

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Osteophloeum platyspermum*
(Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae) E
AVALIAÇÃO DE SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

SÃO PAULO

2014

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Osteophloeum platyspermum*
(Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae) E
AVALIAÇÃO DE SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Profª Drª Ivana Barbosa Suffredini.

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

SÃO PAULO

2014

Sousa, Sinária Rejany Nogaia de.

Análise da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Osteophloeum platyspermum* (*Expruce ex. A. DC.*) Warb. (Myristicaceae) e avaliação de sua composição química / Sinária Rejany Nogaia de Sousa. - 2014.

111 f. : il. + CD-ROM

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2014.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof.^a Dra. Ivana Barbosa Suffredini.

1. Análise química. 2. Variação sazonal. 3. Variação antibacteriana. I. Suffredini, Ivana Barbosa (orientador). II. Título

SINÁRIA REJANY NOGAIA DE SOUSA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Osteophloeum platyspermum*
(Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae) E
AVALIAÇÃO DE SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista - UNIP

Prof Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Universidade de São Paulo - USP

Prof^a Dra Cíntia Helena Couri Saraceni
Universidade Paullista - UNIP

**Dedico este trabalho aos maiores incentivadores
de minha vida: meus pais, Maria e Sebastião.
Aos meus grandes amores Ronaldo, Gabriel e
Carol, que estiveram sempre ao meu lado.**

Obrigada

AGRADECIMENTOS

Agradeço à vida, por ter me dado a oportunidade de estudar e realizar meus sonhos acadêmicos.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Ivana Barbosa Suffredini, pela dedicação, paciência e carinho em todas as etapas desta pesquisa.

A todos os profissionais técnicos da UNIP, que estavam sempre dispostos no desenvolvimento da pesquisa prática.

Aos funcionários da Pós-Graduação, sempre atenciosos e solícitos.

A todos os professores da Pós-Graduação, que se mostraram permanentemente dispostos a me auxiliar no decorrer do projeto.

Enfim, aos colegas de turma e de trabalho, que sempre me incentivaram nos momentos difíceis.

RESUMO

Óleos essenciais são reconhecidos como agentes antibacterianos, medicinais e odoríferos. Plantas que contêm essências são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, bebidas, medicamentos e cosméticos, e por esse motivo a produção de compostos voláteis é constante, por conta do desenvolvimento agronômico dedicado às espécies produtoras. No entanto, plantas selvagens não produzem compostos voláteis de modo distintamente constante. No presente trabalho, 13 óleos essenciais obtidos de folhas de ucuuba-chico-de-assis (*Osteophloeum platyspermum*, Myristicaceae), coletadas de um mesmo indivíduo durante dois anos, foram testados contra *Staphylococcus aureus* no modelo da microdiluição em caldo para se obter a concentração inibitória mínima (CIM), e foi estudado quanto à composição química por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os resultados mostraram que não foi possível se estabelecer uma relação entre as alterações químicas sazonais e os resultados antibacterianos obtidos, mas óleos obtidos em três coletas apresentaram CIM=0.0625% e a presença de alfa-pineno, beta-pineno, 1,8-cineol, pinocarvona, canfeno, limoneno, alfa-terpineol, terpinen-4-ol, alfa-elemeno, beta-elemeno, mirceno, linalol, neo-intermedeol, elemol, alfa-cadinol, tau-muurolol, 1-epi-cubenol, delta-amorfeno, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol. O coeficiente de variação destes terpenos é menor que 68%, e existe uma tendência de que os terpenos da família do alfa-pineno ocorram em maior concentração nos óleos que apresentaram a melhor atividade antibacteriana, embora diferenças estatísticas não tenham sido observadas ($p>0.05$). Este é o primeiro trabalho multianálise em indivíduo único sobre a atividade antibacteriana e sobre a composição química dos óleos essenciais de ucuuba-chico-de-assis, uma planta selvagem coletada na floresta Amazônica, e leva à reflexão sobre como essa espécie selvagem expressa de modo impreciso, porém eficaz, seus componentes antibacterianos.

PALAVRAS-CHAVE: óleos essenciais, *Osteophloeum platyspermum*, análise química, variação sazonal, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Essential oils are recognized as antibacterial, medicinal and fragrant agents. Plants containing essential oils are largely used in food, medicine and cosmetic industries, and for that reason volatiles production are conspicuously constant, as agronomic research usually takes place. Nonetheless, wild plants not necessarily produce volatiles in such distinguished constancy. In the present work, 13 essential oils obtained from the leaves of *ucuuba-chico-de-assis*, (*Osteophloeum platyspermum*, Myristicaceae), which was collected from the same individual during two years, were tested against *Staphylococcus aureus* in the microdilution broth assay to achieve minimal inhibitory concentration (MIC), and were chemically analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Results show that it was not possible to establish a seasonal relationship with the antibacterial activity, but oils obtained in three different collections showed MIC=0.0625% and the presence of alfa-pinene, beta-pinene, 1,8-cineole, pinocarvone, camphene, limonene, alfa-terpineol, alfa-elemene, beta-elemene, myrcene, linalool, terpinen-4-ol, neo-intermedeol, elemol, alfa-cadinol, tau-murolol, 1-epi-cubenol, delta-amorphene, spathulenol, isospathulenol, viridiflorol and ledol. Coefficient of variance for these terpenes are <68%, and there is a subtle tendency of the alpha-pinene family of compounds occur in large amounts in the oils with best antibacterial activity, despite statistical differences could be observed. This is the first one-individual-multianalysis report on the antibacterial activity and the chemical composition of *ucuuba-chico-de-assis*, a wild plant collected in the Amazon Rain Forest. The present study reflected how tropical wild plants imprecisely – but effective - express their chemical antibacterial contents.

Keywords: Essential oils, *Osteophloeum platyspermum*, chemical analysis, seasonal variation, antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Rendimento dos óleos essenciais obtidos das 13 coletas de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Myristicaceae) e variação da (B) temperatura máxima, (C) umidade relativa, (D) insolação e (E) chuvas acumuladas no dia. Dados relativos às medidas climáticas obtidos no sítio www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php	44
Figura 2 – Relação das estruturas moleculares dos terpenos identificados em <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae).....	61
Figura 3 – Média da porcentagem dos terpenos que ocorrem frequentemente nos três grupos de óleos essenciais, reunidos segundo sua atividade antibacteriana. A) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos três óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,0625%; B) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos quatro óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,25%; C) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos cinco óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,50%.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação dos nomes dos terpenos isolados de <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas e de anéis.	62
Quadro 2 – Análise de variância para os terpenos do grupo A dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	75
Quadro 3 – Análise de variância para os terpenos do grupo B dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	76
Quadro 4 – Análise de variância para os terpenos do grupo C dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	77
Quadro 5 – Análise de variância para os terpenos do grupo D dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	78
Quadro 6 – Análise de variância para os terpenos do grupo E dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	79
Quadro 7 – Análise de variância para os terpenos do grupo F dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	80
Quadro 8 – Análise de variância para os terpenos do grupo G dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	81
Quadro 9 – Análise de variância para os terpenos do grupo H dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	82
Quadro 10 – Análise de variância para os terpenos do grupo I dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	83
Quadro 11 – Análise de variância para os terpenos do grupo J dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	84
Quadro 12 – Análise de variância para os terpenos do grupo K dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	85

Quadro 13 – Análise de variância para os terpenos do grupo L dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	86
Quadro 14 – Análise de variância para os terpenos do grupo M dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento dos óleos essenciais obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Myristicaceae), para as 13 coletas, realizadas de novembro de 2009 a outubro de 2011, e relação da concentração mínima inibitória obtida contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213) no ensaio da microdiluição em caldo, expressa em porcentagem (v/v).....	45
Tabela 2 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE2, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	46
Tabela 3 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE3, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	47
Tabela 4 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE4, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	48
Tabela 5 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE5, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	49
Tabela 6 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE6, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	50
Tabela 7 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE7, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	51
Tabela 8 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE8, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	52

Tabela 9 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE9, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	53
Tabela 10 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE10, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	55
Tabela 11 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE11, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	56
Tabela 12 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE12, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	57
Tabela 13 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE13, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	58
Tabela 14 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE14, obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> , suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.....	59
Tabela 15 – Relação dos terpenos presentes nos 13 óleos essenciais obtidos de folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Myristicaceae). Os terpenos estão agrupados de acordo com a semelhança estrutural que apresentam. São dadas as, as médias das somas dos terpenos pertencentes a cada grupo semelhante, as médias das porcentagens de cada terpeno em relação às coletas realizadas, seu desvio padrão e erro padrão, bem como o respectivo coeficiente de variação.....	64
Tabela 16 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE5, 408OE9 e 408OE11 – ativos contra <i>Staphylococcus aureus</i> na concentração inibitória mínima de 0,0625%, obtidos das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos três óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 15/05/2010, 14/12/2010 e em 15/04/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas.....	66

Tabela 17 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE2, 408OE3, 408OE12 e 408OE13 – ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração inibitória mínima de 0,25%, obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos quatro óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 01/11/2009, 03/02/2010, 08/07/2010 e em 20/08/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas. 68

Tabela 18 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 e 408OE14 – ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração inibitória mínima de 0,5% ou mais, obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos quatro óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 12/03/2010, 28/05/2010, 29/08/2010, 11/01/2011 e em 21/10/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas. 70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	LITERATURA CONSULTADA.....	17
2.1	Óleos essenciais	17
2.2	Óleos essenciais e sua função na planta	18
2.3	Atividade antimicrobiana	18
2.4	Família Myristicaceae.....	19
2.5	<i>Osteophloeum platyspermum</i>	21
2.6	Influência na produção de metabólitos secundários em espécies produtoras de óleos essenciais.....	23
3	OBJETIVO.....	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Coleta de plantas	26
4.2	Obtenção dos óleos essenciais.....	26
4.3	Preparo das amostras e substâncias padrão para os ensaios biológicos	26
4.4	Ensaio da microdiluição em caldo	27
4.5	Análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	27
4.6	Obtenção do Índice de Kovats	28
4.7	Análise matemática e estatística	28
5	DELINAMENTO EXPERIMENTAL	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

ANEXOS	43
ANEXO 1 – Tabelas referentes aos resultados obtidos	43
ANEXO 2 – Análises estatísticas realizadas para os óleos essenciais obtidos das 13 coletas das folhas de <i>Osteophloeum platyspermum</i> no período de novembro de 2009 a outubro de 2011. As análises foram realizadas utilizando-se análise de variância de uma via e teste posterior de Tukey, com nível de significância de $p<0,05\%$. Os terpenos foram divididos em grupos, apresentados na figura 2 e no quadro 1, divididos segundo sua semelhança estrutural. As porcentagens de todos os terpenos de cada grupo foram somadas para cada um dos 13 óleos. Depois, 12 dos 13 óleos, com exceção do único que apresentou atividade antibacteriana de 0,125% (408OE8), foram reunidos segundo a atividade antibacteriana (CIM=0,0625%, CIM=0,15% e CIM=0,50%) e as médias para cada grupo foram comparadas. Os resultados não foram significativos, nesta análise, como pode-se observar nos quadros 2 a 15.	74
ANEXO 3 – Artigo científico originado da dissertação	88

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são compostos de plantas que frequentemente apresentam atividade biológica, e por isso despertam interesse há séculos. Seus compostos de baixo peso molecular, em outros tempos, estiveram presentes nos perfumes usados por faraós e reis e influenciaram as rotas comerciais portuguesas, espanholas, inglesas e holandesas. Hoje, as plantas aromáticas ainda exercem interesse, pois, além de aplicação na indústria de alimentos e bebidas, movem a indústria de cosméticos, perfumes e mesmo a indústria de medicamentos, em especial os fitoterápicos. Plantas como hortelã, canela-da-china, cravo-da-índia, patchouli, lavanda, alecrim, rosa, orégano, tomilho e tantas outras foram domesticadas há muito tempo, e hoje são cultivadas em áreas tão grandes como distintos países europeus.

Com o consumo em escala mundial que algumas dessas espécies apresentam, é imprescindível que a padronização da cultura das plantas produtoras seja absolutamente levada em consideração, do mesmo modo que a padronização da obtenção dos óleos essenciais produzidos por essas plantas, visando à qualidade exigida pelo comércio internacional. Por conta do processo de industrialização da obtenção de determinados óleos essenciais, a análise sistemática da qualidade começou a ser estabelecida ainda no século 19, na Europa. A partir da determinação de técnicas analíticas, aliada a um sistema de produção controlada em termos agronômicos, foi possível se estabelecer leis que regulamentam o controle de qualidade de óleos essenciais a serem usados para os diferentes propósitos industriais. Porém, tamanho esforço se dá somente àquelas espécies vegetais conhecidas e consagradas para seu uso. Com plantas nativas, essa realidade não se estabelece.

O Brasil é considerado o país mais rico em biodiversidade terrestre, onde se estima encontrar algo em torno de 20% das espécies de plantas fanerógamas, das quais pouquíssimas foram estudadas em termos biológicos, químicos e farmacológicos. Desde 1997, o Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da Universidade Paulista estabeleceu um projeto de estudos em grande escala da riqueza vegetal amazônica, com vistas à identificação de extratos vegetais ativos contra tumores e agentes infecciosos. Nos últimos cinco anos, um projeto visando

ao estudo dos óleos essenciais de um grupo restrito de espécies foi estabelecido paralelamente ao projeto inicial de prospecção.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a variação quali e quantitativa dos óleos essenciais de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae), uma espécie da mesma família da noz-moscada, conhecida popularmente no Brasil como ucuuba-chico-de-assis no Estado de Amazonas, e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos de diferentes coletas, realizadas no decorrer de dois anos.

2 LITERATURA CONSULTADA

A seguir, serão abordados os principais aspectos relacionados aos temas abordados neste trabalho, a partir da literatura consultada, restrita aos artigos recuperados dos seguintes sítios: www.pubmed.org, www.scielo.br e www.google.com.

2.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos de baixo peso molecular, voláteis à temperatura ambiente, que possuem odor característico. São também conhecidos por óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, denominações dadas por conta das características físico-químicas ligadas à sua volatilidade. São líquidos à temperatura ambiente, de aparência oleosa e de aroma agradável; seus constituintes podem ser classificados em derivados de terpenos ou de fenilpropanoides (CASTRO, et. al., 2010; SIMÕES et. al., 1999), dependendo da via biossintética da qual são originados. Os óleos essenciais de origem terpênica podem ser classificados em monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos, conforme o número de unidades isoprénicas presentes na estrutura.

Plantas aromáticas são usadas como medicinais há milênios (RIOS e RECIO, 2005), e o principal grupo de compostos ativos destas espécies é formado pelos compostos voláteis que compõem seus óleos essenciais. Muitas vezes essas plantas apresentam propriedades antimicrobianas. A ação antimicrobiana atribuída aos óleos essenciais dessas espécies vegetais pode ser explicada pela capacidade dos óleos essenciais destruírem as paredes das membranas celulares, de modo a alterar sua permeabilidade, proporcionando à perda do controle osmótico, em particular, a perda de íons como o potássio (COX et. al., 2000).

Óleos essenciais são amplamente utilizados na indústria de alimentos, de bebidas, na indústria de domissanitários, de cosméticos, de medicamentos fitoterápicos, além da indústria de perfumes e fragrâncias. O número de espécies que apresentam óleos essenciais que não foram estudadas é grande, transformando o Brasil, em particular a floresta Amazônica, em um celeiro de novas descobertas.

2.2 Óleos essenciais e sua função na planta

Os óleos voláteis são encontrados restritamente em algumas famílias botânicas, como Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Laureaceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Rosaceae, Poaceae e Zingiberaceae. Dependendo da família, os óleos ocorrem em estruturas secretoras especializadas, como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas lisígenas. Tendem a se acumular em alguns órgãos, como flores, frutos, folhas ou cascas dos caules, embora sua ocorrência apresente variações segundo a espécie vegetal (NASCIMENTO *et. al.*, 2007; SIMÕES *et. al.*, 1999).

Os óleos essenciais desempenham papel importante na reprodução vegetal por atraírem polinizadores e animais dispersores de sementes. Possivelmente, esse grupo de compostos está envolvido com processos de co-evolução entre os animais polinizadores e as plantas polinizadas (FRIBERG *et. al.*, 2013), levando algumas espécies à profunda dependência desse tipo de procedimento evolutivo (SCHIESTL *et. al.*, 2002).

Outra função exercida pelos óleos essenciais é a de proteção das plantas contra agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra' herbívoros e predadores (FÜRSTENBERG-HÄGG *et. al.*, 2013).

2.3 Atividade antimicrobiana

Plantas medicinais com atividade antimicrobiana são usadas pela humanidade há milênios para o tratamento de doenças infecto-contagiosas (CARSON *et. al.*, 2006; GONÇALVES *et. al.*, 2008; JULIÃO *et. al.*, 2009;), doenças de pele (DA SILVA *et. al.*, 2012), problemas gastrointestinais (ROZZA *et. al.*, 2011), bem como para doenças ligadas ao sistema nervoso central (COSTA *et. al.*, 2011) e sistema cardiovascular (DA CUNHA *et. al.*, 2013), além de alguns apresentarem atividade antioxidante (GOMES *et. al.*, 2013; CAMPÊLO *et. al.*, 2011). Plantas usadas como tempero (outrora denominadas especiarias) apresentam grande quantidade de óleos essenciais, e a possível atividade antimicrobiana presente nos temperos, por conta dos óleos essenciais, pode explicar porque a culinária de países

tropicais ou subtropicais lança mão de sua ampla utilização e porque hoje a utilização de óleos essenciais como conservantes em alimentos tem ganhado espaço (BURT, 2004; HOLLEY *et. al.*, 2005; SONKER *et. al.*, 2014;). Registros históricos relativos à utilização de plantas para tratamento de doenças são descritos no manuscrito Egípcio “Ebers Papirus” (1.500 a.C.), que apresenta cerca de 800 prescrições e 700 drogas, e que contém os nomes, as doses e as indicações sobre o uso das plantas para o tratamento de doenças. Algumas dessas plantas são utilizadas até hoje, como ginseng (*Panax spp.*), que auxilia o aumento da imunidade e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), de ação bactericida. Hoje, o número de trabalhos científicos feitos com plantas que apresentam óleos essenciais é vasto, e aqui são mencionados alguns cujo objetivo é avaliar a ação antimicrobiana. Segundo Vieira *et. al.* (2004) o óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana*) apresenta o linalol como o composto majoritário, enquanto o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) apresenta ação antifúngica e bacteriana relacionada a seus terpenos. Kamatou *et. al.* (2012) relatam a história do eugenol, uma molécula importante na história do uso de óleos essenciais antimicrobianos e anestésicos. Melo *et. al.* (2003) referem-se a compostos fenólicos e carotenoides presentes no coentro (*Coriandrum sativum*) como os responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante. No orégano (*Origanum sp.*), o carvacrol é o responsável pela atividade antibacteriana e antifúngica, enquanto o óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) apresenta o eugenol como agente ativo (ZAGO *et. al.*, 2009). Segundo Tinoco *et. al.* (2007) o funcho-doce (*Foeniculum vulgare*) apresenta anetol e fenchona, enquanto na noz-moscada (*Myristica fragrans*) os compostos fenólicos são os responsáveis pelas propriedades antioxidante e antimicrobiana testados contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesius*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*. O óleo essencial de cravo revelou efeito germicida contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* (cinco linhagens), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (HOFFMANN *et. al.*, 1999).

2.4 Família Myristicaceae

A família Myristicaceae é amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo; o centro de distribuição mundial dessa família

é a Ásia tropical, da Índia à Polinésia. Além da América e Ásia, a família está representada na África e em Madagascar. Na América, ela ocorre nos dois hemisférios, desde o sul do México e Antilhas Menores até Bolívia e parte setentrional do Rio Grande do Sul, no Brasil. Caracterizada principalmente por apresentar quase exclusivamente árvores medianas, arvoretas e árvores de dossel, raramente arbustos, a família Myristicaceae é reconhecida, quando em estado vegetativo, por características peculiares, como tronco com entrenós bem definidos; casca do tronco, quando cortada ou ferida, exsudando seiva avermelhada em geral abundante e translúcida que em contato com o ar se oxida, passando a vermelho (exceto em *Osteophloeum* Warb.); folhas coriáceas, inteiras e sem estípulas; pecíolo profundamente canaliculado; filotaxia alterna, dística. Constituída por 18 gêneros e 400 espécies, as Miristicáceas nas Américas são representadas por cinco gêneros endêmicos, como *Virola* Aublet (45 spp.), *Iryanthera* Warb. (24 spp.), *Compsonera* Warb. (16 spp.), *Otoba* A. DC. ex Karsten. (7 spp.) e *Osteophloeum* Warb. (1 sp.), totalizando 93 espécies. Família de distribuição considerável em algumas regiões, é um dos mais importantes elementos da flora regional. A bacia amazônica é o centro de distribuição da família no continente sul-americano, onde certas espécies são muito comuns (PAULO, 1983 e SILVA e SILVA, 2008).

Espécies de Myristicaceae, especificamente do gênero *Virola* Aublet. são usadas na fabricação de móveis, caixas, compensados, laminados e contraplacados (LOUREIRO *et. al.*, 1989) e pode ser aproveitado na indústria de papel, especificamente papel Kraft, como fonte de celulose. Segundo Revilla (2002), espécies de *Virola* também são usadas popularmente contra fungos e sarna (*V. calophylla*), como alucinógeno (*V. elongata*, sinônimo de *V. theiodora*), como coagulante de feridas e contra infecções causadas por fungos (*V. peruviana*), desordens intestinais, cólicas e dispesprias (*V. sebifera* e *V. surinamensis*) e muitas espécies são exploradas pela indústria madeireira. De modo geral, Lorenzi e Matos (2002) relatam que o cozido da casca de espécies do gênero pode ser usado na assepsia de feridas e como adjuvante em processos de cicatrização e úlceras. Noz moscada (*Myristica fragrans*) é uma das principais espécies dessa família e uma das mais estudadas. Segundo Revilla (2002), espécies de *Iryanthera* são usadas popularmente como alucinógena (casca de *I. macrophylla*) e como antidiarreico

(casca de *I. tessmanii*), além da madeira de várias espécies ser usada em construção.

2.5 *Osteophloeum platyspermum*

O gênero *Osteophloeum* comprehende apenas duas espécies, sendo que somente *O. platyspermum* ocorre no Brasil. Sua distribuição geográfica se dá na Região Norte, especificamente nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia (REFLORA). É uma espécie com flor de gênero monotípico, apresenta folhas aparentemente glabras, mas com tricomas semiestrelados diminutos, como em espécies de *Virola*; as folhas, quando secas, são brilhantes na face adaxial, e o pecíolo é muito mais logo, se comparado aos demais gêneros. Apresenta seiva creme, levemente alaranjada, ápice da folha arredondado e emarginado, raramente cuspido e base gradualmente atenuada e revoluta (RIBEIRO *et. al.*, 1999).

No Brasil, além do nome mais comum – ucuuba-chico-de-assis, também é conhecida como ucuúba-de-banda (AC), ucuubarana (PA) e ixowahi (índios Yanomami) (REFLORA), lacre-da-mata, ucuuba-amarela, ucuuba-branca, ucuuba-da-mata, cumala-blanca e favorito (REVILLA, 2002). Nos outros países da América do Sul, pode ser conhecida por são *anaya huapa*, *huachig caspi*, *huapa*, *llauta caspi* e *machin cara yura*, nomes usados por indígenas da região (BENNET e ALARCÓN, 1994). Segundo Revilla (2002), a casca é usada como alucinógeno. Alguns trabalhos foram realizados com as folhas e o pericarpo desta espécie.

Bennet e Alarcón (1994) desenvolveram trabalho etnobotânico com índios Quijos Quichua, do Equador, sobre o uso de plantas alucinógenas, e reportam a presença de atividade estimulante sobre o sistema nervoso central de *O. platyspermum*. Segundo os autores, “huapa” é nome genérico para espécies da família Myristicaceae. No trabalho, segundo os nativos equatorianos, a seiva contém as substâncias alucinógenas, e não se deve ingerir sem que seja cozido, pois pode ser tóxico. Descrevem que seus ancestrais consumiam essa bebida para ver “fantasmas ou espíritos” ou se comunicar com o mundo espiritual.

Foram isolados os seguintes compostos dos frutos: ácido (-)-kaur-16-en-19-oico, sitosterol, estigmasterol, (\pm)-3-demetylhomopterocarpina e (\pm)-maackiaina

(BRAZ *et. al.*, 1977) e eperu-8(20),13-dien-3 α -15-diol, gliceril laurodimiriasto, gliceril 1,3-lauromiristato, ácido dihidroguaiarético, hidroxiotobaina, hidroxioxootobaína, guaiacina e otobafenol (BRAZ *et. al.*, 1984). Já Paulo (1983) isolou alguns compostos do extrato hexânico das folhas de *O. platyspermum*: espatulenol, δ -cadinol, ácido (-)-kauran-16-en-19-oico, ((-)-kauran-16-en-19-al), (eperu-13-en-8- β -15-diol). Nesse trabalho, o autor relata a avaliação da atividade antibacteriana do extrato hexânico de uma das frações que continha o ácido (-)-kauran-16-en-19-oico, contra *S. aureus*. Trabalho realizado por Morais (2008) relata a presença de flavonoides, sesquiterpenos e neolignanas anteriormente isoladas. Em seu trabalho, Morais trabalhou com o pericarpo, o arilo, o tegumento e as amêndoas da espécie, materiais submetidos à extração com hexano e partição com metanol, e extração com etanol e partição com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Foram isolados ácido *cis*-cafeico, liquiritigenina, butina, espatulenol, *ent*-4(15)-eudesmeno-1- β , 6 α α -diol, ácido *ent*-caur-16-en-19-oico (pericarpo e tegumento), ácido 17-hidroxi-16 α -*ent*-cauran-19-oico, *ent*-8(17),13*E*-labdadieno-3 α ,15-diol e ácido 3 α -hidroxi-*ent*-8(17),13*E*-labdadieno-15-oico (pericarpo). Neste mesmo trabalho, foram estudados os terpenos presentes no óleos essencial obtidos das folhas e do pericarpo de *O. platyspermum*. Do óleo essencial das folhas foram isolados α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, δ -3-careno, α -terpineno, p-cimeno, limoneno, trans-ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, terpinen-4-ol, α -terpineol, δ -elemeno, α -cubebeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, α -amorfeno, germacreno D, β -selineno, biciclogernacreno, β -curcumeno, óxido de cariofileno, globulol, guaiol, γ -eudesmol, α -epi-cadinol, α -epi-muurolol, α -muurolol, α -eudesmol, α -cadinol. No pericarpo, foram identificados o α -pineno, β -pineno, mirceno, δ -3-careno, α -terpineno, p-cimeno, limoneno, eucaliptol, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, α -fenchol, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -cubebeno, β -curcumeno, óxido de cariofileno, globulol, guaiol, γ -eudesmol, α -cadinol. O material vegetal usado para o estudo químico foi coletado, no caso deste trabalho, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, AM.

Carvalho (1980) isolou, do extrato benzênico do fruto, Lauro-dimiristato de glicerila, sitosterol, 1-lauro-3-miristato de glicerila, ácido dihidroguaiarético, um isômero da guaiacim-rel-(7*R*,8*R*,8'S)-4,3'-dihidroxi3,4'-dimetoxi-8,8',7,2'-lignana, um

isômero da otobafenol-rel-(7R,8R,8'S)-4'-metoxi-3'-hidroxi-3,4-meetilenodioxi-8,8',7,2'-lignana, hidroxiotobaina e hidroxi-oxo otobaina.

2.6 Influência na produção de metabólitos secundários em espécies produtoras de óleos essenciais

A produção de metabólitos secundários de plantas pode ocorrer em função de variáveis relacionadas à própria planta (fisiologia, genética) e a fatores externos, como climáticos (temperatura, incidência de radiação solar, umidade relativa, pluviosidade, vento, época do ano) e edáficos (micro e macronutrientes). Segundo Chagas *et. al.* (2011), o Brasil, pela sua grande extensão territorial, possui características climático-edáficas peculiares a cada região, que interfeririam, positiva ou negativamente, no desenvolvimento de espécies nativas ou introduzidas, mesmo que as condições sejam semelhantes ao local de origem (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; TAVEIRA *et. al.*, 2003). A determinação da época de colheita de plantas medicinais e aromáticas é essencial para obter maior teor de óleo essencial e melhor qualidade e máxima produção de biomassa com maior teor de princípio ativo. A composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é alterada acentuadamente durante as fases de crescimento. Sua produção varia de acordo com idade das plantas, estado reprodutivo, opções metabólicas determinadas pelo efeito de hormônios com ciclos de síntese de substâncias influenciada pelas estações ou horas do dia e com as condições de cultivo (CASTRO *et. al.*, 2010; CHAGAS *et. al.*, 2011; NASCIMENTO *et. al.*, 2007; PINTO e BERTOLUCCI, 2002). Assim, o cultivo de plantas em áreas específicas deve estar dentro dos padrões agronômicos requeridos para cada espécie a ser explorada, buscando melhorar a produtividade e a qualidade do material produzido, a fim de garantir a qualidade fitoquímica e farmacológica da matéria-prima. Antes de se iniciar o cultivo em escala comercial, é preciso conhecer o comportamento da espécie com relação aos efeitos climáticos da região de plantio, tratos culturais e fatores bióticos responsáveis pelo desenvolvimento da planta. A falta de domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento levará, provavelmente, à baixa qualidade da biomassa e de teores dos principais constituintes químicos do óleo essencial e de rendimentos (CHAGAS *et. al.*, 2011).

A coleta de plantas nativas e selvagens deve ser feita de acordo com os princípios éticos requeridos pela legislação do país e segundo o estabelecimento de regras relativas à preservação do indivíduo, sua população e sua manutenção no habitat, questões ligadas diretamente à conservação das espécies. Do mesmo modo que as plantas cultivadas podem sofrer a ação dos fatores climáticos-edáficos, as plantas selvagens estão igualmente sujeitas a apresentar alterações em seu metabolismo, porém, as plantas selvagens não estão condicionadas às práticas agronômicas, tornando-se, então, mais susceptíveis a alterações metabólicas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo visa obter a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas da espécie *Osteophloeum platyspermum*, pertencente às Myristicaceae e a análise de seus componentes voláteis.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais
- Avaliar a composição química dos óleos essenciais quali e quantitativamente

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de plantas

Folhas da espécie *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae), localizada no município de Manaus, AM, em floresta de terra firme às margens do rio Cuieiras, afluente do rio Negro, foram periodicamente coletadas na Floresta Amazônica, em áreas sob jurisdição do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), com licença obtida nesse órgão, de número 12A/08. A espécie foi identificada por Dr. Mateus L. B. Paciencia. As folhas foram coletadas de um indivíduo que apresenta diâmetro à altura do peito de 15,8 cm, a uma altura média de 15 metros do chão. Amostra do material coletado para a pesquisa botânica, denominada exsicata, foi depositada no Herbário UNIP, para que a identificação botânica seja feita [M.B.Paciencia, 846 (UNIP)], número de tombo no Herbário UNIP 5720. A cada coleta, realizada no mesmo indivíduo, as folhas foram acondicionadas em sacos de algodão. O material foi limpo, de modo que fossem retirados contaminantes, como insetos ou outros animais, outros órgãos da mesma planta, outras plantas, areia, terra etc. O material limpo foi mantido em câmara fria até ser usado para se obter os óleos essenciais.

4.2 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação, realizada em aparelho de Clevenger (SIMÕES *et. al.* 1999), durante quatro horas. A água contida nos óleos recém-coletados foi removida com a adição de pentano e posterior evaporação em aparelho de evaporação rotativa (Buchi). Os óleos foram pesados para se avaliar seu rendimento. Para as análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, 20 μ L de cada óleo foram diluídos em 980 μ L acetona.

4.3 Preparo das amostras e substâncias padrão para os ensaios biológicos

Os óleos essenciais foram diluídos a 10%, 5%, 2,5% e 1,25% em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth), antes de serem testados nos modelos biológicos. No ensaio da microdiluição em caldo, essas diluições foram mais uma vez diluídas

em 20 vezes, tornando as concentrações finais iguais a 0,50%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%. O DMSO foi igualmente testado nas concentrações de 50% e 100%.

4.4 Ensaio da microdiluição em caldo

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (MDC), (SUFFREDINI *et. al.*, 2004). Os óleos essenciais foram usados nas concentrações de 0,50%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%, sendo dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Colônias frescas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) cultivadas em placas de Petri com meio Müller-Hinton agar (Oxoid) foram usadas para o preparo da suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana foi preparada a 0,5 MacFarland em soro fisiológico estéril. Assim, 190 µL de meio inoculado foram adicionados a poços de microplacas de 96 poços (Costar) de fundo redondo. Depois, 10 µL de cada uma das amostras de óleos essenciais ou do veículo foram adicionados aos seus respectivos poços. Dois poços foram deixados como padrões negativos (só meio de cultura, sem bactéria) e positivos (meio de cultura mais inoculo). Para a análise da viabilidade bacteriana, foram feitas subculturas em meio Müller-Hinton agar.

4.5 Análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Shimatzu 14B/QP5050A, com analisador do tipo quadrupolo de mesma marca. A coluna utilizada foi a BPX5 (non polar 5% phenylpolisylphenylene), de 30m, diâmetro interno de 0,25mm. As condições de corrida do cromatógrafo a gás foram: temperatura inicial do forno 60°C (6 min), temperatura final 320°C (8 min), aumento de temperatura (temperature rate) de 10°C/min (com exceção da amostra 408OE2, que foi de 10 min), tempo total de corrida de 40 min. Pressão da coluna de 150.0kPa, fluxo da coluna de 2,5mL/min, velocidade linear de 58, “split ratio” de 9 e fluxo total de 30.0mL/min, gerado por gás de arraste Hélio. Os dados foram comparados com bibliotecas de compostos, como Willey229, NIST107, SHIM1607 e NIST21 e com livros de referência (ADAMS, 2007). Foram injetadas 13 amostras relativas às diferentes coletas; as datas em que foram efetuadas as coletas

encontram-se na tabela 1. O volume injetado de cada amostra foi de 1 μ L. As análises foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.6 Obtenção do Índice de Kovats

Os compostos voláteis cujas identificações foram sugeridas nas bibliotecas citadas, as quais compararam os espectros de massas das amostras com as referidas, foram submetidos ao cálculo do índice de Kovats, segundo a fórmula apresentada abaixo, a qual se baseia no tempo de retenção de cada um dos compostos e no tempo de retenção de alcanos.

$$KI=100*[n+(N-n) (\log trx-\log trn)/(\log trN - \log trn)]$$

onde N=número de carbonos do alcano que apresenta maior tempo de retenção; n=número de carbonos do alcano que apresenta menor tempo de retenção; x=tempo de retenção do composto em análise.

4.7 Análise matemática e estatística

Para este trabalho, foram utilizadas as análises de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com teste posterior de tukey, nível de significância de 0,05, e análise de variância do tipo ANOVA de duas entradas, com teste posterior de Bonferroni e nível de significância de 0,05 (GraphPad Prism 5.0). Além das análises estatísticas, foram feitas análises matemáticas utilizando-se a teoria dos conjuntos e análise do coeficiente de variação (CV).

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As folhas de *Osteophloeum platyspermum* foram coletadas 13 vezes, de um mesmo indivíduo, no decorrer de dois anos, de novembro de 2014 a outubro de 2014. Das folhas, foram obtidos óleos essenciais, por arraste a vapor, submetidos a análise contra *Staphylococcus aureus*, para obtenção da concentração mínima inibitória e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas. Desses resultados, foram feitas análises para se correlacionar a possível produção de terpenos que varia sazonalmente relacionada ao aumento ou diminuição da atividade antibacteriana.

Essa espécie foi escolhida por ser a única representante de seu gênero na Amazônia, segundo Joly (1993). As datas de coletas foram determinadas de modo aleatório, segundo disponibilidade de se montar as expedições.

As limitações do estudo podem ser relacionadas:

- As coletas não foram realizadas em períodos sistematicamente de mesma frequência;
- Não foram coletados outros órgãos, a não ser as folhas;
- Não foram coletadas amostras de mais de um indivíduo;
- Não foi feita mais de uma coleta por vez, nesse indivíduo, de modo que a quantidade de folhas coletadas não causou alterações significantes na quantidade de folhas disponíveis para a fotossíntese;
- Não foram estudados outros grupos de metabólitos secundários, a não ser os voláteis presentes nos óleos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de *O. platyspermum* estão relacionados na tabela 1 e estão representados na figura 1, juntamente com as variações climáticas registradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os rendimentos parecem variar em função da temperatura de maneira inversa: quando há elevação da temperatura, o rendimento dos óleos é menor, conforme se observa a tendência nos gráficos A e B da figura 1. Em geral, a umidade relativa da região é bastante elevada, acima de 80%. Algumas coletas foram realizadas em meses com umidade relativa inferior a 80%, característicos do período chamado de “verão”, na região, que chove menos. No período de seca, os rendimentos dos óleos foram medianos (gráficos A e C da figura 1). A insolação parece ter influenciado uma pequena diferença na produção de óleos essenciais das duas coletas realizadas em maio/2010 (408OE5 e 408OE6) (gráficos A e D da figura 1). A quantidade de chuvas acumuladas no dia, conforme pode ser observado nos gráficos A e E da figura 1.

Os 13 óleos essenciais foram submetidos à análise contra *Staphylococcus aureus* e sua capacidade antibacteriana foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando-se para isso quatro concentrações pré-definidas. Os óleos essenciais mais ativos (CIM=0,0625%) foram 408OE5, 408OE9 e 408OE11, e apresentaram rendimentos mais altos entre os 13 estudados. Curiosamente, a umidade relativa encontrava-se elevada, nos dias de coleta das folhas que deram origem a esses óleos, assim como a temperatura nesses dias atingiu a máxima em 30 °C, 32,5 °C e 32,5 °C, respectivamente. O óleo essencial, de rendimento mediano, 408OE8 apresentou boa atividade antibacteriana (CIM=0,125%), mas por ter sido o único óleo a apresentar essa atividade, foi analisado de forma isolada. No dia da coleta das folhas que deram origem a esse óleo, a temperatura estava em 36,4 °C, a umidade relativa em 82%, 10 h de insolação e 1 mm de chuvas acumuladas no dia. Os óleos essenciais 408OE2, 408OE3, 408OE12 e 408OE13 apresentaram atividade antibacteriana razoável (CIM=0,25%). Com exceção do óleo 408OE3, os outros três apresentaram os rendimentos mais baixos, temperatura em 32 °C em três coletas e 36 °C na coleta realizada para a obtenção do óleo 408OE13. Por fim, os óleos essenciais 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 e 408OE14 apresentaram uma fraca atividade

antibacteriana ($CIM \geq 0,50\%$). Com exceção da coleta 408OE10, a quantidade de chuvas acumuladas nos dias das outras quatro coletas de folhas foi menor ou igual a 1 mm, o que parece não ter interferido no rendimento dos óleos. Em comparação com estudos prévios realizados com a folha de *O. platyspermum*, observou-se rendimento de 0,15% (p/p) (MORAIS, 2008), todos os óleos estudados no presente trabalho apresentaram rendimento maior.

Estudos com espécies vegetais cultivadas demonstram que fatores ambientais, como ação de alterações climáticas (por exemplo, presença de vento, neve, tempestade, geada, insolação) e como os relacionados ao ataque de insetos ou patógenos, influenciariam diretamente a produção quali e quantitativa dos componentes voláteis por causar alterações em seu metabolismo secundário (CHEN, 2008). Além disso, o estudo da variação quali e quantitativa dos componentes voláteis de uma espécie cultivada pode ser feito com mais exatidão no decorrer dos diferentes estágios de desenvolvimento, como, por exemplo, níveis mais altos de quercitrina e luteolina foram observados no período reprodutivo de sálvia (*Salvia fruticosa* Miller) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e níveis mais baixos durante a fase vegetativa para o alecrim, e no período posterior à frutificação, na sálvia (PAPAGEORGIOU *et. al.*, 2008).

Observa-se que nos óleos analisados, somente monoterpenos e sesquiterpenos foram identificados, enquanto fenilpropanoides encontraram-se ausentes. Foram identificados 50 terpenos (figura 2 e quadro 1) a ocorrer na espécie, sendo β -pineno ($33,78\% \pm 0,96$), limoneno ($20,81\% \pm 0,75$) os componentes majoritários em todos. Considerando-se os terpenos que ocorrem em quantidade maior que 1%, podem ser incluídos α -pineno ($9,40\% \pm 0,56$), mirceno ($7,26\% \pm 0,33$), α -terpineol ($5,26\% \pm 0,67$), espatulenol ($2,98\% \pm 0,45$), α -cadinol ($1,98\% \pm 0,23$), isoespatulenol ($1,42\% \pm 0,17$), linalol ($1,33\% \pm 0,15$), viridiflorol ($1,28\% \pm 0,14$), τ -muurolol ($1,03\% \pm 0,23$) e terpinen-4-ol ($1,01\% \pm 0,08$), perfazendo aproximadamente 87% do total.

No presente trabalho, quatro níveis de atividade antibacteriana foram considerados (0,50%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%). Observa-se que todas as coletas apresentaram certo grau de atividade antibacteriana. Não foi observada variação na quantidade de um terpeno ou de um grupo de terpenos, majoritários ou minoritários,

(tabela 15) relativa ao aumento da atividade antibacteriana dos óleos (tabela 1). Por conta de a planta necessitar produzir óleo essencial durante o ano todo, aparentemente com pouca variação mensurável, evidencia-se que sua composição química de voláteis é essencial para que a planta sobreviva ao ataque de micro-organismos, e que supostamente a presença de alguma atividade é primordial para sua viabilidade na floresta tropical. Esse fator pode ser determinado geneticamente e ser, de certo modo, influenciado pelo meio, por exemplo, durante o ataque de micro-organismos, que estimulariam a produção em maior quantidade de compostos para sua defesa. Além disso, o odor característico de uma espécie é determinado geneticamente, por processos coevolutivos (entre o animal polinizador e a planta) e talvez os mesmos componentes voláteis responsáveis pelo odor característico sejam os responsáveis pela defesa contra micro-organismos (SOUZA *et. al.*,2008).

Não foi possível observar diferenças quantitativas na porcentagem dos terpenos nos 13 óleos essenciais analisados, em relação aos resultados antibacterianos obtidos. Por isso, foi empregada a teoria dos conjuntos especificamente a intersecção, para se tentar evidenciar quais os componentes voláteis que ocorrem concomitantemente em cada grupo de óleos, reunidos segundo o grau de atividade antibacteriana. Deste modo, os óleos que apresentaram os mesmos níveis de atividade antibacteriana foram agrupados e sua composição química avaliada. A primeira análise foi feita com os três óleos que apresentaram a atividade antibacteriana mais efetiva ($CIM=0,0625\%$) e foram verificados os terpenos presentes concomitantemente nos três (tabela 16). Verificou-se que, dos 50 terpenos que ocorrem na espécie, somente 22 apareciam em comum nos óleos que apresentaram a melhor atividade antibacteriana. Esses terpenos são α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, pinocarvona, canfeno, limoneno, α -terpineol, β -elemeno, γ -elemeno, mirceno, linalol, terpinen-4-ol, neo-intermedeol, elemol, α -cadinol, τ -muurolol, 1-epi-cubenol, δ -amorfeno, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol.

Somente um óleo apresentou atividade antibacteriana de $CIM=0,125\%$, e não foi possível se fazer esse mesmo tipo de análise por falta de comparação.

Quatro óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana de $CIM=0,25\%$. Dezenove terpenos ocorrem em comum a esses quatro óleos

(tabela17): β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineol, terpinen-4-ol, β -elemeno, γ -elemeno, mirceno, linalol, nerol, neo-intermedeol, elemol, α -cadinol, 1-epi-cubenol, δ -amorfeno, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol.

Cinco óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana CIM=0,50%. Os terpenos que ocorrem em comum a esses cinco óleos são 19 (tabela 18): β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineol, terpinen-4-ol, β -elemeno, γ -elemeno, linalol, mirceno, neo-intermedeol, germacreno B, elemol, α -cadinol, 1-epi-cubenol, δ -amorfeno, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol.

Dezesete terpenos precisam ocorrer em *O. platyspermum* para haver atividade antibacteriana, e esses terpenos são β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineol, terpinen-4-ol, β -elemeno, γ -elemeno, mirceno, linalol, neo-intermedeol, elemol, α -cadinol, 1-epi-cubenol, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol.

Não existe na literatura uma análise de atividade antibacteriana baseada na teoria dos conjuntos, por conta da ausência de análise quantitativa. Por isso, tendo em mãos apenas as médias e desvios padrão referentes à ocorrência dos terpenos no decorrer das 13 coletas, foram calculados os coeficientes de variação (CV) para cada composto, buscando estabelecer um parâmetro matemático para se avaliar a importância da ocorrência de determinado terpeno para a atividade antibacteriana. Os resultados dessa análise encontram-se na tabela 15. Observou-se que, para os terpenos que precisam estar presentes nos óleos mais ativos o CV deve ser <68%, o que significa que a ocorrência de um composto específico é mais constante. Se o valor do CV for maior do que 68%, o terpeno não está presente em todas as coletas, chegando ao extremo de se apresentar acima de 360%, o que significa que o composto ocorre em somente uma coleta.

Não há registros sobre a presença de flor ou fruto, nem mesmo da exata temperatura e umidade relativa no momento das coletas, porém, esses dados foram levantados na literatura. O período de frutificação registrado para *O. platyspermum* que ocorre na Reserva Ducke, em Manaus, foi de outubro a abril, e floração de setembro a dezembro, sendo fenofases anuais e regulares (ALENCAR *et. al.*, 1979). Ao confrontar o período de frutificação, que vai de outubro a maio, verifica-se que nas coletas 7 (29/08/2010), 12 (8/07/2011) e 13 (20/08/2011), a quantidade de

monoterpenos da família do α -pineno se apresenta em quantidades em torno de 45%, ao passo que na época de floração (de outubro a dezembro), a quantidade de monoterpenos da família do α -pineno está entre 37% e 49%.

Segundo dados coletados no sítio do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) informações referentes às condições climáticas na região amazônica no período abrangido pelo nosso estudo, de novembro de 2009 a outubro de 2011, os seguintes eventos ocorreram:

- Novembro de 2009 – verão quente e seco no norte do Brasil, com previsões de chuva abaixo da média histórica de dez/09 a fev/10; temperaturas acima da normal climatológica. Alterações características da presença do fenômeno El Niño;
- Dezembro de 2009 a março de 2010 – presença do fenômeno El Niño, mantendo as características descritas para o mês de nov/2009. Em março, início do declínio do fenômeno, embora previsão de chuva ainda abaixo da média histórica;
- Abril de 2010 – enfraquecimento do fenômeno El Niño. Chuvas com probabilidade de normal a acima do normal previstas para o presente mês e os seguintes, até julho. A temperatura ainda encontrava-se acima do normal;
- Maio de 2010 – chuvas em torno da média histórica para esse período, e temperatura acima do normal climatológica;
- Junho de 2010 – desenvolvimento do fenômeno La Niña no Pacífico Equatorial, no período de inverno. Previsão de chuvas para o Norte da Amazônia, que não engloba a região de Manaus. Temperaturas ainda acima da normal climatológica.
- Julho de 2010 – manteve-se a previsão de junho.
- Agosto de 2010 – configuração do fenômeno La Niña, com sua persistência até o início do ano seguinte. Chuvas próximas aos valores climatológicos na região de Manaus.

- Setembro de 2010 – repete-se a previsão para o mês de agosto, porém a temperatura esperada encontra-se em torno da normal climatológica;
- Outubro de 2010 – chuvas acima da média para a região de Manaus, temperaturas na normal climatológica;
- Novembro de 2010 – fenômeno La Niña em seu auge. Previsões de chuva e temperatura idênticas às do mês anterior;
- Dezembro de 2010 – repete-se a previsão de nov/09;
- Janeiro de 2011 - repete-se a previsão de nov/09;
- Fevereiro de 2011 - repete-se a previsão de nov/09;
- Março de 2011 – fenômeno La Niña perde força. Chuvas e temperatura em torno da normal climatológica;
- Abril de 2011 - repete-se a previsão de mar/11;
- Maio de 2011 – neutralidade entre condições de El Niño e La Niña. Repete-se a previsão de mar/11;
- Junho de 2011 – La Niña ainda em declínio. Repete-se a previsão de mar/11;
- Julho de 2011 – previsão de chuvas dentro da categoria normal e abaixo do normal, temperatura dentro da normal climatológica;
- Agosto de 2011 – comportamento climatológico com igual probabilidade dentro das categorias acima, na média e abaixo da normal. Temperatura em torno da normal climatológica;
- Setembro de 2011 – tendência ao retorno de La Niña. Comportamento climatológico com igual probabilidade dentro das categorias acima, na média e abaixo da normal. Temperatura em torno da normal climatológica;
- Outubro de 2011 – persiste evolução das condições para o fenômeno La Niña. Chuvas acima do normal e temperatura em torno da média climatológica.

Confrontando as informações obtidas do INPE com os dados do presente trabalho, não há evidências diretas que relate os fenômenos El Niño e La Niña com a ocorrência dos terpenos ou com a atividade antibacteriana.

Como a avaliação da composição química do óleo essencial das folhas de *Osteophloeum platyspermum* ocorreu pela primeira vez de modo repetido (coletas em um mesmo indivíduo por 13 vezes), não foi possível estabelecer a variação da produção de terpenos em função da sazonalidade e das influências climáticocedáficas. Porém, o trabalho gerou número considerável de hipóteses a serem consideradas em futuros trabalhos de avaliação de plantas aromáticas, dentre as quais (1) a variação da produção de terpenos pela espécie selvagem deve ser tal que não impeça de apresentar capacidade de proteção contra agentes microbianos; (2) a produção de terpenos pode variar de tal modo a não depender somente de poucos fatores, mas, dependendo da espécie, essa variação pode ser tão ampla a ponto de dificilmente se estabelecer uma relação temporal; (3) os fatores ambientais e climáticos, juntamente com a ação de agentes patogênicos, levariam a uma variação tão complexa na produção de terpenos, em plantas selvagens, que a determinação exata de sua constituição seria muito imprecisa, a ponto de que estratégias de coleta devem considerar a frequência a ser estabelecida para essa espécie, e deve ser determinado o número de indivíduos a serem coletados concomitantemente, de modo a se buscar fazer médias populacionais qualitativas e quantitativas dos terpenos presentes nos óleos; (4) por conta do elevado custo que esse estudo implicaria no estabelecimento de um mínimo de amostras a serem coletadas e sua frequência talvez deva ser estabelecida para plantas selvagens. Fica evidente que essa proposta é mais viável para espécies cultivadas, que apresentam interesse econômico, mas estas já são muito estudadas e seu plantio estabelecido. O que acontece, de fato, na natureza, não é conhecido, e precisa ser explorado.

7 CONCLUSÕES

- Os 13 óleos essenciais obtidos de folhas de *O. platyspermum* apresentaram atividade antibacteriana em diferentes intensidades, sendo que três apresentaram concentração inibitória mínima de 0,0625%;
- α -pineno, β -pineno, limoneno, α -terpineol, terpineol-4, β -elemeno, γ -elemeno, mirceno/ β -mirceno, trans-cariofileno, neo-intermedeol, elemol, α -cadinol, 1-epi-cubenol, δ -amorfene, espatulenol, isoespatulenol, viridiflorol e ledol são compostos presentes em todos os óleos, e sua presença estaria relacionada à capacidade de combater bactérias que a espécie apresenta;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre a atividade antibacteriana e a quantidade de terpenos nos 13 óleos;
- Com este trabalho, foi possível iniciar o estabelecimento de estratégias de coleta para plantas aromáticas selvagens, sendo o primeiro de uma série de trabalhos do gênero;
- A partir dos estudos iniciais, será possível se estabelecer novas estratégias para a avaliação dos óleos essenciais em novos modelos antibacterianos, com vistas à sua atividade em modelos planctônicos e de biofilme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^a ed. Illinois: Allured Pub. Corp. 804p. 2008.
- ALENCAR, J.C; ALMEIDA, R.A; FERNANDES, N.P. Fenologia das espécies florestais em florestas tropicais úmidas de terra firme na Amazônia Central. **Acta Amazonica**. v.9, n.1, p.163-98, 1979.
- BENNET, B.C; ALARCÓN, R. *Osteophloeum platyspermum* and *Virola duckei* (Myristicaceae): newly reported as hallucinogens from Amazonian Ecuador. **Econ. Bot.** v.48, n.2, p.152-8, 1994.
- BRAZ F.O.R; DE CARVALHO, M.G; GOTTLIEB, O.R. XVIII: Eperudiendio, glycerides and neolignans from fruits of *Osteophloeum platyspermum*. **Planta Med.** v.50, n.1, p.53-5, 1984
- BRAZ F.O.R; GOTTLIEB, O.R; DE MORAES, A.A; PEDREIRA, G; PINHO, S.L.V; MAGALHÃES, M.T; DE S. RIBEIRO, M.N. Isoflavonoids from Amazonian species. **Lloydia**. v. 40, p.236-238, 1977.
- BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.** v.94, p.233-253, 2004.
- CAMPÊLO, L.M; GONÇALVES, F.C; FEITOSA, C.M; FREITAS, R.M. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse hippocampus. **Pharm. Biol.** v.49, n.7, p.709-715, 2011.
- CARSON, C.F; HAMMER, K.A; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Rev. Clin Microbiol.** v.19, n.1, p.50-62, 2006.
- CARVALHO, M.G. **Neolignanas de *Licaria rigida* e *Osteophloeum platyspermum***. 218 f. Dissertação (Mestre em química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.
- CASTRO, H.G; PERINI, V.B.M; SANTOS, G.R; LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Rev. Ciênc. Agron.** v.41, n.2, p.308-314, 2010.

CHAGAS, J.H; PINTO J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V; SANTOS, F.M. Produção da biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scient. Agron.** v.33, n.2, p.2-3, 2011.

CHEN, M.S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science.** v.15, n.2, p.101-114, 2008.

COSTA, C.A; KOHN, D.O; DE LIMA, V.M; GARGANO, A.C; FLÓRIO, J.C; COSTA, M. The Gabaergic system contributes to the anxiolitic-like effect of essential oil from *Cymbopongon citratus* (lemongrass). **J. Ethnopharmacol.** v.137, n.1, p.828-836, 2011.

COX, S.D; MANN, C.M; MARKHAM, J.L; BELL, H.C; GUSTAFSON, J.E; WARMINGTON, J.R; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.** v.88, p.170-175, 2000.

DA CUNHA, G.H; de MORAES, M.O; FECHINE, F.V; FROTA BEZERRA, F. A; SILVEIRA, E.R; CANUTO, K.M; de MORAES, M.E. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascul. Pharmacol.** v.58, n.5-6, p. 337-345, 2013.

DA SILVA, A.G; PUZIOL, P.F; LEITAO, R.N; GOMES, T.R; SCHERER, R; MARTINS, M.L; CAVALCANTI, A.S; CAVALCANTI, L.C. Application of the essential oil from copaíba (*Copaifera langsdorfi* Desf.) for acne vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical Trial. **Altern. Med. Rev.** v.17, n.1, p.69-75, 2012.

FRIBERG, M; SCHWIND, C; RAGUSO, R.A; THOMPSON, J.N. Extreme divergence in floral scent among woodland star species (*Lithophragma* spp.) pollinated by floral parasites. **Ann. Bot.**, 12p. DOI: 10.1093/aob/mct007, 2013.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J; ZAGROBELNY, M; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **Int. J. Mol. Sci.** v.14, p.10242-10297, 2013.

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

GOMES, M.R.F; SCHUH, R.S; JACQUES, A.L.B; DORNELES, G.G; MONTANHA, J; ROEHE, P.M; BORDIGNON, S; DALLEGRAVE, E; LEAL, M.B; LIMBERGER, R.P; *et al.*; Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.23, n.2, p.284-290, 2013.

GONÇALVES, F.A.; et. al.; Antibacterial activity of Guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.50, n.1, p. 11-15, 2008.

HOFFMANN, F.L; SOUZA, S.J.F; GARCIA-CRUZ, C.H; VINTURIM, T.M; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “In vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias, **B. Ceppa**. v.17, n.1, p.11-20, 1999.

HOLLEY, R.A, PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.** v.27, p.273-292, 2005.

INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. <http://www.inmet.gov.br/portal/>, acesso em 10/06/2014.

INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. www.infoclima.cptec.inpe.br, acesso em 10/06/2014.

JOLY, A.B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Cia Editora Nacional. 777p. 1983.

JULIÃO, L.S; BIZZO, H.R; SOUZA, A.M; LOURENÇO, M.C; SILVA, P.E; TAVARES, E.S; RASTRELLI, L; LEITÃO, S.G. Essential oils from two *Lantana* species with antimycobacterial activity. **Nat. Prod. Comm.** v.4, n.12, p.1733-1736, 2009.

KAMATOU, G.P; VERMAAK, I; VILJOEN, A.M. Eugenol-from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**. v.17, n.6, p. 6953-81, 2012.

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

LOUREIRO, A.A; FREITAS, M.C; VASCONCELOS, F.J. Estudo anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae) da Amazônia. **Acta Amazonica**. v.19, p.415-465, 1989.

MELO, E.A; FILHO, J.M; GUERRA, N.B; MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.23, p. 195-199, 2003.

MORAIS, S.K.R. **Constituintes químicos de algumas espécies de Myristicaceae.** 2008. 175 f. Tese (Doutor em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NASCIMENTO, F.C; NASCIMENTO, A.C; RORIGUES, C.S; ANTONIOLLI, A. R; SANTOS, P.O; JÚNIOR, A.M.B; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.17, n.1, p.2-5, 2007.

PAPAGEORGIOU, V; GARDELI, C; MALLOUCHOS, A, *et al.* Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. **J. Agric. Food Chem.** v.56, n.16, p.7254–7264, 2008.

PAULO, M.Q. **Estudo fitoquímico das folhas de *Virola surimamensis* e *Osteophloeum platyspermum*.** 1983. 169 f. Dissertação (Mestre em química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1983.

PINTO, J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais.** 2002. 169 f. Fundação de apoio ao ensino pesquisa e extensão – Universidade Federal de Lavras, Lavras 2002.

REFLORA- **Plantas do Brasil, resgate histórico e herbário virtual para o conhecimento e conservação da flora Brasileira.** Lista de Espécies da Flora do Brasil, <www.reflora.jbrj.gov.br>, acesso em 10/06/2014.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica.** INPA e SEBRAE, v.1-2, 858f, Manaus, 2002.

RIBEIRO, J.E.L.S; *et. al.* **Flora da Reserva Ducke**, Guia de Identificação da plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central, 1.ed. Manaus: Inpa, 1999.

RIOS, J.L; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.** v.100, p.80-84, 2005.

ROZZA, A.L; de MELLO MORAES, T; KUSHIMA, H; NUNES, D.S; HIRUMA-LIMA, C.A; PELLIZZON, C.H. involvement of glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide, vasoactive intestinal peptide, and heat-shock protein-70 in the gastroprotective mechanism of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) essential oil. **J. Med. Food.** v.14, n.9, p.1101-1107, 2011.

SCHIESTL, F.P; AYASSE, M. Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids? **Plant Syst. Evol.** v.234, n.1, p.111-119, 2002.

SIMÕES, C. M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** 1^a ed, 1999.

SILVA, M.F; SILVA, J.A.C. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil – II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. **Acta Amazonica.** v.38, n.2, p.207–212, 2008.

SONKER, N; PANDEY, A.K; SINGH, P; TRIPATHI, N.N. Assessment of *Cymbopongon citratus* (DC.) Stapf. essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and in vivo efficacy during storage. **J. Food. Sci.** v.79, n.4, p.M628-M634, 2014.

SOUZA, J.R.P; MORAIS, H; CARAMORI, P.H; JOJANNSSON, L.A.P.S; MIRANDA, L.V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Hortic. Bras.** v.26, n.1, p.40-44, 2008.

SUFFREDINI, I.B; SADER, H.S; GONÇALVES, A.G; REIS, A.O; GALES, A.C; VARELLA, A.D; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, n.3, p. 379-384, 2004.

TAVEIRA, F.S.N; ANDRADE, E.H.A; LIMA, W.N; MAIA, J.G.S. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v.75, n.1, p.27-31, 2003.

TINOCO, M.T, MARTINS, M.R; CRUZ-MORAIS, J. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* Miller. **Rev. Ciênc. Agr.** v.30, n.1, p.448-454, 2007.

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

ZAGO, J.A.A; USHIMARU, P.I; BARBOSA L.N; JUNIOR, A.F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.19, n.4, p.828-933, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – Tabelas referentes aos resultados obtidos

A tabela 1 relaciona os rendimentos (dados em p/p) obtidos dos 13 óleos essenciais, bem como apresenta os dados obtidos para concentração inibitória mínima, dada em porcentagem (v/v), contra *S. aureus*, através do ensaio da microdiluição em caldo (MDC). A figura 1 demonstra os rendimentos dos óleos essenciais em relação às datas das 13 coletas de folhas.

Figura 1 – (A) Rendimento dos óleos essenciais obtidos das 13 coletas de folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) e variação da (B) temperatura máxima, (C) umidade relativa, (D) insolação e (E) chuvas acumuladas no dia. Dados relativos às medidas climáticas obtidos no sítio www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php

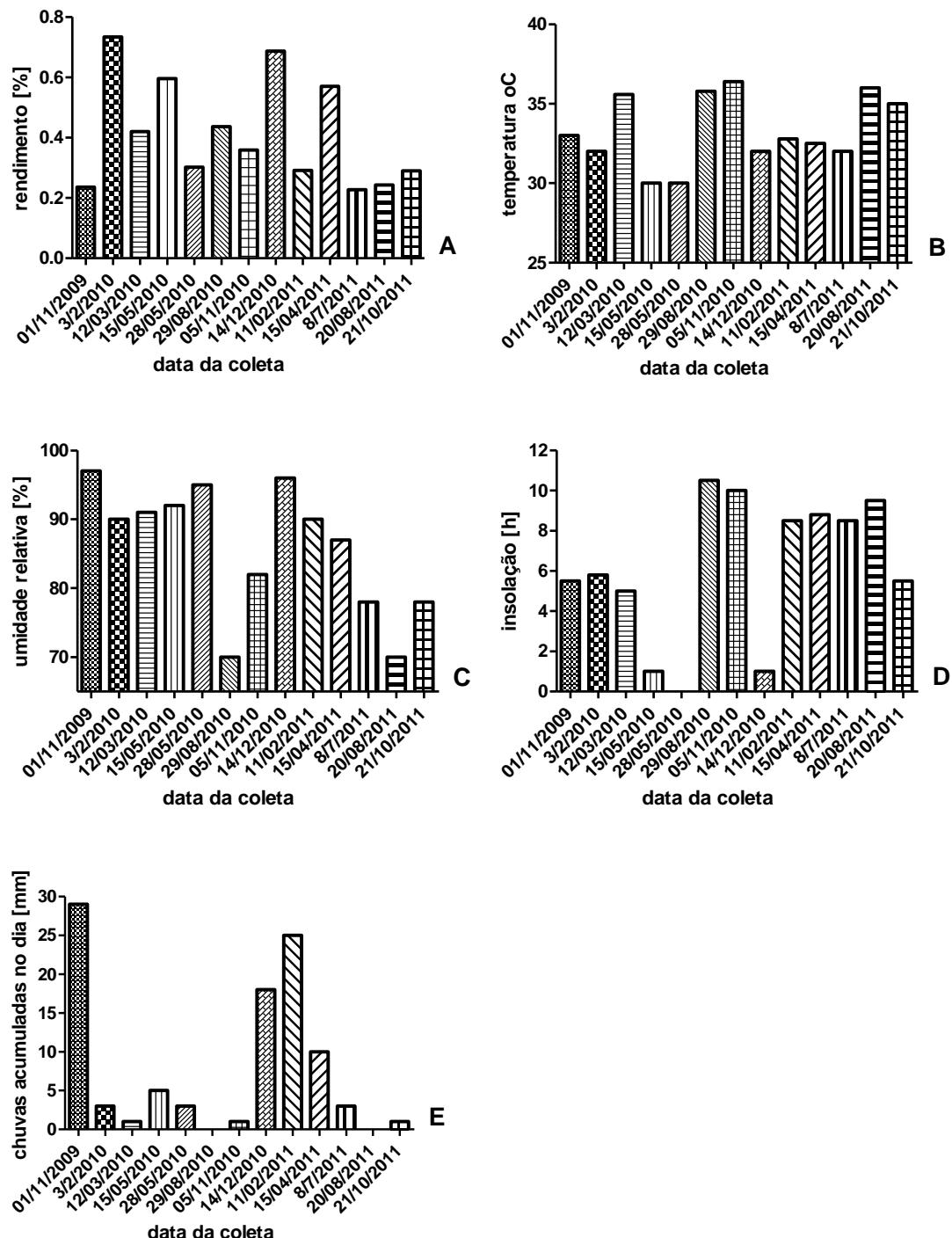


Tabela 1 – Rendimento dos óleos essenciais obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae), para as 13 coletas, realizadas de novembro de 2009 a outubro de 2011, e relação da concentração mínima inibitória obtida contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) no ensaio da microdiluição em caldo, expressa em porcentagem (v/v).

Número de referência do óleo essencial	Massa/Rendimento do óleo	Data da coleta	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	CIM %
408OE2	1,2132g/0,236%	01/11/2009	-	-	+	+	0,25
408OE3	1,7213g/0,7346%	03/02/2010	-	-	+	+	0,25
408OE4	0,3242g/0,4202%	12/03/2010	+	+	+	+	>0,5
408OE5	1,1451g/0,5958%	15/05/2010	-	-	-	-	<0,0625
408OE6	1,352g/0,3025%	28/05/2010	+	+	+	+	>0,5
408OE7	1,2814g/0,4363%	29/08/2010	+	+	+	+	>0,5
408OE8	1,5727g/0,3587%	05/11/2010	-	-	-	+	0,125
408OE9	2,1596g/0,6873%	14/12/2010	-	-	-	-	<0,0625
408OE10	1,2337g/0,2916%	11/02/2011	-	+	+	+	0,5
408OE11	1,5979g/0,5706%	15/04/2011	-	-	-	-	<0,0625
408OE12	1,4876g/0,2276%	08/07/2011	-	-	+	+	0,25
408OE13	1,5120g/0,2432%	20/08/2011	-	-	+	+	0,25
408OE14	1,5627g/0,2904%	21/10/2011	+	+	+	+	>0,5

Legenda: (+) = presença de bactéria no ensaio confirmatório (subcultura em meio Agar) – resultado não ativo; (-) = ausência de crescimento bacteriano.

As tabelas 2 a 14 representam a relação dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais obtidos das folhas de *O. platyspermum* para cada uma das 13 coletas e sua porcentagem, seus respectivos tempos de retenção, bem como os valores calculados de índice de Kovats.

Tabela 2 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE2, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.904	849.8	0,66	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.835	934.48	7,48	α -pineno
3	6.680	984.77	29,29	β -pineno
4	7.025	992.6	7,05	Mirceno
5	8.363	1036.1	21,24	Limoneno
6	8.435	1038.5	0,38	1,8-cineol
7	10.258	1094.2	1,83	Linalool
8	10.754	1112.8	0,20	endo-fenchol
9	11.680	1152	0,30	pinocarvona
10	11.894	1160.7	0,27	Borneol
11	11.993	1164.6	1,05	terpinen-4-ol
12	12.362	1179	5,53	α -terpineol
13	12.783	1194.9	1,17	Nerol
14	15.301	1316.2	0,45	β -elemeno
15	15.880	1347.9	0,37	γ -elemeno
16	16.898	1400.8	0,51	Junipeno
17	17.142	1415.7	0,26	δ -amorfeno
18	17.268	1423.2	0,15	cis-calameleno
19	17.656	1446.1	0,52	Elemol
20	17.785	1453.6	0,17	não identificado
21	18.127	1473.2	3,54	espatulenol
22	18.224	1478.7	0,99	viridiflorol
23	18.337	1485.1	0,62	Ledol
24	18.472	1492.7	0,28	Rosifoliol
25	18.543	1496.6	0,24	longipinanol
26	18.697	1506	0,81	cubenol 1-epi
27	18.756	1509.8	1,65	isoespatulenol
28	18.937	1521.5	1,52	τ -muurolol
29	19.095	1531.5	2,17	α -cadinol
30	19.185	1537.2	0,58	neo-intermedeol

Tabela 3 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE3, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	4.811	933.7	9,48	α -pineno
2	6.352	976.94	0,54	sabineno
3	6.630	983.6	36,62	β -pineno
4	7.015	992.38	6,84	mirceno
5	8.468	1039.6	20,75	limoneno
6	8.585	1043.6	0,35	1,8-cineol
7	10.706	1110.7	1,19	linalol
8	11.824	1157.9	0,40	trans-pinocarveol
9	12.388	1180	0,39	pinocarvona
10	12.763	1194.2	0,45	terpinen-4-ol
11	13.178	1213.1	1,96	α -terpineol
12	13.741	1241	0,80	nerol
13	16.542	1382.6	0,34	α -copaeno
14	16.802	1395.9	1,51	β -elemeno
15	17.394	1430.7	0,49	cariofileno z
16	17.516	1437.9	1,20	γ -elemeno
17	18.499	1494.2	0,43	germacreno D
18	18.668	1504.2	0,32	Não identificado a
19	18.751	1509.5	1,21	Não identificado b
20	19.071	1530	0,72	δ -amorfeno
21	19.138	1534.2	0,35	10-epi-cubebol
22	19.698	1569.1	0,53	elemol
23	19.840	1577.8	0,43	germacreno B
24	20.250	1602.9	5,46	espatulenol
25	20.310	1607	0,62	óxido de cariofileno
26	20.370	1611.1	0,76	viridiflorol
27	20.518	1621.2	0,33	ledol
28	20.977	1651.8	0,46	1-epi-cubenol
29	21.037	1655.7	1,68	isoespatulenol
30	21.215	1667.4	1,24	τ -cadinol
31	21.449	1682.6	1,55	α -cadinol
32	21.554	1689.4	0,62	neo-intermedeol

Tabela 4 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE4, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de kovats	Porcentagem	nome do composto
1	4.839	934.61	10.53	alfa-pineno
2	5.448	953.05	0.37	Canfeno
3	6.675	984.65	35.9	beta-pineno
4	7.051	993.18	8.11	Mirceno
5	7.661	1011.1	0.24	cis-ocimeno
6	8.502	1040.8	21.75	Limoneno
7	8.593	1043.8	0.3	1,8-cineol
8	8.992	1056.7	0.39	trans-ocimeno
9	9.357	1068.1	0.13	gama-terpineno
10	10.126	1090.5	0.26	Terpinoleno
11	10.704	1110.6	1.53	Linalol
12	11.28	1135.5	0.31	Fenchol
13	12.188	1172.3	0.19	Hidrato de canfeno
14	12.631	1189.2	0.29	Borneol
15	12.757	1193.9	1.17	terpinen-4-ol
16	13.202	1214.3	7.1	alfa-terpineol
17	13.734	1240.7	0.79	Nerol
18	16.791	1395.3	0.4	beta-elemeno
19	17.506	1437.3	0.39	gama-elemeno
20	18.645	1502.7	0.2	Não identificado a
21	18.741	1508.9	0.38	Não identificado b
22	19.062	1529.4	0.32	delta-amorfeno
23	19.688	1568.5	0.21	Elemol
24	19.835	1577.5	0.21	germacreno B
25	20.074	1592	0.17	Globulol
26	20.227	1601.4	1.31	Espatulenol
27	20.36	1610.4	1.17	Viridiflorol
28	20.502	1620.1	0.63	Ledol
29	20.683	1632.2	0.28	Rosifoliol
30	20.768	1637.9	0.12	Não identificado
31	20.963	1650.9	0.72	1-epi-cubenol
32	21.027	1655.1	0.83	isoespatulenol
33	21.21	1667.1	0.56	tau-cadinol
34	21.256	1670.1	0.67	tau-muurolol
35	21.443	1682.2	1.61	alfa-cadinol
36	21.546	1688.9	0.45	Neo-intermedeol

Tabela 5 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE5, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	4.805	933.5089	10,43	α -pineno
2	5.422	952.3051	0,33	canfeno
3	6.628	983.5532	35,93	β -pineno
4	7.011	992.2937	7,00	mirceno
5	7.645	1010.544	0,22	cis-ocimeno
6	8.464	1039.512	20,80	limoneno
7	8.567	1042.955	0,33	1,8-cineol
8	10.700	1110.412	1,12	linalol
9	11.282	1135.57	0,24	endo-fenchol
10	12.189	1172.299	0,16	hidrato de canfeno
11	12.382	1179.761	0,23	pinocarvona
12	12.756	1193.895	0,79	terpinen-4-ol
13	13.184	1213.434	5,52	α -terpineol
14	13.781	1242.959	0,51	β -citronelol
15	16.536	1382.319	0,27	α -copaeno
16	16.795	1395.551	1,01	β -elemeno
17	17.388	1430.363	0,40	cariofileno z
18	17.509	1437.507	0,79	γ -elemeno
19	18.493	1493.835	0,30	germacreno D
20	18.655	1503.312	0,34	Não identificado a
21	18.752	1509.587	0,57	Não identificado b
22	19.065	1529.615	0,49	δ -amorfeno
23	19.692	1568.765	0,37	Elemol
24	19.836	1577.58	0,31	germacreno B
25	20.079	1592.312	0,19	Globulol
26	20.234	1601.849	2,54	Espatulenol
27	20.363	1610.651	1,50	Viridiflorol
28	20.506	1620.343	0,76	Ledol
29	20.686	1632.447	0,24	Rosifoliol
30	20.967	1651.134	0,72	1-epi-cubenol
31	21.032	1655.42	1,42	Isoespatulenol
32	21.259	1670.288	1,55	τ -murolol
33	21.446	1682.417	1,98	α -cadinol
34	21.548	1688.989	0,66	neo-intermedeol

Tabela 6 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE6, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.860	847.1356		4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.771	932.4041	10,54	α -pineno
3	6.318	976.1005	0,33	Sabineno
4	6.610	983.1301	36,31	β -pineno
5	6.991	991.8492	7,20	Mirceno
6	7.625	1009.798	0,28	cis-ocimene
7	8.461	1039.411	22,58	limoneno
8	8.560	1042.723	0,19	1,8-cineol
9	8.968	1055.976	0,29	trans-ocimene
10	10.696	1110.235	0,66	linalol
11	12.752	1193.746	1,20	terpinen-4-ol
12	13.163	1212.371	1,70	α -terpineol
13	15.665	1336.251	0,30	biciclogermacreno
14	16.537	1382.371	0,22	α -copaeno
15	16.796	1395.601	1,10	β -elemeno
16	17.511	1437.625	1,07	γ -elemeno
17	18.495	1493.946	0,33	germacreno D
18	18.659	1503.572	0,33	Não identificado a
19	18.745	1509.135	1,35	Não identificado b
20	19.068	1529.805	0,92	δ -amorfeno
21	19.143	1534.555	0,27	10-epi-cubebol
22	19.694	1568.888	0,51	Elemol
23	19.835	1577.519	0,35	germacreno B
24	20.239	1602.191	3,18	Espatulenol
25	20.302	1606.496	0,33	óxido de cariofileno
26	20.365	1610.787	1,00	Viridiflorol
27	20.506	1620.343	0,44	Ledol
28	20.760	1637.392	0,19	Não identificado
29	20.970	1651.332	0,80	1-epi-cubenol
30	21.033	1655.486	1,47	Isoespatulenol
31	21.212	1667.223	1,36	τ -cadinol
32	21.448	1682.547	1,63	α -cadinol
33	21.554	1689.374	1,29	neo-intermedeol
34	22.144	1730.26	0,26	Intermedeol

Tabela 7 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE7, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do compost
1	2.96	853.1225		4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.853	935.0555	10,30	α-pineno
3	5.465	953.5342	0,32	Canfeno
4	6.673	984.606	33,43	β-pineno
5	7.052	993.2009	6,94	Mirceno
6	7.675	1011.658	0,19	cis-ocimeno
7	8.499	1040.687	20,61	Limoneno
8	8.595	1043.884	0,29	1,8-cineol
9	10.714	1111.033	1,59	Linalool
10	11.293	1136.033	0,32	endo-fenchol
11	12.198	1172.649	0,18	hidrato de canfeno
12	12.391	1180.106	0,20	Pinocarvona
13	12.641	1189.594	0,32	Borneol
14	12.766	1194.268	1,23	terpinen-4-ol
15	13.210	1214.747	8,14	α-terpineol
16	13.745	1241.215	0,72	Nerol
17	16.539	1382.474	0,17	α-copaeno
18	16.798	1395.703	0,56	β-elemeno
19	17.512	1437.684	0,60	γ-elemeno
20	18.497	1494.058	0,14	germacreno D
21	18.653	1503.182	0,28	Não identificado a
22	18.757	1509.909	0,36	Não identificado b
23	19.068	1529.805	0,34	δ-amorfeno
24	19.695	1568.949	0,21	Elemol
25	19.840	1577.824	0,34	germacreno B
26	20.081	1592.432	0,23	Globulol
27	20.238	1602.123	2,29	Espatulenol
28	20.368	1610.991	1,47	Viridiflorol
29	20.511	1620.681	0,86	Ledol
30	20.690	1632.715	0,37	Rosifoliol
31	20.768	1637.926	0,19	não identificado 1
32	20.877	1645.176	0,15	não identificado 2
33	20.969	1651.266	0,71	1-epi-cubenol
34	21.036	1655.684	1,44	Isoespatulenol
35	21.263	1670.549	1,55	τ-muurolol
36	21.451	1682.74	2,07	α-cadinol
37	21.553	1689.31	0,63	neo-intermedeol neo
38	21.668	1696.68	0,17	não identificado c
39	21.802	1705.898	0,11	não identificado 3

Tabela 8 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE8, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do compost
1	2.852	846.65	0,48	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.761	932.08	5,44	α -pineno
3	4.840	934.64	4,07	cis-ocimeno
4	6.677	984.7	30,78	β -pineno
5	7.043	993	7,95	Mirceno
6	8.527	1041.6	21,90	Limoneno
7	8.593	1043.8	0,24	1,8-cineol
8	10.712	1110.9	1,68	Linalool
9	11.280	1135.5	0,33	endo-fenchol
10	12.381	1179.7	0,29	Pinocarvona
11	12.639	1189.5	0,40	Borneol
12	12.766	1194.3	1,33	terpinen-4-ol
13	13.243	1216.4	9,00	α -terpineol
14	13.736	1240.8	1,34	Nerol
15	16.796	1395.6	0,53	β -elemeno
16	17.511	1437.6	0,47	γ -elemeno
17	18.635	1502	0,33	Não identificado a
18	18.754	1509.7	0,30	Não identificado b
19	19.065	1529.6	0,31	δ -amorfeno
20	19.695	1568.9	0,22	Elemol
21	20.079	1592.3	0,25	Globulol
22	20.252	1603.1	2,07	espatulenol
23	20.379	1611.7	1,60	Viridiflorol
24	20.519	1621.2	0,87	Ledol
25	20.690	1632.7	0,31	Rosifoliol
26	20.972	1651.5	0,76	1-epi-cubenol
27	21.048	1656.5	1,34	isoespatulenol
28	21.218	1667.6	0,79	τ -cadinol
29	21.272	1671.1	0,89	τ -muurolol
30	21.471	1684	2,31	α -cadinol
31	21.568	1690.3	0,69	neo-intermedeol

Tabela 9 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE9, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.919	850.69	0,84	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.862	935.34	11,25	α -pineno
3	5.457	953.31	0,29	Canfeno
4	6.721	985.72	37,53	β -pineno
5	7.067	993.53	5,83	Mirceno
6	8.520	1041.4	16,89	Limoneno
7	8.610	1044.4	0,26	1,8-cineol
8	10.717	1111.2	1,26	Linalol
9	11.824	1157.9	0,20	trans-pinocarveol
10	12.389	1180	0,28	Pinocarvona
11	12.764	1194.2	0,61	terpinen-4-ol
12	13.197	1214.1	3,04	α -terpineol
13	13.734	1240.7	1,09	Nerol
14	15.671	1336.6	0,13	biciclogermacreno
15	15.957	1352	0,29	α -cubebeno
16	16.543	1382.7	0,44	α -copaenoCopaene α
17	16.805	1396.1	1,17	β -elemeno
18	17.395	1430.8	0,54	cariofileno z
19	17.520	1438.2	0,98	γ -elemeno
20	17.737	1450.8	0,18	Não identificado d
21	17.860	1458	0,13	Não identificado e
22	18.055	1469.1	0,19	Não identificado f
23	18.499	1494.2	0,32	germacreno D
24	18.664	1503.9	0,49	Não identificado a
25	18.757	1509.9	0,88	Não identificado b
26	19.073	1530.1	0,75	δ -amorfeno
27	19.218	1539.3	0,34	trans-calameneno
28	19.698	1569.1	0,33	Elemol
29	19.839	1577.8	0,42	germacreno B
30	20.263	1603.8	4,05	Espatulenol
31	20.380	1611.8	1,08	Viridiflorol
32	20.518	1621.2	0,66	Ledol
33	20.693	1632.9	0,31	Rosifoliol
34	20.777	1638.5	0,26	Não identificado 1
35	20.973	1651.5	0,88	1-epi-cubenol
36	21.047	1656.4	1,39	isoespatulenol

Continuação da tabela 9.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
37	21.218	1667.6	0,74	τ -cadinol
38	21.270	1671	0,74	τ -muurolol
39	21.464	1683.6	1,81	α -cadinol
40	21.568	1690.3	0,76	neo-intermedeol
41	21.677	1697.3	0,19	Não identificado c
42	21.810	1706.5	0,18	Não identificado 3

Tabela 10 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE10, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.914	850.39	0,87	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.864	935.41	11,05	α-pineno
3	6.736	986.07	32,92	β-pineno
4	7.065	993.49	4,77	mirceno
5	8.520	1041.4	14,26	limoneno
6	12.380	1179.7	0,28	pinocarvona
7	12.758	1194	0,70	terpinen-4-ol
8	13.194	1213.9	2,75	α-terpineol
9	15.952	1351.7	0,42	α-cubebeno
10	16.539	1382.5	0,65	α-copaeno
11	16.807	1396.2	1,82	β-elemeno
12	17.392	1430.6	0,72	cariofileno z
13	17.520	1438.2	1,31	γ-elemeno
14	18.661	1503.7	0,72	não identificado a
15	18.756	1509.8	1,06	não identificado b
16	19.067	1529.7	0,72	δ-amorfeno
17	19.135	1534	0,27	10-epi-cubebol
18	19.210	1538.8	0,28	cis-calameneno
19	19.699	1569.2	0,43	elemol
20	19.837	1577.6	0,63	germacreno B
21	20.079	1592.3	0,36	globulol
22	20.279	1604.9	6,01	espatulenol
23	20.398	1613	2,52	viridiflorol
24	20.529	1621.9	1,46	ledol
25	20.696	1633.1	0,61	rosifoliol
26	20.767	1637.9	0,49	unknown 1
27	20.877	1645.2	0,36	unknown 2
28	20.978	1651.9	1,20	1-epi-cubenol
29	21.062	1657.4	2,42	isoespatulenol
30	21.227	1668.2	1,16	τ-cadinol
31	21.280	1671.7	1,47	τ-muurolol
32	21.479	1684.5	2,84	α-cadinol
33	21.578	1690.9	1,20	neo-intermedeol
34	21.677	1697.3	0,38	não identificado c
35	21.810	1706.5	0,32	não identificado 3
36	22.148	1730.5	0,26	intermedeol
37	22.302	1741.4	0,31	não identificado 4

Tabela 11 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE11, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.860	847.136	0,80	4-hydroxy-4-methyl-2-pantanona
2	4.779	932.665	10,28	α -pineno
3	5.389	951.355	0,36	canfeno
4	6.612	983.177	35,62	β -pineno
5	6.995	991.938	8,48	Mirceno
6	7.619	1009.57	0,20	β -ocimeno
7	8.469	1039.68	23,69	Limoneno
8	8.552	1042.46	0,32	1,8-cineol
9	10.685	1109.75	1,26	Linalol
10	11.263	1134.77	0,30	endo-fenchol
11	11.800	1156.89	0,14	trans-pinocarveol
12	12.173	1171.67	0,20	hidrato de canfeno
13	12.366	1179.15	0,33	Pinocarvona
14	12.618	1188.73	0,32	Borneol
15	12.744	1193.45	1,22	terpinen-4-ol
16	13.192	1213.84	7,21	α -terpineol
17	13.716	1239.81	1,21	Nerol
18	16.783	1394.94	0,35	β -elemeno
19	17.498	1436.86	0,21	γ -elemeno
20	18.648	1502.86	0,24	Não identificado a
21	18.747	1509.26	0,24	Não identificado b
22	19.054	1528.92	0,18	δ -amorfeno
23	19.680	1568.03	0,20	Elemol
24	20.224	1601.16	1,72	Espatulenol
25	20.352	1609.9	0,83	Viridiflorol
26	20.495	1619.6	0,35	Ledol
27	20.860	1644.05	0,11	Não identificado 2
28	20.954	1650.27	0,41	1-epi-cubenol
29	21.020	1654.63	0,76	Isoespatulenol
30	21.202	1666.57	0,42	τ -cadinol
31	21.248	1669.57	0,49	τ -muurolol
32	21.434	1681.64	1,14	α -cadinol
33	21.537	1688.28	0,39	neo-intermedeol

Tabela 12 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE12, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.888	848.83	0,62	4-hydroxy-4-methyl-2-pantanona
2	4.823	934.09	10,18	α-pineno
3	5.417	952.16	0,34	Canfeno
4	6.594	982.75	34,86	β-pineno
5	7.060	993.38	8,75	Mirceno
6	7.642	1010.4	0,24	cis-ocimeno
7	8.527	1041.6	23,41	Limoneno
8	8.976	1056.2	0,44	trans-ocimeno
9	10.703	1110.5	1,66	Linalool
10	11.272	1135.1	0,30	endo-fenchol
11	12.179	1171.9	0,18	hidrato de canfeno
12	12.625	1189	0,32	Borneol
13	12.753	1193.8	1,23	terpinen-4-ol
14	13.211	1214.8	6,87	α-terpineol
15	13.723	1240.1	1,16	Nerol
16	16.528	1381.9	0,17	α-copaeno
17	16.788	1395.2	0,64	β-elemeno
18	17.504	1437.2	0,59	γ-elemeno
19	18.486	1493.4	0,20	germacreno D
20	18.635	1502	0,28	Não identificado a
21	18.742	1508.9	0,49	Não identificado b
22	19.057	1529.1	0,41	δ-amorfeno
23	19.683	1568.2	0,22	Elemol
24	19.829	1577.2	0,33	germacreno B
25	20.226	1601.3	0,99	Espatulenol
26	20.357	1610.2	0,93	Viridiflorol
27	20.498	1619.8	0,48	Ledol
28	20.685	1632.4	0,15	Rosifolol
29	20.958	1650.5	0,45	1-epi-cubenol
30	21.025	1655	0,64	Isoespatulenol
31	21.252	1669.8	0,92	τ-muurolol
32	21.442	1682.2	1,21	α-cadinol
33	21.552	1689.2	0,33	neo-intermedeol

Tabela 13 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE13, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

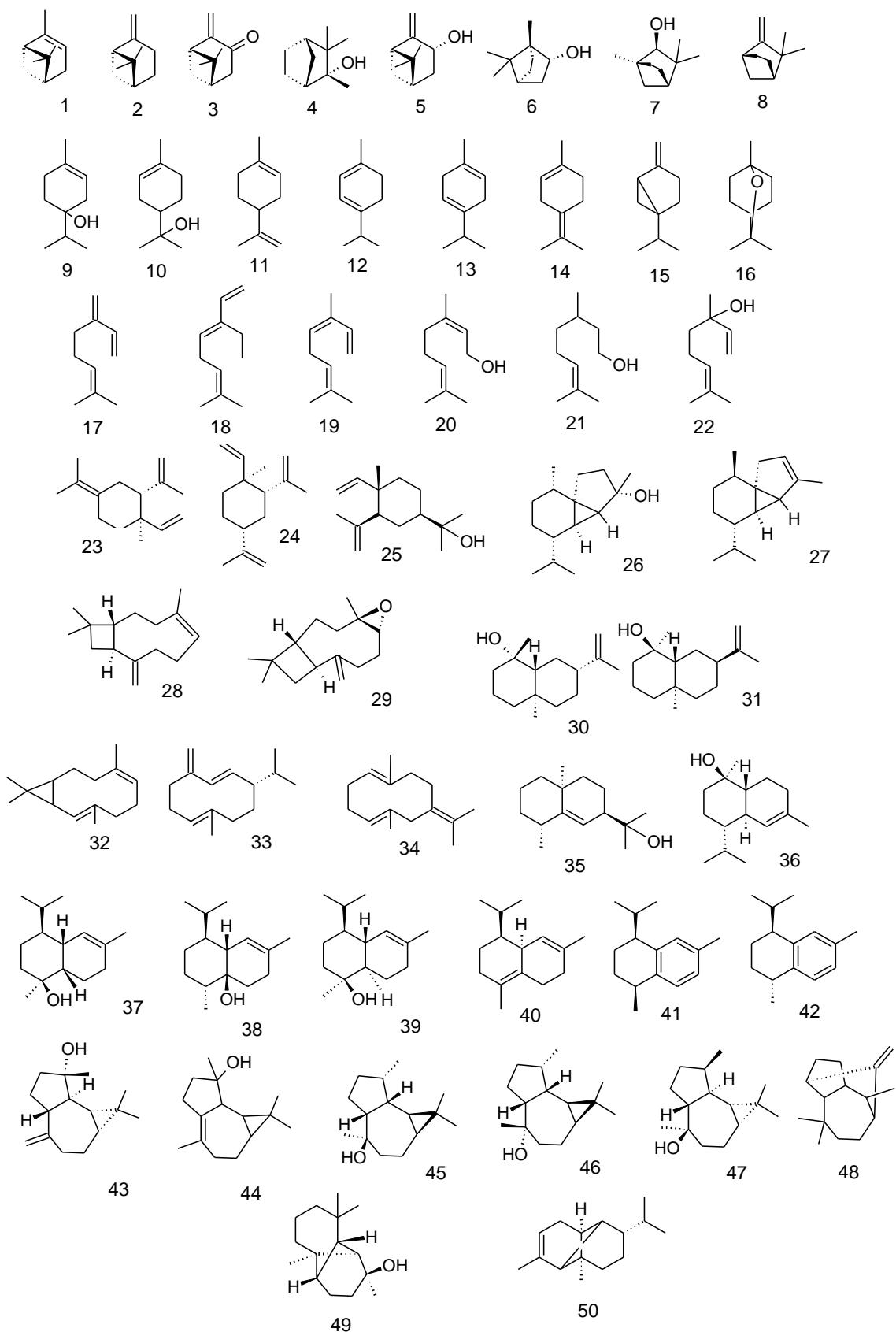
número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.923	850.93	0,71	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.878	935.85	9,91	α -pineno
3	5.465	953.53	0,31	Canfeno
4	6.752	986.44	34,62	β -pineno
5	7.112	994.52	8,97	Mirceno
6	7.677	1011.7	0,28	cis-ocimeno
7	8.020	1024.2	0,17	α -terpineno
8	8.569	1043	23,26	Limoneno
9	9.003	1057.1	0,72	trans-ocimeno
10	9.365	1068.3	0,25	γ -terpineno
11	10.128	1090.6	0,43	terpinoleno
12	10.717	1111.2	1,43	linalol
13	11.283	1135.6	0,27	endo-fenchol
14	12.190	1172.3	0,18	hidrato de canfeno
15	12.635	1189.4	0,27	borneol
16	12.766	1194.3	1,21	terpinen-4-ol
17	13.227	1215.6	5,99	α -terpineol
18	13.732	1240.6	1,18	nerol
19	15.663	1336.1	0,11	biciclogermacreno
20	16.794	1395.5	0,49	β -elemeno
21	17.508	1437.4	0,49	γ -elemeno
22	18.490	1493.7	0,19	germacreno D
23	18.647	1502.8	0,19	Não identificado a
24	18.742	1508.9	0,56	Não identificado b
25	19.064	1529.6	0,41	δ -amorfeno
26	19.689	1568.6	0,25	Elemol
27	19.833	1577.4	0,26	germacreno B
28	20.237	1602.1	1,24	Espatulenol
29	20.366	1610.9	0,92	Viridiflorol
30	20.505	1620.3	0,48	Ledol
31	20.682	1632.2	0,21	Rosifoliol
32	20.760	1637.4	0,12	Não identificado 1
33	20.965	1651	0,57	1-epi-cubenol
34	21.034	1655.6	0,74	Isoespatulenol
35	21.210	1667.1	0,45	τ -cadinol
36	21.260	1670.4	0,53	τ -muurolol
37	21.453	1682.9	1,30	α -cadinol
38	21.552	1689.2	0,32	neo-intermedeol

Tabela 14 – Composição dos terpenos contidos no óleo essencial 408OE14, obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum*, suas porcentagens, tempos de retenção e índices de Kovats obtidos.

número do pico	tempo de retenção	índice de Kovats	porcentagem	nome do composto
1	2.927	851.17		4-hydroxy-4-methyl-2-pentanona
2	4.839	934.61	10,53	α-pineno
3	5.448	953.05	0,37	canfeno
4	6.675	984.65	35,90	β-pineno
5	7.051	993.18	8,11	Mirceno
6	7.661	1011.1	0,24	cis-ocimeno
7	8.502	1040.8	21,75	Limoneno
8	8.593	1043.8	0,30	1,8-cineol
9	8.992	1056.7	0,39	trans-ocimeno
10	9.357	1068.1	0,13	γ-terpineno
11	10.126	1090.5	0,26	Terpinoleno
12	10.704	1110.6	1,53	Linalol
13	11.280	1135.5	0,31	endo-fenchol
14	12.188	1172.3	0,19	hidrato de canfeno
15	12.631	1189.2	0,29	borneol
16	12.757	1193.9	1,17	terpinen-4-ol
17	13.202	1214.3	7,10	α-terpineol
18	13.734	1240.7	0,79	nerol
19	16.791	1395.3	0,40	β-elemeno
20	17.506	1437.3	0,39	γ-elemeno
21	18.645	1502.7	0,20	Não identificado a
22	18.741	1508.9	0,38	Não identificado b
23	19.062	1529.4	0,32	δ-amorfeno
24	19.688	1568.5	0,21	Elemol
25	19.835	1577.5	0,21	germacreno B
26	20.074	1592	0,17	Globulol
27	20.227	1601.4	1,31	Espatulenol
28	20.360	1610.4	1,17	Viridiflorol
29	20.502	1620.1	0,63	Ledol
30	20.683	1632.2	0,28	Rosifoliol
31	20.768	1637.9	0,12	Não identificado 1
32	20.963	1650.9	0,72	1-epi-cubenol
33	21.027	1655.1	0,83	Isoespatulenol
34	21.210	1667.1	0,56	τ-cadinol
35	21.256	1670.1	0,67	τ-muurolol
36	21.443	1682.2	1,61	α-cadinol
37	21.546	1688.9	0,45	neo-intermedeol

A figura 2 demonstra as estruturas dos terpenos identificados para os óleos essenciais das folhas de *O. platyspermum* e o quadro 1 relaciona os nomes das respectivas estruturas, bem como classifica os terpenos segundo o número de unidades isoprênicas necessárias para sua biossíntese e segundo o número de anéis.

Figura 2 – Relação das estruturas moleculares dos terpenos identificados em *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae).



Quadro 1 – Relação dos nomes dos terpenos isolados de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprénicas e de anéis.

1	α-pineno	Monoterpenos tricíclicos (ciclobutano/ciclohexano/ciclohexano)
2	β-pineno	
3	Pinocarvona	
4	Hidrato de canfeno	
5	Trans-pinocarveol	
6	Borneol	Monoterpenos tricíclicos (ciclopentano/ciclopentano/ciclohexano)
7	Endo-fenchol	
8	Canfeno	
9	Terpinen-4-ol	Monoterpenos monocíclicos
10	α-terpineol	
11	Limoneno	
12	α-terpineno	
13	γ-terpineno	
14	Terpinoleno	
15	Sabineno	Monoterpeno bicíclico (ciclopropano e ciclohexano)
16	1,8-cineol	Monoterpeno bicíclico (ciclohexano e ciclohexano)
17	Mirceno	Monoterpenos acíclicos
18	Trans-ocimeno	
19	Cis-ocimeno	
20	Nerol	
21	β-citronelol	
22	Linalol	Sesquiterpenos monocíclicos
23	γ-elemeno	
24	β-elemeno	
25	Elemol	

26	10-epi-cubebol	Sesquiterpenos tricíclicos
27	α -cubebeno	
28	Cariofileno z	Sesquiterpenos bicíclicos
29	Óxido de cariofileno	
30	Neo-intermedeol	Sesquiterpenos bicíclicos
31	Intermedeol	
32	Biciclogermacreno	Sesquiterpenos mono ou bicíclicos
33	Germacreno D	
34	Germacreno B	
35	Rosifoliol	Sesquiterpeno bicíclico
36	α -cadinol	Sesquiterpenos bicíclicos
37	τ -muurolol	
38	1-epi-cubenol	
39	τ -cadinol	
40	δ -amorfeno	Sesquiterpeno bicíclicos
41	Cis-calameneno	
42	Trans-calameneno	
43	Espatulenol	Sesquiterpenos tricíclicos
44	Isoespatulenol	
45	Viridiflorol	Sesquiterpenos tricíclicos do tipo ent-kauranos
46	Ledol	
47	Globulol	
48	Junipeno	
49	Longipinanol	Sesquiterpeno tricíclico
50	α -copaeno	Sesquiterpeno tetracíclico

A tabela 15 representa as médias dos componentes voláteis dos óleos essenciais de *Osteophloeum platyspermum* de cada grupo organizado segundo a semelhança estrutural, bem como fornece dados referentes ao coeficiente de variação.

Tabela 15 – Relação dos terpenos presentes nos 13 óleos essenciais obtidos de folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae). Os terpenos estão agrupados de acordo com a semelhança estrutural que apresentam. São dadas as, as médias das somas dos terpenos pertencentes a cada grupo semelhante, as médias das porcentagens de cada terpeno em relação às coletas realizadas, seu desvio padrão e erro padrão, bem como o respectivo coeficiente de variação.

	01/11/09 408OE2	03/02/10 408OE3	12/03/10 408OE4	15/05/10 408OE5	28/05/10 408OE6	29/08/10 408OE7	05/11/10 408OE8	14/12/10 408OE9	11/01/11 408OE10	15/04/11 408OE11	08/07/11 408OE12	20/08/11 408OE13	21/10/11 408OE14				coeficiente de variação
β-pineno	29,29	36,62	35,9	35,93	36,31	33,43	30,78	37,53	32,92	35,62	34,86	34,62	35,9	33,78	3,48	0,96	10,30
α-pineno	7,48	9,48	10,53	10,43	10,54	10,3	5,44	11,25	11,05	10,28	10,18	9,91	10,53	9,40	2,01	0,56	21,39
Pinocarvona	0,3	0,39	0	0,23	0	0,2	0,29	0,28	0,28	0,33	0	0	0	0,18	0,15	0,04	86,01
trans-pinocarveol	0	0,4	0	0	0	0	0	0,2	0	0,14	0	0	0	0,06	0,12	0,03	213,64
hidrato de canfeno	0	0	0,19	0,16	0	0,18	0	0	0	0,2	0,18	0,18	0,19	0,08	0,09	0,03	112,89
Total	37,07	46,89	46,62	46,75	46,85	44,11	36,51	49,26	44,25	46,57	45,22	44,71	46,62				
Borneol	0,27	0	0,29	0	0	0,32	0,4	0	0	0,32	0,32	0,27	0,29	0,17	0,17	0,05	98,17
endo-fenchol	0,2	0	0,31	0,24	0	0,32	0,33	0	0	0,3	0,3	0,27	0,31	0,17	0,15	0,04	84,54
Canfeno	0	0	0,37	0,33	0	0,32	0	0,29	0	0,36	0,34	0,31	0,37	0,18	0,17	0,05	97,00
Total	0,47	0	0,97	0,57	0	0,96	0,73	0,29	0	0,98	0,96	0,85	0,97				
Limoneno	21,24	20,75	21,75	20,8	22,58	20,61	21,9	16,89	14,26	23,69	23,41	23,26	21,75	20,81	2,69	0,75	12,93
α-terpineol	5,53	1,96	7,1	5,52	1,7	8,14	9	3,04	2,75	7,21	6,87	5,99	7,1	5,26	2,42	0,67	46,02
terpinen-4-ol	1,05	0,45	1,17	0,79	1,2	1,23	1,33	0,61	0,7	1,22	1,23	1,21	1,17	1,01	0,28	0,08	28,19
α-terpineno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0,01	0,05	0,01	360,56
γ-terpineno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,13	0,03	0,08	0,02	258,08
α-terpinoleno	0	0	0,26	0	0	0	0	0	0	0	0	0,43	0,26	0,05	0,13	0,04	252,70
Total	27,82	23,16	29,02	27,11	25,48	29,98	32,23	20,54	17,71	32,12	31,51	31,31	30,41				
1,8-cineol	0,38	0,35	0,3	0,33	0,19	0,29	0,24	0,26	0	0,32	0	0	0,3	0,23	0,14	0,04	60,75
Total	0,38	0,35	0,3	0,33	0,19	0,29	0,24	0,26	0	0,32	0	0	0,3				
sabineno	0	0,54	0	0	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07	0,17	0,05	252,36
Total	0	0,54	0	0	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0				
mirceno	7,05	6,84	8,11	7	7,2	6,94	7,95	5,83	4,77	8,48	8,75	8,97	8,11	7,26	1,20	0,33	16,48
linalol	1,83	1,19	1,53	1,12	0,66	1,59	1,68	1,26	0	1,26	1,66	1,43	1,53	1,33	0,53	0,15	40,08
Nerol	1,17	0,8	0,79	0	0	0,72	1,34	1,09	0	1,21	1,16	1,18	0,79	0,80	0,49	0,14	61,32
cis-ocimeno	0	0	0,24	0,22	0,28	0,19	4,07	0	0	0,2	0,24	0,28	0,24	0,44	1,10	0,30	249,35
trans-ocimeno	0	0	0,39	0	0,29	0	0	0	0	0	0,44	0,72	0,39	0,14	0,24	0,07	169,14
β-citronelol	0	0	0	0,51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04	0,14	0,04	360,56
Total	10,05	8,83	11,06	8,85	8,43	9,44	15,04	8,18	4,77	11,15	12,25	12,58	11,06				
elemol	0,52	0,53	0,21	0,37	0,51	0,21	0,22	0,33	0,43	0,2	0,22	0,25	0,21	0,36	0,17	0,05	46,37
β-elemeno	0,45	1,51	0,4	1,01	1,1	0,56	0,53	1,17	1,82	0,35	0,64	0,49	0,4	0,95	0,61	0,17	64,68
γ-elemeno	0,37	1,2	0,39	0,79	1,07	0,6	0,47	0,98	1,31	0,21	0,59	0,49	0,39	0,81	0,50	0,14	61,81
Total	1,34	3,24	0,64	2,17	2,68	1,37	1,22	2,48	3,56	0,76	1,45	1,23	1				
α-cubebeno	0	0	0	0	0	0	0	0,29	0,42	0	0	0	0	0,05	0,14	0,04	248,89
10-epi-cubebol	0	0,35	0	0	0,27	0	0	0	0,27	0	0	0	0	0,07	0,13	0,04	192,01
Total	0	0,35	0	0	0,27	0	0	0,29	0,69	0	0	0	0				

Continuação da tabela 15.

	01/11/09	03/02/10	12/03/10	15/05/10	28/05/10	29/08/10	05/11/10	14/12/10	11/01/11	15/04/11	08/07/11	20/08/11	21/10/11					
	408OE2	408OE3	408OE4	408OE5	408OE6	408OE7	408OE8	408OE9	408OE10	408OE11	408OE12	408OE13	408OE14	média	desvpadr	errpadr	coeficiente de variação	
cariofileno z	0	0,49	0	0,4	0	0	0	0,54	0,72	0	0	0	0	0,22	0,30	0,08	136,54	
óxido de cariofileno	0	0,62	0	0	0,19	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0,19	0,05	183,33	
Total	0	1,11	0	0,4	0,19	0,19	0	0,54	0,72	0	0	0	0					
neo-intermedeol	0,58	0,62	0,45	0,66	1,29	0,63	0,69	0,76	1,2	0,39	0,33	0,32	0,45	0,70	0,33	0,09	46,65	
intermedeol	0	0	0	0	0,26	0	0	0	0,26	0	0	0	0	0,04	0,10	0,03	244,10	
Total	0,58	0,62	0,45	0,66	1,55	0,63	0,69	0,76	1,46	0,39	0,33	0,32	0,45					
biciclogermacreno	0	0	0,32	0	0,3	0	0	0,13	0	0,11	0	0	0	0,07	0,12	0,03	176,99	
germacreno D	0	0,43	0	0,3	0,33	0,14	0	0,32	0	0	0,2	0,19	0	0,15	0,16	0,04	107,85	
germacreno B	0	0,43	0,21	0,31	0,35	0,34	0	0,42	0,63	0	0,33	0,26	0,21	0,30	0,21	0,06	70,13	
Total	0	0,86	0,53	0,61	0,98	0,48	0	0,87	0,63	0,11	0,53	0,45	0,21					
rosifoliol	0,28	0	0,28	0,24	0	0,37	0,31	0,31	0,61	0	0,15	0,21	0,28	0,26	0,19	0,05	75,65	
α -cadinol	2,17	1,55	1,61	1,98	1,63	2,07	2,31	1,81	2,84	1,14	1,21	1,3	1,61	1,98	0,81	0,23	40,96	
τ -muurulol	1,52	0	0,67	1,55	0	1,55	0,89	0,74	1,47	0,49	0,92	0,53	0,67	1,03	0,81	0,23	79,01	
1-epi-cubenol	0,81	0,46	0,72	0,72	0,8	0,71	0,76	0,88	1,2	0,41	0,45	0,57	0,72	0,78	0,33	0,09	42,76	
τ -cadinol	0	1,24	0,56	0	1,36	0	0,79	0,74	1,16	0,42	0	0,45	0,56	0,52	0,51	0,14	98,69	
Total	4,5	3,25	3,84	4,25	3,79	4,33	4,75	4,17	6,67	2,46	2,58	2,85	3,56					
δ -amorfeno	0,26	0,72	0,32	0,49	0,92	0,34	0,31	0,75	0,72	0,18	0,41	0,41	0,32	0,57	0,38	0,11	67,11	
cis-calameneno	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0,28	0	0	0	0	0,03	0,08	0,02	256,94	
trans-calameneno	0	0	0	0	0	0	0	0,34	0	0	0	0	0	0,03	0,09	0,03	360,56	
Total	0,41	0,72	0,32	0,49	0,92	0,34	0,31	1,09	1	0,18	0,41	0,41	0,32					
Espatulenol	3,54	5,46	1,31	2,54	3,18	2,29	2,07	4,05	6,01	1,72	0,99	1,24	1,31	2,98	1,62	0,45	54,39	
isoespatulenol	1,65	1,68	0,83	1,42	1,47	1,44	1,34	1,39	2,42	0,76	0,64	0,74	0,83	1,42	0,63	0,17	44,06	
Total	5,19	7,14	2,14	3,96	4,65	3,73	3,41	5,44	8,43	2,48	1,63	1,98	2,14					
Viridiflôrol	0,99	0,76	1,17	1,5	1	1,47	1,6	1,08	2,52	0,83	0,93	0,92	1,17	1,28	0,50	0,14	39,20	
Ledol	0,62	0,33	0,63	0,76	0,44	0,86	0,87	0,66	1,46	0,35	0,48	0,48	0,63	0,71	0,34	0,09	47,87	
Globulol	0	0	0,17	0,19	0	0,23	0,25	0	0,36	0	0	0	0,17	0,11	0,14	0,04	119,02	
Junipeno	0,51	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,14	0,04	360,56	
Total	2,12	1,09	1,97	2,45	1,44	2,56	2,72	1,74	4,34	1,18	1,41	1,4	1,97					
longipinanol	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0,07	0,02	360,56	
Total	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
α -copaeno	0	0,34	0	0,27	0,22	0,17	0	0,44	0,65	0	0,17	0	0	0,20	0,20	0,06	102,83	
Total	0	0,34	0	0,27	0,22	0,17	0	0,44	0,65	0	0,17	0	0					
Monoterpenos hidrocarbonetos	65,06	74,23	56,37	74,71	77,53	71,79	70,14	71,79	63	78,63	78,22	78,92	77,68	65,06				
Monoterpenos oxidados	10,73	5,54	7,85	8,9	3,75	12,99	14,61	6,74	3,73	12,51	11,72	10,53	11,68	10,73				
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	2,57	4,09	6,33	3,19	3,59	2,43	1,65	4,62	5,84	1,05	1,75	1,6	1,36	2,57				
Sesquiterpenos oxigenados	12,09	14,63	23,72	12,31	13,1	11,74	11,76	13,51	22,92	6,51	6,91	7,25	8,57	12,09				
Total identificado	90,45	98,49	94,27	99,11	97,97	98,95	98,16	96,66	95,49	98,7	98,6	98,3	99,29	90,45				

Para se avaliar a variação dos terpenos em função da atividade antibacteriana, foi usada a teoria dos conjuntos. Os três óleos que apresentaram CIM de 0,0625% foram comparados e, através da análise da intersecção, os terpenos presentes nos três óleos foram identificados e podem ser visualizados na tabela 16.

Tabela 16 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE5, 408OE9 e 408OE11 – ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração inibitória mínima de 0,0625%, obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos três óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 15/05/2010, 14/12/2010 e em 15/04/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas.

	408OE5	408OE9	408OE11
β-pineno	35.93	37.53	35.62
α-pineno	10.43	11.25	10.28
Pinocarvona	0.23	0.28	0.33
trans-pinocarveol	0	0.2	0.14
hidrato de canfeno	0.16	0	0.2
Borneol	0	0	0.32
endo-fenchol	0.24	0	0.3
Canfeno	0.33	0.29	0.36
Limoneno	20.8	16.89	23.69
α-terpineol	5.52	3.04	7.21
terpinen-4-ol	0.79	0.61	1.22
α-terpineno	0	0	0
γ-terpineno	0	0	0
α-terpinoleno	0	0	0
1,8-cineol	0.33	0.26	0.32
Sabineno	0	0	0
Mirceno	7	5.83	8.48
Linalool	1.12	1.26	1.26
Nerol	0	1.09	1.21
cis-ocimeno	0.22	0	0.2
trans-ocimeno	0	0	0
β-citronelol	0.51	0	0
Elemol	0.37	0.33	0.2
β-elemeno	1.01	1.17	0.35
γ-elemeno	0.79	0.98	0.21
α-cubebeno	0	0.29	0
10-epi-cubebol	0	0	0
cariofileno z	0.4	0.54	0
óxido de cariofileno	0	0	0
neo-intermedeol	0.66	0.76	0.39

	408OE5	408OE9	408OE11
Intermedeol	0	0	0
biciclogermacreno	0	0.13	0.11
germacreno D	0.3	0.32	0
germacreno B	0.31	0.42	0
α -cadinol	1.98	1.81	1.14
τ -muurolol	1.55	0.74	0.49
1-epi-cubenol	0.72	0.88	0.41
τ -cadinol	0	0.74	0.42
Rosifoliol	0.24	0.31	0
δ -amorfeno	0.49	0.75	0.18
cis-calameneno	0	0	0
trans-calameneno	0	0.34	0
Espatulenol	2.54	4.05	1.72
isoespatulenol	1.42	1.39	0.76
Viridiflorol	1.5	1.08	0.83
Ledol	0.76	0.66	0.35
Globulol	0.19	0	0
Junipeno	0.00	0.00	0.00
Longipinanol	0	0	0
α -copaeno	0.27	0.44	0

Os seguintes terpenos não ocorrem nas coletas 408OE5, 408OE9 e 408OE11: α -terpineno, γ -terpineno, α -terpinoleno, sabineno, trans-ocimeno, 10-epi-cubebol, óxido de cariofileno, intermedeol, cis-calameneno e longipinanol. Os terpenos que ocorrem eventualmente nos óleos essenciais mais ativos são os seguintes: trans-pinocarveol, hidrato de canfeno, borneol, endo-fenchol, cis-ocimeno, β -citronelol, α -cubebeno, cariofileno α , biciclogermacreno, germacreno D, germacreno B, τ -cadinol, rosifoliol, trans-calameneno, globulol e α -copaeno.

Do mesmo modo feito anteriormente, os quatro óleos essenciais que apresentaram atividade antimicrobiana (CIM) de 0,25% foram comparados e os terpenos que ocorriam concomitantemente nos quatro óleos foram identificados e encontram-se relacionados na tabela 17.

Tabela 17 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE2, 408OE3, 408OE12 e 408OE13 – ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração inibitória mínima de 0,25%, obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos quatro óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 01/11/2009, 03/02/2010, 08/07/2010 e em 20/08/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas.

	408OE2	408OE3	408OE12	408OE13
β-pineno	29.29	36.62	34.86	34.62
α-pineno	7.48	9.48	10.18	9.91
Pinocarvona	0.3	0.39	0	0
trans-pinocarveol	0	0.4	0	0
hidrato de canfeno	0	0	0.18	0.18
Borneol	0.27	0	0.32	0.27
endo-fenchol	0.2	0	0.3	0.27
Canfeno	0	0	0.34	0.31
Limoneno	21.24	20.75	23.41	23.26
α-terpineol	5.53	1.96	6.87	5.99
terpinen-4-ol	1.05	0.45	1.23	1.21
α-terpineno	0	0	0	0.17
γ-terpineno	0	0	0	0.25
α-terpinoleno	0	0	0	0.43
1,8-cineol	0.38	0.35	0	0
Sabineno	0	0.54	0	0
Mirceno	7.05	6.84	8.75	8.97
Linalool	1.83	1.19	1.66	1.43
Nerol	1.17	0.8	1.16	1.18
cis-ocimeno	0	0	0.24	0.28
trans-ocimeno	0	0	0.44	0.72
β-citronelol	0	0	0	0
Elemol	0.52	0.53	0.22	0.25
β-elemeno	0.45	1.51	0.64	0.49
γ-elemeno	0.37	1.2	0.59	0.49
α-cubebeno	0	0	0	0
10-epi-cubebol	0	0.35	0	0
cariofileno z	0	0.49	0	0
óxido de cariofileno	0	0.62	0	0
neo-intermedeol	0.58	0.62	0.33	0.32
Intermedeol	0	0	0	0
biciclogermacren o	0	0	0	0
germacreno D	0	0.43	0.2	0.19
germacreno B	0	0.43	0.33	0.26
α-cadinol	2.17	1.55	1.21	1.3
τ-muurolol	1.52	0	0.92	0.53

	408OE2	408OE3	408OE12	408OE13
1-epi-cubenol	0.81	0.46	0.45	0.57
τ -cadinol	0	1.24	0	0.45
Rosifoliol	0.28	0	0.15	0.21
δ -amorfeno	0.26	0.72	0.41	0.41
cis-calameneno	0.15	0	0	0
trans-calameneno	0	0	0	0
Espatulenol	3.54	5.46	0.99	1.24
isoespatulenol	1.65	1.68	0.64	0.74
Viridiflorol	0.99	0.76	0.93	0.92
Ledol	0.62	0.33	0.48	0.48
Globulol	0	0	0	0
Junipeno	0.51	0.00	0.00	0.00
Viridiflorol	1.61	1.09	1.41	1.4
longipinanol	0.24	0	0	0
α -copaeno	0	0.34	0.17	0

Os seguintes terpenos não ocorrem nas coletas 408OE2, 408OE3, 408OE12 e 408OE13: β -citronelol, α -cubebeno, intermedeol, biciclogermacreno, trans-calameneno e globulol. Os terpenos que ocorrem eventualmente nos óleos essenciais mais ativos são os seguintes: pinocarvona, trans-pinocarveol, hidrato de canfeno, borneol, endo-fenchol, canfeno, α -terpineno, γ -terpineno, α -terpinoleno, 1,8-cineol, sabineno, cis-ocimeno, trans-ocimeno, 10-epi-cubebol, cariofileno z, óxido de cariofileno, germacreno D, germacreno B, τ -muurolol, τ -cadinol, rosifoliol, cis-calameneno, longipinanol, α -copaeno e junipeno.

Seguindo a análise baseada na teoria dos conjuntos, os cinco óleos essenciais que apresentaram atividade antimicrobiana (CIM) de 0,5% foram comparados e os terpenos que ocorriam concomitantemente nos quatro óleos foram identificados e encontram-se relacionados na tabela 18.

Tabela 18 – Relação dos terpenos que ocorrem nos óleos essenciais 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 e 408OE14 – ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração inibitória mínima de 0,5% ou mais, obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae). Os terpenos em destaque ocorrem nos quatro óleos, que foram obtidos de coletas realizadas em 12/03/2010, 28/05/2010, 29/08/2010, 11/01/2011 e em 21/10/2011, respectivamente. Os terpenos que ocorrem concomitantemente nos quatro óleos são evidenciados na tabela nas células sombreadas.

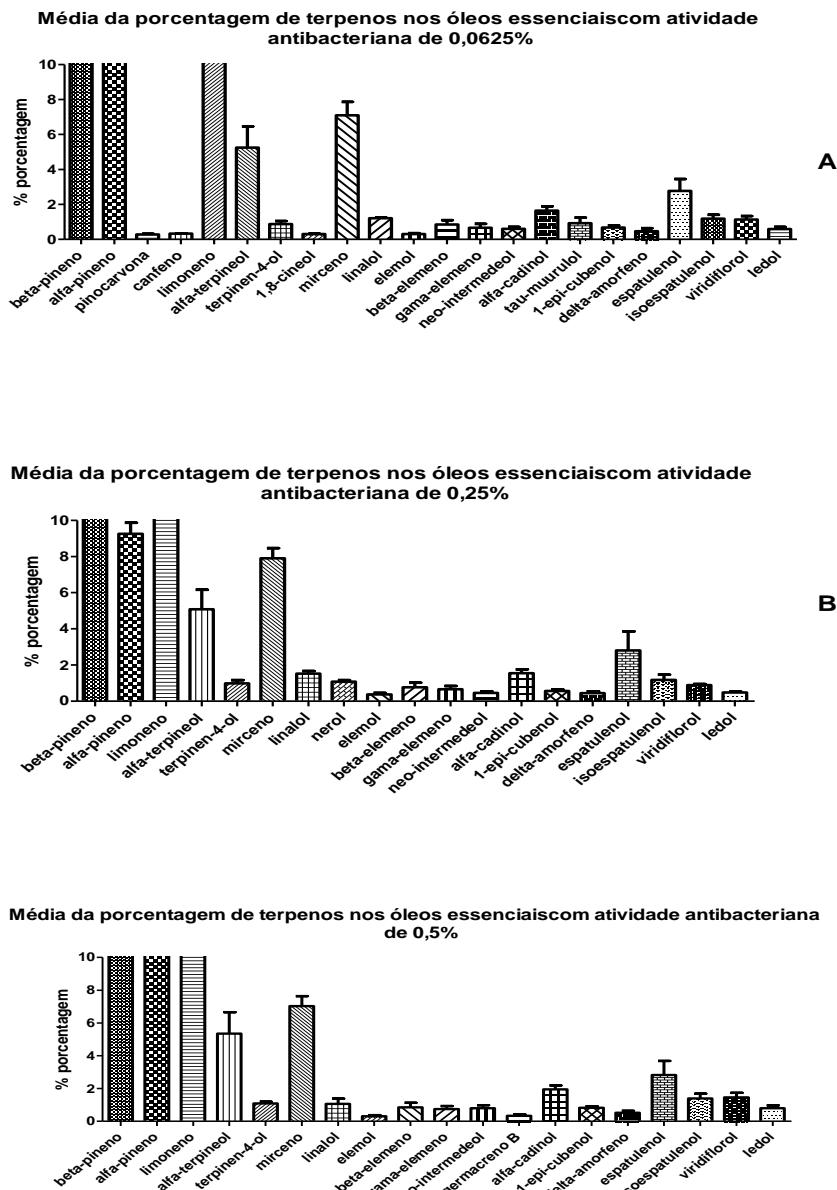
	408OE4	408OE6	408OE7	408OE10	408OE14
β-pineno	35.9	36.31	33.43	32.92	35.9
α-pineno	10.53	10.54	10.3	11.05	10.53
pinocarvona	0	0	0.2	0.28	0
trans-pinocarveol	0	0	0	0	0
hidrato de canfeno	0.19	0	0.18	0	0.19
Borneol	0.29	0	0.32	0	0.29
endo-fenchol	0.31	0	0.32	0	0.31
Canfeno	0.37	0	0.32	0	0.37
Limoneno	21.75	22.58	20.61	14.26	21.75
α-terpineol	7.1	1.7	8.14	2.75	7.1
terpinen-4-ol	1.17	1.2	1.23	0.7	1.17
α-terpineno	0	0	0	0	0
γ-terpineno	0	0	0	0	0.13
α-terpinoleno	0.26	0	0	0	0.26
1,8-cineol	0.3	0.19	0.29	0	0.3
Sabineno	0	0.33	0	0	0
Mirceno	8.11	7.2	6.94	4.77	8.11
Linalool	1.53	0.66	1.59	0	1.53
Nerol	0.79	0	0.72	0	0.79
cis-ocimeno	0.24	0.28	0.19	0	0.24
trans-ocimeno	0.39	0.29	0	0	0.39
β-citronelol	0	0	0	0	0
Elemol	0.21	0.51	0.21	0.43	0.21
β-elemeno	0.4	1.1	0.56	1.82	0.4
γ-elemeno	0.39	1.07	0.6	1.31	0.39
α-cubebeno	0	0	0	0.42	0
10-epi-cubebol	0	0.27	0	0.27	0
cariofileno z	0	0	0	0.72	0
óxido de cariofileno	0	0.19	0.19	0	0
neo-intermedeol	0.45	1.29	0.63	1.2	0.45
Intermedeol	0	0.26	0	0.26	0
biciclogermacreno	0	0.3	0	0	0
germacreno D	0	0.33	0.14	0	0
germacreno B	0.21	0.35	0.34	0.63	0.21
α-cadinol	1.61	1.63	2.07	2.84	1.61
τ-murolol	0.67	0	1.55	1.47	0.67
1-epi-cubenol	0.72	0.8	0.71	1.2	0.72

	0.56	408OE6	408OE7	408OE10	408OE14
τ -cadinol	0.32	1.36	0	1.16	0.56
δ -amorfeno	0	0.92	0.34	0.72	0.32
cis-calameneno	0	0	0	0.28	0
trans-calameneno	1.31	0	0	0	0
espatulenol	0.83	3.18	2.29	6.01	1.31
isoespatulenol	0.28	1.47	1.44	2.42	0.83
Rosifoliol	1.17	0	0.37	0.61	0.28
viridiflorol	0.63	1	1.47	2.52	1.17
Ledol	0.17	0.44	0.86	1.46	0.63
Globulol	0.00	0	0.23	0.36	0.17
Junipeno	0	0	0	0	0
longipinanol	0	0	0	0	0
α -copaeno		0.22	0.17	0.65	0

Os seguintes terpenos não ocorrem nas coletas 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 e 408OE14: trans-pinocarveol, α -terpineno, β -citronelol, trans-calameneno, longipinanol e junipeno. Os terpenos que ocorrem eventualmente nos óleos essenciais mais ativos são os seguintes: pinocarvona, hidrato de canfeno, borneol, endo-fenchol, canfeno, γ -terpineno, α -terpinoleno, 1,8-cineol, sabineno, linalol, nerol, cis-ocimeno, trans-ocimeno, α -cubebeno, 10-epi-cubebol, cariofileno z, óxido de cariofileno, intermedeol, biciclogermacreno, germacreno D, τ -muurolol, τ -cadinol, cis-calameneno, rosifoliol, globulol e α -copaeno.

A figura 3 mostra as médias das porcentagens dos terpenos que ocorrem concomitantemente nos óleos essenciais divididos segundo sua atividade (0,0625%, 0,25% e 0,50%).

Figura 3 – Média da porcentagem dos terpenos que ocorrem frequentemente nos três grupos de óleos essenciais, reunidos segundo sua atividade antibacteriana. A) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos três óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,0625%; B) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos quatro óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,25%; C) média das porcentagens dos terpenos mais frequentes nos cinco óleos que apresentaram concentração inibitória mínima de 0,50%.



A relação dos terpenos que ocorrem concomitantemente em todos os óleos estudados é dada a seguir. Aparentemente, esses terpenos devem estar presentes em *O. platyspermum* para que a planta apresente o mínimo de atividade

antibacteriana: β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineol, terpinen-4-ol, mirceno, linalol, elemol, β -elemeno, γ -elemeno, neo-intermedeol, α -cadinol, 1-epi-cubenol, espatulenol, isoestpatulenol, viridiflorol e ledol, sendo que β -pineno, limoneno, α -pineno, mirceno e espatulenol são os compostos que juntos perfazem quase 80% da composição do óleo essencial da espécie.

ANEXO 2 – Análises estatísticas realizadas para os óleos essenciais obtidos das 13 coletas das folhas de *Osteophloeum platyspermum* no período de novembro de 2009 a outubro de 2011. As análises foram realizadas utilizando-se análise de variância de uma via e teste posterior de Tukey, com nível de significância de $p<0,05\%$. Os terpenos foram divididos em grupos, apresentados na figura 2 e no quadro 1, divididos segundo sua semelhança estrutural. As porcentagens de todos os terpenos de cada grupo foram somadas para cada um dos 13 óleos. Depois, 12 dos 13 óleos, com exceção do único que apresentou atividade antibacteriana de 0,125% (408OE8), foram reunidos segundo a atividade antibacteriana (CIM=0,0625%, CIM=0,15% e CIM=0,50%) e as médias para cada grupo foram comparadas. Os resultados não foram significativos, nesta análise, como pode-se observar nos quadros 2 a 15.

Quadro 2 – Análise de variância para os terpenos do grupo A dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo A				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.9978				
P valor resumo	ns				
As medias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.002244				
R quadrado	0.0003738				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	1.832	2	0.9159		
Residual (inserido nas colunas)	4899	12	408.2		
Total	4900	14			
Teste de comparação múltipla de Tukey	diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.8320	0.08681	Não	ns	-35.33 to 36.99
0,0625% vs 0,50%	0.1767	0.01916	Não	ns	-34.62 to 34.97
0,25% vs 0,50%	-0.6553	0.07575	Não	ns	-33.30 to 31.98

Legenda: ns=não significante.

Quadro 3 – Análise de variância para os terpenos do grupo B dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo B				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.7568				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.2875				
R quadrado	0.06005				
ANOVA Tabela					
	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	0.1229	2	0.06145		
Residual (inserido nas colunas)	1.924	9	0.2138		
Total	2.047	11			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.04333	0.1735	Não	ns	-0.9427 to 1.029
0,0625% vs 0,50%	0.2273	0.9522	Não	ns	-0.7155 to 1.170
0,25% vs 0,50%	0.1840	0.8390	Não	ns	-0.6820 to 1.050

Legenda: ns=não significante.

Quadro 4 – Análise de variância para os terpenos do grupo C dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo C				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.6827				
P valor resumo	ns				
As medias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.3983				
R quadrado	0.08132				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas vias)	19.55	2	9.775		
Residual (inserido nas colunas)	220.9	9	24.54		
Total	240.4	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença da médias.	q	Significante? P < 0.05?	Resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	-1.860	0.6952	Não	ns	-12.43 to 8.705
0,0625% vs 0,50%	1.098	0.4292	Não	ns	-9.004 to 11.20
0,25% vs 0,50%	2.958	1.259	Não	ns	-6.321 to 12.24

Legenda: ns=não significante.

Quadro 5 – Análise de variância para os terpenos do grupo D dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo D				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.2842				
P valor resumo	ns				
As medias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	1.452				
R quadrado	0.2439				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	11.84	2	5.921		
Residual (inserido nas colunas)	36.71	9	4.079		
Total	48.55	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	-1.534	1.407	Não	ns	-5.841 to 2.773
0,0625% vs 0,50%	0.7593	0.7281	Não	ns	-3.359 to 4.878
0,25% vs 0,50%	2.294	2.394	Não	ns	-1.490 to 6.077

Legenda: ns=não significante.

Quadro 6 – Análise de variância para os terpenos do grupo E dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo E				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.5097				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.7270				
R quadrado	0.1391				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	2.469	2	1.234		
Residual (inserido nas colunas)	15.28	9	1.698		
Total	17.75	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias.	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	-0.01167	0.01658	Não	ns	-2.791 to 2.767
0,0625% vs 0,50%	-0.9267	1.377	Não	ns	-3.584 to 1.731
0,25% vs 0,50%	-0.9150	1.480	Não	ns	-3.356 to 1.526

Legenda: ns=não significante.

Quadro 7 – Análise de variância para os terpenos do grupo F dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo F				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.8524				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.1629				
R quadrado	0.03913				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	0.02046	2	0.01023		
Residual (inserido nas colunas)	0.5024	8	0.06280		
Total	0.5229	10			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	-0.0200	0.1382	Não	ns	-0.6047 to 0.5647
0,0625% vs 0,50%	-0.09533	0.7367	Não	ns	-0.6183 to 0.4276
0,25% vs 0,50%	-0.07533	0.5821	Não	ns	-0.5983 to 0.4476

Legenda: ns=não significante.

Quadro 8 – Análise de variância para os terpenos do grupo G dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo G				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.8647				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.1477				
R quadrado	0.03178				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre as colunas)	0.06196	2	0.03098		
Residual (inserido nas colunas)	1.888	9	0.2097		
Total	1.950	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	Summary	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.03583	0.1449	Não	ns	-0.9409 to 1.013
0,0625% vs 0,50%	-0.1227	0.5187	Não	ns	-1.057 to 0.8113
0,25% vs 0,50%	-0.1585	0.7296	Não	ns	-1.016 to 0.6994

Legenda: ns=não significante.

Quadro 9 – Análise de variância para os terpenos do grupo H dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo H					
Análise de variância de uma via						
P valor	0.0801					
P valor resumo	ns					
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No					
Número de grupos	3					
F	3.386					
R quadrado	0.4294					
ANOVA tabela						
	SS	df	MS			
Tratamento (entre duas vias)	0.8383	2	0.4192			
Residual (inserido nas colunas)	1.114	9	0.1238			
Total	1.953	11				
Teste de comparação múltipla de Tukey		Diferença das médias.	q	Significante? P < 0.05?	Resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.1408	0.7411		Não	ns	-0.6096 to 0.8912
0,0625% vs 0,50%	-0.4447	2.447		Não	ns	-1.162 to 0.2729
0,25% vs 0,50%	-0.5855	3.508		Não	ns	-1.245 to 0.07359

Legenda: ns=não significante.

Quadro 10 – Análise de variância para os terpenos do grupo I dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo I				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.7200				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.3408				
R quadrado	0.07040				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	0.08307	2	0.04153		
Residual (inserido nas colunas)	1.097	9	0.1219		
Total	1.180	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	Resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.07000	0.3713	Não	ns	-0.6745 to 0.8145
0,0625% vs 0,50%	-0.1200	0.6657	Não	ns	-0.8319 to 0.5919
0,25% vs 0,50%	-0.1900	1.147	Não	ns	-0.8439 to 0.4639

Legenda: ns=não significante.

Quadro 11 – Análise de variância para os terpenos do grupo J dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo J				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.1720				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	2.154				
R quadrado	0.3237				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	11.89	2	5.944		
Residual (inserido nas colunas)	24.84	9	2.760		
Total	36.73	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias.	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.3317	0.3697	Não	ns	-3.211 to 3.875
0,0625% vs 0,50%	-1.813	2.114	Nao	ns	-5.201 to 1.574
0,25% vs 0,50%	-2.145	2.722	Não	ns	-5.257 to 0.9668

Legenda: ns=não significante.

Quadro 12 – Análise de variância para os terpenos do grupo K dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo K				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.4777				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.8028				
R quadrado	0.1514				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	0.2935	2	0.1468		
Residual (inserido nas colunas)	1.645	9	0.1828		
Total	1.939	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	diferença das médias	q	Significante? P < 0.05?	resumo	95% IC da diferença
0,0625% vs 0,25%	0.09917	0.4294	Não	ns	-0.8127 to 1.011
0,0625% vs 0,50%	-0.2513	1.138	Não	ns	-1.123 to 0.6206
0,25% vs 0,50%	-0.3505	1.728	Nao	ns	-1.151 to 0.4504

Legenda: ns=não significante.

Quadro 13 – Análise de variância para os terpenos do grupo L dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo L				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.6896				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	0.3874				
R quadrado	0.07927				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas vias)	4.397	2	2.199		
Residual (inserido nas colunas)	51.07	9	5.675		
Total	55.47	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias.	q	Significante? P < 0.05?	Resumo	95% IC das diferenças
0,0625% vs 0,25%	-0.02500	0.01943		Não	ns
0,0625% vs 0,50%	-1.242	1.010		Não	ns
0,25% vs 0,50%	-1.217	1.077		Não	ns
					-5.105 to 5.055
					-6.100 to 3.616
					-5.679 to 3.245

Legenda: ns=não significante.

Quadro 14 – Análise de variância para os terpenos do grupo M dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Osteophloeum platyspermum*.

	grupo M				
Análise de variância de uma via					
P valor	0.0905				
P valor resumo	ns				
As médias são significantemente diferentes? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	3				
F	3.174				
R quadrado	0.4136				
ANOVA Tabela	SS	df	MS		
Tratamento (entre duas colunas)	4.434	2	2.217		
Residual (inserido nas colunas)	6.286	9	0.6984		
Total	10.72	11			
Teste de comparação múltipla de Tukey	Diferença das médias.	q	Significante? P < 0.05?	Resumo	95% IC das diferenças
0,0625% vs 0,25%	0.4125	0.9139		Não	ns -1.370 to 2.195
0,0625% vs 0,50%	-0.9560	2.215		Não	ns -2.660 to 0.7483
0,25% vs 0,50%	-1.369	3.452		Não	ns -2.934 to 0.1970

Legenda: ns=não significante.

ANEXO 3 – Artigo científico originado da dissertação

Original Research Paper

Variation of terpenes in *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) and the expression of its antibacterial activity.

Ivana Barbosa Suffredini^{1,2*}, Sinária Rejany Nogaia de Sousa.¹; Sergio Alexandre Frana^{1,2}; Mateus Luís Barradas Paciencia²; Hugo Barbosa Suffredini³; Ingrid Elida Collantes Díaz²

¹Graduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil.

²Center for Research in Biodiversity, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil.

³Center of Natural and Human Sciences, ABC Federal University, Santo André, SP, Brazil.

*Corresponding author: IBS, Laboratório de Extração

ABSTRACT

Essential oils are recognized as antibacterial, medicinal and fragrant agents. Plants containing essential oils are largely used in food, medicine and cosmetic industries, and for that reason volatiles production are conspicuously constant, as agronomic research usually takes place. Nonetheless, wild plants not necessarily produce volatiles in such distinguished constancy. In the present work, 13 essential oils obtained from the leaves of *ucuuba-chico-de-assis*, (*Oenocarpus platyspermum*, Myristicaceae), the only species of the genus occurring in the Amazon Rain Forest, which was collected from the same individual during two years, were tested against *Staphylococcus aureus* in the microdilution broth assay to achieve minimal inhibitory concentration (MIC), and were chemically analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Results show that it was not possible to establish a seasonal relationship with the antibacterial activity, but oils obtained in three different collections showed MIC=0.0625% and the presence of alpha-pinene, beta-pinene, 1,8-cineole, pinocarvone, camphene, limonene, alpha-terpineol, beta-elemene, gamma-elemene, myrcene, linalool, trans-caryophyllen, iso caryophyllen, neo-intermedeol, elemol, alpha-cadinol, tau-muurolol, 1-epi-cubenol, delta-amorfene, spathulenol, isospathulenol, viridiflorol and ledol. Coeficient of variance for these terpenes are <68%, and there is a subtle tendency of the alpha-pinene family of compounds occur in large amounts in the oils with best antibacterial activity, despite statistical differences could be observed. It was also observed that 18 terpenes necessarily are present in the oils, despite the level of antibacterial activity, and their presence may be related to the need of constant maintenance of protection against microorganisms in such adverse environment as the rain forest. This is the first one-individual-multianalysis report on the antibacterial activity and on the chemical volatile terpenes composition of *ucuuba-chico-de-assis*, a wild plant collected in the Amazon Rain Forest, and the study reflected how tropical wild plants imprecisely express their chemical antibacterial contents.

KEYWORDS: essential oils, terpenes, gas chromatography coupled to mass spectrometry, antibacterial.

INTRODUCTION

Plants are not the same all the time. Their complex biochemical apparatus changes depending on climate-edaphic alterations, as water regulation, sunlight incidence (Gazim et al., 2010), soil conditions, amount of macro/micronutrients, presence of microorganisms (Banchio et al. 2010), locations (Benini et al., 2012; Özcan et al., 2005), intrinsic changes as the presence of phytopathogens, reproductive/vegetative cycle (Murakami et al., 2013), and recently, studies are going deep in the analysis relating how plants interact to each other (Dudley and File, 2007) and to the surrounding environment through allelopathy (Mabrouk et al, 2013; Ehlers, 2011). Volatile compounds play an important role in this scenario.

Our group decided to long-term analyze the seasonal variation of some Amazonian tree species some years ago. One of the species to be studied is *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A. DC.) Warb. (Myristicaceae), popularly known as *ucuuba-chico-de-assis*. According to some authors (Steyermark et al., 2001; Gentry, 1993; Joly, 1984), this species is the only representative of the genus occurring in the Amazon Rain Forest.

O. platyspermum has been studied before. The plant is known for its hallucinogen properties (Bennet and Alarcón, 1994) and former chemical studies reported that the species contains (-)-kaur-16-en-19-oic acid, sitosterol, stigmasterol, (\pm)-3-demethylhomopterocarpin and (\pm)-maackiain (Braz Fo et al., 1977) and eperu-8(20),13-dien-3 α , 15-diol, glyceryl laurodimyriaste, glyceryl 1,3-lauromyristate, dihydroguaiaretic acid, hydroxyotobain, hydroxyoxotobain, guaiacin and otobaphenol (Braz Fo et al., 1984). Nonetheless, information on the chemical composition of the essential oil and its seasonal variation is not available so far, as is not any biological or pharmacological tests.

The present study aims the evalution of the qualitative and quantitative terpene variation in the essential oils from the leaves of wild plant *O. platyspermum*, as well as the correlation of terpene profile with the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

RESULTS AND DISCUSSION

Antibacterial activity was obtained for all essential oils, as well as their minimal inhibitory concentrations were obtained. Results can be seen in table 1. Dates of collection and oils' yields are also displayed in the same table. Table 3 represents the mean, standard deviation and coefficient of variation of each terpene occurring in the 13 essential oils. It was observed that coefficient of variation shows indices <68% when terpenes occur more frequent in the plant, 12 to 13 times. On the other hand, when terpenes are sporadically present, CV values can be as high as 360%. Terpenes were grouped into terpene families, according to their structure similarity. Percentages of occurrence of all terpenes from the same family were summed to all 13 essential oils. After that, two-way ANOVA analysis was performed considering terpene families and time of collection as the two variances. No statistical differences were observed in the analysis, that were made using Bonferroni post-test considering $p<0.05$ (GraphPad Prism 5.0). Nonetheless, it is possible to observe a slight tendency in the prevalence of α -pinene, intermedeol, cadinol and spathulenol families in the oils. In order to make a correlation between volatiles and antibacterial activity, set theory - specifically intersection - was applied in oils grouped by level of antibacterial activity. So, the first group was composed by three oils that showed MIC 0.0625% (dates of collection May/15/2010, Dec/14/2010 and Apr/15/2011), the second group was composed by four oils that showed MIC 0.25% (dates of collection Nov/01/2009, Feb/03/2010, Jul/08/2011 and Aug/20/2011) and the last group was composed by five oils that showed MIC 0.5% (dates of collection Mar/12/2010, May/28/2010, Aug/29/2010, Feb/11/2011 and Oct/21/2011). The presence of terpenes occurring in all oils of the same group was observed and listed. After that, mean, standard deviation (figure 2) and coefficient of variance (table 4) were obtained.

Chemical studies realized with aromatic crop plants demonstrate that environmental factors as climate (warm, water regulation, snow, light incidence) and soil alterations, as well as pathogen attacks may interfere with volatiles metabolism and with the quality of the final products (CHEN, 2008), destined as raw material to be used in food, beverage, cosmetics and chemical industries. For that reason, studies related to the standardization of aromatic plant production takes place in agriculture, so soil conditions can be systematically manipulated, as well as irrigation.

Studies focused on the introduction of high-quality plant material are being reported, and the relationship between chemical composition and developmental stage of the plant supports the market of salvia or rosemary, as few examples (Papageorgiou et al. 2008).

This rule seems to be extremely diffuse for wild plants whatsoever, once they are completely vulnerable to constant climate-edaphic alterations, as was possible to observe in data obtained from *O. platyspermum*. Our initial hypothesis on the study of the chemical variation versus antibacterial activity was that leaves of *O. platyspermum* would provide a correlation based on the seasonal variation of one or few volatiles within the oil composition. But in the present work, it was not observed so far, neither for collections made in the same month of different years (Feb/2010 and Feb/2011, or Aug/2010 and Aug/2011), nor in different days of the same month and year (May 15, 2010 e May 28, 2010). Moreover, no seasonal variations were observed as expected to cultivated plants. *O. platyspermum* is a tropical tree native to the Amazon Rain Forest, which is more prone to receive drastic climatic-edaphic changes. Reports on the chemical variations of compounds in tropical plants are scarce, but it has been done and the experimental design of those manuscripts do not feet with the design here proposed, for the number of collections (Ellouze, et al., 2012) or the period range are shorter than ours (Silva et al., 2013).

The chemical analysis performed with the 13 oils suggested that only terpenes occurred, despite the presence of phenylpropanoids. The extraction yields are summarized in table 1. Fifty eight different terpenes were identified in the oils obtained from *O. platyspermum* leaves. The main components (table 3) are alpha-pinene ($9.40\pm0.56\%$), beta-pinene ($33.78\pm0.96\%$), limonene ($20.81\pm0.75\%$), myrcene ($7.26\pm0.33\%$), alpha-terpineol ($5.26\pm0.67\%$) and spathulenol ($2.98\pm0.45\%$), and means and standard errors were based on the results of the evaluations of the 13 collections. The six compounds correspond to approximately 80% of the terpenes.

From the 13 essential oils chemically analyzed, only mono- and sesquiterpenes occurred. Terpenes were divided into families, established according to molecules' structure. So, nine families were determined: acyclic monoterpene family (here called terpenes of myrcene family – $10.01\pm0.70\%$), monocyclic monoterpenes (here called limonene family - $29.16\pm1.11\%$), bicyclic monoterpenes

(here called beta-pinene family - $44.07\pm1.52\%$), bicyclic sesquiterpenes (here called intermedeol, cadinol and spathulenol families – $13.01\pm1.58\%$), tricyclic sesquiterpenes (here called cubebol family – $0.1\pm0.06\%$) and bi- or tricyclic sesquiterpenes (here called caryophyllen family – $1.39\pm0.29\%$) (figure 1). Analysis consisting in observing the total percentage of terpenes in each family and its relationship to antibacterial activity was done. Nonetheless, we observe that the total amount (in percentage) of bicyclic sesquiterpenes in two oils obtained from leaves collected in March/2010 and Feb/2011 were higher than the observed for the other 11 oils (23.6% and 23.52%, respectively), and that the antibacterial activity, expressed as MIC of both oils, was 0.5%.

MIC's of oils, obtained from the analysis against *S. aureus*, are displayed in table 1. Three oils (408OE5, 408OE9 and 408OE11, leaves collected in May/15/10, Dec/14/2010 and Apr/15/2011, respectively) showed an expressive antibacterial activity (MIC=0.0625%), which could not be related to an overexpression of the major compounds, nor to the expression of some specific minor compound, or even their amounts. Season changes are not related to an improvement of antibacterial activity, once the rainy season encompasses April and May, but December is the end of the dry season. In the periods concerning October/2009 to March/2010, the Amazon Rain Forest experienced the El Niño phenomenon, and in the periods concerning August/2010 to March/2011, the area experienced the La Niña phenomenon. It is interesting to observe that collect that originated oil #408OE5 was made right after the decline of El Niño and collect that originated oil #408OE11 was made right after the decline of La Niña. Nonetheless, collect that originated oil #408OE9 was made exactly when La Niña was more intense. One of the oils (# 408OE8, leaves collected in Nov/15/2010), showed a very good activity (MIC=0.125%), and collect was made under intense La Niña. Four oils showed a good (MIC=0.25%) activity (oils # 408OE2, 408OE3, 408OE12 and 408OE13, leaves collected in Nov/01/2009, Feb/03/2010, Jul/08/2010 and Aug/20/2010, respectively). Collects that originated oils #408OE2 and 408OE3 were made under El Niño, and collects that originated oils # 408OE12 and 408OE13 were made in a period when no climate phenomena were observed. Finally, five oils showed the weaker activity considering the concentrations that were tested (oils # 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 and 408OE14, leaves collected in Mar/12/2010, may, 28/2010, Aug/29/2010, Feb/11/2011 and

Oct/12/2011, respectively). It is observed that both phenomena were weakening or absent in the periods the leaves used for obtaining the five oils were collected.

The antibacterial activity of the oils present in the leaves was not directly related to the presence of flowers or fruits. The analysis concerning the influence of the presence of antibacterial activity of flower or fruit oils is out of the scope of this manuscript, but there is a suggestion that the a better antibacterial activity may be related to some secondary metabolites present in flowers or fruits (table 1).

Terpenes are known to attract pollinators, and according to what we have seen, some of the volatiles are present in *O. platyspermum* independently of external or internal influences, and these volatiles are responsible to assist the plant in both protection against microorganism, as here observed, and pollinator attraction. There are some terpenes that are constantly present in the plant, so after calculating the mean and standard deviation of each terpene in the 13 oils, we ended up with the observation that the more constant is the presence of one terpene, the lower is its standard deviation. So we calculated the coefficient of variation (CV), which is obtained as a percent correlation between standard deviation and mean, and we concluded that CV's obtained for the terpenes occurring in all oils are <68%, independently if majoritary or minoritary volatiles. If the terpenes are not present in all oils, CV's are high from 70% to 360%, if they occur only once. So, CV may be used as a parameter to predict the importance of the terpene for the plant, despite any other mathematical or statistical test.

As our first hypothesis was not confirmed, and the lack of relationship between chemical composition and antibacterial activity was evident, a new way of approaching the results was needed. Considering that the 13 oils should be analyzed from the antibacterial point-of-view, we decided to group the chemical results for each oil according to the levels of antibacterial response, so we ended up with a group of three oils (named G3) that gave us the best antibacterial activity (0.0625%), a group of four oils (named G4) that gave us an intermediate activity (0.25%) and a third group of five oils (named G5) that gave us the weaker activity (0.5%). Chemical composition of each group was compared and an unconventional mathematical weapon, which is the set theory, specifically intersection, was used. Results can be seen in figure 2. So, G3 (oils collect # 408OE5, 408OE9 and 408OE11), from the 58

terpenes that were identified in *O. platyspermum* leaves oils, only 24 could be found (figure 2A). The same analysis was made for G4 (oils # 408OE2, 408OE3, 408OE12 and 408OE13) and 20 terpenes were concomitantly present (figure 2B). Analysis performed with G5 (oils # 408OE4, 408OE6, 408OE7, 408OE10 and 408OE14) resulted in 21 terpenes occurring in the five oils (figure 2C). Finally, terpenes occurring in G3, G4 and G5 were compared to each other, and we ended up with 18 terpenes that necessarily must occur in the species, so an antibacterial activity can be achieved (figure 1 and table 4).

CONCLUSIONS

The antibacterial activity of the 13 essential oils obtained from the leaves of *O. platyspermum* was given. Considering that MIC of 0.5% is relatively good, all oils showed activity, but three of them showed activity as low as 0.0625%. Beta-pinene, alpha-pinene, limonene, myrcene, alpha-terpineol, spathulenol and alpha-cadinol were the terpenes occurring in higher percentages. It was not possible to correlate antibacterial activity to terpene amount, nor to seasonal variation. Nonetheless, it was possible to identify the main terpenes involved in the maintenance of the biological activity. The present study led to the conclusion that secondary metabolites, mainly volatile terpenes, in wild plants may be extremely influenced by both intrinsic and extrinsic variables that it was not possible to establish any prediction in their production, but findings support the hypothesis of how plants containing volatiles may exert protection against pathogens in the wild.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank FAPESP for their grant #2009/58706-8 and to Guilherme Lima Semencio for technical help.

EXPERIMENTAL PART

Plant collection

Leaves of one individual tree identified as *O. platyspermum* [M.B. Paciencia, 846 (UNIP Herbarium)] were collected for 13 times during the period of November/2009 to October/2011. Collections were made under license of *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis-IBAMA/MMA/Brazil* #12A/08. A voucher of the plant material is deposited at UNIP Herbarium under number 5720.

Essential oil obtainment

Leaves of *O. platyspermum* were submitted to steam distillation in Clevenger apparatus for 4 h. After that, oils were completely collected using pentane, then were dried with sodium sulphate anhydro and were storage under -10°C until use. The same procedure was repeated each time leaves were collected.

Sample preparation

Essential oils (EO's) were diluted to the chromatographic analysis, as well as to the antibacterial analysis. So, 20µL of essential oil were diluted in 980 µL of acetone and were sent to chromatographic analysis. The essential oils were diluted to 10%, 5%, 2.5% and 1.25% in dimethylsulfoxide (DMSO, Synth) before testing in the biological assay.

Microdilution broth assay and determination of minimal inhibitory concentrations

EO's were tested using the microdilution broth assay (MDBA), in sterile conditions, according to CLSI standards (8th edition), with modifications. The assay was developed using Müller-Hinton broth (MHB) medium (Oxoid, London, England) in 96-well microplates. Inocula were adjusted to 1.5×10^8 colony-forming units per mL (CFU/mL) with fresh colonies of *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) grown on sterilized Müller-Hinton agar (MHA) (Oxoid, London, England). A 190-µL aliquot of the bacterial suspension was dispensed into the wells, and a 10µL aliquot of each

EO was added to the correspondent wells. Microplates were incubated at 36°C for 24 h. The inhibition of bacterial growth was visually assessed, and bacterial suspensions from all test wells were subcultured in sterile MHA to evaluate the effectiveness of treatments (de Castilho et al., 2013; da Silva et al., 2014).

Using a similar procedure, the minimal inhibitory concentrations (MIC's) and minimal bactericidal concentrations (MBC's) against *S. aureus* were obtained for all EO's, using the pre-determined EO concentrations of 10%, 5%, 2.5% and 1.25%. The final test concentrations, 20 times diluted, were achieved at 0.5%, 0.25%, 0.125% and 0.0625%, respectively.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis

One μ L of each EO was injected in gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), in a Shimatzu 14B/QP5050A, with quadrupole analyzer of the same brand. The non polar 5% phenylpolysilphenylene BPX5 column was used, and its features are 30 m long, internal diameter of 0.25 mm. Run conditions were: oven initial temperature of 60° C (6 min), final temperature of 320° C (8 min), temperature rate of 10° C/min, total run time of 40 min. Column pressure of 150.0 kPa, column flux of 2.5 mL/min, linear velocity of 58, split ratio of 9 and total flux of 30.0 mL/min. Results were compared to Willey229, NIST107, SHIM1607 and NIST21. Kovats indices were obtained and compared to the literature (Adams, 2008).

Mathematical and statistical analysis

Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, significance level of 0.05 (GraphPad Prism 5.0). Mathematical analysis using the set theory, particularly, intersection, and coefficients of variation.

Experimental design

Leaves of *O. platyspermum* were systematically collected for 13 times, from the same tree, in a period ranging from November/2009 to October/2011. Essential oils were obtained by steam distillation. Oils were submitted to the antibacterial activity, as were submitted to gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis. Results from both minimal inhibitory concentration and volatiles profiles

were compared so as a variation of biological activity related to the quantitative seasonal influence of volatiles could be observed. As the limitation of the analysis, the collections were not monthly realized due to limitations of field access; other organs as stem, flowers, fruits or seeds were not collected; samples from other trees were not collected; only one leaf collection was made in this tree at each collection, so as to preserve leaf amount and tree health; only volatiles were accessed at this time; the performance of oil activity has been narrowed by the use of only four concentrations due to the effectiveness of antibacterial activity usually related to essential oils, so subtle differences among oils activity could be observed and related to chemical composition.

BIBLIOGRAPHY

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4Ed. Illinois: Allured Pub. Corp. 804p. 2008.

BANCHIO, E; BOGINO, P.C; SANTORO, M; TORRES, L; ZYGADLO, J; GIORDANO, W. Systemic induction of monoterpane biosynthesis in *Origanum majoricum* by soil bacteria. **J. Agric. Food Chem.** v.58, n.1, p.650-4, 2010.

BENINI, C; MAHY, G; BIZOUX, J.P; WATHELET, J.P; JARDIN, P. Comparative chemical and molecular variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f.& Thomson forma *genuine* (Ylang-ylang) in the Western Indian ocean Islands: implication for valorization. **Chemistry & Biodiversity**. v.9, p.1389-97, 2012.

BENNET, B.C; ALARCÓN, R. *Osteophloeum platyspermum* and *Virola duckei* (Myristicaceae): newly reported as hallucinogens from Amazonian Ecuador. **Econ. Bot.** v.48, n.2, p.152-8, 1994.

BOTREL, P.P; PINTO, J.E.B.P; FERRAZ, V; BERTOLUCCI, S.K.V; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy** v.32, n.3, p.2, 2010.

BRAZ F.O.R; DE CARVALHO, M.G; GOTTLIEB, O.R. XVIII: Eperudiendio, glycerides and neolignans from fruits of *Osteophloeum platyspermum*1. **Planta Med.** v.50, n.1, p.53-5, 1984

BRAZ F.O.R; GOTTLIEB, O.R; DE MORAES, A.A; PEDREIRA, G; PINHO, S.L.V; MAGALHÃES, M.T; DE S. RIBEIRO, M.N. **Isoflavonoids from Amazonian species Lloydia**. v. 40, p.236-238, 1977.

CHAGAS, J.H; PINTO J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V; SANTOS, F.M. Produção da biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scient. Agron.** v.33, n.2, p.2-3, 2011.

DA SILVA, J.P.C; CASTILHO, A.L; SARACENI, C.H.C; DIAZ, I.E.C; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D; YOUNES, R.N; SUFFREDINI, I.B. Anti-Streptococcal activity of Brazilian Amazon Rain Forest plant extracts present discloses a potential to preventive strategies against dental caries. **J. Appl. Oral Sci.** v.22, n.2, p.91-7, 2014.

DE CASTILHO, A.L; SARACENI, C.H.C; DIAZ, I.E.C; PACIENCIA, M.L.B; SUFREDINI, I.B. New trends in Dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. **Braz Oral Res.** v.27, p.109 - 115, 2013.

DUDLEY, S.A; FILE, A.L. Kin recognition in an annual plant. **Biology Letters**. v.3, p.435-8, 1997.

EHLERS, B.K. Soil microorganisms alleviate the allelochemical effects of a thyme monoterpenes on the performance of an associated grass species. **PlosOne**, v.6, n.11, e26321, 2011.

ELLOUZA, I; ABDERRABBA, M; SABADOU, N; MATHIEU, F; LEBRIHI, A; BOUAJULA, J. Season's variation impacto n Citrus aurantium leaves essential oil: chemical composition and biological activities. **J. Food. Sci.** v.77, n.9, p.T173-T180, 2012.

GAZIM, Z.C; AMORIM, A.C; HOVELL, A.M; REZENDE, C.M; NASCIMENTO, I.A; FERREIRA, G.A; CORTEZ, D.A. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (hochst.) codd in Southern Brazil. **Molecules**. v.15, n.8, 5509-24, 2010.

GENTRY, A.H. A Field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary note on herbaceous taxa. 895p. **The University of Chicago Press**: Chicago. 1993.

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

MABROUK, S; SALAH, K.B.H; ELAISSI, A; JLAIEL, L; JANNET, H.B; AOUNI, M; HARZALLAH-SKHIRI, F. Chemical composition and antimicrobial and allelopathic activity of Tunisian Conyza sumatrensis (Retz.) E.Walker essential oils. **Chemistry& Biodiversity**. v.10, n.2, p.209-23, 2013.

MURAKAMI, C; LAGO, J.H.G; PERAZZO, F.F; FERREIRA, K.S; LIMA, M.E.L; MORENO, P.R.H; YOUNG, M.C.M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Chromolaena laevigata during Flowering and fruiting season. **Chemistry and Biodiversity**, v.10, p.621-7, 2013.

NASCIMENTO, F.C; NASCIMENTO, A.C; RORIGUES, C.S; ANTONIOLLI, A. R; SANTOS, P.O; JÚNIOR, A.M.B; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn** v.17, n.1, p.2-5, 2007.

ÖZCAN, M; CHALCHAT, J.C. Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. **J.Med. Food**. v.8, n.3, p.408-11, 2005.

PINTO, J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais.** 2002. 169 f. Fundação de apoio ao ensino pesquisa e extensão – Universidade Federal de Lavras, Lavras 2002.

SILVA, E.B.P; SOARES, M.G; MARIANE, B; VALLIM, M.A; PASCON, R.C; SARTORELLI, P; LAGO, J.H.G. The seasonal variation of the chemical composition of essential oils from *Procelia macrocarpa* R.E.Fries (Annonaceae) and their antimicrobial activity. **Molecules.** v.18, 13574-87, 2013.

SIMÕES, C. M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** 1^a ed, 1999.

STEYERMARK, J.A; BERRY, P.E., Yatskievych K., holst, B.K. Flora of the Venezuelan Guayana. **Missouri Botanical Garden Press.** St. Louis, v.6, p.740-1, 2001.

SUFFREDINI, I.B; SADER, H.S; GONÇALVES, A.G; REIS, A.O; GALES, A.C; VARELLA, A.D; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, n.3, p. 379-384, 2004.

TAVEIRA, F.S.N; ANDRADE, E.H.A; LIMA, W.N; MAIA, J.G.S. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v.75, n.1, p.27-31, 2003.

Table 1 – Antibacterial activity of 13 essential oils collected from the leaves of *Osteophoeum platyspermum* (Myristicaceae) using microdilution broth assay. Yields of each oil are also given.

			Essential oil concentration in the antibacterial analysis				
Essential oil number	Essential oil weight/yield	Collect date	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%	MIC %
408OE2	1.2132g/0.236%	11/01/2009	-	-	+	+	0.25
408OE3	1.7213g/0.7346%	02/03/2010	-	-	+	+	0.25
408OE4	0.3242g/0.4202%	03/12/2010	+	+	+	+	>0.5
408OE5	1.1451g/0.5958%	05/15/2010	-	-	-	-	<0.0625
408OE6	1.352g/0.3025%	05/28/2010	+	+	+	+	>0.5
408OE7	1.2814g/0.4363%	08/29/2010	+	+	+	+	>0.5
408OE8	1.5727g/0.3587%	11/05/2010	-	-	-	+	0.125
408OE9	2.1596g/0.6873%	12/14/2010	-	-	-	-	<0.0625
408OE10	1.2337g/0.2916%	02/11/2011	-	+	+	+	0.5
408OE11	1.5979g/0.5706%	04/15/2011	-	-	-	-	<0.0625
408OE12	1.4876g/0.2276%	07/08/2011	-	-	+	+	0.25
408OE13	1.5120g/0.2432%	08/20/2011	-	-	+	+	0.25
408OE14	1.5627g/0.2904%	10/21/2011	+	+	+	+	>0.5

Legend: (+)=presence of bacteria grow, no activity observed; (-)=absence of bacteria grow, activity observed.

Table 2 lists the terpenes that were individually identified in each of the 13 essential oils. Terpene identification was done based on the retention times, Kovats indices and on comparison of the experimental mass spectra and the ones described in the following libraries: WILEY 229 and NIST107 and with the literature (ADAMS, 2007).

Table 2 - Terpene occurrence and percentage in the 13 essential oils obtained from leaves of *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) collected between November/2009 and October/2011.

δ-amorphene			0.26	0.72	0.32	0.49	0.92	0.34	0.31	0.75	0.72	0.18	0.41	0.41	0.32
Elemol			0.52	0.53	0.21	0.37	0.51	0.21	0.22	0.33	0.43	0.2	0.22	0.25	0.21
10-epi-cubebol			0	0.35	0	0	0.27	0	0	0	0.27	0	0	0	0
cis-calamenene			0.15	0	0	0	0	0	0	0	0.28	0	0	0	0
trans-calamenene			0	0	0	0	0	0	0	0.34	0	0	0	0	0
Spathulenol			3.54	5.46	1.31	2.54	3.18	2.29	2.07	4.05	6.01	1.72	0.99	1.24	1.31
Isospathulenol			1.65	1.68	0.83	1.42	1.47	1.44	1.34	1.39	2.42	0.76	0.64	0.74	0.83
Viridiflorol			0.99	0.76	1.17	1.5	1	1.47	1.6	1.08	2.52	0.83	0.93	0.92	1.17
Ledol			0.62	0.33	0.63	0.76	0.44	0.86	0.87	0.66	1.46	0.35	0.48	0.48	0.63
Globulol			0	0	0.17	0.19	0	0.23	0.25	0	0.36	0	0	0	0.17
Rosifoliol			0.28	0	0.28	0.24	0	0.37	0.31	0.31	0.61	0	0.15	0.21	0.28
caryophyllene oxide			0	0.62	0	0	0.19	0.19	0	0	0	0	0	0	0
Longipinanol			0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-epi-cubenol			0.81	0.46	0.72	0.72	0.8	0.71	0.76	0.88	1.2	0.41	0.45	0.57	0.72
intermedeol-neo			0.58	0.62	0.45	0.66	1.29	0.63	0.69	0.76	1.2	0.39	0.33	0.32	0.45
Intermedeol			0	0	0	0	0.26	0	0	0	0.26	0	0	0	0
α-cadinol			2.17	1.55	1.61	1.98	1.63	2.07	2.31	1.81	2.84	1.14	1.21	1.3	1.61
τ-cadinol			0	1.24	0.56	0	1.36	0	0.79	0.74	1.16	0.42	0	0.45	0.56
τ-muurulol			1.52	0	0.67	1.55	0	1.55	0.89	0.74	1.47	0.49	0.92	0.53	0.67
Hydrocarbon monoterpenes	65.06	74.23	77.55	74.71	77.53	71.79	70.14	71.79	63	78.63	78.22	78.92	77.68		
Oxygenated monoterpenes	10.73	5.54	11.68	8.9	3.75	12.99	14.61	6.74	3.73	12.51	11.72	10.53	11.68		
Hydrocarbon sesquiterpenes	2.57	4.09	1.36	3.19	3.59	2.43	1.65	4.62	5.84	1.05	1.75	1.6	1.36		
Oxygenated sesquiterpenes	12.09	14.63	7.52	12.31	13.1	11.74	11.76	13.51	22.92	6.51	6.91	7.25	8.57		
Total identified	90.45	98.49	98.11	99.11	97.97	98.95	98.16	96.66	95.49	98.7	98.6	98.3	99.29		
Climatic or phenological influences	408O E2	408O E3	408O E4	408O E5	408O E6	408O E7	408O E8	408O E9	408O E10	408O E11	408O E12	408O E13	408O E14		
Flowering															
Fruiting															
El Niño															
La Niña															

Climate and phenological information were obtained from www.infoclima.cptec.inpe.br and in Alencar *et al.*, 1979, respectively.

Table 3 - Mean, standard deviation, standard error and coefficient of variation of the volatiles occurrence in the 13 essential oils obtained from the leaves of *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) in 13 collections made from 2009 and 2011.

	mean	strddev	coefficient of variation
beta-pinene	33.7762	3.47821	10.2978
Limonene	20.8085	2.68999	12.9274
Myrcene	7.25538	1.19579	16.4814
alpha-pinene	9.39692	2.01042	21.3945
terpinen-4-ol	1.00923	0.28447	28.187
Viridiflorol	1.28077	0.502	39.1955
Linalol	1.32692	0.53184	40.0809
alpha-cadinol	1.98385	0.81254	40.9579
1-epi-cubenol	0.77923	0.33318	42.7573
Isospathulenol	1.42462	0.62765	44.0575
alpha-terpineole	5.26077	2.42126	46.0249
Elemol	0.36385	0.1687	46.3652
neo-intermedeol	0.69769	0.3255	46.6543
Ledol	0.70692	0.33841	47.8712
Spathulenol	2.97846	1.61986	54.3858
1,8-cineole	0.22769	0.13833	60.7542
Nerol	0.80462	0.49337	61.317
gamma-elemene	0.80615	0.49827	61.8086
beta-elemene	0.94846	0.61347	64.6807
delta-amorphene	0.57231	0.38408	67.1112
germacrene B	0.30077	0.21093	70.1298
Rosifolol	0.25538	0.1932	75.6513
tau-muurulol	1.02846	0.81258	79.0089
endo-fenchol	0.17462	0.14763	84.5438
Pinocarvone	0.17692	0.15217	86.0104
Canmphene	0.17846	0.1731	96.9965
Borneol	0.16846	0.16537	98.1652
tau-cadinol	0.51692	0.51017	98.6935
alpha-copaene	0.19923	0.20488	102.834
germacrene D	0.14692	0.15845	107.846
camphene hydrate	0.08385	0.09465	112.888
Globulol	0.11462	0.13642	119.024
caryophyllen z	0.21923	0.29935	136.544
trans-ocimene	0.14154	0.2394	169.144
bicyclogermacrene	0.06615	0.11709	176.989
caryophyllen oxide	0.10615	0.19462	183.335
10-epi-cubebol	0.06846	0.13146	192.015
trans-pinocarveol	0.05692	0.12161	213.645
Intermedeol	0.04	0.09764	244.097
alpha-cubebene	0.05462	0.13593	248.886
cis-ocimene	0.44	1.09714	249.35

Sabinene	0.06692	0.16889	252.361
alpha-terpinolene	0.05308	0.13413	252.701
cis-calamenene	0.03308	0.08499	256.943
gama-terpineno	0.02923	0.07544	258.08
alpha-terpinene	0.01308	0.04715	360.555
trans-calamenene	0.02615	0.0943	360.555
beta-cytronellol	0.03923	0.14145	360.555
Junipene	0.03923	0.14145	360.555
Longipinanol	0.01846	0.06656	360.555

Figure 1 - Means and standard deviations for the terpenes that concomitantly occur in essential oils grouped according to the minimal inhibitory concentrations of 0.0625% (2A), 0.25% (2B) and 0.5% (2C). Set theory – specifically intersection - was used in the analysis.

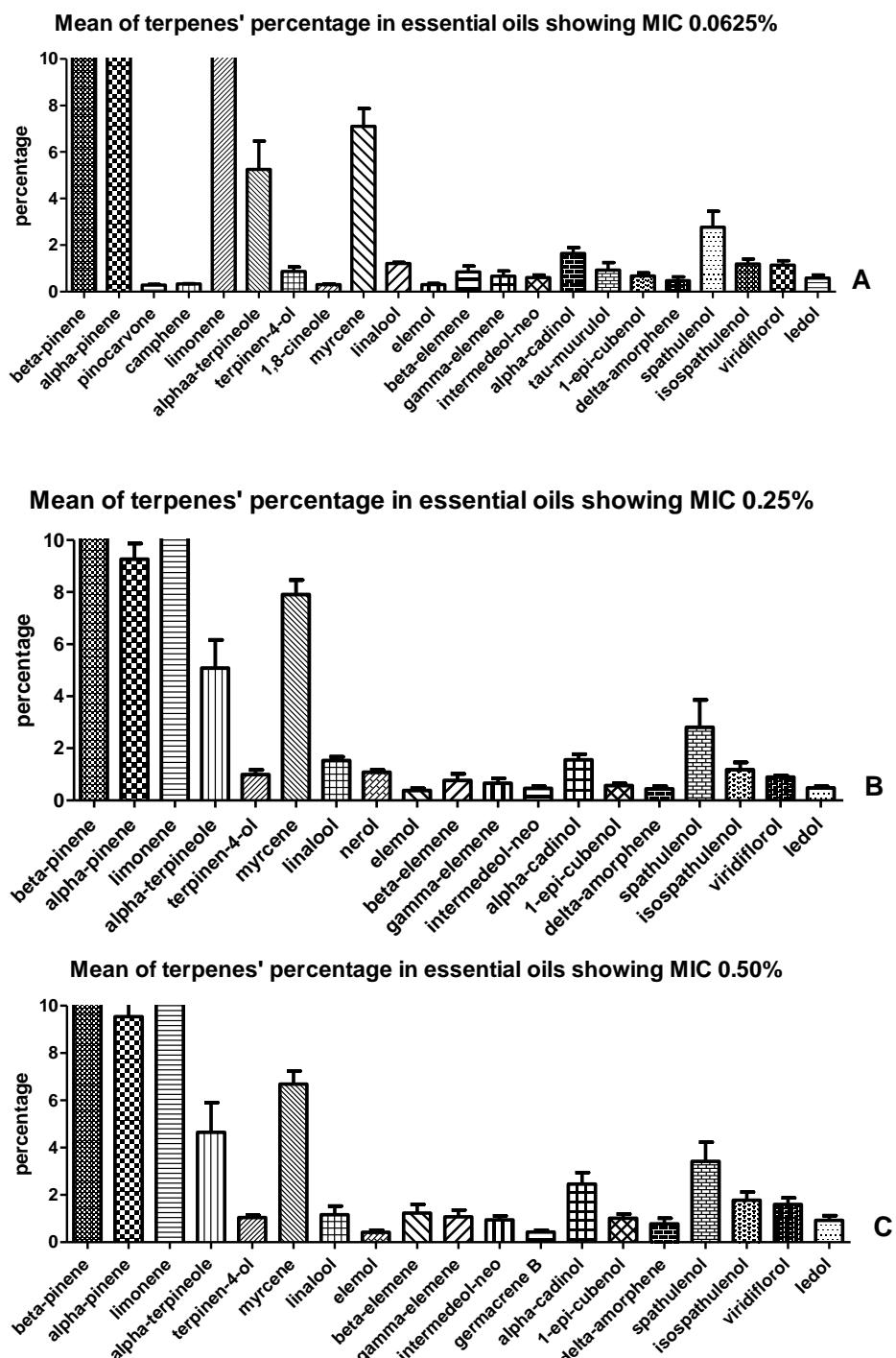


Table 4 - Means and standard deviations for terpenes that concomitantly occur in essential oils obtained from leaves of *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) grouped by the minimal inhibitory concentrations of 0.0625%, 0.25% and 0.5%. Set theory (intersection) and coefficient of variation (CV) were used in the analysis. Shadows divide terpenes into families according to their skeletal similarity.

	Percentage			Statistics			
	408OE5	408OE9	408OE11	Mean	StrdDev	CV	
Terpenes 0.0625%							
beta-pineno	35.93	37.53	35.62	36.36	1.03	2.82	
alpha-pineno	10.43	11.25	10.28	10.65	0.52	4.90	
Pinocarvona	0.23	0.28	0.33	0.28	0.05	17.86	
Canfeno	0.33	0.29	0.36	0.33	0.04	10.75	
Limoneno	20.8	16.89	23.69	20.46	3.41	16.68	
alfa-terpineol	5.52	3.04	7.21	5.26	2.10	39.90	
terpinen-4-ol	0.79	0.61	1.22	0.87	0.31	35.89	
1,8-cineol	0.33	0.26	0.32	0.30	0.04	12.48	
Mirceno	7	5.83	8.48	7.10	1.33	18.70	
Linalol	1.12	1.26	1.26	1.21	0.08	6.66	
Elemol	0.37	0.33	0.2	0.30	0.09	29.63	
beta-elemeno	1.01	1.17	0.35	0.84	0.43	51.54	
gama-elemeno	0.79	0.98	0.21	0.66	0.40	60.78	
neo-intermedeol	0.66	0.76	0.39	0.60	0.19	31.72	
alfa-cadinol	1.98	1.81	1.14	1.64	0.44	27.02	
tau-muurulol	1.55	0.74	0.49	0.93	0.55	59.80	
1-epi-cubenol	0.72	0.88	0.41	0.67	0.24	35.67	
delta-amorfeno	0.49	0.75	0.18	0.47	0.29	60.29	
Espatulenol	2.54	4.05	1.72	2.77	1.18	42.67	
Isoespatulenol	1.42	1.39	0.76	1.19	0.37	31.32	
Viridiflorol	1.5	1.08	0.83	1.14	0.34	29.79	
Ledol	0.76	0.66	0.35	0.59	0.21	36.23	

	Percentage				Statistics		
	408OE2	408OE3	408OE12	408OE13	Mean	StrdDev	CV
Terpenes 0.25%							
beta-pineno	29.29	36.62	34.86	34.62	33.85	3.17	9.36
alpha-pineno	7.48	9.48	10.18	9.91	9.26	1.22	13.20
limoneno	21.24	20.75	23.41	23.26	22.17	1.37	6.17
alfa-terpineol	5.53	1.96	6.87	5.99	5.09	2.16	42.41
terpinen-4-ol	1.05	0.45	1.23	1.21	0.99	0.37	37.12
Mirceno	7.05	6.84	8.75	8.97	7.90	1.11	14.08
Linalol	1.83	1.19	1.66	1.43	1.53	0.28	18.22
Nerol	1.17	0.8	1.16	1.18	1.08	0.19	17.19
Elemol	0.52	0.53	0.22	0.25	0.38	0.17	44.19
beta-elemeno	0.45	1.51	0.64	0.49	0.77	0.50	64.52
gama-elemeno	0.37	1.2	0.59	0.49	0.66	0.37	55.77
neo-intermedeo1	0.58	0.62	0.33	0.32	0.46	0.16	34.52
alfa-cadinol	2.17	1.55	1.21	1.3	1.56	0.43	27.80
1-epi-cubenol	0.81	0.46	0.45	0.57	0.57	0.17	29.24
delta-amorfeno	0.26	0.72	0.41	0.41	0.45	0.19	42.98
espatulenol	3.54	5.46	0.99	1.24	2.81	2.11	75.09
isoespatulenol	1.65	1.68	0.64	0.74	1.18	0.56	47.94
viridiflorol	0.99	0.76	0.93	0.92	0.90	0.10	10.92
ledol	0.62	0.33	0.48	0.48	0.48	0.12	24.80

	percentage					Mean	StrdDev
	408OE4	408OE6	408OE7	408OE10	408OE14		
Terpenes 0.5%							
beta-pineno	35.9	36.31	33.43	32.92	35.9	32.77	4.44
alpha-pineno	10.53	10.54	10.3	11.05	10.53	9.54	2.39
limoneno	21.75	22.58	20.61	14.26	21.75	19.71	3.28
alfa-terpineol	7.1	1.7	8.14	2.75	7.1	4.65	2.81
terpinen-4-ol	1.17	1.2	1.23	0.7	1.17	1.05	0.23
mirceno	8.11	7.2	6.94	4.77	8.11	6.69	1.23
linalol	1.53	0.66	1.59	0	1.53	1.16	0.82
elemol	0.21	0.51	0.21	0.43	0.21	0.42	0.22
beta-elemeno	0.4	1.1	0.56	1.82	0.4	1.24	0.81
gama-elemeno	0.39	1.07	0.6	1.31	0.39	1.08	0.64
neo-intermedeo1	0.45	1.29	0.63	1.2	0.45	0.94	0.38
germacreno B	0.21	0.35	0.34	0.63	0.21	0.43	0.19
alfa-cadinol	1.61	1.63	2.07	2.84	1.61	2.46	1.08
1-epi-cubenol	0.72	0.8	0.71	1.2	0.72	1.01	0.40
delta-amorfeno	0.32	0.92	0.34	0.72	0.32	0.78	0.53
espatulenol	1.31	3.18	2.29	6.01	1.31	3.42	1.82
isoespatulenol	0.83	1.47	1.44	2.42	0.83	1.78	0.78
viridiflorol	1.17	1	1.47	2.52	1.17	1.61	0.61
Ledol	0.63	0.44	0.86	1.46	0.63	0.93	0.42