	33,80	33,83
10	2,29 (m)	2,25	33,71	33,76
11	-	-	73,57	73,54
12	1,16 (s)	1,11	26,01	26,05
13	1,19 (s)	1,14	27,44	27,40
14	0,95 (d; 6,85)	0,91	19,97	19,86
15	0,99 (d; 7,18)	0,95	19,80	19,78

CAPÍTULO VI
ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

1. INTRODUÇÃO

Estudos químicos e imunofarmacológicos tem demonstrado que o efeito da redução das lesões causadas pela *Leishmania*, em camundongos é devido ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (ROMÃO *et al.*, 2007). No entanto, evidências experimentais comprovaram que o mecanismo que produz o NO, um radical pouco reativo, pode produzir o radical hidroxila, que é extremamente reativo (DE CAMPOS, 2003) e esse processo pode ser prejudicial à saúde, por causar a oxidação das células, levando a um desequilíbrio pela produção de radicais livres, podendo desenvolver diversas patologias tais como diabetes, câncer e aterosclerose (HUANG *et al.*, 2005). Um fornecimento de antioxidantes é necessário para recuperar o equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes (EDRIS, 2007).

Uma variedade de métodos está correntemente sendo utilizada para se determinar a capacidade antioxidante, por exemplo, a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas, como lipídeos e DNA, e métodos para avaliar a degradação de radicais (FERRONATO *et al.*, 2006). Tanto ensaios *in vivo* quanto *in vitro* são utilizados e todos têm suas próprias vantagens e limitações (BERG *et al.*, 1999). Porém deve-se ter em mente que não existe um método universal simples pelo qual esta atividade possa ser medida de forma precisa (FERRONATO *et al.*, 2006). Dentre os sistemas mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante utiliza-se o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). Esse radical apresenta coloração violeta e quando em contato com substâncias doadoras de hidrogênio, muda-se para a coloração amarelada.

Como existe relação no aumento da produção de radicais livres em lesões causadas pela *Leishmania*, testou-se a capacidade antioxidante dos óleos essenciais, como também, realizou-se o ensaio frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* de seis óleos essenciais que apresentaram expressiva atividade leishmanicida, em comparação ao padrão pentamidina, que apresentou concentração inibitória 50% (CI₅₀) de $3,0 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 20), visto que estudos realizados com óleos essenciais tem mostrado que esses podem ser uma fonte promissora de novas drogas anti-leishmania (COSTA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006).

Também, lignóides e neolignanas isoladas de espécies de Myristicaceae também são descritos como potenciais agentes contra *Leishmania*. As neolignanas surinamensina e virolina devido à boa atividade estão sendo usadas como base para a síntese de novas

substâncias anti-leishmania (BARATA *et al.*, 2000; MORAIS *et al.*, 2009). Portanto, um estudo leishmanicida com as amostras EBVMHex, VMHex, carinatina e deidrodieugenol isolados de *V. mollissima* foi realizado (Tabela 21).

Concernente à toxicidade dos óleos essenciais, realizou-se o ensaio da letalidade de organismos simples, com o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach, que permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982). Os valores de CL₅₀ (concentração letal 50%) encontrados para citotoxicidade em alguns tumores humanos sólidos, em geral, eram 1/10 dos valores de CL₅₀ encontrados nos testes realizados com *A. salina*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos. Com as amostras mais ativas, foi realizado o ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoniais murinos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ensaio antioxidante

A análise da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, localizado na Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brasil, coordenado pelo Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada conforme descrito por Souza *et al.* (2007a), com modificações. A solução estoque de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) foi preparada em etanol (2 mg/12mL) até que a solução apresentasse absorvância de 1,00 nm sob a proteção da luz. A mistura de reação foi composta por 100µL de solução de DPPH, 170 µL de etanol e 30µL dos extratos na concentração de 10 mg/mL dissolvidos em DMSO, realizou-se diluições sucessivas. A leitura das absorvâncias foi medida após 15min de reação no leitor de microplaca no método - leitor 540 nm DTX 800 multimode detectos Beckman Coulter. A atividade seqüestradora de radicais livres de cada amostra foi calculada mediante a porcentagem de inibição (AA) de DPPH pela Equação 1:

$$\%AA = 100 - (A/B) \times 100 \quad (1)$$

sendo (A) a diferença entre o branco e a amostra com DPPH e (B) a amostra controle. Para comparação do percentual de inibição, foi utilizada o padrão quercetina na concentração de 12,5 µg/mL.

2.2. Avaliação da toxicidade com *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade frente *A. salina* Leach dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Cromatografia, localizado na Universidade Federal do Amazonas, setor norte, Manaus-AM, Brasil, coordenado pelo Prof. Dr. Jefferson Rocha de A. Silva.

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer *et al* (1982), com modificações. Os cistos de *A. salina* foram incubados na solução salina (10 mg de cistos/100 mL de solução), sob iluminação artificial a 28°C. Após 24h foi transferido o primeiro estágio larval (náuplio) para outro aquário contendo solução salina mantendo uma nova incubação por mais 24h, sob iluminação artificial a 28°C. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de 10mg/mL em DMSO dos óleos essenciais diluindo-a para 1mg/mL em água salina. Posteriormente, foram adicionados nos primeiros tubos de ensaio 1000 µL, da solução diluída, realizando diluições sucessivas contendo 3,5 mL de solução salina em cada tubo. Foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*, em cada tubo, no volume de 500 µL. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 28°C (Esquema 16). Após 24h, foi realizada a contagem do número de larvas mortas e a concentração letal (CL50%) foi calculada utilizando o programa estatístico Probit. Para cada concentração testada foram realizadas análises em triplicata e o controle negativo foi conduzido paralelamente usando solução salina e DMSO. Só foram levadas em consideração as concentrações nas quais o controle negativo (DMSO) apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10% das larvas. O lapachol foi utilizado como controle positivo.



Esquema 16: Procedimento do teste de toxicidade com *Artemia salina*.

2.3. Ensaio leishmanicida e citotoxicidade em macrófagos

Os ensaios de atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e os de citotoxicidade em macrófagos não parasitados foram realizados no

Laboratório de Tripanossomatídeos, localizado na Fundação Oswaldo Cruz, 21040-360 Rio de Janeiro-RJ, Brasil, coordenado pela Dr. Leonor L. Leon.

Ensaio leishmanicida: Promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 66) (MHOM/BR/77/LTB0016) foram cultivadas a 26 °C em meio Schneider, em pH 7,2. Parasitas foram colhidos a partir do 4º dia, quando uma elevada percentagem de formas infectantes (promastigotas metacíclicas) foi encontrada. Depois de serem colhidas, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de 4×10^6 promastigotas/mL utilizando o sobrenadante de cada cultura como diluentes. As amostras foram dissolvidas em DMSO e posteriormente adicionadas aos parasitas em concentrações finais entre 80–2,5 µg/mL. Após 24h de incubação, os parasitas foram contados e comparados com os controles, contendo somente DMSO e parasitas. Isotionato de pentamidina foi usada como controle positivo. A concentração da amostra correspondente a 50% de inibição do crescimento do parasita foi expresso como CI_{50} .

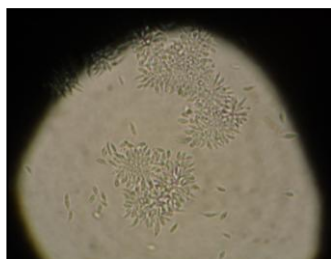


Figura 66: Promastigotas de *Leishmania amazonensis* - visualização no microscópio.

Ensaio de citotoxicidade: Macrófagos de camundongos peritoniais foram isolados em meio RPMI 1640, contendo 200 UI/mL de penicilina, 200 mg/mL de estreptomicina, 1 piruvato de sódio mM, 1mM de L-glutamina e tampão HEPES 1M (Sigma cultura de células, St. Louis, MO, EUA). As células foram contadas em câmara de Neubauer usando Eritrocina B como corante vital e ajustado a uma concentração de 4×10^6 /mL. As células foram então cultivadas em uma placa de cultura de 96 poços (Falcon, NJ, EUA) a 37 °C e numa atmosfera de CO₂ 5%. As amostras nas concentrações de 80, 40, 20, 10 e 5 mg/mL e isotionato de pentamidina (droga de referência) foram adicionados a cultura e após 24h, a viabilidade das células tratadas foi comparada com a do controle, sem amostra, através da metodologia MTT (MOSMANN, 1983).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antioxidante

Os dados da atividade antioxidante mostrado na Tabela 17 mostram que os óleos de todas as espécies apresentam baixa atividade antioxidante, abaixo de 28%, na concentração final de 100µg/mL.

O sesquiterpeno *trans*-cariofileno também foi testado, visto que ele está presente na maioria dos óleos analisados por CG-EM, apresentando 25,80% de atividade. Entretanto, os óleos que apresentaram ativos próximos a esse dado, como em Vt2ff (27,5%) e Vt2fs (24,80%), possuem as seguintes substâncias majoritárias: α -pineno, β -pineno, β -felandreno e β -selineno.

Dentre os óleos essenciais das Myrtaceae, os óleos de *E. patrisii* foram os mais ativos. Em Ep2ff e Ep2fs onde foi observada a predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, a atividade foi a mais alta em relação aos demais óleos; 27,47% e 24,28%, respectivamente. Um estudo com o resultado próximo ao observado nos óleos de *E. patrisii*, foi com o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* Hook. que apresentou atividade antioxidante de 12-45% entre as concentrações de 50-400 µg/mL (SINGH *et al.*, 2012).

Mesmo os óleos que possuem em comum os componentes majoritários, como em *B. multiflora* e *V. theiodora*, não foi possível inferir com precisão que sejam estes os responsáveis pela ação observada, pois o efeito antioxidante dos óleos voláteis, muitas vezes, decorre do sinergismo que existe entre as substâncias (CANDAN *et al.*, 2003, SOUZA *et al.*, 2007b).

Tabela 17: Atividade antioxidante dos óleos essenciais das espécies vegetais

Amostras	Atividade antioxidante (%)
	Média ± DP
Quercetina	3,20±0,33
Eb1ff	10,31±1,20
Bm1ff	<1
Bm2ff	14,33±2,61
Bm2fs	15,05±1,53
Vm1ff	8,90±1,85
Vm2ff	9,76±0,77
Vm2fs	7,42±1,10
Vt1ff	9,76±0,77
Vt1fs	6,62±2,22
Vt2ff	27,5±1,70
Vt2fs	24,80±0,52
Ep1ff	6,22±3,55
Ep1fs	12,86±1,85
Ep2ff	27,47±0,99
Ep2fs	24,19±0,85
Mf1ff	5,20±2,54
Mf2ff	3,83±1,43
Mf2fs	4,33±2,90
Mu1ff	0,71±0,90
Mu2ff	<1
Mu2fs	1,66±1,93
<i>E-cariofileno</i>	25,83±0,76

Ff: folha fresca; fs: folha seca; Eb: *E. bracteolata*; Bm: *Bocageopsis multiflora*; Vm: *Virola mollissima*; Vt: *Virola theiodora*; Ep: *Eugenia patrisii*; Mf: *Myrciaria floribunda*; Mu: *Marlierea umbraticola*.
Média ± DP = média de 3 experimentos independentes e desvio padrão.

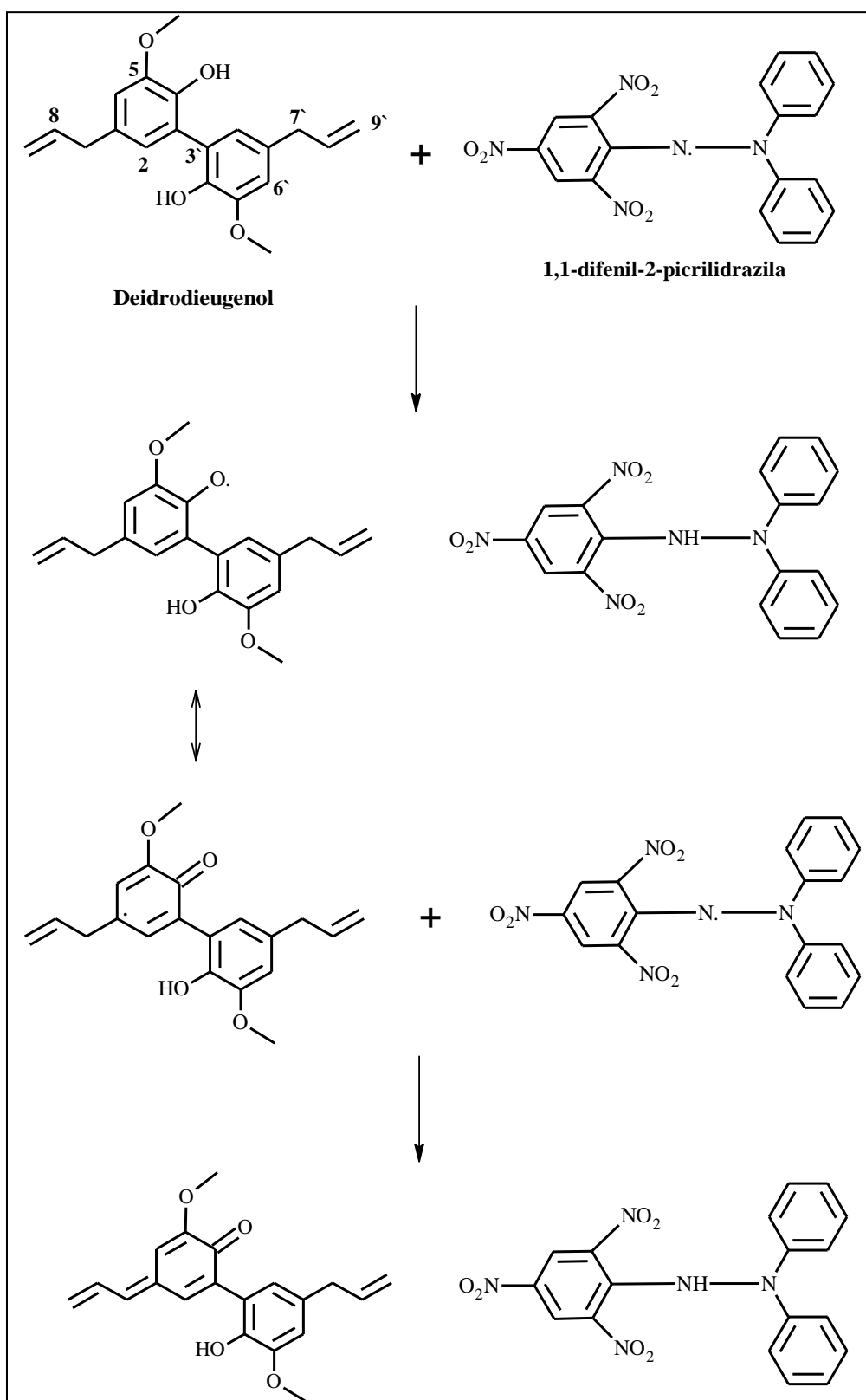
Extratos e substâncias isoladas de miristicáceas tem apresentado grandes potenciais antioxidantes (SILVA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005; PATRO *et al.*, 2005), no entanto, ainda há escassez de estudos referentes às espécies da Amazônia. Por isso, foi investigada a capacidade antioxidante das amostras dos extratos de *V. mollissima*. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos no ensaio frente ao radical DPPH.

O extrato EBVMHex e o precipitado VMHex (contendo deidrodieugenol) apresentaram atividade bastante pronunciada com o CI_{50} de 21,00 $\mu\text{g/mL}$ e $CI_{50}=6,87 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 18), respectivamente, sendo utilizado como referência o padrão quercetina ($CI_{50}=3,20\mu\text{g/mL}$). Possivelmente, o constituinte majoritário em EBVMHEX e VMHex contribuiu para esses dados, visto que ele apresentou $CI_{50}=10,68\mu\text{g/mL}$. Na literatura há relato da existência de boa correlação entre as atividades antioxidantes e potenciais de oxidação de substâncias fenólicas naturais e sintéticas (SILVA *et al.*, 2005). Um estudo, do comportamento cinético de deidrodieugenol, mostra que a presença do substituinte alquila na posição para em relação ao grupo hidroxila, possui efeito maior de estabilização eletrônica, o que o torna um eficaz doador de elétrons e um potente antioxidante ($CI_{50}=0,184\pm 0,002 \text{ mol antioxidante/mol DPPH}$) (BORTOLOMEAZZI *et al.*, 2010). O mecanismo de reação entre estrutura-atividade foi proposta no Esquema 17, uma adaptação do estudo realizado por Bortolomeazzi e colaboradores (2010).

Tabela 18: Atividade antioxidante de EBVMHex, VMHex e deidrodieugenol.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP
Quercetina	3,20 \pm 0,33
EBVMHex	21,00 \pm 1,58
VMHex	6,87 \pm 0,33
Deidrodieugenol	10,68 \pm 1,40

Média \pm DP = média de 3 experimentos independentes e desvio padrão.



Esquema 17: Proposta do mecanismo de reação de deidrodieugenol frente ao radical DPPH.

3.2. Atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

A metodologia adotada mostrou alta sensibilidade dos microcrustáceos as amostras e foram necessárias, pelo menos, quatro repetições de cada uma para a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 19. Todos os óleos testados foram considerados ativos com CL₅₀ abaixo do padrão utilizado, exceto Mu1ff que mostrou CL₅₀ de 14,31 µg/mL.

Os óleos apresentaram alta toxicidade em comparação com o padrão lapachol (10,47 µg/mL), inclusive o sesquiterpeno *trans*-cariofileno (0,32 µg/mL).

Tabela 19: Resultados do teste de toxicidade frente *Artemia salina* dos óleos essenciais.

Amostras	Toxicidade (<i>A. salina</i> Leach) CL₅₀ (intervalo de confiança)
Eb2ff	0,53 (0,28 – 0,97)
Eb2fS	0,54 (0,27 – 1,09)
Bm2ff	0,78 (0,28 – 2,14)
Bm2fs	3,22 (1,72 – 6,00)
Vm1ff	1,43 (0,70 – 2,95)
Vm2ff	0,69 (0,33 – 1,42)
Vm2fs	1,26 (0,64 – 2,47)
Vt1ff	4,53 (3,05 – 6,75)
Vt1fs	5,00 (2,70 – 9,24)
Vt2ff	5,73 (2,56 – 12,80)
Vt2fs	0,74 (0,39 – 1,40)
Ep1ff	1,19 (0,64 – 2,18)
Ep1fs	0,81 (0,45 – 1,45)
Ep2ff	0,62 (0,22 – 1,75)
Ep2fs	1,92 (1,01 – 3,63)
Mf1ff	2,84 (1,55 – 5,18)
Mf2ff	2,33 (1,78 – 3,05)
Mf2fs	1,11 (0,61 – 2,01)
Mu1ff	14,31 (6,49 – 31,56)
Mu2ff	10,80 (5,26 – 22,15)

Mu2fs	3,33 (1,56 – 3,27)
<i>E</i> -cariofileno	0,32 (0,13 – 0,76)
Lapachol	10,47 (8,55 – 12,81)

Ff: folha fresca; fs: folha seca; Eb: *E. bracteolata*; Bm: *Bocageopsis multiflora*; Vm: *Virola mollissima*; Vt: *V. theiodora*; Ep: *Eugenia patrisii*; Mf: *Myrciaria floribunda*; Mu: *Marlierea umbraticola*.

3.3. Atividade leishmanicida e citotoxicidade em macrófagos

O óleo mais ativo entre as espécies de Myrtaceae foi o óleo essencial de *M. umbraticola* (Mu1ff) que apresentou valor de CI_{50} de 21,1 $\mu\text{g/mL}$. Os óleos de *E. patrisii* (Ep1ff) e *M. floribunda* (Mf1ff) apresentaram CI_{50} de 29,8 $\mu\text{g/mL}$ e 30,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 20).

O óleo essencial de *B. multiflora* (Bm1ff) apresentou CI_{50} de 14,8 $\mu\text{g/mL}$, atividade significativa quando comparado com os óleos essenciais obtidos das folhas de *Annona foetida* Martius ($CI_{50}=16,2 \mu\text{g/mL}$) (COSTA *et al.*, 2009) e das folhas de *A. coriacea* Mart., o qual foi ativo contra as formas promastigotas de *L. chagasi* ($CI_{50} = 39,93 \mu\text{g/mL}$) (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Ambos os óleos possuem os sesquiterpenos hidrocarbonetos (*E*)-cariofileno e biciclogermacreno como constituintes principais.

Concernente aos óleos de Myristicaceae, *V. mollissima* e *V. theiodora* apresentaram boa atividade contra as linhagens de *L. amazonensis*. O óleo essencial de *V. mollissima* (Vm1ff) foi o mais ativo ($CI_{50} = 19,7 \mu\text{g/mL}$) em relação ao óleo de *V. theiodora* (Vt1ff) que apresentou $CI_{50} = 27,5 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$. Esses dados demonstraram que essas espécies são potenciais contra leishmania, corroborando com resultados existentes na literatura para espécies da família Myristicaceae (BARATA *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2000; MORAIS *et al.*, 2009). Entretanto, o óleo de Vm1ff quando testado em macrófagos peritoniais não parasitados foi tóxico com CI_{50} de 17,16 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao padrão pentamidina ($CI_{50} = 24,40 \mu\text{g/mL}$). O óleo de Bm1ff apresentou CI_{50} de 42,71 $\mu\text{g/mL}$, menos tóxico que o anterior (Tabela 20).

Com os dados apresentados, os óleos mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram em sua composição a predominância de sesquiterpenos, como em Bm1ff e Vm1ff. Na verdade, a literatura tem evidenciado a atividade de sesquiterpenos hidrocarbonetos contra espécies de *Leishmania* (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRÍGUEZ,

2001; ZHELJAZKOV *et al.*, 2008), mas os mecanismos de ação dessas substâncias ainda são desconhecidos (COSTA *et al.*, 2009). O efeito inibitório do *trans*-cariofileno sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* foi estudado, e este se mostrou um antiparasitário moderado, o que corrobora, em parte, com a teoria do efeito sinérgico dos constituintes presentes dos óleos essenciais (DO CARMO *et al.*, 2012; ZHELJAZKOV *et al.*, 2008). Outros estudos apresentaram resultados que podem ser utilizados, como o estudo com o sesquiterpeno nerolidol sobre culturas de promastigotas de *L. amazonensis*, o qual revelou que a atividade desse terpeno pode estar associada com a inibição da biossíntese celular de isoprenóides (ARRUDA *et al.*, 2005). Outro fato é a lipofilicidade dos terpenos de óleos essenciais, a qual facilita a penetração na bicamada lipídica das membranas celulares, produzindo mudanças nas células e estruturas mitocôndriais de espécies de *Leishmania*, modificando sua permeabilidade e integridade (YUSTE *et al.*, 2010) e conduzindo à apoptose celular e necrose (MACHADO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2003; YUSTE *et al.*, 2010).

Tabela 20: Resultados leishmanicida e citotoxicidade dos óleos das espécies.

Amostras	<i>L. amazonensis</i> CI ₅₀ /(µg/mL) ± DP	Citotoxicidade (%) Macrófagos CI ₅₀ / (µg/mL)
Pentamidina	3,0 ± 1,8	24,40
Bm1ff	14,8 ± 0,2	42,71
Vm1ff	19,7 ± 0,2	17,16
Vt1ff	27,5 ± 1,2	-
Ep1ff	29,8 ± 0,8	-
Mu1ff	21,1 ± 0,8	-
Mf1ff	30,9 ± 1,7	-

Ff: folha fresca; Bm: *Bocageopsis multiflora*; Vm: *Virola mollissima*; Vt: *V. theiodora*; Ep: *Eugenia patrisii*; Mf: *Myrciaria floribunda*; Mu: *Marlierea umbraticola*. DP = desvio padrão.

A substância deidrodieugenol isolada do precipitado e EBVMHex demonstraram a mesma atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀=27,0µg/mL e CI₅₀=27,5 µg/mL), respectivamente. Enquanto que VMHex apresentou CI₅₀ de 35,9 µg/mL e a neolignana carinatina CI₅₀ de 53,9 µg/mL. Os resultados mostrados estão em estudo para obtenção de mais informações sobre as atividades observadas para as amostras mais ativas, o extrato bruto e o deidrodieugenol. Quanto a toxicidade, EBVMHex foi o mais tóxico em

macrófagos com CI_{50} de 17,35 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 21). Em contrapartida ao dado relatado, a literatura reporta a atividade das neolignan carinatina e deidrodieugenol isolados dos frutos de *V. pavonis* frente às formas de *L. amazonensis* com $CI_{50} \geq 250 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 148 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (MORAIS *et al.*, 2009).

Tabela 21: Atividade leishmanicida de EBVMHex, VMHex, deidrodieugenol e carinatina de *Virola mollissima*

Amostras	<i>L. amazonensis</i> $CI_{50}/(\mu\text{g/mL}) \pm \text{DP}$	Citotoxicidade (%) Macrófagos $CI_{50} / (\mu\text{g/mL})$
Pentamidina	$3,0 \pm 1,8$	24,40
EBVMHex	$27,5 \pm 2,1$	17,35
VMHex	$35,9 \pm 7,7$	-
Deidrodieugenol	$27,0 \pm 6,2$	-
Carinatina	$53,9 \pm 0,8$	-

EBVMHex=extrato hexano de *V. mollissima*; VMHex=precipitado obtido do extrato hexano. DP=desvio padrão.

CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro relato dos constituintes químicos dos óleos das folhas das espécies vegetais *V. mollissima*, *V. theiodora*, *M. umbraticola*, *B. multiflora* e *E. bracteolata*. Apesar de a literatura reportar os constituintes dos óleos essenciais das folhas das espécies *M. floribunda* e *E. patrisii*, os componentes relatados neste trabalho, diferenciaram-se dos já relatados na literatura, comprovando que os fatores geográficos também influenciam nos constituintes dos óleos essenciais dessas espécies. As variações observadas nos dados obtidos indicam que além do regime de precipitação, outros fatores podem ter influenciado na composição dos óleos essenciais, como nos óleos das espécies *E. patrisii* e *E. bracteolata*.

Os dados reportados neste trabalho demonstram que estas espécies são uma fonte rica de compostos ativos contra a *Leishmania*. Almeja-se que estes resultados estimulem estudos posteriores para o alcance do potencial farmacológico destas espécies.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation; Carol Stream, IL, 4 ed., 2009. 804p.

AEDO, J. R. N. G. Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; SILVA, J. R. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). *Acta Amazonica*, vol. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.

AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; BESSA, W. S.; BARNES, R. A.; KAPLAN, M. A. C.; WESSJOHANN, L. A. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 29, p. 653 – 654, 2001.

ANGELO, H.; BRASIL, A. A.; SANTOS, J. Madeiras tropicais: análise econômica das principais espécies florestais exportadas. *Acta Amazonica*, vol. 31, n. 2, p. 237-248, 2001.

APEL, M. A.; LIMA, M. E.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. M. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo – Brazil). *Pharmacology on line*, vol. 3, p. 376 – 386, 2006.

APEL, M. A.; LIMA, M. E.; YOUNG, M. C.; CORDEIRO, I.; SCHAPOVAL, E. E.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. *Pharmaceutical biology*, vol. 48, n. 4, p. 433 – 438, 2010.

ARRUDA, D. C.; D`ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, n. 5, p. 1679 – 1687, 2005.

ARRUDA, D. C. Caracterização da atividade leishmanicida de nerolidol e limoneno e da interferência desses terpenos na biossíntese de isoprenóides. 2007. 206f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARATA, L. E. S. Isolamento e síntese de neolignanas de *Virola surinamensis* (Rol) Warb. 1976. 214f. Tese (doutorado em Ciências). Universidade de Campinas, São Paulo.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, vol. 55, p. 589-595, 2000.

BERG, R. V. D.; HAENEM, G. R. M. M.; BERG, H. V. D.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, vol. 66, n. 2, p. 511-517, 1999.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (BVS). Leishmaniose. 2007. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/126leishmaniose.html>. Acesso em: 14 novembro 2010.

BORTOLOMEAZZI, R.; GIANCARLO, V.; LIESSI, A.; CALLEA, A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry*, vol. 118, p. 256-265, 2010.

BRITO, A. F. R. Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 87, p. 215-220, 2003.

CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; SIQUEIRA, J. M. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, n. 6, p. 647-649, 2005.

CERQUEIRA, M. D. Estudo fitoquímico de *Myrcia rontundifolia* (Berg.) Legrand. (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). 2002. 105f. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J. M.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae). *Química Nova*, vol.32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHAGAS, A. P.; MULLER, A. H.; SOARES, M.; GARCEZ, L. M. Potencial anti-leishmania e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, vol. 1, n.1, p. 117-124, 2010.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports*, vol. 18, p. 674-688, 2001.

CHEN, F.; RO, D-K.; PETRI, J.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E.; THOLL, D. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiology*, vol. 135, p. 1956-1966, 2004.

CHENG, AL-XIA; LOU, Y.; MAO, Y.; LU, S.; WANG, L.; CHEN, X. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological function. *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos*. Atheneu: São Paulo, 2^a. ed., 2001, 390p.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R.; GU, Z.-M.; NG, J. H.; SMITH, D. L.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatic*. *Journal of Natural Products*, vol. 57, n. 4, p. 486-493, 1994.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 66, p. 33-39, 1999.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura/IBDF: Rio de Janeiro, 1984, 707 p.

COSTA, E. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. *Phytotherapy Research*, vol. 22, n. 5. p. 705-707, 2008a.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteriaopsis* species. *Phytochemistry*, vol. 69, p. 1895-1899, 2008b.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, vol. 32, n. 1, p. 78-81, 2009.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMINA, C.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 22, n. 6, p. 1111-1117, 2011.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

DE ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). *Revista Visão Acadêmica*, vol. 2, n. 2, p. 81-84, 2001.

DE BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMAN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova*, vol. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

DE CAMPOS, S. A ação dos radicais livres no organismo, 2003. Disponível em: <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/2474>. Acesso em: 15 junho 2012.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. Medicinal plants of the Guianas. National Museum of Natural History, 2004. Disponível em: <<http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Introduction.pdf>>. Acesso em: 21 fevereiro 2012.

DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T., G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, vol. 70, p. 1621-1637, 2009.

DE LIMA, R. K.; CARDOSO, M.G.; ANDRADE, M. A.; NASCIMENTO, E. A.; DE MORAIS, S. A. L.; NELSON, D. L. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, p. 41-44, 2010.

DE SOUZA, M. A. D.; KAWASAKI, M. L.; HOLST, B. K. Myrtaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Orgs.). *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA-DFID, 1999, p. 417-436.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural products Reports*, v. 19, 2002. 222p.

DO CARMO, D. F. M.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, J. R. A. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. *Molecules*, vol. 17, p. 1819-1829, 2012.

DO ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S. Sinopse das espécies de *Marlierea* Cambess. (Myrtaceae) na Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, vol. 36, n. 1, p. 37-52, 2006.

DO VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 80, n. 4, p.421-428, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, vol. 21, p. 308-323, 2007.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, p. 381-391, 2005.

FARINÃ, L.; BOIDO, E.; CARRAU, F.; VERSINI, G.; DELLACASSA, E. Terpene compounds as possible precursors of 1,8-cineole in red grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n.5, p.1633-1636, 2005.

FEHLBERG, I.; DE OLIVEIRA, R. A.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Atividade antibacteriana de flavonóides e triterpenos de *Myrcia guianensis*. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32, 2009, Fortaleza.

FERRONATO, R.; MARCHESAN, E. D.; BEDNARSKI, F.; DE ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, vol. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

FIGUEIRÓ-LEANDRO, A. C. B.; CITADINI-ZANETTE, V. Árvores medicinais de um fragmento florestal urbano no município de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, vol. 10, n. 2, p. 56-67, 2008.

FONSECA, C. N.; LISBOA, P. L. B.; URBINATI, C. V. A xiloteca (coleção Walter A. Egler) do Museu Paraense Emílio Goeldi. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Ciências Naturais. Belém, vol.1, n. 1, p. 65-140, 2005.

FORTES, G. A. C.; NAVES, S. S.; GODOI, F. F. F.; DUARTE, A. R.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Assessment of a maturity index in jaboticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. American Journal of Food Technology, vol. 6, n. 11, p. 974-984, 2011.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ANTONIETA, R. A.; DE ORTIZ, S. T.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; HOCQUEMILLER, R. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 40, n.11, p. 2447-2451, 1996.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology, vol. 3, p. 408-414, 2007.

GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BEZERRA, J. C. B.; AGUIAR, F. A. Leishmaníase: arsenal terapêutico e alvos moleculares. Vita et Sanitas, vol. 1, n. 01, p. 90-115, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, vol.30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides: com atenção especial à química das neolignanas. *Química Nova*, vol. 7 p. 250-273, 1984.

GUTERRES, Z. R. Investigação das atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

HEUSKIN, S.; GODIN, B.; LEROY, P.; QUENTIN CAPELLA, Q.; WATHELET, J-P.; VERHEGGEN, F.; HAUBRUGE, E.; LOGNAY, G. Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae). *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, p. 2768-2775, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUNT, P. Neglected diseases: a human rights analysis. Who library research report series, n.6., 2007. Disponível em: http://www.who.int/tdr/publications/documents/seb_topic6.pdf. Acesso em 26 junho 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Gri%2ficos>. Acesso em: 17 abril 2012.

JOLY, A. B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal. 12 ed. Companhia Editora Nacional – São Paulo, 1998, 777 p.

KAMPRANIS, S. C.; LONNIDIS, D.; PURVIS, A.; MAHREZ, W.; NINGA, E.; KATERELOS, N. A.; ANSSOUR, S.; DUNWELL, J. M.; DEGENHARDT, J.; MAKRIS, A. M.; GOODENOUGH, D. W.; JOHNSON, C. B. Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *Plant Cell*, vol. 19, p. 1994-2005, 2007.

KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. The neolignans (-)-carinatone and caranatin from *Virola carinata*. *Phytochemistry*, vol. 21, n. 4, p. 929-931, 1982.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, vol. 90, n. 2, p. 55-62, 2003.

KELLER, J. S. Electron impact (EI) fragmentation mechanisms: the case of β -pinene. Chemistry Natural Sciences Division - CHEM 234, 2011. Disponível em: <http://chem.uaf.edu/keller/courses/324sp11/pdf/pinenefragmentation.pdf>.> Acesso: 09 agosto 2012.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, vol. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazonica*, vol. 35, n. 3, p. 363-366, 2005.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, p. 197-201, 2006.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, vol. 27, n. 6, p. 916 - 919, 2004.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*. Editora IST Press, 2007. 261p.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.; KATZIN, A. M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Viola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 67, n. 3, 313 -319, 1999.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SOBRINHO, A. F. S.; PEREIRA, M. V. G. Linalool - rich essential oil from leaves of *Croton cajucara* Benth. *Journal Essential Oil Research*, vol. 12, n. 6, p. 705-708, 2000.

LOUREIRO, A. A.; DE FREITAS, M. C.; DE VASCONCELLOS, F. J. Estudo anatômico de 24 espécies do gênero *Viola* (Myristicaceae) da Amazônia. *Acta Amazonica*, vol. 19 (único), p. 415-465, 1989.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. vol. 2, Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, 2002, 384 p.

LÚCIO, A. S. S. C. Alcalóides azafenantrenos isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Farmoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MA, Wen-Wen.; ANDERSON, J. E.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive benzyl benzoates from the roots of *Endlicheria dysodantha*. International Journal of Pharmacology, vol. 29, n. 3, p. 237-239, 1991.

MACHADO, K. E. Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* Berg. 2005. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

MACHADO, M.; SANTORO, G.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. Flavour and Fragrance Journal, vol. 25, p. 156-160, 2010.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. Experimental Parasitology, vol. 130, p. 223-231, 2012.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, J. S. Essential oils of the Amazon *Guatteria* and *Guatteriopsis* species. Flavour and Fragrance Journal, vol. 20, p. 478-480, 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. Revista Florestal e Ambiente, vol. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MCRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. Phytochemistry, vol. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.

MESSIAS, K. L. S. Estudo fitoquímico e farmacológico das folhas e caules da *Marlierea tomentosa* Camb. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2005. 62 p. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

MESSIAS, K. L. S.; CAMPOS-BUZZI, F.; MALHEIROS, A.; MONACHE, F. D.; CHECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of the leaves and branches of *Marlierea tomentosa* Camb. Química Nova, vol. 31, n. 7, p. 1747 – 1749, 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica, vol. 45, p. 31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da *Leishmania* Tegumentar Americana. Editora do Ministério da Saúde – Brasília, 2007, 182p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Acesso em: 21 fevereiro 2012.

MORAIS, S. R. R. Constituintes químicos de algumas espécies de Myristicaceae. 2008. 175f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORAIS, S. K. R.; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. L. S.; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; LINDOSO, J. A. L.; YOSHIDA, M. Biological activities of lignoids from Amazon Myristicaceae species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavanis* and *Yryanthera juruensis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 20, n. 6, p. 1110-1118, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER-RIEBAU, F. J.; BERGER, B. M.; YEGEN, O.; CAKIR, C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 45, n. 12, p. 4821-4825, 1997.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. Atheneu: São Paulo, 10^a ed., 2000, 518p.

PABON, L. C.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). Química Nova, vol. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.

PATRO, B. S.; BAURI, A. K.; MISHRA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n. 17, p. 6912-6918, 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à Espectrometria*. Cengage Learning – São Paulo, 4 ed., 2010, 687p.

PESQUISAS ECOLÓGICAS DE LONGA DURAÇÃO (PELD). Sítio 1: Reserva Florestal Adolpho Ducke. Disponível em: <http://peld.inpa.gov.br/sitios/ducke>. Acesso em 21 fevereiro 2012.

PEREIRA, R. A.; ZOGHBI, M. G. B.; BASTOS, M. N. C. Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the Sandbank of the Resex Maracanã, State of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, vol. 13, n. 4, p. 440–450, 2010.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.; MELO, C. S.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S.; SILVA, S. G. Screening of plants found in Amazon State for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazonica*, vol. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

RAHARIVELOMANA, P.; BIANCHINI, J-P.; CAMBON, A.; AZZARO, M.; FAURE, R. Two-dimensional NMR of sesquiterpenes. 8-complete assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of seven sesquiterpene alcohols from *Neocallitropsis pancheri*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 33, n. 3, p. 233-235, 1995.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, p. 1433-1439, 2005.

REYNERTON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHE, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. I. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, vol. 69, n.8, p. 1228-1230, 2006.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, vol. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D. MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Orgs.). *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA-DFID, 1999, p. 417-436.

RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROCHA, A. I.; REIS LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. III – Annonaceae (1). *Acta Amazonica*, vol. 11, n. 3, p. 537-546, 1981.

RODILLA, J. M.; SILVA L. A.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DAVYT, D.; CASTILLO, L.; GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; GONZALEZ-COLOMA, A.; ZROSTLIKOVÁ, J.; DELLACASSA, E. Advances in the identification and agrochemical importance of sesquiterpenoids from *Bulnesia sarmienta* essential oil. *Industrial Crops and Products*, vol. 33, p. 497-503, 2011.

RODRIGUES, W. A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil – Introdução. *Acta Amazonica*, vol. 10, n. 1, p. 1-25, 1980.

ROMÃO, P. R.; DIAS, R. O.; CRUZ, K. K.; MARQUES, F. C. S.; MONTEIRO, M. C. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*, vol. 3, n. 1, p. 1-10, 2007.

ROSA, M. S. S., MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MACLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. *Journal of Natural Products*, vol. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SALLAUD, C.; RONTEIN, D.; ONILLON, S.; JABES, F.; DUFFÉ, P.; GIACALONE, C.; THORAVAL, S.; ESCOFFIER, C.; HERBETTE, G.; LEONHARDT, N.; CAUSSE, M.; TISSIER, A. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, vol. 21, p. 301-317, 2009.

SANTIN, M. R.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; FERREIRA, I. C. P.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, vol. 105, p. 1489-1496, 2009.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, vol. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C. H.; OLIVEIRA, M. G. M.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. *Biotecnologia, ciências e desenvolvimento*, vol.3, n. 16, p.37-43, 2000.

SILVA, D. H., PEREIRA, F. C., ZANONI, M. V., YOSHIDA, M. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. *Phytochemistry*, vol. 57, n.3, p. 437-442, 2001.

SILVA, P. A.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BARRETO, M. C. V. Efeito da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa e óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Revista Ciência Agronômica*, vol. 34, n. 1, p. 5-9, 2003.

SILVA, D. H. S.; PEREIRA, F. C.; YOSHIDA, M.; ZANONI, M. V. B. Eletrochemical evaluation of lipophilic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits (Myristicaceae). *Eclética Química*, vol. 30, n. 3, p. 15-31, 2005.

SILVA, D. B. Estudo fitoquímica e avaliação alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* (A. ST. – HIL.) Benth. & Hook. F. – Annonaceae. 2006. 193f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

SILVA, J. R. A.; DO CARMO, D. F. M.; REIS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DA SILVA, B. O.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of Brazilian Chemical Society*, vol. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a. ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2003. p. 467-495.

SINGH, H. P.; KAUR, S.; NEGI, K.; VARINDER, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. LWT-Food Science and Technology, vol. 48, p. 237-241, 2012.

SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. H.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; FISCHER, D. C. H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol. 21, n. 1, p. 33-40, 2011.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas, vol. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, vol.30, n. 2, p. 351-355, 2007a.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 17, n. 3, p. 368-372, 2007b.

SOUZA, A. Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. 2009. 351f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from Neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Chemistry and Biodiversity, vol. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 10, n. 6, p. 400-402, 2006.

TEIXEIRA, A. F. Metabólicos secundários de frutos da *Virola mollissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb: Neolignanas e atividade antifúngica. 2007. 158f. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Universidade de São Paulo, São Paulo.

TELASCREA, M.; DE ARAÚJO, C. C.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; DE MORAIS, P. L. R.; CAVALHEIRO, A. J. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): composition and intraspecific chemical variability. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 35, p. 222-232, 2007.

TIETBOHL, L. A. C.; LIMA, B. G.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; SILVA, F. E. B.; DENARDIN, E. L. G.; BACHINSKI, R.; ALVES, G. G.; SILVA-FILHO, M. V.; ROCHA, L. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 31, p. 637-641, 2012.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, vol. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; SIQUEIRA, J. M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18, n. 3, p. 373-378, 2008.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, vol. 74, p. 91-97, 2003.

VERPOORT, R.; SVENDSEN, B. A. Terpenoid Indole Alkaloids and simple Indole alkaloids. *Journal of Chromatography Library*, chapter 17, vol. 23, part B, p. 155-172, 1984.

VICENTINI, A.; RODRIGUES, W. A. Myristicaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M.

A. D. MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Orgs.). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA-DFID, 1999, p. 136-145.

VICENTINI, A.; VAN DER WERFF, H.; NICOLAU, S. Laureceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D. MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Orgs.). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA-DFID, 1999, p.150-179.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; TEKWANI, B.; KHAN, S. I. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of Harvesting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n.2, p. 380-385, 2008.

WERFF, H. V. D. A key to the genera of Lauraceae in the New World. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 78, p. 377-387, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A human rights-based approach to neglected tropical diseases, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/human-rights.pdf>. Acesso em: 25 junho 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Strategic direction for leishmaniasis research. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction/en>. Acesso em: 25 junho 2012.

YU, Y.; HUANG, T.; YANG, B.; LIU, X.; DUAN, G. Development of gas chromatography–mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, p. 24-31, 2007.

YUSTE, M. M.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; VALERO-LÓPES, A.; NAVARRO-MOLL, M. C. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine*, vol. 17, p. 279-281, 2010.