

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

PROGRAMA DE DOUTORADO EM
PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS
DE FOLHAS DE *Iryanthera polyneura* DUCKE
(MYRISTICACEAE) E A INFLUÊNCIA DOS FATORES
CLIMÁTICOS.**

ERIKA RAMOS MARTINS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do prof(a). Dr(a). Ivana Barbosa Suffredini

SÃO PAULO
2018

ERIKA RAMOS MARTINS

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS
DE FOLHAS DE *Iryanthera polyneura* DUCKE
(MYRISTICACEAE) E A INFLUÊNCIA DOS FATORES
CLIMÁTICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Ivana Barbosa Suffredini

Martins, Erika Ramos.

Avaliação biológica dos óleos voláteis de folhas de *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae) e a influência dos fatores climáticos / Erika Ramos Martins – 2018.

120 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Patologia ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Sulffredini.

1. Análise de correspondência.
 2. Clima.
 3. *Iryanthera polyneura*.
 4. Floresta Amazônica.
- I. Sulffredini, Ivana Barbosa (Orientadora).
II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

À minha família
pelo amor, apoio e incentivo,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por cuidar de mim, por me socorrer nos momentos difíceis e por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho

À Universidade Paulista – UNIP, que desde a graduação sempre me levou as melhores oportunidades para minha formação profissional e agora me proporcionou a bolsa de Doutorado e que permitiu que tudo se tornasse realidade

À coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, na pessoa de seu coordenador, Mario Mariano por todo apoio conferido durante o desenvolvimento do projeto de Doutorado.

Ao Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade, pela infraestrutura fornecida para a realização desse trabalho.

A Dra. Ivana Barbosa Suffredini, pela orientação, por todos os ensinamentos, proteção, amizade, respeito e pela qual tenho imenso carinho e admiração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental que me mostraram um novo mundo com disciplinas que me tiraram da minha zona de conforto e assim me fizeram crescer profissionalmente.

Ao meu amigo Jefferson de Souza Silva que me ajudou com toda técnica e muitas risadas no laboratório.

Aos meus alunos de Iniciação Científica Elielson Rodrigo Silveira e Matheus Potsclam Barro que realizaram muitos experimentos e se comportaram muito bem no laboratório.

Ao Matheus Luís Barradas Pacienza e ao Sergio Alexandre Frana pela contribuição da coleta, análises e conversas sobre os diversos trabalhos na área da biologia.

Ao Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas da UNICAMP, em especial ao Dr. Marcos Nogueira Eberlin, que aceitou de imediato a colaboração, à Dra. Damila Rodrigues Moraes e ao Professor Dr. José Luiz Costa pela realização das análises no espectrômetro de massa que foram fundamentais para a elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos Bárbara, Fernando, Thaís (Tata), Paulo, Raphael e Renato que me ajudaram durante todo o processo ora nas análises ora nas festas que me distraíam e me fazia sentir um pouco mais leve.

À minha família, em especial ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelas palavras de incentivo, pelas orações, pela paciência, pelo amor incondicional, pelo carinho tão necessário nessa fase, enfim, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu esposo e companheiro Henrique, que muitas vezes ouviu minhas lamentações e reclamações, sempre me incentivou e me acompanhou no passo-a-passo desta minha linda caminhada. Sem você, eu não teria conseguido.

Amo vocês.

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sou eternamente grata!

Sou como você me vê.
Posso ser leve como uma brisa ou forte como uma ventania.
Depende de quando e como você me vê passar.

Clarice Lispector

	Sumário
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Floresta Amazônica	12
2.2 Histórico das plantas medicinais	15
2.3 Metábolitos secundários	18
2.4 Óleos volatéis e sua função na planta	22
2.5 Myristicaceae R.Br.	24
2.6 <i>Iryanthera</i> (A.DC.) Warb.	27
2.7 <i>Iryanthera polyneura</i> Ducke	33
2.8 Influência do clima na produção de metabólitos secundários em espécies produtoras de óleos voláteis	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos gerais	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Coleta de plantas	37
4.2 Obtenção dos óleos voláteis	39
4.3 Preparo das amostras e substâncias padrão para os ensaios biológicos	41
4.4 Ensaio da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo	41
4.5 Ensaio da atividade antitumoral (citotóxica)	42
4.6 Análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	43
4.7 Obtenção do Índice de Retenção	44
4.8 Delineamento experimental	44
4.9 Análise matemática e estatística	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
6. ARTIGO	57
6.1 Avaliação química de <i>Iryanthera polyneura</i> Ducke e a interação dos óleos voláteis das folhas com os fatores climáticos	57
6.2 Avaliação biológica de <i>Iryanthera polyneura</i> Ducke e a interação dos óleos voláteis das folhas com os fatores climáticos.	84
Análise matemática e estatística	93

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	111
APÊNDICE 1	121
ANEXO 1	124
Certificado do Comitê de ética da UNIP	124
ANEXO 2	125
Espectros de massa dos compostos que não foram identificados	125

RESUMO

O Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos. Estudos fitoquímicos anteriores com o gênero *Iryanthera* demonstraram seu potencial antioxidante e a presença de compostos que podem apresentar propriedades antibacterianas em algumas espécies. Estes conhecimentos serviram de incentivo para os estudos com *Iryanthera polyneura*. O objetivo deste trabalho foi estudar a variação temporal qualitativa e quantitativa dos óleos voláteis de *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae), avaliar a atividade antimicrobiana e antitumoral destes óleos e a interação da síntese dos óleos voláteis com os fatores climáticos. Foram obtidas amostras periódicas de três indivíduos da espécie, extraíndo-se os óleos volatéis a partir dos mesmos durante dois anos. Posteriormente foram realizadas as análises antimicrobianas (CIM), ensaio de citotoxicidade (IC_{50}), análise química por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e as análises estatísticas de componentes principais (ACP), análise de correspondência (AC), análise de correspondência canônica (ACC) e ANOVA. Segundo as análises realizadas, observou-se que nos rendimentos dos óleos voláteis houve uma variação entre a composição dos compostos voláteis dos três indivíduos. Quanto à composição quali e quantitativa, a ocorrência de espatulenol, α -cadinol e τ -muurolol como compostos majoritários é comum aos três indivíduos. As variáveis climáticas analisadas (umidade relativa, precipitação, temperaturas diárias mínima, média e máxima, insolação, velocidade do vento e evaporação) influenciaram a composição dos óleos voláteis. Foi possível observar atividade antibacteriana significativa para os óleos obtidos de *I. polyneura*, em particular para as bactérias Gram-positivas. De modo geral, os óleos apresentaram-se mais tóxicos para as células de tumor de próstata do que contra células de tumor de mama. Além disso, houve diferenças relacionadas a cada um dos indivíduos de *I. polyneura* estudados: embora todos tenham apresentado atividade antibacteriana e citotóxica, a pequena variação quali e quantitativa na composição dos óleos voláteis de cada um dos indivíduos fez com que houvesse diferença nas respostas das atividades biológicas observadas.

Palavras – chave: ACP, AC, ACC, clima, *Iryanthera polyneura*, Floresta Amazônica.

ABSTRACT

Brazil presents a very diversified flora, with vegetation of different characteristics and many active ingredients still unknown. Phytochemical studies with essential oils and extracts from plants belonging to the genus *Iryanthera* demonstrated antioxidant and antibacterial properties. The aim of the presente work was to evaluate the qualitative and quantitative variation of the essential oils of *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae) and to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils and the interaction of the synthesis of the volatile oils with the climatic factors. Three specimens of the species were collected for two years. Biological analyses (MIC), cytotoxicity tests (IC₅₀), chemical analyses by GS-MS and the statistical multivariate analyses of componentes princial analysis (PCA), correspondence analysis (CA), canonical correspondence analysis (CCA) and ANOVA. According to the analyzes, the differences in the yields of the volatile oils showed a variation between the composition of the volatile compounds of the three individuals. The qualitative and quantitative composition, the occurrence of espatulenol, α -cadinol and τ -muurolol as major compounds is common to all three individuals, but they occur in different concentrations. The climatic variables analyzed (relative humidity, precipitation, minimum daily temperatures, medium and maximum, insolation, wind speed and evaporation), influenced the composition of the volatile oils. It was possible to observe significant antibacterial activity for the oils obtained from *I. polyneura*, in particular for Gram-positive bacteria. In general, the oils were more toxic to prostate tumor cells than to breast tumor cells. In addition, there were differences related to each of the individuals of *I. polyneura* studied: although all presented antibacterial and cytotoxic activity, the small qualitative and quantitative variation in the composition of the volatile oils of each one of the individuals caused that there was difference in the responses of the activities observed.

Keywords: Amazon Rainforest, APC, CA, CCA, climate, *Iryanthera polyneura*, principal component analysis.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, dos quais derivam diversos fármacos comercializados no mundo inteiro. A área de produtos naturais presume a enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas desses produtos encontrados na natureza. Apesar disso, os dados disponíveis indicam que somente uma porcentagem das plantas já foram estudada quanto ao seu potencial medicinal.

A família Myristicaceae é constituída por 18 gêneros e aproximadamente 500 espécies, com distribuição pantropical. A Bacia Amazônica é o centro de diversidade da família no continente sul-americano, onde certas espécies são muito comuns (PAULO, 1983, SILVA; SILVA, 2008; MORAIS *et al.*, 2009), principalmente, por apresentam propriedades medicinais nos óleos voláteis que são sintetizados pelo vegetal.

Algumas pesquisas relativas à composição química dos óleos voláteis de *Iryanthera* têm sido realizadas, em alguns casos, relaciona com a atividade biológica, mas não justifica quais fatores podem interferir nessa interação do vegetal e a possível atividade biológica de seus óleos. Contudo, algumas questões ainda não são bem compreendidas, principalmente no que tange à interações do vegetal com o meio ambiente. Qual a variação qualitativa e quantitativa dos terpenos dos óleos voláteis de *Iryanthera polyneura*? Qual a influência dos fatores climáticos sobre a produção dos terpenos da espécie? Qual a relação entre a sazonalidade e os terpenos? Existem diferenças de ocorrência dos principais compostos em cada indivíduo? Os óleos voláteis apresentam atividade antimicrobiana? Os óleos voláteis apresentam atividade citotóxica? Existe relação entre os terpenos e as atividades biológicas? Como as diferenças sazonais influenciaram a produção de terpenos e consequentemente a atividade biológica?

Para procurar responder a estas questões, análises que relacionam o tipo e a porcentagem de ocorrência de terpenos a medidas de variáveis climáticas obtidas para a região de coleta do material vegetal, além de resultados obtidos

de análises antimicrobianas e citotóxicas dos óleos foram feitas. Metodologias de análise multivariada foram necessárias para esse fim. Dessas análises, o estudo da importância dos terpenos para *Iryanthera polyneura* e sua relação com o meio ambiente foi avaliado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Floresta Amazônica

Biodiversidade ou diversidade biológica é a variedade de espécies, genes e ecossistemas de uma determinada área (BARBERI, 2010). O Brasil está entre os 12 países com maior biodiversidade do mundo (OLSON; DINERSTEIN, 1998; MYERS *et al.* 2000; OLSON *et al.* 2001), contando com aproximadamente um terço das florestas tropicais remanescentes no globo (PAS, 2008). Em seu território encontra-se parte da Amazônia, uma Floresta Tropical reconhecida como a maior e mais diversificada floresta do planeta considerando todas as formas de vida (TURNER, 2001).

A Amazônia abriga um número expressivo de espécies de animais e plantas. Os levantamentos mais recentes indicam a existência de aproximadamente 40.000 espécies de plantas, 427 mamíferos, 1.294 aves, 378 répteis, 427 anfíbios e cerca de 3.000 peixes (SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005). Atualmente, estima-se que a flora desconhecida na Amazônia está subestimada e que a biodiversidade vegetal provavelmente inclui pelo menos 3 vezes mais espécies de plantas do que atualmente são conhecidas (HOPKINS, 2007), muitas das quais são endêmicas deste bioma (FERREIRA, 2017). Além disso, a floresta Amazônica tem um papel fundamental na ciclagem de água e carbono (SAATCHI *et al.*, 2007) do planeta.

A Floresta Amazônica possui a maior extensão de floresta tropical do mundo, com aproximadamente 6.000.000 quilômetros quadrados, sendo que mais da metade encontra-se em território brasileiro (PIRES; PRANCE, 1985). É reconhecida na literatura científica como um conjunto vegetal de características bem definidas, que se estende dos Andes até o Oceano Atlântico como um verdadeiro mosaico de ecossistemas. Na Amazônia, muitas áreas são formadas

por mosaicos de fisionomias vegetais, com diferentes conjuntos de espécies de plantas que ocorrem em diferentes substratos (PITMAN *et al.*, 2001; NOVAES FILHO *et al.*, 2007).

As inúmeras fitosionomias dessa floresta fazem-na uma província fitogeográfica complexa e heterogênea, caracterizada pela floresta tropical úmida de grande biomassa, que interage com os diversos tipos de solos, que são sempre ácidos e pobres em nutrientes, bem como pelas variações no regime de chuvas (Pires-O'Brien; O'Brien, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999).

Na definição segundo Rizzini (1997), floresta de terra-firme, é a floresta pluvial de grande porte localizada em planaltos pouco elevados, planos, ondulados ou recortados por cursos d'água, não sujeitos a inundações, cujo substrato é de areia mais ou menos argilosa, amarelada ou avermelhada, podendo, em vários pontos, ser argiloso e fértil. Tal definição corrobora com o sistema de classificação de Veloso *et al.* (1991), em que as florestas de terra-firme são descritas como florestas ombrófilas, onde se incluem, as florestas ombrófilas abertas com bambus, cipós e palmeiras.

Vale ressaltar que, segundo Aziz Ab'Sáber (2005), a terra-firme não é igual em toda parte, tendo grande continuidade e homogeneidade nos tabuleiros ondulados da Amazônia e modificações setoriais em diversos pontos devido ao contraste nos solos aflorantes. Às vezes, aparecem pequenos setores nos quais se verifica a existência de muita areia e onde a floresta não entra: campinas, campinaranas e réstias de cerrado em terraços arenosos. Esses fatores afetam diretamente na distribuição e presença das espécies.

As florestas de terra-firme cobrem, aproximadamente, 90% da Amazônia brasileira (PIRES, 1973; BRAGA, 1979) e representam uma área não inteiramente contínua, podendo ser interrompida por vegetação não arbórea. Fisionomicamente, apresenta uma paisagem muito uniforme, mas quando estudada em detalhes, mostra constante variação em relação à composição botânica.

Essa tipologia de plantas é a mais representativa da floresta amazônica, caracterizada principalmente pela alta riqueza de espécies e diversidade, com poucos indivíduos de cada espécie e, geralmente, alta diversidade florística entre

parcelas adjacentes (FERREIRA; PRANCE, 1998; CONDÉ; TONINI, 2013). Segundo Oliveira e Amaral (2004) há cerca de 240 espécies em um hectare de floresta de terra firme em Manaus, evidenciando a alta diversidade desta fitofisionomia.

Braga (1979) destaca ainda algumas características complementares que podem ser ressaltadas para a floresta de terra-firme, como: presença de raízes expostas; forma irregular de caules sulcados, retorcidos, enrugados, fendidos, escandentes, epifíticos e estranguladores; maneiras de reprodução e restauração; plantas anuais; plantas umbrófilas, e árvores que só crescem em clareiras abertas.

A Amazônia está situada na região equatorial e possui um clima quente e úmido, onde é possível identificar duas estações do ano, a primeira é dominada por chuvas de verão austral (de janeiro a março) ao sul, enquanto ao norte ocorrem precipitações maiores durante o verão boreal (de maio a julho) e a outra seca (julho a dezembro) (AB-SÁBER, 2003). O clima da Amazônia deve-se a mistura e a combinação de vários fatores, sendo o mais importante a disponibilidade de energia solar.

Desde a descoberta do Brasil em 1500 as matas brasileiras sofreram uma invasão devastadora, seja em decorrência do desenvolvimento urbano, das indústrias, do avanço da agropecuária em áreas naturais ou da extração de recursos diretos da natureza, como madeira. A diversidade vegetal que constitui os diversos habitats da Floresta Tropical Amazônica ainda é pouco conhecida e a destruição desse patrimônio implicará na perda de espécies com potencial de aplicação em áreas de interesse humano, como agricultura, indústria e medicina. Vale ressaltar que é diretamente proporcional a alta diversidade biológica com a diversidade química sugerindo uma possibilidade maior dessa floresta conter compostos com atividade terapêutica (SUFFREDINI; DALY, 2001).

2.2 Histórico das plantas medicinais

A utilização das plantas como medicamento é muito antiga e data dos primórdios da civilização. Na China, há registros de cultivo de plantas medicinais que datam de 3.000 a.C.; os assírios e hebreus também as cultivavam em 2.300 a.C. e produziam vermífugos, purgantes, cosméticos, diuréticos e produtos para embalsamar, entre outros. 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 o ginseng (*Panax spp.*), que auxilia o aumento da imunidade e o capim-limão (*Cymbopogon citratus (DC.) Stapf*), de ação bactericida. Hipócrates (460-377 a.C.), o “Pai da Medicina”, escreveu sobre doenças e os remédios feitos com plantas para combatê-las (NOLLA; SEVERO; MIGOTT, 2005).

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) e doenças ligadas ao sistema nervoso central (COSTA *et. al.* 2011), além de algumas plantas apresentarem atividade antioxidante (GOMES *et al.* 2013; CAMPÊLO *et al.* 2011).

Os primeiros europeus que chegaram no Brasil se depararam com uma grande quantidade de plantas medicinais em uso pelos povos indígenas que aqui viviam. Os conhecimentos sobre a flora local acabaram se fundindo àqueles trazidos da Europa e os escravos africanos deram sua contribuição com o uso de plantas oriundas da África. A percepção sobre o poder curativo de algumas plantas é uma das diversas formas de relação entre homens e plantas, e as práticas relacionadas ao uso tradicional de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa para a manutenção da saúde ou o tratamento de doenças (AMOROZO, 2002).

Estudos realizados entre populações tradicionais da Amazônia confirmam a utilização intensiva da flora nativa para um amplo espectro de atividades. Em alguns locais da Amazônia peruana e boliviana, bem no Maranhão, Amazonas e Acre, o aproveitamento das espécies arbóreas pode variar de 65 a 85% da flora local para alimentação, remédio, construção e combustível, além de ferramentas de caça e pesca, cestas e adornos usados em rituais religiosos (SUFFREDINI; DALY, 2001).

Em 1988, o botânico norte-americano Richard Schultes já havia documentado o uso de cerca de 2.000 plantas medicinais pelos índios da Amazônia colombiana para diversos fins, como atividades cardiovasculares, vermífugas, contraceptivos, inseticidas entre outros (Quadro 1) (SCHULTES, 1988). No Brasil, o etnobotânico William Milliken e colaboradores descobriram que cerca de 15% das espécies de árvores acima de 10 centímetros de diâmetro encontradas em um hectare eram usadas como plantas medicinais (MILLIKEN et al. 1992).

QUADRO 1: Algumas plantas utilizadas popularmente pelos povos da Amazônia. (Adaptado de SUFFREDINI; DALY, 2001).

Nome popular	Família	Nome científico	Finalidade
Acapurana	Fabaceae	<i>Campsandra comosa</i> Benth.	Afecções bucais
Anabi	Gentianaceae	<i>Potalia amara</i> Aubl.	Contra sífilis e intoxicação alimentar. É também utilizada contra envenenamento por mandioca
Andiroba	Meliaceae	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Antiinflamatório
Carapanaúba	Apocynaceae	<i>Aspidosperma nitidum</i> Benth. ex Müll.Arg.	Contra febre, malária e afecções do fígado
Curare	Menispermaceae	espécies de Menispermaceae	Paralisção dos músculos estriados, incluindo o diafragma
Guaraná	Sapindaceae	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	Estimulante sobre o sistema nervoso central, possuía propriedades antidiarréicas, diuréticas e febrífugas

Quadro 1. (Cont.)

Nome popular	Família	Nome científico	Finalidade
Melão-de-são-caetano	Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Regularizar o fluxo menstrual, contra cólicas intestinais e para combater a leucorréia
Muirapuama	Olacaceae	<i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth.	Afrodisíaco e tônico, para tratar doenças do sistema nervoso, reumatismo e nevralgias
Pega-pinto	Nyctaginaceae	<i>Boerhavia paniculata</i> Rich.	Contra hepatite
Pinipisa, Iluichu ou lancetilla	Acanthaceae	<i>Justicia pectoralis</i> Jacq.	Antipirético e antiinflamatório, e como compressas em hematomas. É afrodisíaca e aromática
Quina ou quassia-do-brasil	Simaroubaceae	<i>Quassia amara</i> L.	Contra sarampo
Sabugueiro	Adoxaceae	<i>Sambucus peruviana</i> Kunth.	Contra catapora
Sangue-de-drago	Euphorbiaceae	<i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.	Cicatrizante de lesões e feridas e internamente para tratar úlceras, hemorragias e vários problemas do sangue
Ucuuba-chico-de-assis	Myristicaceae	<i>Osteophloeum platyspermum</i> (Spruce ex A.DC.) Warb.	Contra asma
Unha-de-gato	Rubiaceae	<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J.F.Gmel. e <i>U. tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) DC.	Antiinflamatório, anti-reumático, contraceptivo, contra úlceras gástricas e tumores

O avanço ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e eficientes, embora ainda faltam estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (VIEIRA *et al.*, 2010).

O Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos, o que justifica o crescimento significativo de estudos com produtos de origem vegetal objetivando a obtenção de novos potenciais fitoterápicos (CALIXTO, 2003;

NAPOLITANO *et al.*, 2005). Além disso, é considerado o país mais rico em biodiversidade, atualmente são reconhecidas em torno de 46.000 espécies para a flora brasileira (FLORA DO BRASIL, 2018), das quais poucas foram estudadas em termos biológicos, químicos e farmacológicos.

Diante disso, vários programas de pesquisa de novas drogas têm sido organizados no mundo, inclusive no Brasil. Dentre eles está o trabalho desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da Universidade Paulista, que, desde 1997, 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 voláteis de um grupo restrito de espécies foi estabelecido paralelamente ao projeto inicial, projeto Rio Negro, de prospecção na UNIP. O presente trabalho encontra-se vinculado ao referido projeto, no caso, abordando a espécie *Iryanthera polyneura*, uma Myristicacea.

2.3 Metabolitos secundários

Os metabólitos secundários, dos quais os óleos voláteis fazem parte, são compostos orgânicos presentes em células especializadas, atuando como sinalizadores na interação das plantas com seu ambiente, considerando as relações com os fatores bióticos e abióticos (VERPOORTE, 2000). São originados a partir de produtos intermediários das vias metabólicas principais, responsáveis pela produção de açúcares, lipídeos e proteínas. Caracteristicamente, possuem alta plasticidade genética e diversidade química, que possibilitam às plantas adaptar-se às demandas do ambiente, continuamente variável (HARTMANN, 2007).

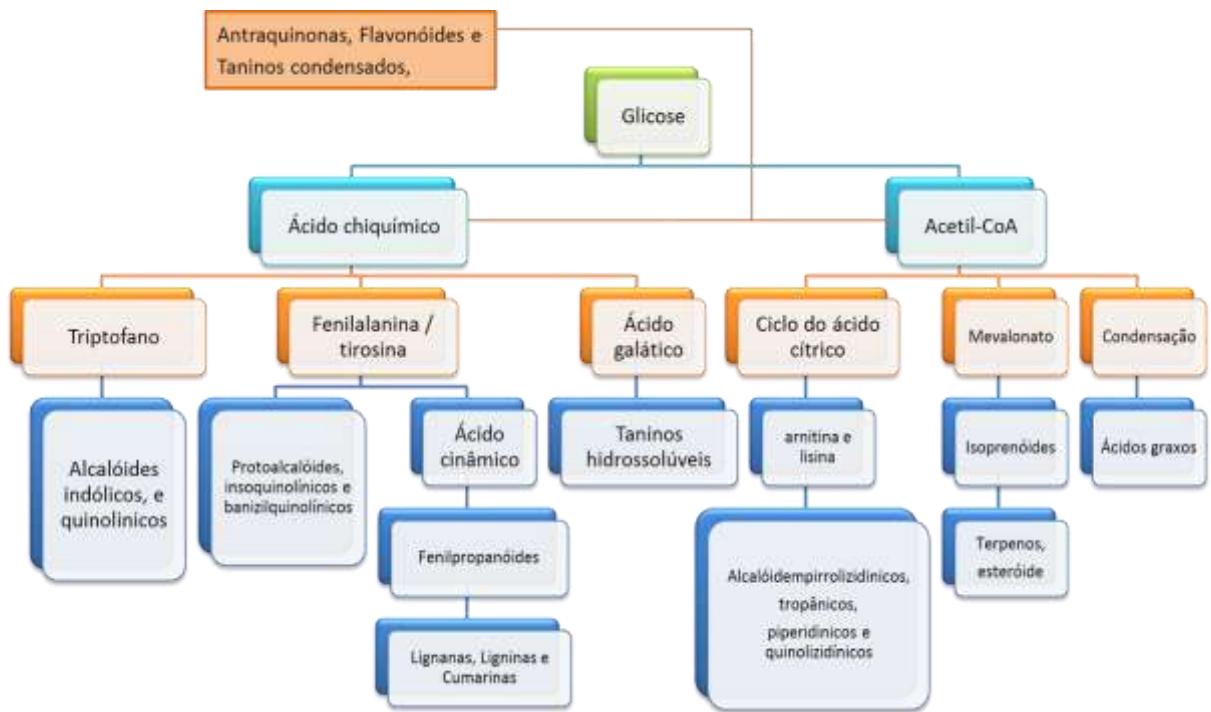
A produção desses componentes tem diversas funções, como por exemplo, proteger a planta contra herbívoros, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, podem favorecer a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes, bem como micro-organismos simbiontes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas,

como temperatura, umidade, proteção contra raios UV e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001; PERES, 2004; SIMÕES *et al.* 2010). Independentemente da sua origem, houve um processo seletivo que fez com que as plantas produzissem tais substâncias em quantidade suficiente para interagir com animais ou outras plantas (SUFFREDINI; DALY, 2001).

As funções ecológicas dos metabólitos secundários sobre as plantas que os produzem sugerem que os mesmos possam atuar similarmente com efeitos medicinais em humanos, de forma que produtos envolvidos na defesa vegetal contra micro-organismos patógenos, através de mecanismos de citotoxicidade, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, assim como as substâncias envolvidas na defesa contra herbivoria através de ação neurotóxica podem ter efeitos benéficos sobre humanos, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BRISKIN, 2000).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (Figura 1), utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenoides são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos voláteis, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores são terepenoides; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

FIGURA 1: Via de biossíntese dos metabólitos secundários.



Fonte: (Adaptado de Kreis *et al.* 1999).

Possivelmente, os metabólitos secundários estão envolvidos com processos de coevolução entre os animais polinizadores e as plantas polinizadas (FIBERG *et. al.* 2013), levando algumas espécies à profunda dependência desse tipo de procedimento evolutivo.

Alguns metabólitos secundários de origem vegetal que são utilizados pelo homem para o tratamento de doenças são: morfina, um alcalóide extraído dos frutos de *Papaver somniferum* L. (papoula), por sua forte ação analgésica, (HARTMANN, 2007) receitada para o alívio da dor moderada a forte causada pelo câncer e promoção de sensação de bem-estar (HANKS *et al.* 2001); taxol, um diterpeno extraído das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (MACÍAS *et al.* 2007), vinblastina e vincristina, alcaloides extraídos de *Catharanthus roseus* (L.) Dom, aplicados no tratamento antitumoral; quinina, um alcaloide extraído de *Cinchona officinalis* L., e artemisina, um sesquiterpeno extraído de *Artemisia annua* L., aplicados no tratamento da malária (CROTEAU *et al.* 2000).

No decorrer dos anos, o papel dos compostos bioativos extraídos de vegetais é cada vez mais considerado relevante na economia mundial. Há pouco tempo somente algumas pequenas empresas se interessavam por plantas

medicinais, ao passo que atualmente empresas multinacionais estão investindo nessa área já que os números são crescentes.

Acredita-se que, em países em desenvolvimento, 65 a 80% da população dependa exclusivamente das plantas medicinais para cuidados básicos de saúde, sendo até 80% da população na África, 71% no Chile e 40% na Colômbia (AGRA, M.F. *et al.* 2008). Esse é frequentemente o único recurso disponível às comunidades carentes, em geral compostas por habitantes de países tropicais que apresentam enormes barreiras geográficas e financeiras de acesso a medicamentos alopáticos.

A importância da busca de novos medicamentos entre os produtos naturais pode ser justificada pelas pesquisas que evidenciam os números que envolvem esses produtos naturais. Por exemplo, entre as décadas de 1950 a 1980, o National Cancer Institute (EUA) pesquisou cerca de 600 mil compostos, dentre os quais 114 mil eram extratos de produtos naturais, encontrando 42 extratos que acabaram resultando em drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA). Já em 1990 US\$ 15 bilhões foram as cifras desse comércio (SUFFREDINI; DALY, 2001). Pesquisas revelaram que em 1997 o mercado europeu atingiu cerca de US\$ 7 bilhões, sendo a Alemanha responsável por cerca de 50% desse valor (US\$ 3,5 bilhões), seguida pela França (US\$ 1,8 bilhão), Itália (US\$ 700 milhões), Reino Unido, (US\$ 400 milhão), Espanha (US\$ 300 milhões) e Holanda (US\$ 100 milhões). No entanto, em nenhum outro país este mercado é tão promissor como nos EUA que, em 1996, movimentava cerca de US\$3,2 bilhões (CALIXTO, 2000). Em 2000 cerca de US\$ 6,3 e US\$ 8,5 bilhões foram movimentados no mercado com agentes terapêuticos nos EUA e na Europa, respectivamente (SIMÕES; SCHENCKEL, 2002).

No Brasil, a Associação Brasileira de Empresas de Fitoterápicos (Abifisa) estima um mercado interno de R\$ 700 milhões a R\$ 1 bilhão. Durante o período de 1981 a 2002, 61% dos 877 novos fármacos desenvolvidos foram provenientes de produtos naturais ou de substâncias desenvolvidas a partir deles (NEWMAN *et al.* 2003). Já Freitas (2007) calculou que o segmento de agentes fitoterápicos brasileiros faturou, no período de 2003 a 2006, o valor de US\$ 1,086 bilhões. De acordo com Hasenklever *et al.* (2009), o segmento de agentes fitoterapêuticos

teve um aumento acelerado do faturamento, que foi de 10% no ano de 2005 e superior a 18% no ano de 2006.

De acordo com os registros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o último levantamento do número de fitoterápicos registrados foi realizado em 2011, havia 382 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, sendo 357 medicamentos fitoterápicos simples (apenas uma espécie vegetal empregada como ativo) e 25 compostos (com mais de uma espécie vegetal empregada como ativo) (ANVISA, 2018).

Considerando a diversidade da flora amazônica, o número de espécies vegetais que apresentam metabólitos secundários com potencial fitoterápico e que ainda não foram estudadas é grande, transformando o Brasil, em particular a Floresta Amazônica, em um celeiro de novas descobertas.

2.4 Óleos voláteis e sua função na planta

A utilização de óleos voláteis, bem como outras formas alternativas de tratamento médico, vem demonstrando grande popularidade desde a década de 1990. As razões para esse crescimento incluem diminuição de novas substâncias antimicrobianas sintéticas, consideradas potencialmente tóxicas e com efeitos colaterais evidentes no paciente (MAREGESI *et al.* 2008; SILVA JUNIOR. *et al.* 2009).

Os óleos voláteis são misturas de substâncias voláteis (de 20 a 200 componentes), solúveis em solventes orgânicos apolares, em geral odoríferas, obtidas por arraste a vapor d'água ou espremedura dos pericarpos de frutos cítricos. Seus constituintes podem ser classificados em derivados de terpenoides ou de fenilpropanoides (CASTRO, *et al.*, 2010; SIMÕES *et. al.* 1999), dependendo da via biossintética da qual são originados. Podem ser encontradas em diferentes partes da planta tais como casca, folhas, flores e frutos (BURT, 2004). Atualmente, são conhecidas mais de 3.000 substâncias químicas detectadas nos óleos voláteis (Heinzmann *et al.* 2017).

Dentre as funções exercidas pelos óleos voláteis podem ser citadas a de proteção contra agentes bacterianos, virais, fúngicos, além de inseticidas contra

herbívoros e predadores (FÜRSTENBERG-HÄGG *et. al.* 2013), o que sinaliza um grande potencial dessas plantas para uso medicamentoso.

Os óleos voláteis são encontrados em várias famílias botânicas, como Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Laureaceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Rosaceae, Poaceae e Zingiberaceae, entre outras. Dependendo da família, os óleos ocorrem em estruturas secretoras especializadas, como tricomas 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).

Atualmente, o número de trabalhos científicos feitos com plantas que apresentam óleos voláteis é vasto. Segundo Vieira *et. al.* (2004) o óleo volátil de manjerona (*Origanum majorana* L.) apresenta o linalol como o composto majoritário, enquanto o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) apresenta ação antifúngica e antibacteriana relacionada a seus terpenos. Kamatou *et al.* (2012) relatam a história do eugenol, uma molécula importante na história do uso de óleos voláteis antimicrobianos e anestésicos. No orégano (*Origanum vulgare* L.), o carvacrol é o responsável pela atividade antibacteriana e antifúngica, enquanto o óleo volátil de cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) apresenta o eugenol como agente ativo (ZAGO *et al.* 2009). Segundo Tinoco *et al.* (2007) o funcho-doce (*Foeniculum vulgare* Müll.) apresenta anetol e fenchona, enquanto na noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.) os compostos fenólicos são os responsáveis pelas propriedades antioxidante e antimicrobiana. O óleo volátil 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).

De uma forma geral, as análises químicas dos vegetais têm evidenciado que a síntese de óleos voláteis nas plantas é influenciada por diversos fatores relacionados as condições ambientais, como o local de cultivo (KAROUSOU *et al.* 2005), a localização geográfica (SCHWOB *et al.* 2004), a sazonalidade, o

ciclo circadiano, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, os nutrientes, a altitude, a poluição atmosférica, a indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos e, muitas vezes, até a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido podem alterar sua produção (GOBBO NETO; LOPES, 2007; PERRY *et al.* 1999). Além disso, algumas pesquisas indicam que as funções ecológicas dos metabólitos secundários produzidos por plantas dioicas podem variar conforme o sexo do vegetal e interferir no seu potencial farmacológico (SIMPSON, 2013). Apesar da existência de um controle genético, a expressão pode apresentar modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos. De fato, os óleos volatéis representam uma interface química entre as plantas e o ambiente onde elas estão, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais. Por isso, as condições acerca da coleta do vegetal é um dos fatores de maior importância para o estudo desses metabolitos, visto que, variações podem coordenar ou alterar a produção desses compostos.

2.5 Myristicaceae R.Br.

São plantas de folhas alternas, simples, inteiras, peninérveas, às vezes coriáceas, pecioladas, estípulas ausentes. Inflorescência cimosa ou racemosa, paniculada ou umbelada; flores unissexuais, monóicas às vezes no gênero *Iryanthera* ou dióicas, pequenas, em racemos axilares ou terminais, às vezes fasciculadas ao final ou ao longo das ramificações, apétalas; cálice cupulado ou campanulado, 2-3(-5)-lobado, lobos valvados; flores masculinas 2-30, anteras 3 ou mais, extrorsas dorsalmente adnatas a uma coluna central estaminal; flores femininas, ovário súpero, 1-locular, com um óvulo basal anátropo, estilete curto, estigma sub-séssil em forma de disco lobado. Fruto cápsula, às vezes polposo, lenhoso, geralmente deiscente ao longo de duas suturas ventrais e dorsais; 1 semente, revestida por arilo delgado ou polposo, inteiro ou laciniado, arilo freqüentemente vermelho (Figura 2), rico em lipídeos, semente com abundante óleo; endosperma às vezes ruminado, aromático (VAN ROOSMALEN; BARDALES & GARCIA, 1996).

Podem ser arbustos, árvores ou lianas, comumente exudando uma seiva, quando cortado. A dispersão é endozoocórica, por frugívoros especializados como macacos-aranha (VAN ROOSMALEN, 1985), tucanos e cotingas (VAN DER PIJL, 1982; McKEY, 1975).

FIGURA 2: Ilustração do fruto de Myristicaceae.



Fonte: Ilustração: Roosmalen, 2003

Myristicaceae é constituída por 18 gêneros e aproximadamente 500 espécies, amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo, sendo a Ásia o centro de diversidade mundial. Além da América e Ásia, a família está representada na África e em Madagascar. A Bacia Amazônica é o centro de diversidade da família no continente sul-americano, onde certas espécies são muito comuns (PAULO, 1983, SILVA; SILVA, 2008; MORAIS *et al.*, 2009).

As Myristicaceae nas Américas são representadas por cinco gêneros endêmicos, como *Compsoneura* (A.DC.) Warb. (5 espécies), *Iryanthera* (A.DC.) Warb. (21 espécies), *Osteophloeum* Warb. (1 espécie), *Otoba* A.DC. ex Karsten. (2 espécies) e *Virola* Aublet (35 espécies), totalizando 64 espécies (FLORA DO BRASIL, 2018). Estão concentradas na Região Amazônica, onde as Myristicaceae são conhecidas como “ucuúbas”, que significa “árvore produtora de gordura”, (RODRIGUES, 1980) suas sementes são muito valorizadas pelo seu alto teor de ácidos graxos, principalmente o ácido mirístico, que é usado na indústria farmacêutica (SILVA *et al.*, 2005, SOUZA; LORENZI, 2005) e na comercialização da “manteiga de ucuúba”, usada como matéria-prima na fabricação de velas e cosméticos em geral (RODRIGUES, 1980).

O interesse etnofarmacológico por Myristicaceae surgiu na década de 1950, quando Richard Schultes divulgou a descoberta de que algumas espécies do gênero *Virola* constituiam fonte do *rapé yakee, parika* ou *epena*, um narcótico alucinogênico poderoso utilizado até os tempos atuais por índios da região amazônica. (RODRIGUES, 1980). As Myristicaceae são usadas ainda com diversas finalidades pelos indígenas da Amazônia, como por exemplo, no preparo de flechas, como estimulante cerebral, no tratamento de infecções dermatológicas ou estomacais, reumatismo, tumores etc., sendo muitas destas atividades comprovadas por pesquisas científicas (SCHULTES E HOLMSTED, 1971; GOTTLIEB, 1979; SCHULTES, 1985). Segundo Revilla (2002), espécies de *Virola* também são usadas popularmente contra fungos e sarna (*V. calophylla* Warb.), como alucinógeno (*V. elongata* (Benth.) Warb.), como coagulante de feridas e contra infecções causadas por fungos (*V. peruviana* (A.DC.) Warb.), desordens intestinais, cólicas e dispepsias (*V. sebifera* Aubl. e *V. surinamensis* (Rol.) Warb.).

A noz-moscada e o macis são especiarias apreciadas na culinária de todo mundo e consistem nas amêndoas e no arilo, respectivamente, da espécie de origem asiática *Myristica fragrans*. Dentre as espécies amazônicas, a *V. suribamensis* (Rol.) Wrb. apresenta importante valor comercial madeireiro. (RODRIGUES, 1980).

Os primeiros estudos fitoquímicos realizados com a família surgiram na década de 1970, realizadas com a madeira do tronco e com as cascas de *Virola* e *Iryanthera*. Desses estudos isolou-se compostos pertencentes às classes de diarilpropanoides, flavonoides, ligninas, γ -lactonas e alcaloides. No início da década de 1980, o interesse fitoquímico se direcionou aos metabólitos secundários encontrados nos frutos dessas plantas. Foram encontrados compostos pertencentes a outras classes, tais como policetídeos, tocotrienóides, flavonolignoides e uma grande variedade de neoligninas (MORAIS, 2008). Em trabalho recente Sufredinni *et al.* (2016) identificaram 17 compostos no óleo de *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A.DC.) Warb. relacionando sua composição química com fatores abióticos.

Há registro para cerca de 230 constituintes químicos isolados de Myristicaceae neotropicais, dentre as quais 50% correspondem a lignanas e neolignanas farmacologicamente ativas, como ariltetralina neolignana, lignana tetra, neolignana ariltetralona, neolignana do tipo benzofurano, dihidrobenzofurano, tetrahidrofuran e bifenil neolignana (MORAIS *et al.*, 2009).

2.6 *Iryanthera* (A.DC.) Warb.

Folhas alternas, inteiras, glabras, às vezes ligeiramente recurvadas nas margens, coriáceas, pecioladas. Inflorescência fasciculada racemosa, ou estreitamente paniculada, axilar ou sobre ramos desfolhados, às vezes bi- ou trifurcada na base, pedúnculo curto, minuciosamente estrigoso com tricomas semelhantes aos dos ramos ou glabrescentes; flores díclinas, às vezes monóclinas, em pequenos fascículos ao longo das ramificações, brácteas decíduas, bractéolas 1-2 persistentes; perianto estaminado pequeno, sem pubescência, internamente glabro, 3 (raramente 4)- lobado, filamentos conatos numa coluna, anteras 3 (raramente 4) conatas no ápice, distalmente divergente ou livre na base; ovário elipsóide, cônico ou cilíndrico, glabro, estilete curto, estigma inconsípicio. Fruto cápsula, transversalmente elipsóide, essencialmente globosa, deiscente em 2 valvas; pericarpo lenhoso, arilo inteiro ou inconspicuamente laciado distalmente, vermelho; semente transversalmente elipsóide ou globosa (Figura 3) (VAN ROOSMALEN; BARDALES & GARCIA, 1996).

Arbustos ou árvores de altura mediana, variando quando adultas, desde pequenas arvoretes de 2 m de altura até árvores maiores que alcançam 40 m de altura. A maioria situa-se entre 10 e 20 m. Crescem sempre em solos argilosos, aparecendo eventualmente em solos arenosos (*/. campinae* W.A. Rodrigues) (LISBOA; LOUREIRO; SILVA, 1984). Várias espécies exsudam uma resina da casca, de cor vermelho escuro, translúcida, daí porque algumas *Iryanthera* que detém altas concentrações desta resina, são conhecidas como sangue de boi (LISBOA; LOUREIRO; SILVA, 1984). O fruto é consumido e as sementes

dispersas por macacos do gênero *Callicebus*, popularmente conhecidos como zogue-zogue (KINZEY, 1981; GRANDLEMIRE, 1988).

As *Iryanthera* são conhecidas popularmente por: apunã, lacre da mata virgem, punã, sangue de boi, uchi vermelho, ucuubarana, ucuuba pequena, ucuuba vermelha (LISBOA; LOUREIRO; SILVA, 1984), cumala blanca para *I. lancifolia* e *I. grandis* e cumala colorada para *I. paradoxa*, no Peru e ainda ucuubapunã para *I. ulei* (SILVA, 1997).

FIGURA 3: Fotos de *Iryanthera* evidenciando os caracteres taxonômicos. A. Ramo com flores de *I. juruensis*. B. Frutos *I. juruensis*. C. Casca *I. juruensis*. D. Folhas de *I. polyneura*.



Fonte: [Foto 3A](https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/images/Myristicaceae) [Foto 3B](https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/images/Myristicaceae)
[Foto 3C](https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/images/Myristicaceae) [Foto 3D](https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/images/Myristicaceae)
 Erika Martins.

Algumas espécies do gênero *Iryanthera* são usadas popularmente como alucinógenas (casca de *I. macrophylla* (Benth.) Warb.) e como antidiarreico (casca de *I. tessmanii* Markgr.), além da madeira de várias espécies serem usadas em construção (MORAIS *et al.*, 2009). Outras espécies de *Iryanthera* são conhecidas por índios da Amazônia, que utilizam suas folhas esmagadas para curar infecções, feridas e cortes, e o seu exsudato misturado com água no tratamento de infecções estomacais. Estudo fitoquímico realizado em frutos de *I. grandis* Ducke e *I. lancifolia* Ducke revelou a presença de tocotrienois que tem poder oxidante maior que o tocoferol (SILVA *et al.* 2005).

O uso de emplastos de folhas de *Iryanthera* em tratamentos dermatológicos é ser justificado pela presença de neolignanas com reconhecia atividade fungicida ou fungistática e de isoflavonóides com propriedades antimicrobianas (SILVA, 1997).

Silva (1997), verificou a presença de metabólitos especiais pertencentes a várias classes, como lactonas, neolignanas, flavonolignóides e principalmente flavonoides dos tipos virolano, flavana, diidrocharlcona e chalcona em vários tecidos estudados. Outros estudos realizados com espécies que pertencem ao gênero *Iryanthera* demonstraram presença de tocotrienois (SILVA *et al.* 2001), lignanas (MING *et al.* 2002; MESA SIVERIO *et al.* 2008), neolignanas, butanolídeos, flavonóides, diarilpropanoides e flavonolignoides, o que faz destas substâncias as principais classes de metabólitos secundários de Myristicaceae (ROMOFF; YOSHIDA, 1997; SARTORELLI *et al.* 1998; SILVA *et al.* 2001; NUNOMURA; YOSHIDA 2002; LOPES *et al.* 2004; SILVA *et al.* 2007). O quadro 2 apresenta o levantamento dos trabalhos realizados com o gênero *Iryanthera*.

QUADRO 2: Levantamento dos trabalhos realizados com o gênero *Iryanthera*. Trabalhos organizados de acordo com a data de publicação e espécie.

Espécie	Análise	Nome da substância	Atividade biológica	Referência
<i>I. polyneura</i> Ducke	Química	chalcon- diidrochalcon-1,3-diarilpropano	não analisada	ALMEIDA <i>et al.</i> 1979
6 ssp.	Madeira	não analisada	não analisada	LISBOA; LOUREIRO; SILVA, 1984
20 ssp.	Levantamento florístico	não analisada	não analisada	ROOSMALEN <i>et al.</i> 1996
<i>I. sagotiana</i> (Benth.) Warb.	Química	Flavonoides	não analisada	SILVA, 1997
<i>I. lancifolia</i> Ducke e <i>I. grandis</i> Ducke		diidrochalcona, tocotrienol, lignana		
<i>I. grandis</i> Ducke, <i>I. lancifolia</i> Ducke e <i>I. paraenses</i> Huber		lactonas policetídicas		
<i>I. paraenses</i> Huber		Neolignana		
<i>I. laevis</i> Markgr.		diidrochalconas, flavonolignóide		
<i>I. lancifolia</i> Ducke		Flavonolignanas		
		Diidrochalcones		
<i>I. leavis</i> Markgr.	Química	chalconas e devirados	<i>Plasmodium</i> <i>berghei</i>	MUNÖZ <i>et al.</i> 2002
<i>I. megistophylla</i> A.C.Sm.	Química	2,3-dimetil-4-(4-metoxifenil)-6hidroxinaftaleno, (2R,3R,4R)-3-hidroxi-4-metil-2-(hexacos-17-enil), grandinolídeo, irianterina K, irianterina L, cinchonaina Ib, cinchonaina Ia	não analisada	MING <i>et al.</i> 2002

Quadro 2 (Cont.)

Espécie	Análise	Nome da substância	Atividade biológica	Referência
<i>I. lancifolia</i> Ducke	Biológica	não analisada	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ROJAS <i>et al.</i> 2003
<i>I. juruensis</i> Warb.	Química	3-metil-sargacromenol, sargacromenol, ácido 3-metil-sargaquinoico, ácido sargaquinoico	não analisada	SILVA <i>et al.</i> 2005
<i>I. lancifolia</i> Ducke	Química	Ácidos trans e cis dihidroguaiareticos, (E)-4,40-dihidroxí-7-en-8,80-lignana, (8S,80R)-4-hidroxi-30,40-metilenodioxi-7-ona-8,80-lignana, (7S,8S,80R)-7-hidroxi-3,4:30,40-bis(metilenodioxi)-8,80-lignana, (7R,8S,80R)-7-etoxy-3,4:30,40dimetilenodioxi-8,80-lignana	não analisada	SIVERIO <i>et al</i> 2007
<i>I. juruensis</i> Warb.	Química	Guaiacina. 5-desoxiflavonas, sargacromenol, ácido sargaquinoico, ácido juruenolico, ácido ω -arilalcanoico, guaiacina	não analisada	SILVA <i>et al.</i> 2007

Quadro 2 (Cont.)

Espécie	Análise	Nome da substância	Atividade biológica	Referência
11 ssp.	Levantamento florístico	não analisada	não analisada	SILVA; SILVA, 2008
<i>I. juruensis</i> Warb.	Química	ácido 2-(4'-metilpentenil-3)-10-oxo-undecan-2,6dienóico	não analisada	MORAIS, 2008
<i>I. juruensis</i> Warb.	Citotoxicidade	2',4'-dihidroxi-6'metoxi-3,4-metilenodioxidihidrochalcona, 2',4'-dihidroxi-4,6'-dimetoxidihidrochalcona	não analisada	APONTE <i>et al.</i> 2008
<i>I. juruensis</i> Warb.	Biológica	2',4'-dihidroxi-4,6'-dimetoxidihidrochalcona	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
<i>I. juruensis</i> Warb.	Química	2'-Hidroxi-7-metoxi-4',5'-metilenodioxflavona, 7,4'-Dimetoxiflavona, Fasciculiferina, Farnisina, 7,4'-Dihydroxiflavona, 2',4'-di-hidroxi-6'-metoxi-3,4-metilenodioxidi-hidrochalcona, 2',4'-di-hidro-4,6'-dimetoxi-di-hidrochalcona, Juruenolido, Juruenolido B, epi-Guaiacina, Nectandrina B, Verrucosina, Ácido 15'-(3,4-metilenodioxifenil)- pentadecanóico, Ácido 17' -(3,4-metilenodioxifenil)-heptadecanóico, Ácido 19' - (3,4-metilenodioxifenil)-nonadecanóico, Sargacromenol, 7-metil-sargacromenol, Ácido sargaquinóico, Ácido 3-metil-sargaquinóico	não analisada	MORAIS 2008
<i>I. juruensis</i> Warb.	Química	neolignana ariltetralínica, neolignana tetraidrofurânica	não analisada	MORAIS <i>et al.</i> , 2009
<i>I. ulei</i> Warb.	Química	α-muurolol, spathulenol, α-cadinol, guaiol, oplopanone, 1,10-diepi-cubenol, limonene	<i>S. aureus</i>	CUCA <i>et al.</i> 2009

2.7 *Iryanthera polyneura* Ducke

Árvores de até 25 m. Infrutescência 2,3-3,0 cm de comprimento, fruto caulinar lustroso, pedicelado; pedicelo grosso, 0,4 cm de comprimento. Cápsula transversalmente elipsóide ou subglobosa, 2,9 x 3,8 cm, lisa, ápice obtuso, base arredondada; pericarpo lenhoso, 0,6-0,9 cm de espessura, sutura longitudinal espessada, com elevação somente num extremo que vai até o ápice, arilo vermelho; semente transversalmente elipsóide, 1,3 x 2,5 cm (VAN ROOSMALEN; BARDALES & GARCIA, 1996).

Ocorre no Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia) na fitofisionomia de mata de terra-firme, em solo argilo-arenoso, na Colômbia e no Peru. O arilo é comido por macaco-prego (*Cebus apella*), e a semente imatura por parauacús (*Pithecia pithecia chrysoccephala*) (SETZ, 1993).

Algumas análises químicas para o gênero demonstraram compostos que podem apresentar propriedades antibacterianas, ressaltando a necessidade de mais pesquisas como esta para compreender se as espécies do gênero, no caso *I. polyneura*, apresenta tal característica. Vale ressaltar que são escassos trabalhos com esta espécie, sendo este inédito para análise química e biológica juntas.

A necessidade para encontrar novas substâncias capazes de atuar como antibióticos ocorre devido ao aumento da resistência dos micro-organismos e por algumas infecções que podem surgir quando o sistema imunológico está suprimido (PENNA *et al.*, 2001). Dentre esses micro-organismos estão: *Staphylococcus aureus* (bactéria), *Enterococcus faecalis* (bactéria), *Candida albicans* (fungo), *Escherichia coli* (bactéria), *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria) e *Streptococcus mutans* (bactéria) (Quadro 3).

QUADRO 3: Relação entre os micro-organismos e doenças causadas por eles.

Microorganismo	Característica	Doenças
<i>Candida albicans</i>	diploide e polimórfico	Infecções orais, candidíase eritematosa, hiperplásica e mucocutânea crônica (CANNON <i>et al.</i> 1995)
<i>Enterococcus faecalis</i>	cocos, Gram-positiva	Infecções em imunocomprometidos, bacteremia, septicemia, do trato urinário, de feridas, meningites e endocardites (CAMPOS <i>et al.</i> 2013)
<i>Escherichia coli</i>	bacilo, Gram-negativa	Infecções intestinais e infecções extra-intestinais (RUSSO; JONHSON, 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bacilos, Gram-negativa	Infecções hospitalares (STRATEVA; YORDANOV 2009)
<i>Staphylococcus aureus</i>	cocos, Gram-positiva	infecção cutânea, endocardite, pneumonia, empiema, osteomielite e artrite séptica (MURRAY, 2009)
<i>Streptococcus mutans</i>	cocos, Gram-positiva	cárie dentária (LEMOS <i>et al.</i> 2013)

A composição química das espécies vegetais, especialmente daquelas encontradas nas florestas tropicais, está longe de ser descrita em sua totalidade, principalmente quando se leva em conta a biodiversidade desses locais. Isso ocorre devido a vários fatores, como a dificuldade em coletar e processar o material botânico e principalmente em fazer as complexas análises e identificação dos compostos químicos das plantas. São comuns os experimentos realizados com óleos voláteis, nos quais são identificados mais de 60 compostos distintos (BURT, 2004; CASTELO, DEL MENEZZI, RESCK, 2010).

2.8 Influência do clima na produção de metabólitos secundários em espécies produtoras de óleos voláteis

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; LOPES, 2007; TAVEIRA *et al.*, 2003).

A constituição dos metabólitos secundários dos vegetais pode ser alterada durante as fases de desenvolvimento dos mesmos, influenciando diretamente a quantidade e qualidade dos compostos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A síntese dos metabólitos secundários varia conforme a idade das plantas, estado reprodutivo, e atuação dos fitormônios, sendo que estes seriam influenciados pelos ciclos circadianos do vegetal (CASTRO *et al.*, 2010; CHAGAS *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2007; PINTO; BERTOLUCCI, 2002). Para que o cultivo de determinada planta seja realizado em larga escala é necessário conhecimento sobre todos os aspectos bióticos e abióticos do local e da espécie que será realizado o plantio, pois são fatores determinantes para o padrão de substâncias que se deseja coletar. Segundo Chagas *et al.* (2001), ignorar a influência e o conhecimento sobre como as plantas se relacionam com os fatores climáticos e edáficos, provavelmente reflete na baixa qualidade da biomassa e, consequentemente, de teores dos principais constituintes químicos do óleo volátil e de seus rendimentos.

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. Do mesmo modo que as plantas cultivadas podem sofrer a ação dos fatores edafoclimáticos, as plantas selvagens estão igualmente sujeitas a apresentar alterações em seu metabolismo devido a esses fatores (MORAIS, 2009).

A maior produção de metabólitos secundários sujeitos a altos níveis de radiação solar é explicada devido ao fato de que as reações biossintéticas são dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O rendimento e a qualidade dos óleos voláteis podem ser influenciados pelos fatores edafoclimáticos como a temperatura, luminosidade, pluviosidade,

irradiação, pH, disponibilidade de nutrientes, umidade e composição das partículas do solo. Essas condições adequadas a cada espécie vegetal economicamente explorada são importantes para promover o máximo rendimento de óleo volátil, bem como influenciam na relação percentual entre seus compostos (LIMA, 2003). A espécie estudada nesse trabalho é espontânea e, portanto, sujeita a variações edáfico-climáticas não controladas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e atividades biológicas dos óleos voláteis provenientes das folhas de três indivíduos distintos de *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae), coletadas por um período de 2 anos, e analisar se fatores climáticos influenciam na síntese dos óleos voláteis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O principal objetivo deste trabalho foi identificar a composição química dos óleos voláteis de *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae), avaliar a sua ação biológica provenientes das folhas de três indivíduos distintos e analisar se fatores climáticos influenciam na síntese dos terpenos e nas suas ações contra microorganismos e células tumorais.

3.2 Objetivos específicos

O presente trabalho teve por objetivos específicos:

- Estudar a variação química qualitativa e quantitativa dos óleos voláteis de *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae).
- Avaliar as atividades antimicrobiana e antitumoral dos óleos voláteis obtidos de várias coletas, realizadas no decorrer de dois anos de três indivíduos da mesma espécie de *Iryanthera polyneura*.
- Analisar como os fatores climáticos podem afetar o metabolismo vegetal na produção dos óleos voláteis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de plantas

A coleta do material botânico faz parte do Projeto Rio Negro. Dentro deste Projeto, são realizadas coletas de material vegetal em florestas de igapó e de terra-firme para prospecção de produtos naturais ativos em modelos biológicos, farmacológicos e toxicológicos; também são realizadas coletas de material vegetal de terra firme para estudos de dinâmica florestal. As coletas são feitas em três hectares de floresta de terra-firme divididos em três parcelas de 1 hectare cada. Nestas parcelas, os indivíduos com diâmetro à altura do peito (DAP) foram numerados, coletados e posteriormente identificados para subsidiar pesquisas futuras, como esta.

Entre as espécies identificadas nas parcelas, pertencentes a famílias conhecidas por produzirem óleos voláteis, foi escolhida a espécie *Iryanthera polyneura*, que apresentava três indivíduos próximos com biomassa de folhas suficientemente grande para possibilitar a realização de coletas por um período de dois anos. Os indivíduos foram identificados como 22, 80 e 530, fornecendo dados temporais da interação do vegetal com o meio ambiente (Quadro 4). Anteriormente o grupo de pesquisas realizou um estudo semelhante com uma espécie de Myristicaceae, *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A.DC.) Warb., e obteve resultados importantes sobre a interação da espécie com o meio ambiente. (SUFFREDINI, 2016).

Quadro 4: Informações sobre a indexação do material botânico coletado de *Iryanthera polyneura*.

Indivíduo	Coletor	Tombo	Determinador
22	Oliveira A.A. (4064)	UNIP 5170	Paciencia, M.L.B.
80	Oliveira A.A. (41444)	UNIP 5279	Paciencia, M.L.B.
530	*		Paciencia, M.L.B.

* Para o indivíduo 530 não houve indexação, somente coleta das folhas e identificação em campo.

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as folhas de indivíduos adultos de *Iryanthera polyneura* provenientes de 15 coletas de campo, realizadas em diferentes épocas ao longo de outubro de 2009 a dezembro de

2011 sempre dos mesmos três indivíduos. Foram identificados como 22 (15 coletas de material), 80 (14 coletas de material) e 530 (15 coletas de material), de acordo com suas distribuições nas parcelas. As datas de coletas foram determinadas de modo aleatório, segundo disponibilidade de se montar as expedições conforme apresentados na Quadro 5.

Quadro 5: Relação dos óleos voláteis obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*, coletadas pelo período de outubro de 2009 a dezembro de 2011. Os indivíduos são identificados pelos números 22, 80 e 530 e as coletas identificadas por OE1, OE2, ..., OE15, de acordo com a data de coleta.

Número de referência do óleo volátil			Data da coleta
22OE1	80OE1	530OE1	out/09
22OE2	80OE2	530OE2	nov/09
22OE3	80OE3	530OE3	03/02/2010
22OE4	80OE4	530OE4	12/03/2010
22OE5	80OE5	530OE5	15/05/2010
22OE6	80OE6	530OE6	28/05/2010
22OE7	80OE7	530OE7	29/08/2010
22OE8	80OE8	530OE8	05/11/2010
22OE9	80OE9	530OE9	14/12/2010
22OE10	80OE10	530OE10	11/02/2011
22OE11	80OE11	530OE11	15/04/2011
22OE12	80OE12	530OE12	08/07/2011
22OE13	80OE13	530OE13	20/08/2011
22OE14	80OE14	530OE14	21/10/2011
22OE15		530OE15	16/12/2011

Os indivíduos de *Iryathera polyneura* em questão são árvores que estão localizadas no município de Manaus, AM, em floresta de terra firme às margens do rio Cuiieiras, afluente do rio Negro. As árvores foram coletadas periodicamente, 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 pelo Dr. Mateus L. B. Paciencia.

Amostra do material coletado para a pesquisa botânica, foram depositadas no Herbário da Universidade Paulista UNIP (Quadro 4). A cada coleta, realizada no mesmo indivíduo, as folhas foram acondicionadas em sacos de algodão (Figura 4). 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 voláteis.

FIGURA 4: Coleta e acondicionamento do material botânico em campo. A. Coletas de folhas com as quais foram obtidos óleos voláteis. B. Barco usado para acessar o dossel de árvores para coleta das folhas para serem submetidas à extração e óleos voláteis. C. Acondicionamento do material de campo em sacos de algodão. D. Exemplo de árvore plaqueada, da qual foram retiradas folhas para obtenção de óleos voláteis, dentro de uma das parcelas que também abriga os indivíduos 22, 80 e 530, estudados no presente trabalho.



Fonte: Foto A: Araquém Alcâtara; Foto B: Wilson Malavazi; Foto C e D: Mateus Paciencia.

4.2 Obtenção dos óleos voláteis

Os experimentos para obtenção dos óleos voláteis e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de extração e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista – UNIP. Vale ressaltar que esta pesquisa foi certificada pelo Comitê de ética da UNIP sob o protocolo nº 048/16 CEUA/UNIP (Anexo 1) o qual está de acordo com os Princípios Éticos e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação, realizada em aparelho de Clevenger (SIMÕES *et al.* 1999), durante quatro horas. Os óleos foram completamente coletados do aparelho de Clevenger com auxílio de pentano, em seguida a água foi retirada com a adição de sulfato de sódio anidro e posterior evaporação em aparelho de evaporação rotatória (Buchi). Os óleos foram pesados para se avaliar seu rendimento e foram estocados a -10 °C, até o uso. Para as análises por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas, 20 µL de cada óleo foram diluídos em 980 µL acetona (Figura 5).

FIGURA 5: Amostras dos óleos voláteis obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* diluídos para serem testados em modelos biológicos.



Fonte: Foto: Erika Martins

4.3 Preparo das amostras e substâncias padrão para os ensaios biológicos

Os óleos voláteis foram diluídos a 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth), antes de serem testados nos modelos biológicos. No ensaio da microdiluição em caldo, as diluições finais nos poços foram de 6,00 mg/mL, 3,00 mg/mL, 1,50 mg/mL e 0,75 mg/mL para *E. faecalis* e *S. aureus*, enquanto que as diluições de 3,00 mg/mL, 2,00 mg/mL e 1,00 mg/mL foram utilizadas nos ensaios com *S. mutans* e *S. sanguinis*. Para os ensaios de citotoxicidade, as diluições finais nos poços foram de 100 µg/mL.

4.4 Ensaio da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo

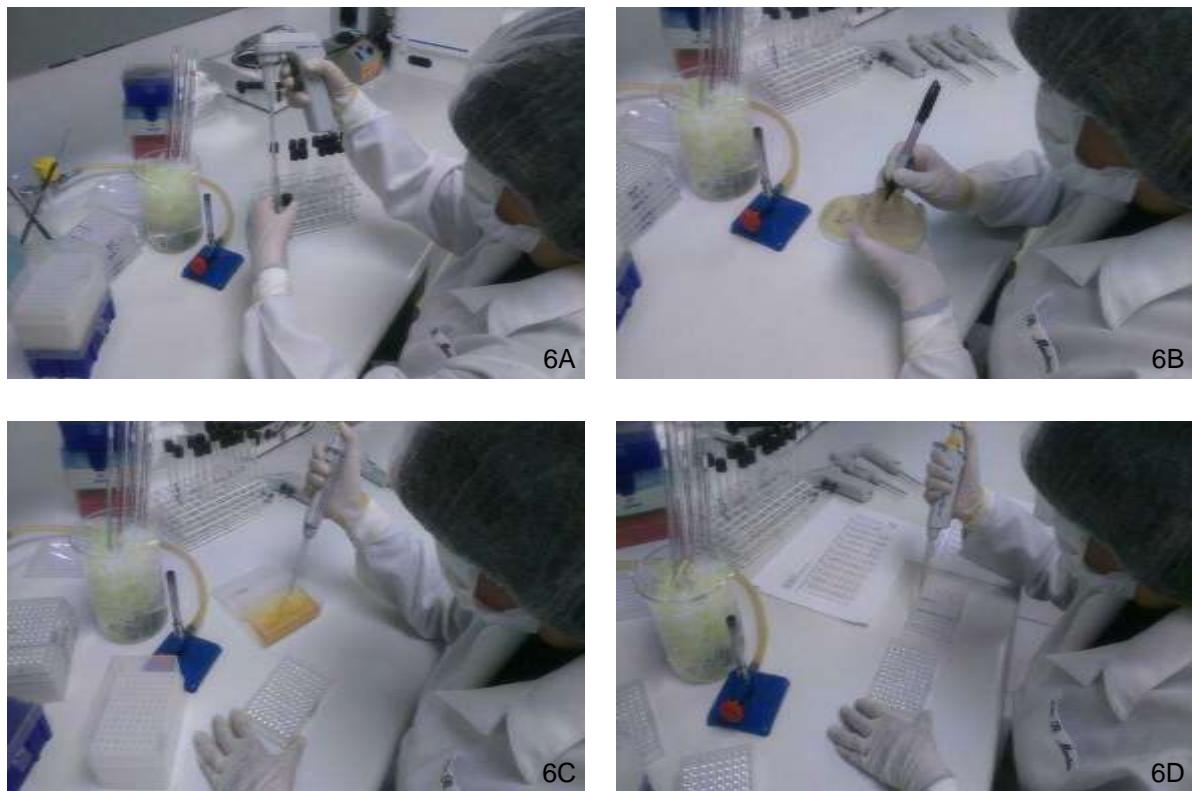
A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (MDC) (SUFFREDINI *et al.* 2004). Os óleos voláteis foram diluídos a uma concentração de 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Colônias frescas de *Candida albicans* (ATCC10231), cultivada em placa Sabouraud dextrose; *Escherichia coli* (ATCC25922/AVA51/A, 31/1A e 35A), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027/27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), cultivadas em placas de Petri com meio Müller-Hinton e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556), cultivadas em placas de Petri com meio Brain heart infusion, foram usadas para o preparo da suspensão bacteriana. O meio agar foi utilizado para o cultivo dos micro-organismos, enquanto o meio caldo para a micro-diluição.

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 em “U”. Depois, 10 µL de cada uma das amostras de óleos voláteis foram adicionados aos seus respectivos poços. Dois poços foram deixados como padrões negativos (só meio de cultura, sem micro-organismo) e positivos (meio de cultura mais inóculo). Para a análise da viabilidade microbiana, foram feitas subculturas em meio específico para cada

um dos micro-organismos. A leitura visual dos resultados foi feita segundo estes parâmetros: “X” = formação de botão, não houve inibição.

Os óleos voláteis que apresentaram atividade, portanto, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CBM (concentração bactericida mínima). Na análise dos óleos essenciais por conta destes produzirem uma turbidez no meio de cultura, os valores de CIM e de CBM foram considerados os mesmos (Figura 6).

FIGURA 6: Ensaio da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo. A.: Primeiro tubo com uma quantidade da massa do micro-organismo (suspensão). B.: Contagem das colônias. C.: Acréscimo do meio caldo inoculado com micro-organismo em placa de fundo “U”. D.: Acréscimo das amostras dos óleos voláteis nos poços com a suspensão do microorganismo.



Fonte: Fotos A-D: Erika Martins.

4.5 Ensaio da atividade antitumoral (citotóxica)

Os óleos voláteis foram dissolvidos em DMSO na concentração de 40 mg/mL. As linhagens celulares foram incubadas em meio RPMI-1640

suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (2 mM), gentamicina mM, a 37°C com 5% de CO₂. As células foram semeadas em microplacas de 96 cavidades de fundo chato a uma densidade de 10.000 células/cavidade para as células de mama, e de 7.500 células/cavidade para as células de próstata, transferidas em 100 µL/poço. As placas foram levadas à incubação por 24 h, a 37°C com 5% de CO₂. Após essas 24 h, os óleos voláteis foram adicionados aos respectivos poços em cinco diferentes concentrações. Nos poços, essas concentrações foram de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µL/mL, acrescentados em meio de cultura RPMI1640. Depois, as placas foram novamente incubadas por mais 48 h, nas mesmas condições. Cada concentração de óleo foi testada em 6 replicatas de cada amostra. Grupos controle receberam o mesmo volume de meio RPMI. O crescimento das células tumorais foi quantificado pelo método sulfurodamina B (SRB) (MONKS *et al.*, 1991). Os resultados da atividade antitumoral (citotóxica) foram apresentados como inibição de crescimento 50% (CI₅₀), obtidos da leitura das células viáveis coradas com SRB, em leitor de ELISA ao comprimento de onda de 515 nm.

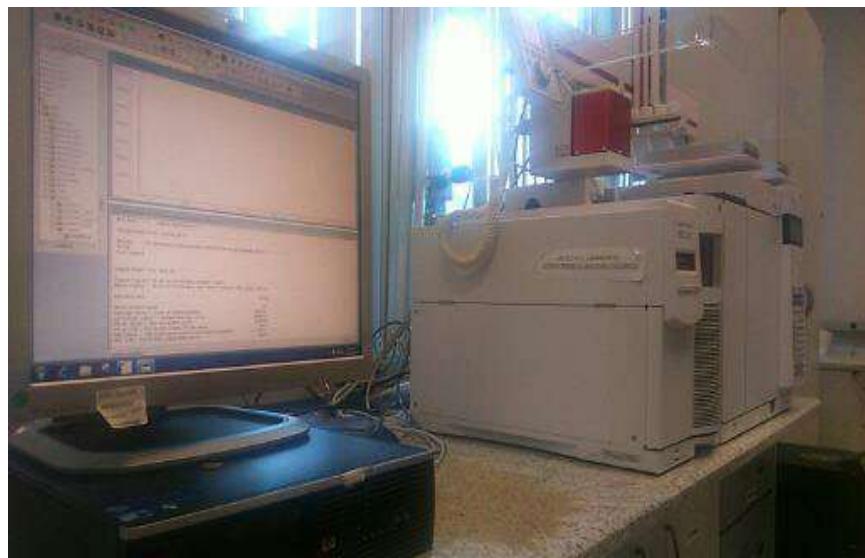
4.6 Análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Universidade de Campinas.

A cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Shimatzu 14B/QP5050A, com analisador do tipo quadrupolo de mesma marca (Figura 7). A coluna utilizada foi a BPX5 (*non polar 5% phenylpolysilphenylene*), 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, 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 (ADAMS, 2007).

Os dados foram comparados com bibliotecas de compostos, como Willey229, NIST107, SHIM1607 e NIST21 e com livros de referência (ADAMS, 2007). Foram injetadas 41 amostras relativas às diferentes coletas. O volume injetado de cada amostra foi de 1 μ L.

FIGURA 7: Equipamento Shimatzu 14B/QP5050A, com analisador do tipo quadrupolo utilizado na análise de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.



Fonte: Foto: Erika Martins.

4.7 Obtenção do Índice de Retenção

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 Retenção (IR), 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.

$$Ix=100n+100(t_x-t_n)/(t_{n+1}-t_n)$$

Onde:

I_x é o valor que quero encontrar

T_x é O tempo de retenção da molécula desconhecida

T_n é o tempo de retenção do alcano de menor número de carbonos

4.8 Delineamento experimental

Este trabalho foi planejado de modo a ser realizado em duas etapas principais denominadas de Avaliação química de *Iryanthera polyneura* Ducke e Avaliação biológica de *Iryanthera polyneura* Ducke.

Para a obtenção dos rendimentos de cada óleo, obtidos em termos de porcentagem volume/massa, foram utilizadas todas as amostras de óleos obtidas, sendo 15 amostras obtidas dos indivíduos 22 e 530 e 14 amostras obtidas do indivíduo 80. A avaliação dos terpenos também foi executada para todos os óleos citados anteriormente.

Para a avaliação da variação dos terpenos dos óleos foram usadas 41 amostras de óleos, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de terpenos anteriormente obtidas, e dois óleos do indivíduo 80 foram descartados porque o número de terpenos detectados após a análise do CG-EM foi muito baixo, e configuraram-se como outliers, uma vez que criaram tendências nas análises de modo muito significativo. Análises multivariadas do tipo análise de componentes principais e análise de correspondência foram realizadas. Para a análise de verificação da variação dos terpenos em função do clima e da variação climática foi efetuada análise de correspondência canônica. Para todos os casos descritos, considerou-se os 41 óleos essenciais como os casos e os 59 terpenos como as variáveis. Para as análises realizadas em função das estações do ano e dos fatores climáticos, cujos dados foram obtidos para os dias de coleta, as variáveis consideradas foram umidade relativa, precipitação, temperaturas diárias mínima, média e máxima, insolação, velocidade do vento e evaporação.

A mesma análise foi realizada considerando-se ordenação ou correspondência para os óleos dos três indivíduos, ou para as estações do ano, que na Amazônia são duas: a estação seca (DS) e a estação chuvosa (WS).

Foram consideradas análises realizadas com todos os terpenos, em um total de 59 moléculas, e análises realizadas apenas com os terpenos comuns a todos os óleos voláteis, que são apenas sete.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, realizada em duas etapas, foram utilizadas todas as amostras de óleos obtidas, sendo 15 amostras obtidas

dos indivíduos 22 e 530 e 14 amostras obtidas do indivíduo 80. Em uma primeira etapa, os óleos voláteis foram avaliados em dose única, para se identificar os ativos. Na segunda etapa, foram obtidos os valores de concentração inibitória mínima para os óleos identificados como ativos na primeira etapa.

Para avaliação da atividade citotóxica, foram utilizados os 15 óleos obtidos do indivíduo 22, 12 óleos obtidos do indivíduo 80 e 14 óleos obtidos do indivíduo 530.

Para a avaliação da variação dos terpenos que ocorrem em todos os óleos voláteis, foram utilizados os 41 óleos, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de terpenos anteriormente obtidas. Foram feitas análises de variância de uma via com teste posterior de Tukey, para a comparação da quantidade de cada composto volátil comum, entre os três indivíduos. Também foi feita uma análise de variância de duas vias, com teste posterior de Tukey, para se verificar a variação dos sete terpenos comuns nos três indivíduos estudados, 22, 80 e 530. Para estes ensaios, foi considerada significância de $\alpha < 0,05$.

Para a avaliação da correspondência entre a ocorrência dos terpenos dos óleos e as atividades antimicrobiana e citotóxica foram usadas as 41 amostras de óleos, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de terpenos anteriormente obtidas e dos valores de concentração inibitória mínima para a atividade antimicrobiana e de IC_{50} para a citotoxicidade. Análises multivariadas do tipo análise de correspondência canônica foram executadas.

4.9 Análise matemática e estatística

Para este trabalho, foram utilizadas a análise de componentes principais (ACP), análise de correspondência (AC) e a análise de correspondência canônica (ACC), que foram realizadas pelo programa *Multivariate Statistical Package* (MVSP)

Foram também empregadas as análises de variância do tipo ANOVA de uma entrada e análise de variância do tipo ANOVA de duas entradas, com teste posterior de Tukey e nível de significância de $\alpha < 0,05$. Foi utilizada a regressão não linear para o cálculo de IC_{50} da análise de citotoxicidade (GraphPad Prism 5.0). Além das análises estatísticas, foram feitas análises matemáticas utilizando-se a teoria dos conjuntos, para obtenção dos terpenos que ocorriam em comum em todas as amostras de óleos voláteis.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. 4ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 804p. 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(3): 472-508. 2008.
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; ALMEIDA, M.E.L.; BRAZ FILHO, R.; VON Bulow, M.V.; CORRÊA, J.J.L.; GOTTLIEB, O.R.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.S. Diarylpropanoids from *Iryanthera polyneura*. *Phytochemistry*. Vol. 18, pp.1015-1016. 1979.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, p. 10-15. 2001.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 16(2): 189-203. 2002.
- ANVISA. Fitoterápicos. Disponível em: <https://goo.gl/EPs8xu> (Acesso em: 04.03.2018) 2018.
- AZIZ AB'SÁBER. Os Domínios De Natureza No Brasil: Potencialidades Paisagísticas. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003.
- AZIZ AB'SÁBER. Dossiê Amazônia brasileira I. In: Aziz Ab'Sáber: problemas da Amazônia brasileira. *ESTUDOS AVANÇADOS* 19 (53). 2005.
- BARBIERI, E. Biodiversidade: a variedade de vida no planeta Terra. In: Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. 16 p. 2010.
- BRAGA, P.I.S. Subdivisão fitogeográfica, tipos de vegetação, conservação e inventário florístico da floresta amazônica. *Supl. Acta Amazonica*, 9(4): 53-80. 1979.
- BRISKIN, D. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology* 124: 507-514. 2000.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 179-189. 2000.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*. v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo volátil de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpine. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (2): 116 – 126. 2011.

CAMPOS, A.C.F.B.; SOUZA, N.R.; SILVA, P.H.C.; SANTANA, A.P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. *Pesq. Vet. Bras.* 33(5):575-580. 2013.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis. *Journal of Dental Research*, Washington, v. 74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

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.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C , IV) da composição química dos óleos voláteis de quatro plantas do Cerrado. *CERNE*, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A.B.; Avaliação do teor e composição do óleo volátil de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Rev. Ciênc. Agron.* V.41 n.2, 2010.

CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 5663, 2005.

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

CONDÉ, T.M.; TONINI, H. Fitossociologia de uma Floresta Ombrófila Densa na Amazônia Setentrional, Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*, v.43, n.3, p.247-259, 2013.

COSTA, E.V.; DUTRA, L.M.; JESUS, H.C.R.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S.; SALVADOR, M.J.; PRATA, A.P.N. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil das folhas de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 34. Florianópolis. 2011.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M. & LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). *In: B. Buchanam, W. Gruissem & R. Jones (eds.). Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists*, p.1367. 2000.

CUCA, L.E.; BERNAL, F.A.; COY, C.A.; COY, E.D. Essential oil composition and antimicrobial activity of fruits of *Iryanthera ulei* W. from Colombia. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54, Nº 4. 2009.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. And *Clavibacte michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 22(1):39-4. 2003

DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, E.S.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy Reserch*, v.22, n.10, p.1307-1310, 2008.

FERREIRA, G.C.; STURARO, M.J.; PELOSO, P.L.V. Amphibians and reptiles from Floresta Nacional de Pau-Rosa, Amazonas, Brazil: an important protected area at the heart of Amazonia. 47(3) p. 259 – 268. 2017.

FERREIRA, L.V.; PRANCE, G.T. Species richness and floristic composition in four hectares in the Jaú National Park in upland forests in Central Amazonia. *Biodiversity and Conservation*, v.7, n.10, p.1349-1364, 1998.

FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde, Brasília-DF/Brasil. 2007.

FLORA DO BRASIL. Myristicaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB169>>. Acesso em: 09 Mar. 2018.

FRIBERG I.M.; LITTLE S.; RALLI C. Macroparasites at peripheral sites of infection are major and dynamic modifiers of systemic anti-microbial pattern recognition responses. *Molecular Ecology*, 22, 2810–2826, 2013.

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

GRANDLEMIRE, S.J. An Ecological Comparison of two Sympatric Primates *Saguinus fuscicollis* and *Callicebus moloch* of Amazonian Peru. In: *Primates*, 29 (4): p. 465-475. 1988.

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

GOMES, M.R.F.; SCHUHI, R.S.; JACQUESI, A.L.B.; DORNELESI, G.G.; MONTANHAI, J.; ROEHEII, P.M.; BORDIGNONIII, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M.B.; LIMBERGERI, R.P. 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, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISITIN, J.A., COSTA, L.F.S. Produção in vitro de embriões. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca. p.261-291. 2008.

GOTTLIEB, O.R. Chemical studies on medicinal Myristicaceae from Amazonia. *Journal of Ethnopharmacology*, v.1, n.4, p.309-323, 1979.

HANKS, G.W., DE CONNO, F., CHERNY, N., HANNA, M., KALSO, E., MCQUAY, H.J., MERCADANTE, S., MEYNADIER, J., POULAIN, P., RIPAMONTI, C., RADBRUCH, L., ROCA, I., CASAS, J., SAWE, J., TWYCROSS, R.G., VENTAFRIDDA, V. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. *British journal of cancer* 84(5): 587-593. 2001.

HARTMANN, T. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831-2846. 2007.

HASENCLEVER, L., ANTUNES, A., KLEIN, H., MENDES, F., LOPES, R. HOEFLE, D., CASTRO, L.L., DONATI, L., CACICEDO, T. Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos brasileiro. Relatório Final do Centro de Gestão de Estudos Estratégicos – CGEE. Brasília-DF/Brasil. 2009.

HEINZMANN, B.M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C.M.O. Óleos voláteis. In: C.M.O. SIMÕES, E.P. SCHENKEL, G. GOSMANN, J.C.P. DE MELLO, L.A. MENTZ & P.R. PETROVICK eds. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*, Porto Alegre, Artmed, p. 168-183. 2017.

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 voláteis de condimentos e especiarias, B. CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20.1999.

HOPKINS, M.J.G. Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *J. Biogeogr.*, vol. 34, no. 8, p. 1400-1411. 2007.

JULIÃO, L. D. S.; PICCINELLI, A. L.; MARZOCCO, S.; LEITÃO, S. G.; LOTTI, C.; AUTORE, G.; RASTRELLI, L. Phenylethanoid Glycosides from *Lantana fucata* with in Vitro Anti-inflammatory Activity. *J. Nat. Prod. [S.I.]*, v. 72, p. 1424-1428, 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.

KAROUSOU, R., KOUREAS, D.N., KOKKINI, S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry* 66: 2668-2673. 2005.

KINZEY, W.G. The Titi Monkeys, Genus *Callicebus*. In: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Vol. I. Eds. Coimbra-Filho A. & R.A. Mittermeier. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 241-276. 1981.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R.M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*, Porto Alegre, Artmed.1999.

LEMOS, J.A.; QUIVEY R.G.; KOO, JR.H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*. 159, 436-445. 2013.

LIMA, R. P., KAPLAN, M.A.C., CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*. v.10, n.2, p.71-77, 2003.

LISBOA, P.L.B.; LOUREIRO, A.A.; SILVA J.C.A. Identificação macroscópica do lenho das Myristicaceae da Amazônia Brasileira. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Botanica*. Vol. 1 (1/2): 37-65. 1984.

LOPES, N.P.; SANTOS, P.A.; KATO, M.O. YOSHIDA, M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, n.10, p.1255-1257, 2004.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p. 2009:

LOUREIRO, A.; DE FREITAS, M.D.; DE VASCONCELLOS F.J. Estudo anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae) da Amazônia. *Acta Amazônica* 19 : 415-465. 1989.

MACIAS, F.A., GALINDO, J.L.G., GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917-2936. 2007.

MAREGESI, S. M., L. PIETERS, O. D. NGASSAPA, S. APERS, R. VINGERHOETS, P. COS, D. A. V. BERGHE; A. J. VLIETINCK. Screening of Some Tanzanian Medicinal Plants from Bunda District for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activities. *Journal of ethnopharmacology*, 119, 58-66. 2008.

MCKEY, D. The ecology of coevolved seed dispersal systems. Coevolution of animals and plants. University of Texas Press, Austin. Vol. 246. 158-191. 1975.

MESA-SIVERIO, D.; MACHÍN, R.P.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; LOCK, O. Structure and estrogenic activity of new lignans from *Iryanthera lancifolia*. *Bioorg Med Chem.* 16(6):3387-94. 2008.

MILLIKEN, W.; MILLER, R. P.; POLLARD, S. R.; WANDELLI, E. V. Ethnobotany of the Waimiri-Atroari Indians of Brazil. Royal Botanical Gardens, London. 1992.

MING, D.S.; LÓPEZ, A.; HILLHOUSE, B.J.; FRENCH, C.J.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Bioactive Constituents from *Iryanthera megistophylla*. *J. Nat. Prod.*, 65 (10), pp 1412–1416. 2002.

MONKS A.; SCUDIERO D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; Langley, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766. 1991.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos voláteis. *Horticultura Brasileira* 27: S4050S4063. 2009.

MORAIS, S.K.R. Constituents químicos de algumas espécies de *Myristicaceae*. Tese de doutorado. São Paulo, 2008.

MORAIS, S.K.R.; TEIXEIRA, A.F.; TORRES, Z.E. S.; NUNOMURA, S.M.; KANASHIRO, E.H.Y.; LINDOSOF, J.A.L.; YOSHIDA, M. Biological Activities of Lignoids from Amazon *Myristicaceae* Species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 6, 1110-1118, 2009.

MOTILA, S.; MAHARAJ, R.G. Nutmeg extracts for painful diabetic neuropathy: a randomized, double-blind, controlled study. *J. Altern. Complement. Med.*, v.19, n.4, p.347-52, 2013.

MURRAY P.R. *Microbiologia Médica*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 24; 403 (6772):853-8. 2000.

NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

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 voláteis: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 17, n. 1, p. 2 e 5, 2007.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022-1037. 2003.

NOLLA, D.; SEVERO, B.M.A.; MIGOTT, A.M.B.M. *Plantas Medicinais*. 2 ed. Passo Fundo: UPF, 2005.

NOVAES FILHO, J.P.; SELVA, E.C.; COUTO, E.G.; LEHMANN, J.; JOHNSON, M.S.; RIHA, S.J. Distribuição espacial de carbono em solo sob floresta primária na Amazonia Meridional. *Revista Árvore*, v.31, n.1, p.83-92, 2007.

NUNOMURA, S.; YOSHIDA, M. Lignans and benzoic acid derivatives from pericarps of *Virola multinervia* (Myristicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, n.10, p. 985-987, 2002.

OLIVEIRA, A.N.; AMARAL, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v.34, n.1, p.21-34, 2004.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E. The Global 200: A Representation Approach to Conserving the Earth's Most Biologically Valuable Ecoregions. *Conserv. Biol.* 12, nº. 3, p.502. 1998.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D'AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. *BioScience* 51(11):933-938. 2001.

PAULO, M. Q.; Estudo fitoquímico das folhas de *Virola surimamensis* e *Osteophloeum platyspermum*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.; 1983.

PAS - Plano Amazônia Sustentável. Diretrizes para o desenvolvimento sustentável da Amazônia brasileira. / Presidência da República. – Brasília: MMA, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. S.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from *sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 37-40. 2001.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10. 2004.

PERRY, N.B., ANDERSON, R.E., BRENNAN, N.J., DOUGLAS, M.H., HEANEY, A.J., MCGIMPSEY, J.A., SMALLFIELD, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plantp, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2048-2054. 1999

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: UFLA/Faepe, 2002.

PIRES, J.M. 1973. Tipos de vegetação da Amazônia. *Publicações Avulsas Museu Goeldi*, Belém. 20: 179-202.

PIRES, J.M.; PRANCE, G.T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. *In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (eds.) Key Environments: Amazonia*. Pergamon Press, Oxford, p. 109-145. 1985.

PIRES, J.M.; PRANCE, G.T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. *In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (Eds). Key environments Amazonia*. Pergamon Press. Oxford. New York. p.109145. 1985.

PIRES-O'BRIEN, M.J.; O'BRIEN, C.M. Ecologia e modelamento de florestas tropicais. Belém:FCAP. 400p. 1995.

PITMAN, N.C.M.; TERBORG, S.R.; SILVAN, S.R.; NUNES, P.V.; NEIL, D.A.; CERON, C.E.; PALACIOS, W.A. Dominance and distribution of tree species in upper Amazonia terra firme. *Ecology*, v. 82, n.11, p. 2101-2117, 2001.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Manaus: INPA/SEBRAE, 2002.

RIBEIRO, J.E.L. DA S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A. DA S.; BRITO, J.M. DE; SOUZA, M.A.D.DE; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C.F.DA; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA.816p. 1999.

RIZZINI, C.T. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. Âmbito Cultural Edições Ltda. 2a ed.747p. 1997.

RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. *Acta Amazonica*, v.10, n.1, p.5-127, 1980.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical constituents from Myristicaceae. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.49, n.5/6, p. 354-353, 1997.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β-pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, v. 189, p. 82-89, 2011.

RUSSO T.A, JOHNSON J.R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*.181:1753-4. 2000

SAATCHI, S.; HOUGHTON, R.; ALVALA S.R.; SOARES, J.; YU, Y. Distribution of aboveground live biomass in the Amazon basin. *Global Change Biology*, 13:816-837. 2007.

SARTORELLI, P.; YOUNG, C.M.M.; KATO, M.J. AntifungaLignans from the arils of *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, v.47, n.6, p. 1003-1006, 1998.

SCHWOB, I., BESSIÈRE, J.M., MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical systematics and ecology* 32: 735-745. 2004.

SETZ, E.Z.F. Ecologia alimentar de um grupo de parauacus (*Pithecia pithecia chrysocephala*) em um fragmento florestal na Amazônia Central. Unpublished PhD thesis, Inst. Biol. Unicamp, Campinas, SP. 1993.

SHULTES, R.E.; HOLMSTED, B. De plantis toxicaris et. mundo novo tropicale commentationes. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous Plants of South America. *Lloydia*, v.34, p.61-78, 1971.

SHULTES, R.E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: Miscellaneous notes on biodynamic Plants of the Northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.14, n.1, p.125-158, 1985.

SCHULTES, R.E. Ethnopharmacological Conservation: a key to progress in medicine. *Supl. Acta amazônica*, 18(1-2):393-06. 1988.

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, v.19, n.3, p.689-694, 2005.

SILVA, D.H.S. Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*. Tese de doutorado. Inst. Química. Universidade de São Paulo. 1997.

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

SILVA, D.H.S.; PEREIRA, F.C.; ZANONI, M.V.B.; YOSHIDA, M. Avaliação do comportamento eletroquímico de antioxidantes extraídos dos frutos da *Iryanthera juruensis* (Myristicaceae). *Eclet. Quím.*, v.30 n.3, p. 15-21, 2005.

SILVA, D.H.S.; ZHANG, Y. SANTOS, L.A.; BOLZANI, V.S.; NAIR, M.G. Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 e 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.77, p. 2569-2574, 2007.

SILVA-JÚNIOR, N.J., CINTRA, C.E.D., SILVA, H.L.R., COSTA, M.C., SOUZA, C.A., PACHÊCO-JÚNIOR, A.A., GONÇALVES, F.A. Herpetofauna, Ponte de Pedra hydroelectric power plant, states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 5(3): 518-525.

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

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.

SIMÕES, C.M.O. & SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12(1), 35-40. 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. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.1102. 2010.

SIMPSON, B.S. Dioecy in plants – Is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Medica* 79: 613-615. 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. São Paulo: Instituto Plantarum. 639p. 2005

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 58, 1133–1148. 2009.

SUFFREDINI, I.B.; DALY, D.C. O Rio Negro como Cenário na Busca de Novos Medicamentos. In: Varella, D. (coord.). Florestas do Rio Negro. São Paulo: Companhia das Letras, p.255-281. 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. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v.37, n.3, p. 379-384, 2004.

SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., PACIENCIA, M.L.B. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. Die pharmazie 61: 722-724. 2006.

SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., FRANA, S.A., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. *In vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. Die pharmazie 62: 798-800. 2007.

SUFFREDINI, I.B.; SOUSA, S.R.N.; FRANA, S.A.; SUFFREDINI, H.B.; DÍAZ, I.E.C.; PACIENCIA, M.L.B. Multivariate Analysis of the Terpene Composition of *Osteophloeum platyspermum* Warb. (Myristicaceae) and Its Relationship to Seasonal Variation Over a Two-Year Period. TEOP 19 (6) 1380 – 1393. 2016.

TAIZ L., ZEIGER E. Fisiologia vegetal. 3^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed. 720 p., 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

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. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.

TINOCO, M.T.; MARTINS, M.R.; CRUZ-MORAIS, J. Actividade antimicrobiana do óleo volátil do *Foeniculum vulgare* Miller. Rev. de Ciências Agrárias, v. 30, n. 1, p.448-454, 2007.

TURNER, I. M. The Ecology of Trees in the Tropical Rain Forest; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001.

VAN DER PIJL, L. Principles of dispersal in higher plants. 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin. 1982.

VAN ROOSMALEN, M.G.M. Fruits of the Guianan flora. Utrecht University, Netherlands, p. 483. 1985.

VAN ROOSMALEN, M.G.M.; BARDALES, M.P.D.; GARCIA, O.M.C.G. Frutos da Floresta Amazônica. Parte I: Myristicaceae. Acta Amazonica 26(4): 209-264.1996.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE. Rio de Janeiro. 124 p. 1991.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. *In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism, 1 ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29, 2000.*

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO E. A. Constituientes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). Química 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 voláteis e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia. Journal of Pharmacognosy, Aimbiré, v. 19, n. 4, p 828-933, 2009.

6. ARTIGO

6.1 Avaliação química de *Iryanthera polyneura* Ducke e a interação dos óleos voláteis das folhas com os fatores climáticos

RESUMO

O Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos. Isso justifica o crescimento significativo de estudos com produtos de origem vegetal objetivando a obtenção de novos potenciais fitoterápicos. Algumas espécies do gênero *Iryanthera* são usadas popularmente para curar infecções, feridas e cortes, e no tratamento de infecções estomacais, sinalizando possíveis efeitos medicamentosos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição dos óleos voláteis de *Iryanthera polyneura* e analisar como os fatores climáticos podem afetar a ocorrência de terpenos. Foram utilizadas as folhas de *Iryanthera polyneura*, coletadas 15 vezes, com intervalos mensais e trimestrais durante os anos de 2009 a 2011, de três indivíduos. Foi realizado CG-EM e os dados foram comparados com bibliotecas de compostos e posteriormente foram realizadas análises estatísticas para quantificar os resultados. A partir da análise química dos óleos voláteis das folhas de *Iryanthera polyneura* foram detectados 59 compostos, dos quais 44 foram identificados, representando 74,5% do total de terpenos. Os principais compostos do óleo volátil foram espatulenol ($6,42 \pm 1,02\%$), α -cadinol ($5,82 \pm 0,40\%$) e τ -muurolol ($5,24 \pm 0,03\%$). Verificou-se a presença de 15 compostos que não puderam ser determinados (25,4%). Segundo as análises realizadas, observou-se que as diferenças nos rendimentos dos óleos voláteis apresentaram uma variação entre os três indivíduos. Quanto à composição quali e quantitativa, a ocorrência de espatulenol, α -cadinol e τ -muurolol como compostos majoritários é comum aos três indivíduos, porém, ocorrem em concentrações diversas. As estações do ano, bem como as variáveis climáticas analisadas influenciaram a composição dos óleos voláteis.

Palavras-chave: *Iryanthera*, clima, óleo volátil, terpenos

ABSTRACT

Brazil presents a very diversified flora, with vegetation of different characteristics and many active ingredients still unknown, this justifies the significant growth of studies with products of vegetal origin aiming the search of new phytotherapeutic potentials. Some specific species of the genus *Iryanthera* are popularly extracted to cure infections, wounds and cuts, and their exudate with water to treat stomach infections, sending therapeutic effects. The purpose of this study was the characterization of the chemical compounds of the *Iryanthera polyneura* and to analyze how climate factors can affect the metabolism of vegetable in the synthesis of these compounds. The leaves were collected 15 times, always from the same three individuals identified as 22, 80 and 530, during the years of 2009 to 2011. GC-MS analyses were performed, and the results were compared with the compound of the libraries and subsequent the statistical analyzes were performed to quantify the results. According to the chemical analysis of the volatile oils of leaves of *Iryanthera polyneura* 59 compounds were detected, of which 44 were identified, representing 74.5% of the total terpenes. The main compounds of the essential oil were spathulenol ($6.42 \pm 1.02\%$), α -cadinol ($5.82 \pm 0.40\%$) and τ -muurolol ($5.24 \pm 0.03\%$). However, it verified the presence of 15 compounds that were not determined (25.4%). It was possible to verify an individual response of each of the specimens of the *I. polyneura*, in reason of the composition of terpenes in volatile oils, though there are similarities between individuals, such as the prevalence of spathulenol, α -cadinol and τ -muurolol. Finally, changes were observed in the composition of terpenes among the essential oils of the three individuals, due to changes in climatic factors considered.

Keywords: climate, essential oil, *Iryanthera*, terpenes

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e quiçá princípios ativos ainda desconhecidos, o que justifica o crescimento significativo de estudos com produtos de origem vegetal para a obtenção de novos fitoterápicos (CALIXTO, 2003; NAPOLITANO *et al.*, 2005). Além disso, é considerado o país mais rico em biodiversidade, de modo que, atualmente, são reconhecidas pouco mais de 46.500 espécies para a flora brasileira, sendo 4.754 de algas, 33.158 de angiospermas, 1.567 de briófitas, 5.719 de fungos, 30 de gimnospermas e 1.345 de samambaias e licófitas (FLORA DO BRASIL, 2018), das quais pouquíssimas foram estudadas em termos biológicos, químicos e farmacológicos. A conversão da pesquisa científica sobre a biodiversidade da Amazônia em produtos comerciais é um desafio nacional, uma vez que essas descobertas permitirão o desenvolvimento em diversos setores, dentre eles, os produtos farmacêuticos.

Óleos voláteis são compostos orgânicos presentes em células especializadas dos vegetais, com papel fundamental na interação com o meio ambiente, atuando como compostos sinalizadores na interação das plantas com seu ambiente biótico e abiótico (VERPOORTE 2000). Originam-se a partir de produtos intermediários das vias metabólicas principais, responsáveis pela produção de açúcares, lipídeos e proteínas. Caracteristicamente, possuem alta plasticidade genética e grande diversidade química, o que possibilita às plantas adaptar-se às demandas do ambiente, continuamente variável (HARTMANN, 2007).

Dentre as funções exercidas pelos óleos voláteis nos vegetais podem ser citadas a de proteção contra agentes bacterianos, virais, fúngicos, herbívoros e predadores (FÜRSTENBERG-HÄGG *et. al.* 2013), que sinaliza o potencial dessas plantas para uso medicamentoso. Os óleos voláteis podem ser utilizados como medicamentos desde que seja possível identificar o composto químico que apresenta a atividade desejada.

As Myristicaceas estão entre as várias famílias botânicas que sintetizam óleos voláteis. O interesse etnofarmacológico surgiu na década de 1950, quando Richard Schultes divulgou a descoberta de que algumas espécies do gênero

Virola constituiam fonte do *rapé yakee*, *parika* ou *epena*, um narcótico alucinogênico poderoso utilizados por índios da região amazônica. (RODRIGUES, 1980). As Myristicaceae são usadas ainda com diversas finalidades pelos indígenas da Amazônia, como por exemplo, no preparo de flechas, no tratamento de infecções dermatológicas ou estomacais, reumatismo, tumores etc., sendo muitas destas atividades comprovadas por pesquisas científicas (SCHULTES; HOLMSTED, 1971; GOTTLIEB, 1979; SCHUTES, 1985). Algumas espécies do gênero *Iryanthera* são usadas popularmente como alucinógenas (casca de *I. macrophylla* (Benth.) Warb.) e como antidiarreico (casca de *I. tessmanii* Markgr.), além da madeira de várias espécies serem usadas em construção (MORAIS *et al.*, 2009). Outras ainda, têm suas folhas usadas para curar infecções, feridas e cortes, e o exsudato usado no tratamento de infecções estomacais. Também, estudo fitoquímico realizado em frutos de *I. grandis* Ducke e *I. lancifolia* Ducke revelou a presença de tocotrienois que têm poder antioxidante maior que o tocoferol, ambos compostos da vitamina E (SILVA *et al.* 2005).

Todas essas pesquisas fornecem indícios das propriedades medicinais das *Iryanthera*, evidenciando a necessidades de estudos químicos sobre um maior número possível de espécies do gênero, para melhor compreensão a respeito de seus compostos.

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar os óleos voláteis quanto ao rendimento, à variação qualitativa e quantitativa, à influência dos fatores climáticos (umidade relativa, precipitação, temperaturas diárias mínima, média e máxima, insolação, velocidade do vento e evaporação) e das estações do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material botânico

A coleta do material botânico faz do Projeto Rio Negro. Dentro deste projeto, são realizadas coletas de material vegetal em florestas de igapó e de terra-firme para prospecção de produtos naturais ativos em modelos biológicos, farmacológicos e toxicológicos; também são realizadas coletas de material

vegetal de terra firme para estudos de dinâmica florestal. As coletas são feitas em três hectares de floresta divididos em três parcelas de 1 hectare cada. Nestas parcelas, os indivíduos com diâmetro à altura do peito (DAP) foram numerados, coletados e posteriormente identificados para subsidiar pesquisas futuras, como a presente.

Entre as espécies identificadas nas parcelas, pertencentes a famílias conhecidas por produzirem óleos voláteis, foi escolhida a espécie *Iryanthera polyneura*, que apresentava três indivíduos próximos dentro de uma mesma parcela, com biomassa de folhas suficientemente grande para possibilitar a realização de coletas por um período de dois anos. Os indivíduos foram identificados como 22, 80 e 530, fornecendo dados temporais da interação do vegetal com o meio ambiente (Quadro 6). Anteriormente o grupo de pesquisas realizou um estudo semelhante com uma espécie de Myristicaceae, *Osteophloeum platyspermum* (Spruce ex A.DC.) Warb., e obteve resultados importantes sobre a interação da espécie com o meio ambiente (SUFFREDINI, 2016).

Quadro 6: Informações sobre a indexação do material botânico coletado de *Iryanthera polyneura*.

Indivíduo	Coletor	Tombo	Determinador
22	A.A.O. (4064)	UNIP 5170	Paciencia, M.L.B.
80	A.A.O. (41444)	UNIP 5279	Paciencia, M.L.B.
530	*		Paciencia, M.L.B.

* Para o indivíduo 530 não houve indexação, somente coleta das folhas e identificação em campo.

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as folhas de indivíduos adultos de *Iryanthera polyneura* provenientes de 15 coletas de campo, realizadas em diferentes épocas ao longo de outubro de 2009 a dezembro de 2011 sempre dos mesmos três indivíduos. Tais indivíduos foram identificados como 22 (15 coletas de material), 80 (14 coletas de material) e 530 (15 coletas de material), de acordo com suas distribuições nas parcelas. As datas de coletas foram determinadas de modo aleatório, segundo disponibilidade de se montar as expedições.

Amostra do material coletado para a pesquisa botânica foram depositadas no Herbário da Universidade Paulista UNIP, (Quadro 4). 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 voláteis.

Obtenção dos óleos voláteis

Os experimentos para obtenção dos óleos voláteis e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de extração e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista – UNIP. Vale ressaltar que esta pesquisa foi certificada pelo Comitê de ética da UNIP sob o protocolo nº 048/16 CEUA/UNIP (Anexo 1) o qual está de acordo com os Princípios Éticos e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação, realizada em aparelho de Clevenger (SIMÕES *et al.* 1999), durante quatro horas. Os óleos foram completamente coletados do aparelho de Clevenger com auxílio de pentano posterior evaporação em aparelho de evaporação rotativa (Buchi). Em seguida, a água foi retirada com a adição de sulfato de sódio anidro. Os óleos foram pesados para se avaliar seu rendimento e foram estocados a -10 °C, até o uso. Para as análises por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas, 20 µL de cada óleo foram diluídos em 980 µL acetona.

Análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Universidade de Campinas.

A cromatografia a gás 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, 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 (ADAMS, 2007). Os dados foram comparados com bibliotecas de compostos, como Willey229, NIST107, SHIM1607 e NIST21 e com livros de referência (ADAMS, 2007). Foram injetadas 41 amostras relativas às diferentes coletas. O volume injetado de cada amostra foi de 1 μ L.

Obtenção do Índice de Retenção

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 Retenção (IR), 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.

$$Ix=100n+100(t_x-t_n)/(t_{n+1}-t_n)$$

Onde:

I_x é o valor que quero encontrar

T_x é O tempo de retenção da molécula desconhecida

T_n é o tempo de retenção do alcano de menor número de carbonos

Delineamento experimental

Inicialmente para a obtenção dos rendimentos de cada óleo, obtidos em termos de porcentagem volume/massa, foram utilizadas todas as amostras de óleos obtidas, sendo 15 amostras obtidas dos indivíduos 22 e 530 e 14 amostras obtidas do indivíduo 80. A avaliação dos terpenos também foi executada para todos os óleos citados anteriormente.

Para a avaliação da variação dos terpenos dos óleos foram usadas 41 amostras de óleos, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de terpenos anteriormente obtidas, e dois óleos do indivíduo 80 foram descartados porque o número de terpenos detectados após a análise do CG-EM foi muito baixo, e configuraram-se como outliers, uma vez que criaram tendências nas análises de modo muito significativo. Análises multivariadas do tipo análise de componentes principais e análise de correspondência foram realizadas. Para a análise de verificação da variação dos terpenos em função do

clima e da variação climática foi efetuada análise de correspondência canônica. Para todos os casos descritos, considerou-se os 41 óleos essenciais como os casos e os 59 terpenos como as variáveis. Para as análises realizadas em função das estações do ano e dos fatores climáticos, cujos dados foram obtidos para os dias de coleta, as variáveis consideradas foram umidade relativa, precipitação, temperaturas diárias mínima, média e máxima, insolação, velocidade do vento e evaporação.

A mesma análise foi realizada considerando-se ordenação para os óleos dos três indivíduos, ou para as estações do ano, que na Amazônia são duas: a estação seca (DS) e a estação chuvosa (WS).

Foram consideradas análises realizadas com todos os terpenos, em um total de 59 moléculas, e análises realizadas apenas com os terpenos comuns a todos os óleos voláteis, que são apenas sete.

Análise matemática e estatística

Para este trabalho, foram utilizadas a análise de componentes principais (ACP), análise de correspondência (CA) e a análise de correspondência canônica (ACC), que foram realizadas pelo programa *Multivariate Statistical Package* (MVSP). Além das análises estatísticas, foram feitas análises matemáticas utilizando-se a teoria dos conjuntos, para obtenção dos terpenos que ocorriam em comum em todas as amostras de óleos voláteis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado na Tabela 1, os rendimentos dos óleos voláteis obtidos das folhas de *Iryanthera polyneura* variaram entre 0,03% e 0,43%, sendo os menores resultados observados para a coleta 22OE1 e os maiores para a coleta 530OE9.

A partir da análise química das folhas de *Iryanthera polyneura* foram detectados 59 compostos (Figura 8), dos quais 44 foram identificados, representando 74,5% do total de terpenos (Apêndice 1). Os principais compostos dos óleos voláteis foram espatulenol ($6,42 \pm 1,02\%$), α -cadinol ($5,82 \pm 0,40\%$) e τ -muurolol ($5,24 \pm 0,03\%$), cujos rendimentos dados foram calculados com base na média e erro padrão obtido para os 44 óleos analisados. Suffredini *et al.* (2016)

também relatam a maior porcentagem de espatulenol na espécie *Osteophloeum platyspermum* Warb., outra espécie de Myristicaceae. Verificou-se a presença de 15 compostos que não foram determinados (25,4%).

A composição dos óleos voláteis dos três indivíduos foi quantitativamente e qualitativamente diferentes como apresentado na tabela 2, onde estão listados todos os compostos orgânicos voláteis detectados nos óleos voláteis obtidos das folhas dos indivíduos 22, 80 e 530 de *Iryanthera polyneura*. Os compostos cis-jasmona e α -cadineno só foram detectados no indivíduo 22, sesqui 6 no indivíduo 80 e β -bisaboleno no indivíduo 530. Essa diferença sugere que cada indivíduo apresenta variabilidade genética e está em uma fase fisiológica e possivelmente relacionam-se de maneiras diferentes com os fatores intrínsecos e extrínsecos. Os compostos orgânicos voláteis espathulenol, elemol, α -muuroleno, τ -muuroleno, sesqui 2, sesqui 3 e τ -muurolol são comuns a todos os indivíduos, ou seja, ocorrem em todas as coletas para todos os três indivíduos. O composto majoritário, considerando a média dos três indivíduos, foi o espatulenol com a maior porcentagem de ocorrência para o indivíduo 80 (8,13%).

Embora os fenilpropanoides possam ser encontrados em algumas espécies de Myristicaceae, por exemplo, *Myristica fragrans*, não foram encontrados nos óleos voláteis de *Iryanthera polenyura* analisados.

TABELA 1: Rendimentos (% v/p) obtidos dos óleos voláteis de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*.

Coleta	Material Vegetal (g)	Massa final de óleo (g)	Rendimento (%)	Coleta	Material Vegetal (g)	Massa final de óleo (g)	Rendimento (%)	Coleta	Material Vegetal (g)	Massa final de óleo (g)	Rendimento (%)
22OE1	651	0,2148	0,033	80OE1	575	0,5111	0,0889	530OE1	422,3	0,4395	0,1041
22OE2	330,2	0,3025	0,0916	80OE2	331,3	0,4412	0,1332	530OE2	286,5	0,426	0,1487
22OE3	308,83	0,8712	0,2821	80OE3	353	0,3968	0,1124	530OE3	179,28	0,6245	0,3483
22OE4	291,6	0,2242	0,0769	80OE4	358,49	0,2865	0,0799	530OE4	333,69	0,442	0,1325
22OE5	218,32	0,3809	0,1745	80OE5	182,19	*	*	530OE5	184,07	0,6691	0,3635
22OE6	168,83	0,1531	0,0907	80OE6	254,16	0,2806	0,1104	530OE6	221,83	0,3789	0,1708
22OE7	186,34	0,2295	0,1232	80OE7	272,14	*	*	530OE7	67,75	0,18	0,2657
22OE8	189,36	0,2487	0,1313	80OE8	150,5	0,1154	0,0767	530OE8	202,26	0,2429	0,1201
22OE9	357,32	0,4271	0,1195	80OE9	122,75	0,4147	0,3378	530OE9	233,72	1,0194	0,4362
22OE10	227,32	0,1403	0,0617	80OE10	206,43	0,1709	0,0828	530OE10	316,96	0,6053	0,191
22OE11	247,35	0,1562	0,0631	80OE11	215,84	0,2483	0,115	530OE11	328,84	0,4667	0,1419
22OE12	248,46	0,1393	0,0561	80OE12	167,67	0,1297	0,0774	530OE12	207,7	0,2198	0,1058
22OE13	418,79	0,3026	0,0723	80OE13	303,89	0,2331	0,0767	530OE13	289,91	0,3903	0,1346
22OE14	181,34	0,1482	0,0817	80OE14	166,06	0,1352	0,0814	530OE14	235,07	0,2515	0,107
22OE15	121,17	0,0767	0,0633					530OE15	156,51	0,211	0,1348

* Sem informação

FIGURA 8: Fórmula estrutural dos componentes orgânicos volatéis identificados nos óleos volatéis das folhas de três indivíduos de *I. polyneura*.

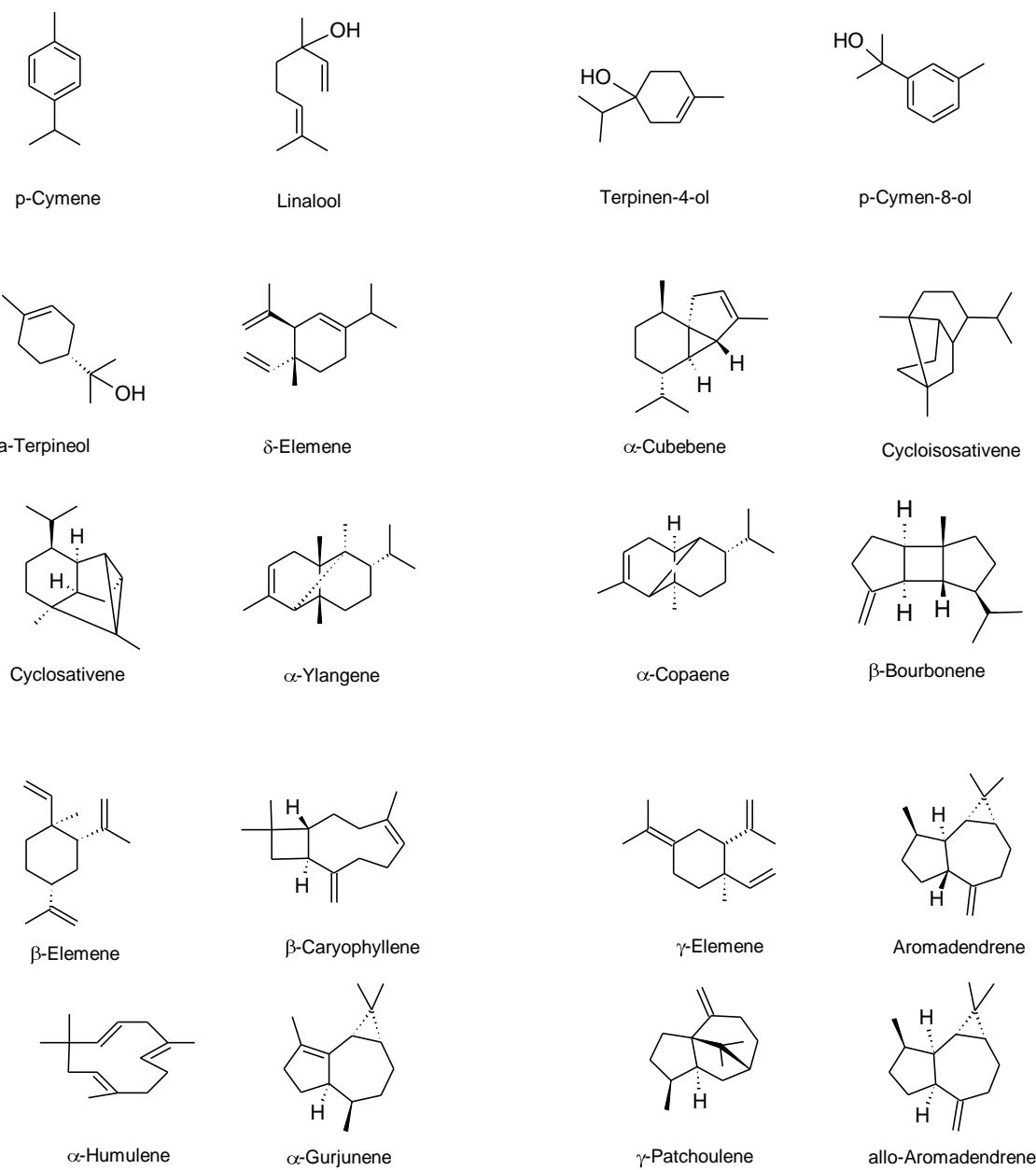


FIGURA 8: (Cont.)

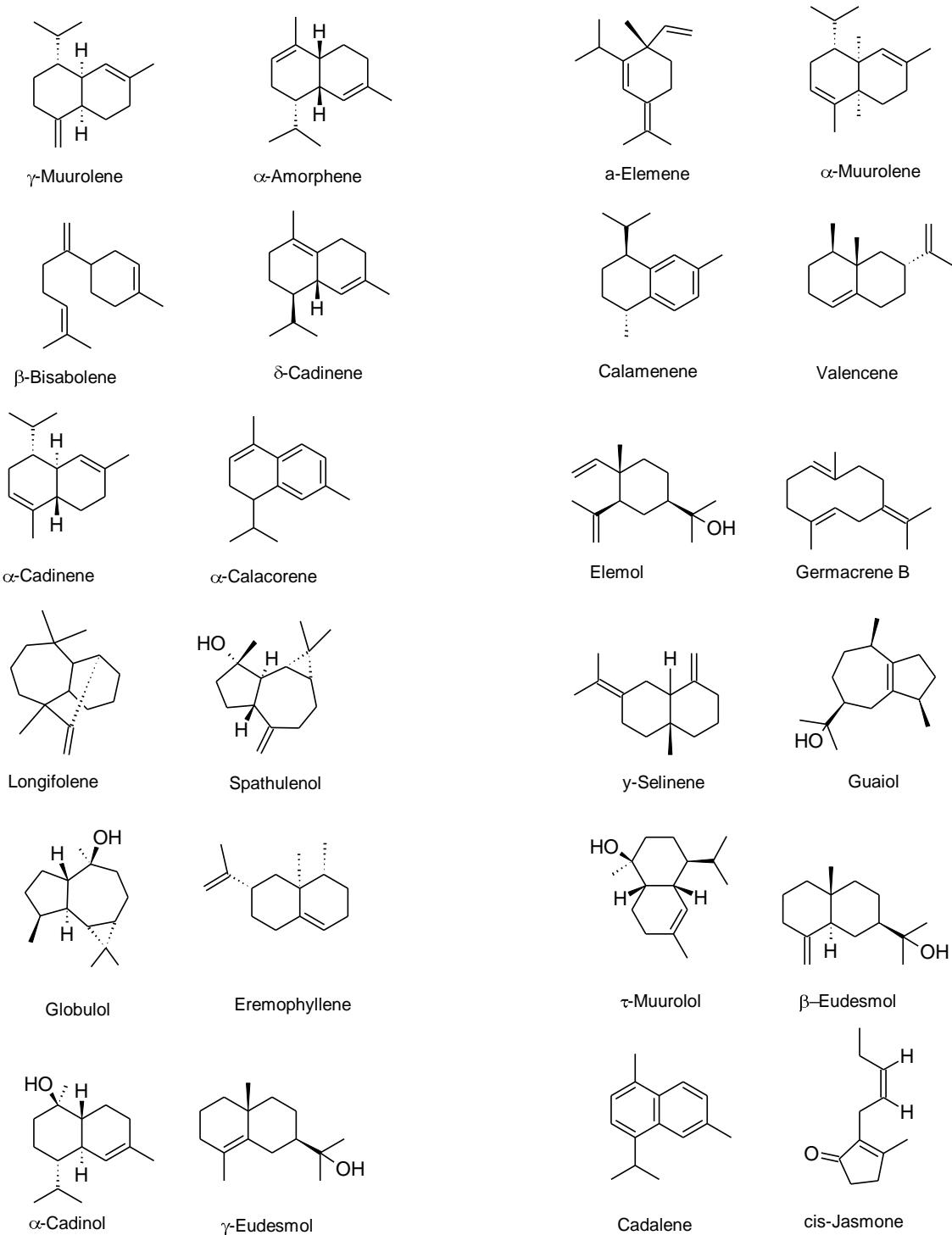


TABELA 2: Composição química nos óleos voláteis obtidos das folhas dos indivíduos 22, 80 e 530 de *Iryanthera polyneura*. São dados Tempos de Retenção, Índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e média de porcentagens para cada indivíduo, considerando-se as 15 coletas analisadas.

Indivíduo 22							Indivíduo 80							Indivíduo 530						
Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão
p-Cimeno	7.828	*	1027	*	0,01	0,01	p-Cimeno	7.828	*	1027	*	0,02	0,01	p-Cymene	7.828	*	1027	*	0,01	0,01
Linalol	10.75	*	1109	*	0,06	0,03	Linalol	10.75	*	1109	*	0,03	0,03							
Terpinen-4-ol	13.679	*	1182	*	0,03	0,03	Terpinen-4-ol	13.679	*	1182	*	0,02	0,02							
p-Cimen-8-ol	13.99	*	1190	*	0,02	0,01														
α -Terpineol	14.202	*	1195	*	0,06	0,02	α -Terpineol	14.202	*	1195	*	0,03	0,02	α -Terpineol	14.202	*	1195	*	0,01	0,01
δ -Elemeno	20.131	21.77	1337	1335	1,08	0,17	δ -Elemeno	20.131	21.77	1337	1335	0,97	0,10	δ -Elemeno	20.131	21.77	1337	1335	1,44	0,22
α -Cubebeno	20.627	22.33	1349	1345	0,10	0,03	α -Cubebeno	20.627	22.33	1349	1345	0,21	0,15	α -Cubebeno	20.627	22.33	1349	1345	0,17	0,04
Cicloisosativeno	21.23	*	1364	*	0,35	0,10	Cicloisosativeno	21.23	*	1364	*	0,45	0,09	Cicloisosativeno	21.23	*	1364	*	0,52	0,09
Ciclosativeno	21.327	23.25	1366	1369	0,98	0,26	Ciclosativeno	21.327	23.25	1366	1369	0,46	0,10	Ciclosativeno	21.327	23.25	1366	1369	1,20	0,25
α -Ilangene	21.508	23.43	1370	1373	0,12	0,04	α -Ilangene	21.508	23.43	1370	1373	0,06	0,03	α -Ilangene	21.508	23.43	1370	1373	0,24	0,06
α -Copaeno	21.693	23.49	1375	1374	0,43	0,09	α -Copaeno	21.693	23.49	1375	1374	0,51	0,05	α -Copaeno	21.693	23.49	1375	1374	0,68	0,12
β -Bourboneno	22.063	24.05	1383	1387	0,63	0,14	β -Bourboneno	22.063	24.05	1383	1387	0,33	0,06	β -Bourboneno	22.063	24.05	1383	1387	0,37	0,07
β -Elemeno	22.394	24.15	1391	1389	2,56	0,28	β -Elemeno	22.394	24.15	1391	1389	3,84	0,25	β -Elemeno	22.394	24.15	1391	1389	3,35	0,18
β -Cariofileno	23.455	25.36	1417	1417	0,64	0,09	β -Cariofileno	23.455	25.36	1417	1417	0,63	0,10	β -Cariofileno	23.455	25.36	1417	1417	0,81	0,11
sesqui 1	23.857	*	1428	*	0,72	0,13	sesqui 1	23.857	*	1428	*	1,26	0,20	sesqui 1	23.857	*	1428	*	0,98	0,19
γ -Elemeno	24.066	21.77	1433	1434	0,31	0,05	γ -Elemeno	24.066	21.77	1433	1434	0,50	0,08	γ -Elemeno	24.066	21.77	1433	1434	0,59	0,08
Aromadendreno	24.243	26.27	1437	1439	0,65	0,08	Aromadendreno	24.243	26.27	1437	1439	1,36	0,11	Aromadendreno	24.243	26.27	1437	1439	1,03	0,10
α -Humuleno	24.829	26.82	1452	1452	0,13	0,04	α -Humuleno	24.829	26.82	1452	1452	0,16	0,05	α -Humuleno	24.829	26.82	1452	1452	0,17	0,03
α -Gurjuneno	23.08	25.00	1408	1409	0,01	0,01	α -Gurjuneno	23.08	25.00	1408	1409	0,06	0,03	α -Gurjuneno	23.08	25.00	1408	1409	0,08	0,03
α -Patchouleno	24.941	26.92	1454	1454	0,01	0,01								α -Patchouleno	24.941	26.92	1454	1454	0,08	0,07

Tabela 2 (Cont.)

Indivíduo 22							Indivíduo 80							Indivíduo 530						
Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão
Alo-Aromadendreno	25.11	27.07	1459	1458	0,12	0,03	Alo-Aromadendreno	25.11	27.07	1459	1458	0,30	0,05	Alo-Aromadendreno	25.11	27.07	1459	1458	0,26	0,04
α -Muuroleno	25.789	27.91	1475	1478	2,85	0,28	α -Muuroleno	25.789	27.91	1475	1478	2,90	0,15	α -Muuroleno	25.789	27.91	1475	1478	3,90	0,33
α -Amorfeno	25.927	28.13	1479	1483	1,25	0,15	α -Amorfeno	25.927	28.13	1479	1483	1,28	0,12	α -Amorfeno	25.927	28.13	1479	1483	1,85	0,23
Sesqui 2	26.14	*	1484	*	0,65	0,09	Sesqui 2	26.14	*	1484	*	0,98	0,05	Sesqui 2	26.14	*	1484	*	0,93	0,07
α -Elemeno	26.505	*	1493	*	1,36	0,12	α -Elemeno	26.505	*	1493	*	1,70	0,11	α -Elemeno	26.505	*	1493	*	1,94	0,15
α -Muuroleno	26.741	28.83	1499	1500	2,80	0,30	α -Muuroleno	26.741	28.83	1499	1500	3,12	0,28	α -Muuroleno	26.741	28.83	1499	1500	4,03	0,41
														β -Bisaboleno	27.088	29.04	1508	1505	0,01	0,01
α -Cadineno	27.261	29.35	1513	1513	1,53	0,32	α -Cadineno	27.261	29.35	1513	1513	1,73	0,07	α -Cadineno	27.261	29.35	1513	1513	2,10	0,23
Sesqui 3	27.32	*	1514	*	0,69	0,27	Sesqui 3	27.32	*	1514	*	0,09	0,09	Sesqui 3	27.32	*	1514	*	0,33	0,21
Calameneno	27.62	29.69	1522	1521	1,92	0,15	Calameneno	27.62	29.69	1522	1521	1,25	0,14	Calameneno	27.62	29.69	1522	1521	2,41	0,27
Valenceno	28.046	28.66	1533	1532	0,61	0,07	Valenceno	28.046	28.66	1533	1532	0,85	0,06	Valenceno	28.046	28.66	1533	1532	1,00	0,07
α -Cadineno	28.178	30.33	1536	1537	0,10	0,06														
α -Calacorene	28.369	30.62	1541	1544	0,60	0,14	α -Calacorene	28.369	30.62	1541	1544	0,31	0,08	α -Calacorene	28.369	30.62	1541	1544	0,30	0,10
Elemol	28.645	30.78	1549	1548	2,08	0,24	Elemol	28.645	30.78	1549	1548	1,13	0,16	Elemol	28.645	30.78	1549	1548	1,11	0,12
Germacreno B	28.874	31.24	1555	1559	0,72	0,13	Germacreno B	28.874	31.24	1555	1559	1,07	0,28	Germacreno B	28.874	31.24	1555	1559	0,97	0,15
Longifolene	29	24.92	1558	1555	0,35	0,03	Longifolene	29	24.92	1558	1555	0,80	0,08	Longifolene	29	24.92	1558	1555	0,41	0,07
Sesqui 4	29.254	*	1565	*	3,00	0,22	Sesqui 4	29.254	*	1565	*	4,15	0,34	Sesqui 4	29.254	*	1565	*	4,17	0,32
Espatulenol	29.721	31.96	1577	1577	6,51	0,47	Espatulenol	29.721	31.96	1577	1577	8,13	0,42	Espatulenol	29.721	31.96	1577	1577	4,61	0,37
Sesqui 5	29.944	*	1582	*	4,79	0,21	Sesqui 5	29.944	*	1582	*	7,14	0,40	Sesqui 5	29.944	*	1582	*	5,09	0,43
γ -Selineno	30.226	*	1590	*	1,03	0,13	γ -Selineno	30.226	*	1590	*	2,00	0,17	γ -Selineno	30.226	*	1590	*	1,04	0,14
Guaiol	30.489	32.92	1597	1600	0,79	0,13	Guaiol	30.489	32.92	1597	1600	0,13	0,04	Guaiol	30.489	32.92	1597	1600	0,18	0,03
Globulol	30.652	32.50	1601	1590	1,30	0,15	Globulol	30.652	32.50	1601	1590	2,62	0,21	Globulol	30.652	32.50	1601	1590	0,74	0,24
Eremofileno	30.636	*	1601	*	0,05	0,05								Eremofileno	30.636	*	1601	*	1,05	0,21

Tabela 2 (Cont.)

Indivíduo 22							Indivíduo 80							Indivíduo 530							
Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	Composto	TR	TR ref.	IR	IR ref.	Média	Erro Padrão	
							sesqui 6	31.025	*	1611	*	0,78	0,11								
Sesqui 7	31.52	*	1624	*	1,87	0,26	Sesqui 7	31.52	*	1624	*	1,89	0,15	Sesqui 7	31.52	*	1624	*	1,91	0,22	
sesqui 8	31.638	*	1628	*	5,19	0,47	sesqui 8	31.638	*	1628	*	3,58	0,30	sesqui 8	31.638	*	1628	*	4,33	0,25	
sesqui 9	31.746	*	1631	*	1,82	0,26	sesqui 9	31.746	*	1631	*	1,29	0,06	sesqui e	31.746	*	1631	*	1,37	0,12	
t-Muurolol	32.137	*	1641	*	5,28	0,29	t-Muurolol	32.137	*	1641	*	5,19	0,26	t -Muurolol	32.137	*	1641	*	5,26	0,37	
Sesqui 10	32.298	*	1646	*	2,46	0,25	Sesqui 10	32.298	*	1646	*	2,45	0,11	Sesqui f	32.298	*	1646	*	2,87	0,19	
β -Eudesmol	32.398	34.79	1649	1649	1,28	0,22	β -Eudesmol	32.398	34.79	1649	1649	0,89	0,04	β -Eudesmol	32.398	34.79	1649	1649	0,76	0,05	
α -Cadinol	32.598	34.93	1654	1654	5,35	0,65	α -Cadinol	32.598	34.93	1654	1654	6,61	0,41	α -Cadinol	32.598	34.93	1654	1654	5,49	0,45	
γ -Eudesmol	32.948	34.08	1664	1630	0,07	0,04								γ -Eudesmol	32.948	34.08	1664	1630	0,16	0,06	
Sesqui 11	33.08	*	1667	*	0,19	0,13	Sesqui 11	33.08	*	1667	*	0,74	0,17	Sesqui 11	33.08	*	1667	*	1,16	0,18	
Cadaleno	33.309	35.80	1673	1675	1,13	0,12	Cadaleno	33.309	35.80	1673	1675	0,98	0,09	Cadaleno	33.309	35.80	1673	1675	1,41	0,09	
Sesqui 12	34.04	*	1693	*	0,15	0,06	Sesqui 12	34.04	*	1693	*	0,81	0,10	Sesqui 12	34.04	*	1693	*	0,86	0,11	
sesqui 13	34.509	*	1706	*	0,23	0,08	sesqui 13	34.509	*	1706	*	0,46	0,02	sesqui 13	34.509	*	1706	*	0,31	0,03	
sesqui 14	34.8	*	1716	*	0,67	0,16	sesqui 14	34.8	*	1716	*	0,88	0,15	sesqui 14	34.8	*	1716	*	0,70	0,16	
cis-Jasmona	35.176	*	1725	*	0,01	0,01															
sesqui 15	35.97	*	1748	*	0,09	0,05	sesqui 15	35.97	*	1748	*	0,30	0,03	sesqui 15	35.97	*	1748	*	0,24	0,03	
Hidrocarboneto monoterpênico (%)							0,69	Hidrocarboneto monoterpênico (%)							Hidrocarboneto monoterpênico (%)						
Monoterpeno oxigenado (%)							3,70	Monoterpeno oxigenado (%)							Monoterpeno oxigenado (%)						
Hidrocarboneto sesquiterpênico (%)							78,24	Hidrocarboneto sesquiterpênico (%)							Hidrocarboneto sesquiterpênico (%)						
Sesquiterpeno oxigenado (%)							17,36	Sesquiterpeno oxigenado (%)							Sesquiterpeno oxigenado (%)						

As Análises de Componentes Principais (ACP) e Correspondência Canônica (CA) foram realizadas para ordenar os óleos com variáveis. Essas técnicas podem ser utilizada para entender as complexas interações de um organismo com as variáveis que o cercam. São recentes as aplicações dessa metodologia para analisar as relações dos óleos voláteis com possíveis fatores que o influenciam, como fatores geográficos e ambientais de coleta do vegetal (RAGUSA *et al.* 2017; HANLIDOU *et al.*, 2014), diferenças na composição química do vegetal, (PINHEIROA *et al.*, 2016), análises quimiotaxônicas (PITAROKILIA *et al.*, 2014), analisar as variações da composição química dos óleos voláteis (Suffredini *et al.* 2016) entre outras possíveis aplicações.

A figura 9 representa a ordenação dos três indivíduos (22, 80 e 530) de *I. polyneura* cujas folhas foram coletadas para obtenção dos óleos voláteis, analisados em função da ocorrência de todos os compostos orgânicos voláteis e sua porcentagem, feita por análise de componentes principais (ACP). A ACP realizada para os três indivíduos, levando em conta todos os terpenos, apresentou porcentagem acumulada de 58,498 nos dois primeiros eixos. Mostra um gradiente que leva à separação do indivíduo 80 no primeiro eixo e do indivíduo 530 no segundo eixo. Em termos biológicos, mostra uma tendência de que os três indivíduos possam apresentar características individuais relativas à produção de terpenos, o que pode indicar condições fisiológicas distintas, dadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos.

A figura 10 representa a análise de correspondência entre os óleos voláteis obtidos das folhas dos três indivíduos (22, 80 e 530), analisados em função da ocorrência de todos os compostos orgânicos voláteis e sua porcentagem. Nota-se, na figura 10, que o indivíduo 80 se destaca dos outros dois, e que vários óleos voláteis coletados do indivíduo 22 são diretamente influenciados pela presença de linalol, elemol e terpinen-4-ol, compostos minoritários (Figura 10). Apesar da influência de todos os compostos orgânicos volatéis na ordenação dos óleos, no indivíduo 80, o que se destaca é o sesq6 que foi detectado apenas para este indivíduo. Já os óleos do indivíduo 530 foram influenciados por β -bisaboleno, detectado apenas para esse indivíduo, α -ilangene e α -gurjuneno compostos minoritários.

FIGURA 9. Análise de componentes principais feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*. A sequência numérica é relativa as datas de coletas de cada um dos indivíduos.

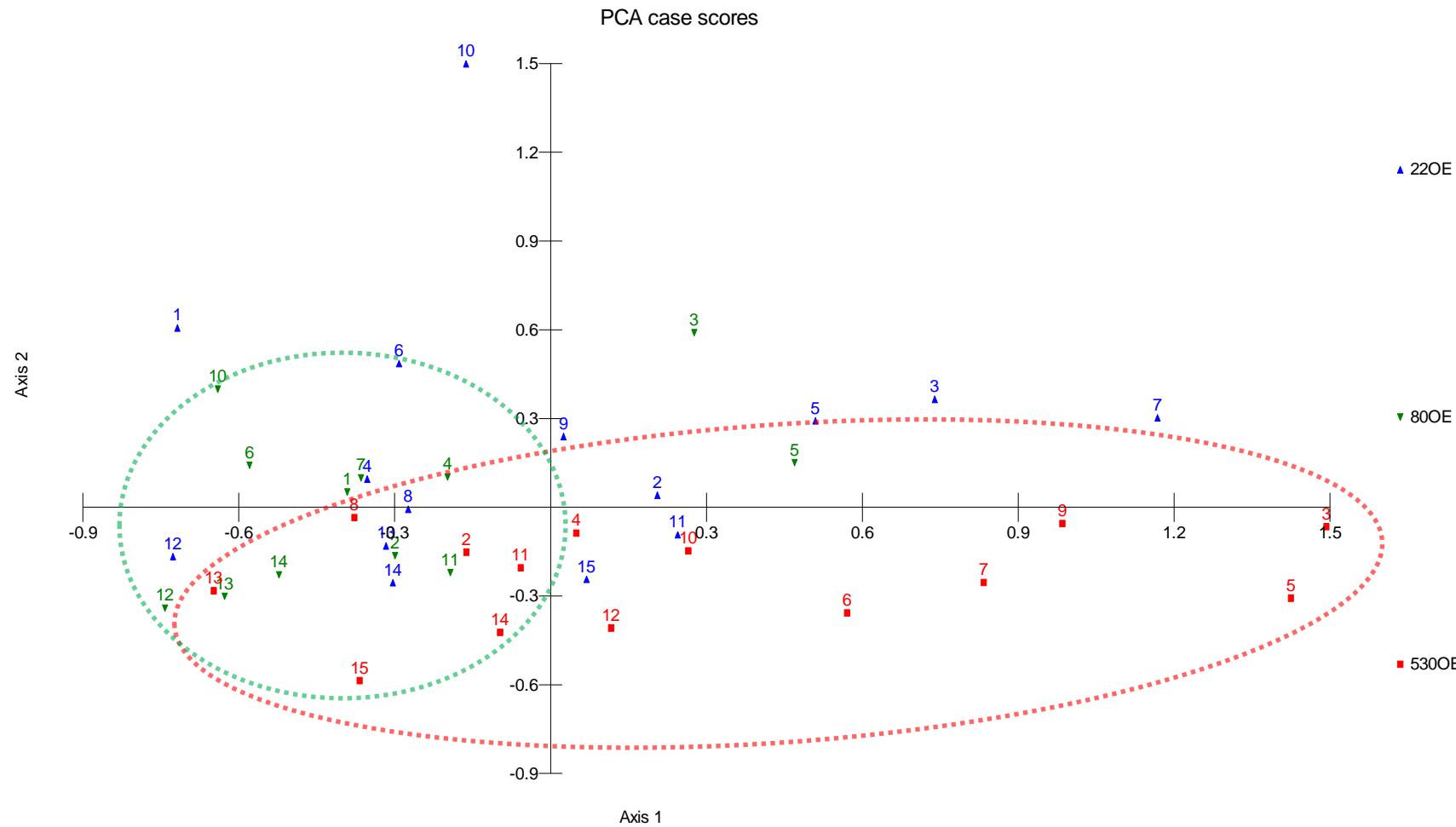
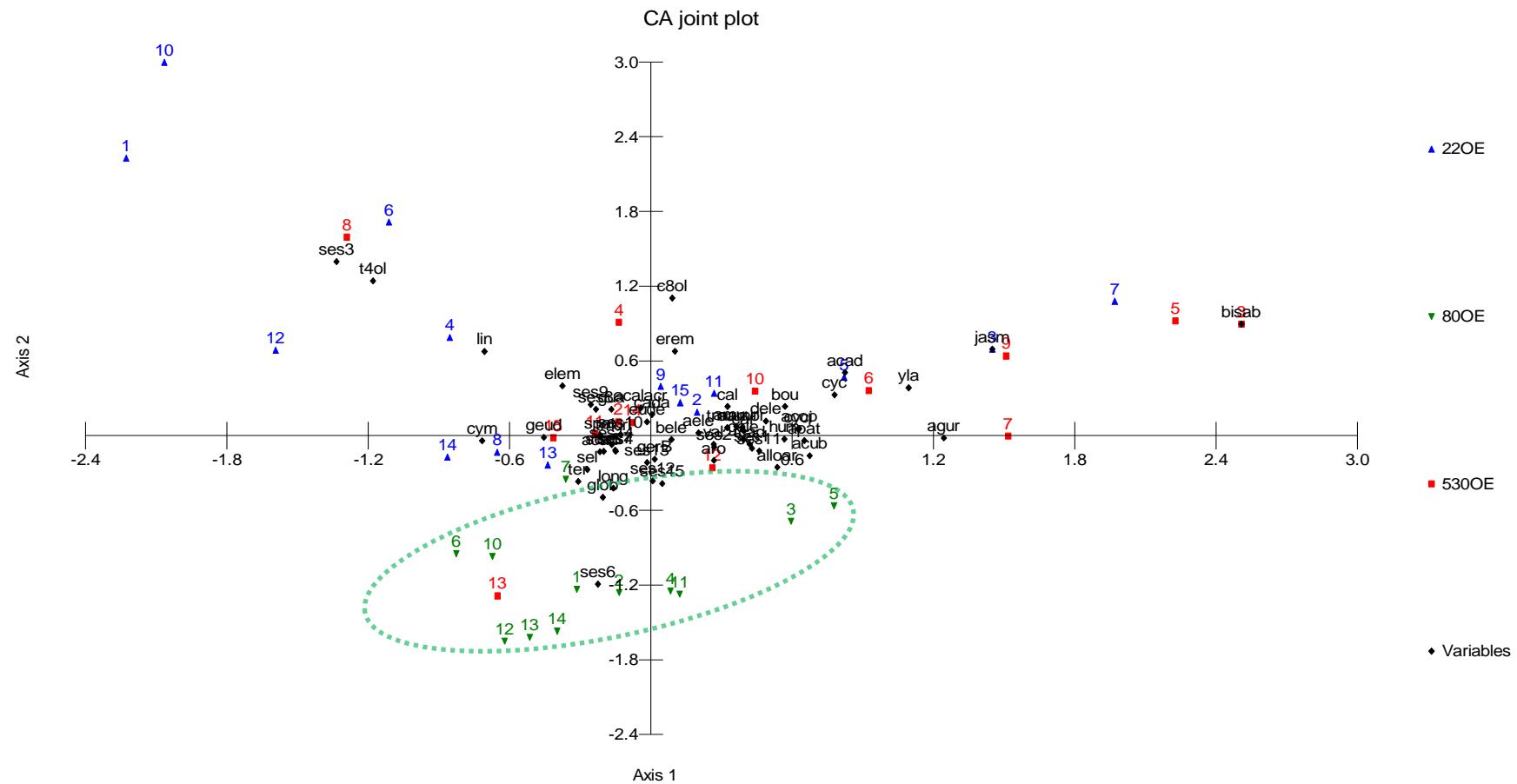


FIGURA 10. Análise de correspondência feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*. A sequência numérica é relativa as datas de coletas de cada um dos indivíduos.



A figura 11 representa a análise de correspondência canônica referente aos três indivíduos (22, 80 e 530) cujas folhas foram coletadas para obtenção dos óleos voláteis, analisados em função da ocorrência de todos os terpenos e sua porcentagem, em função do clima à época de coleta das folhas. Uma análise de correspondência canônica (CCA) foi realizada levando-se em consideração os óleos voláteis e todos os terpenos como variáveis, comparados com as variáveis referentes ao clima da região à época de colheita do material com o qual se obteve os óleos. Na figura 11, observa-se que a umidade relativa influenciou diretamente a composição de óleos voláteis obtidos de material vegetal coletado no período chuvoso, como o 22OE3, 22OE5, 80OE3, 80OE5, 530OE3, 530OE5 - estes todos coletados no mesmo dia -, além dos óleos 530OE6, 530OE7 e 530OE9. Observa-se que a precipitação influenciou diretamente a composição de óleos voláteis de 530OE10 e 530OE12. O fator climático variação de temperatura, observada pelos dados de temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média, influenciou a composição dos óleos voláteis obtidos de plantas que foram coletadas no período chuvoso, como os óleos 22OE9, 22OE11, 22OE15, 22OE7, 80 OE1 e 80OE4, além do 22OE2 (o único coletado em estação seca). O fator climático insolação influenciou diretamente a composição dos óleos obtidos de plantas coletadas na estação seca, como 22OE1, 22OE13, 80OE1 e 80OE2.

Na figura 12, observa-se que o fator climático temperatura influenciou na presença de linalol, terpinen-4-ol e com menos influência o α -cadinene nos óleos voláteis. A estação mais seca com temperaturas mais elevadas parece contribuir com a síntese de terpinen-4-ol, esse mesmo resultado já foi relatado em trabalhos anteriores (SUFFREDINI *et al.*, 2016; CABRERA *et al.*, 2015). A umidade relativa influenciou diretamente a presença de cis-jasmona e de β -bisaboleno. Cis-jasmona é reconhecido por ser relacionado com a defesa do vegetal atraindo insetos que vão atuar contra herbivoria (BIRKETT, *et al.* 2000), isso reforça a premissa da participação desse composto orgânico volátil com a interação planta e meio ambiente. O espatulenol está sob influência de maior precipitação e corrobora com o trabalho de Suffredini *et al.* (2016), que também encontraram tal resultado para *O. platyspermum*. Os estudos dos óleos voláteis das folhas de *I. polyneura*, coletadas em diferentes estações do ano, apresentou

variação sazonal de seus constituintes tornando evidente a influência dos fatores climáticos.

Na figura 13, observa-se uma ordenação segundo a estação do ano, classificada como seca e chuvosa, uma vez que na Amazônia o regime de chuvas tem relação direta com a estação do ano e é determinante para suas alterações (AB-SÁBER, 2003). Para esta análise, observa-se uma porcentagem acumulada no segundo eixo de 58,498. Observa-se, portanto, que na ACP obtida há uma ordenação segundo a estação do ano, onde pode-se verificar um acúmulo de óleos voláteis coletados na estação seca alocados no lado esquerdo do eixo 1, ao passo que os óleos voláteis coletados na estação chuvosa se encontram localizados entre o centro e a direita do eixo 1. As análises por ACP indicam influência sazonal nos óleos voláteis, com o óleo obtido das folhas coletadas na estação seca apresentando as maiores diferenças em relação à estação chuvosa.

A figura 13 representa a ordenação dos três indivíduos (22, 80 e 530) cujas folhas foram coletadas para obtenção dos óleos voláteis, analisados em função da ocorrência de todos os compostos orgânicos volatéis que ocorrem nos três indivíduos e sua porcentagem, feita por análise de componentes principais (ACP), tendo como vetores os terpenos. Considerando-se que a coleta do material vegetal usado para obtenção dos óleos voláteis de cada um dos indivíduos foi feita no mesmo dia, pode-se comparar o conteúdo desses óleos segundo a sazonalidade. Apartir dessa ACP é possível identificar o espatulenol, sesq5 e o α -cadinol como os compostos orgânicos voláteis com maior porcentagem de ocorrência em estação seca, ao passo que, α -muurolol e τ -muurolol apresentam maior porcentagem na estação chuvosa. A presença de maior porcentagem do espatulenol na estação seca já foi relatado em outros estudos (Prochnow, 2015). Os sesquiterpenos são moléculas maiores, mais densas e menos voláteis, tendo muitas vezes funções de ação antimicrobiana e ação de fungitoxidade (AMARAL, *et al.* 2015).

FIGURA 11. Análise de correspondência canônica feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando as variáveis climáticas. A sequência numérica é relativa as datas de coletas de cada um dos indivíduos.

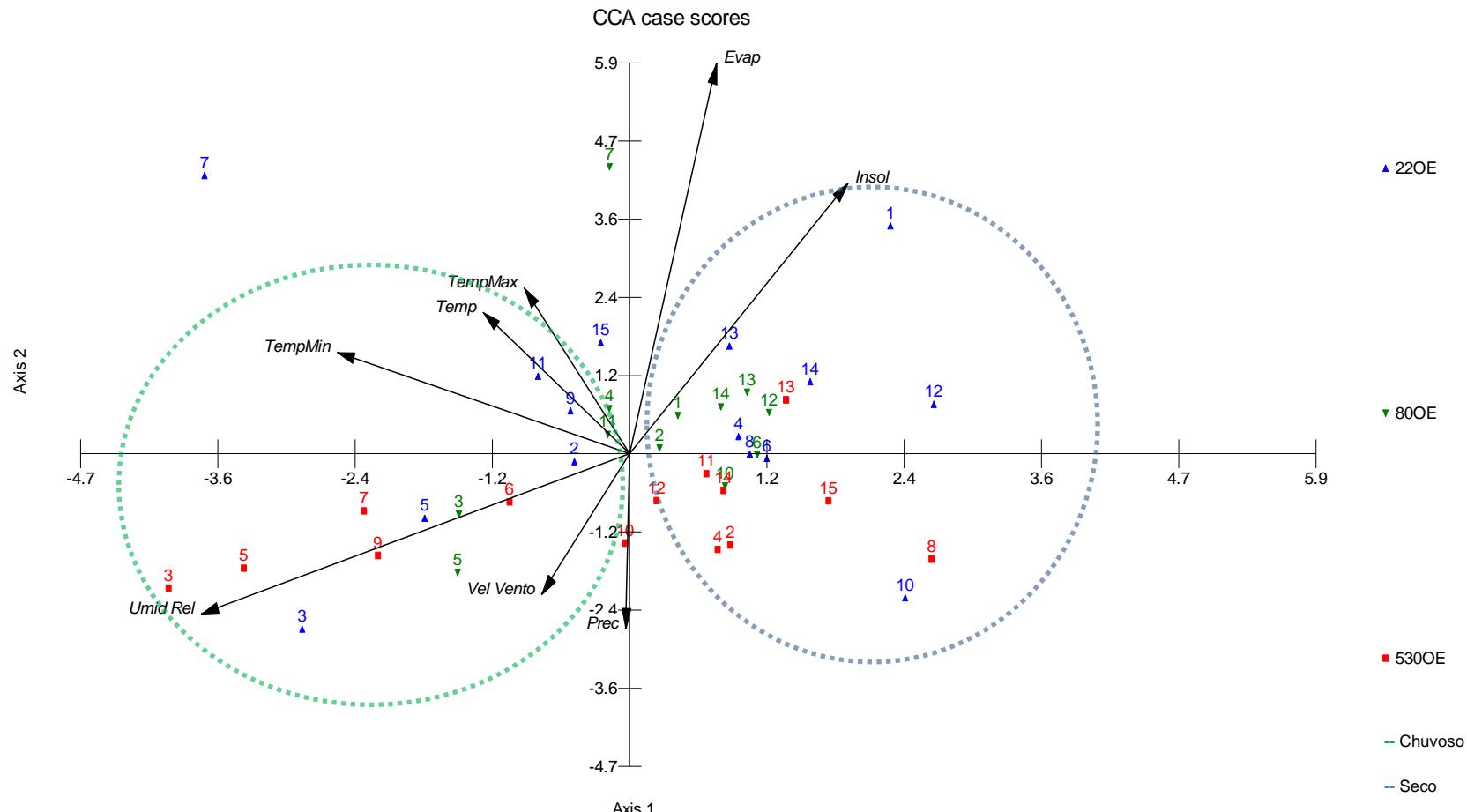


FIGURA 12. Análise de correspondência canônica feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando os compostos orgânicos voláteis e as variáveis climáticas.

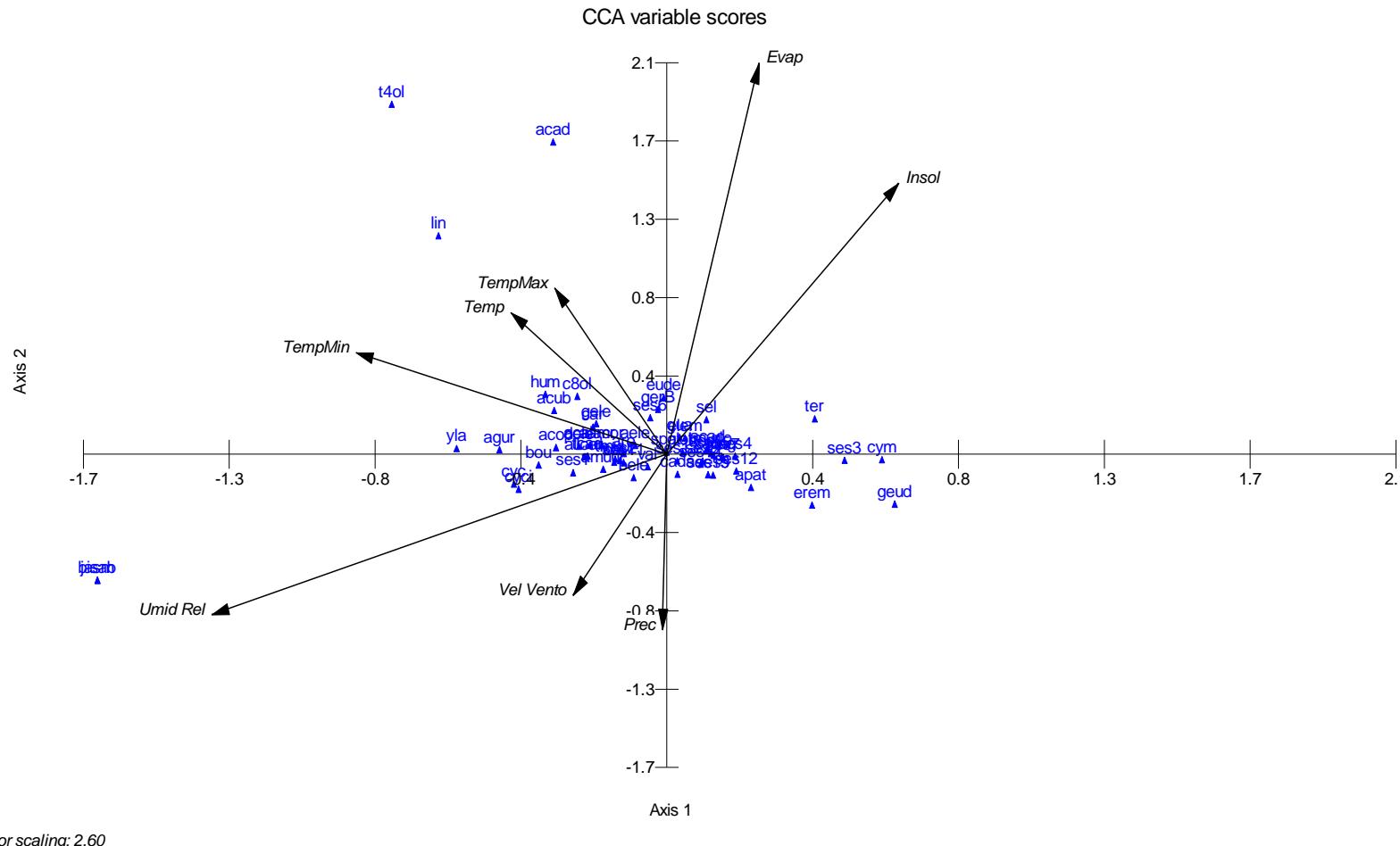
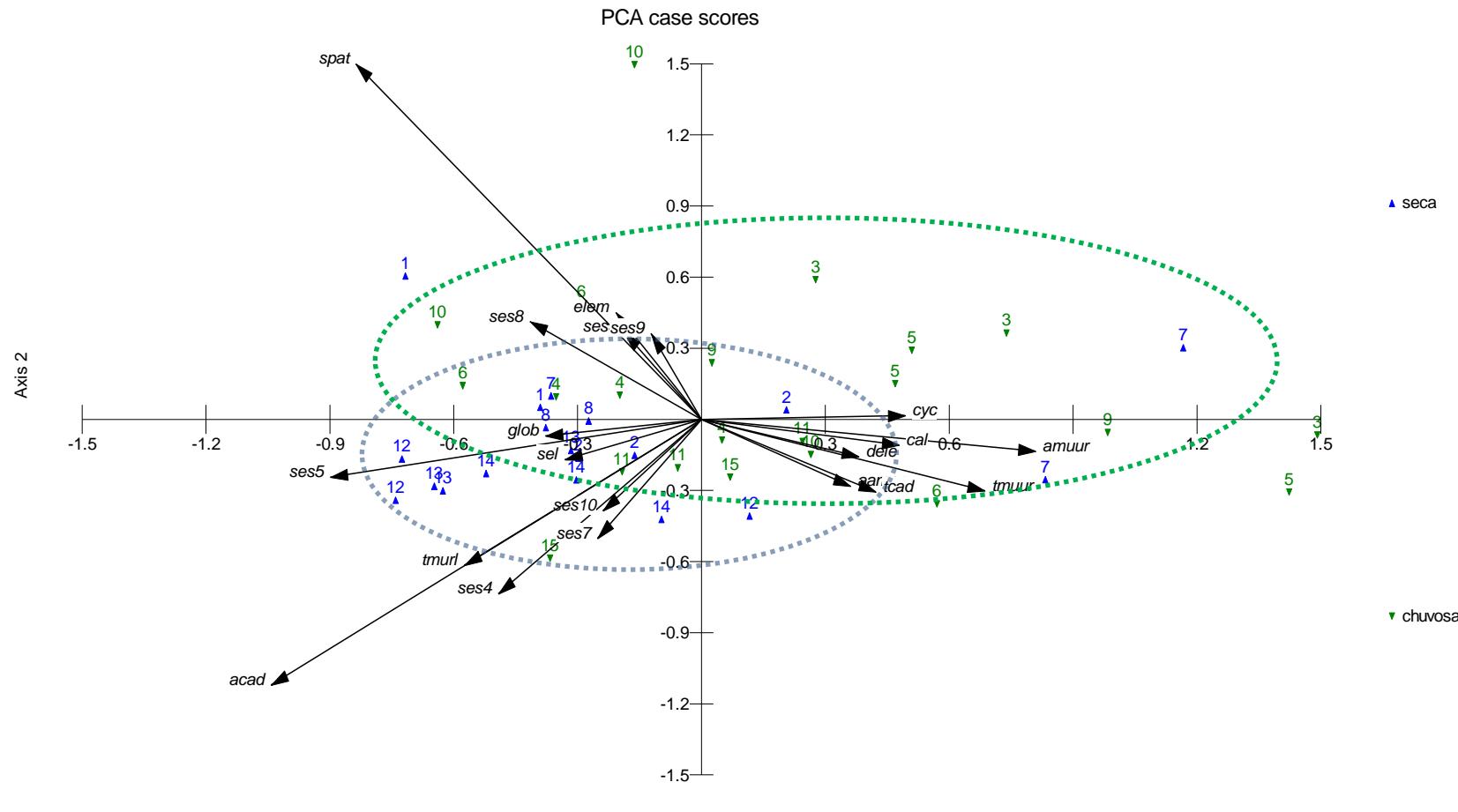


FIGURA 13. Análise de componentes principais feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando os compostos orgânicos voláteis e as estações do ano. A sequência numérica é relativa as datas de coletas de cada um dos indivíduos.



CONCLUSÕES

Segundo as análises realizadas, observou-se que as diferenças nos rendimentos dos óleos voláteis apresentaram uma variação entre a composição dos compostos voláteis dos três indivíduos. Quanto à composição quali e quantitativa, a ocorrência de espatulenol, α -cadinol e τ -muurolol como compostos majoritários é comum aos três indivíduos, porém, ocorrem em concentrações diversas. As estações do ano, bem como as variáveis climáticas analisadas, influenciaram a composição dos óleos voláteis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. 4ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 804p. 2007.
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; ALMEIDA, M.E.L.; BRAZ FILHO, R.; VON Bulow, M.V.; CORRÊA, J.J.L.; GOTTLIEB, O.R.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.S. Diarylpropanoids from *Iryanthera polyneura*. Phytochemisfry. Vol. 18, pp.1015-1016. 1979.
- AMARAL, L.P. *et al.* Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Brazilian Archives of Biology and Technology. V.58, n.1, p.12-21.2015.
- BIRKETT, M.A. *et al.* New roles for cis-jasmone as na insect semiochemical na in plant defense. Proceedings of the National Academy of Sciences. Washington. v.97, p. 9329-9334, 2000.
- CABRERAA, D.C.; GOMESA, G.L.S.; FLACHB, A.; COSTAB, L.A.M.A.; ROSAA, G.R.; MOURAA, N.F. Evaluation of climatic factors on the yield and chemical composition of the essential oil of *Myrocarpus frondosus*. Natural Product Research Vol. 29, No. 7, 667–670. 2015.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura. v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- FÜRSTENBERG-HÄGG J.; ZAGROBELNY M.; BAK S. Plant defense against insect herbivores. Int J Mol Sci14: 10242–10297, 2013.
- GOTTLIEB, O.R. Chemical studies on medicinal Myristicaceae from Amazonia. Journal of Ethnopharmacology, v.1, n.4, p.309-323, 1979.
- HANLIDOU, E., KAROUSOUA, R., LAZARIB, D. Essential-Oil Diversity of *Salvia tomentosa* Mill. in Greece. CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 11 pp. 1205-1215. 2014.
- HARTMANN, T. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry. 68: 2831-2846. 2007.
- MONKS A.; SCUDIERO D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766. 1991.
- MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos voláteis. Horticultura Brasileira 27: S4050S4063. 2009.
- NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. Journal of Ethnopharmacology, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.
- PINHEIROA, C.G., MACHADOB, C.M., AMARALA, L.P., SILVAA, D. T., ALMEIDAC, C. A. A., LONGHIA, S.J., MALLMANC, C.A., HEINZMANNA, B.M. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. Braz. J. Biol. vol. 76, no. 1, pp. 176-184. 2016.
- PITAROKILIA, D., CONSTANTINIDIS, T., SAITANIS, C., TZAKOU, O. Volatile Compounds in *Thymus* sect. *Teucrioides* (Lamiaceae): Intraspecific and Interspecific Diversity, Chemotaxonomic Significance and Exploitation Potential. CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 11 pp. 593-618. 2014.

PROCNOW, D. Crescimento, produção e qualidade do óleo essential de *Aloysia triphylla* em função da disponibilidade hídrica e sazonalidade. Dissertação de mestrado. Frederico Westphalen. Brasil. 2015.

RAGUSA, A., CENTONZE, C., GRASSO, M.E., LATRONICO, M.F., MASTRANGELO, P.F., FANIZZI, F.P., MAFFIA, M. Composition and Statistical Analysis of Biophenols in Apulian Italian EVOOs. Foods 6, 90. 2017.

RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. Acta Amazonica, v.10, n.1, p.5-127, 1980.

SHULTES, R.E.; HOLMSTED, B. De plantis toxicaris et. mundo novo tropicale commentationes. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous Plants of South America. Lloydia, v.34, p.61-78, 1971.

SHULTES, R.E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: Miscellaneous notes on biodynamic Plants of the Northwest Amazon. Journal of Ethnopharmacology, v.14, n.1, p.125-158, 1985.

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. The fate of the Amazonian areas of endemism. Conservation Biology, v.19, n.3, p.689-694, 2005.

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.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism, 1 ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29, 2000.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

**6.2 Avaliação biológica de *Iryanthera polyneura* Ducke e a
interação dos óleos voláteis das folhas com os fatores
climáticos.**

RESUMO

A Floresta Amazônica ocupa uma vasta área da América do Sul e contém um número expressivo de espécies de plantas, o que implica em potenciais descobertas de fármacos incluindo aqueles provenientes de óleos voláteis de espécies da flora amazônica. Dentre as funções exercidas pelos óleos voláteis estão a de proteção contra microorganismos patogênicos, como inseticidas e também contra herbívoros e, o que sinaliza, que existe um potencial nesses vegetais quanto a aplicação dos mesmos para medicamentos. O objetivo desse trabalho foi analisar o potencial antimicrobiano dos óleos voláteis de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* frente a *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e a atividade antitumoral em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama e de câncer de próstata. Foram coletadas por 15 vezes durante os anos de 2009 a 2011 as folhas de três indivíduos adultos de *Iryanthera polyneura*. Para a análise do potencial antibacteriano foi realizada a microdiluição em caldo e para a análise da atividade antitumoral foi calculado o IC₅₀ de todas as amostras de 43 óleos voláteis. De acordo com as análises dos 43 óleos voláteis testados contra 10 cepas de bactérias e o fungo, verificou-se que os óleos de *I. polyneura* não inibiram o crescimento das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, nem da levedura *Candida albicans*, sendo mais eficiente contra as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Também foi possível observar atividade citotóxica contra células de tumor de mama e de próstata para estes óleos, sendo que se apresentaram mais efetivos contra as células de próstata.

Palavras-chave: antibacteriano, *Iryanthera polyneura*, óleos voláteis

ABSTRACT

The Amazon Rainforest takes up a vast area of South America, contain an expressive number of plant species, this vast biodiversity implies some potential discoveries mainly of drugs derived from the essential oils of the Amazonian flora. Among the functions performed by essential oils is the protection of plants against bacterial agentes, virals, fungals, insecticides, herbivores and predators that signals the potential of these plants for drug use. The objective of this study was to analyze the antibacterial potential the volatile oils of three individuals of *Iryanthera polyneura* against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* and the antitumor activity in human cell lines of breast adenocarcinoma and cancer of prostate. The leaves of three adult individuals of *Iryanthera polyneura* were collected 15 times during the years 2009 to 2011. For the analysis of the antibacterial potential, the microdilution in broth was performed and for the analysis of the antitumor activity the IC 50 of all the essential oils was calculated. According to the analyzes of the 43 essential oils tested against 10 strains of bacteria and one fungus, it was found that *I. polyneura* oils did not inhibit the growth of the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, nor of the *Candida albicans*, being more efficient for the Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Finally, was observed cytotoxic activity against breast and prostate tumor cells for these oils, and they were more effective against the prostate cells.

Key words: antibacterial, essential oils, *Iryanthera polyneura*

INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica ocupa uma vasta área da América do Sul, aproximadamente 6.000,000 quilômetros quadrados, sendo que mais da metade encontra-se em território brasileiro (PIRES; PRANCE, 1985). Abriga o expressivo número de aproximadamente 40.000 espécies, evidenciando a importante riqueza de sua flora. Atualmente, estima-se que a flora desconhecida na Amazônia esteja subestimada e que a biodiversidade vegetal provavelmente inclui pelo menos 3 vezes mais espécies de plantas do que atualmente são conhecidas (HOPKINS, 2007), muitas das quais são endêmicas deste bioma, (FERREIRA, 2017).

Essa vasta variedade de espécies implica em potenciais descobertas principalmente de fármacos provenientes dos óleos voláteis da flora amazônica. A necessidade de encontrar-se novas substâncias capazes de atuarem como antibióticos ocorre devido ao aumento da resistência dos micro-organismos e por algumas infecções que podem surgir quando o sistema imunológico está suprimido (PENNA *et al.*, 2001). Dentre esses micro-organismos estão *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sangunis*, alguns dos principais causadores de doenças nos seres humanos e, por isso mesmo, há grande impotância de se estudar tratamentos alternativos para esses agentes patológicos.

Dentre as funções exercidas pelos óleos voláteis a de proteção contra microorganismos patogênicos, como inseticidas e contra herbívoros (FÜRSTENBERG-HÄGG *et. al.* 2013) é o que sinaliza que existe um potencial nesses vegetais quanto a aplicação dos mesmos para medicamentos.

Esses medicamentos poderiam ser utilizados em diversas áreas da saúde, dentre elas em tratamentos oncológicos. O câncer é uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo. Estima-se que, para o Brasil, no biênio 2018-2019, haverá ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, sendo que os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2018).

A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010), por esse motivo, os óleos volatéis podem ser uma alternativa.

Os óleos voláteis são encontrados em algumas famílias botânicas, como Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Laureaceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Rosaceae, Poaceae e Zingiberaceae, entre outras. O gênero *Iryanthera* da família Myristicacea é muito comercializado devido a características de sua madeira (LISBOA; LOUREIRO; SILVA, 1984). Além disso, estudos etnobotânicos relataram o uso da casca interna e da seiva para o tratamento de infecções causadas por fungos (SHULTES, 1985), fornecendo indícios de suas possíveis propriedades antibacterianas e citotóxicas.

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar diferenças de ocorrência dos principais terpenos entre os indivíduos. Além disso, avaliar os óleos voláteis quanto à atividade antimicrobiana e citotóxica e sua relação com os terpenos e com as estções do ano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de material botânico

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as folhas de indivíduos adultos de *Iryanthera polyneura* coletadas 15 vezes, sempre dos mesmos três indivíduos identificados como 22, 80 e 530, no decorrer de dois anos, de outubro de 2009 a dezembro de 2011. As datas de coletas foram determinadas de modo aleatório, segundo disponibilidade de se montar as expedições.

A escolha da espécie *Iryanthera polyneura* deu-se porque foi possível realizar coletas por um período de dois anos de três indivíduos distintos da mesma espécie, identificados como indíviduo 22, 80 e 530, fornecendo dados temporais e espaciais da interação do vegetal com o meio ambiente (Quadro 7). Anteriormente o grupo de pesquisas realizou um estudo semelhante com uma

espécie de Myristicacea, e obteve resultados importantes sobre a interação da espécie com o meio ambiente. (SUFFREDINI, 2016).

Quadro 7: Informações sobre a indexação do material botânico coletado de *Iryanthera polyneura*.

Indivíduo	Coletor	Tombo	Determinador
22	A.A.O. (4064)	UNIP 5170	Paciencia, M.L.B.
80	A.A.O. (4144)	UNIP 5279	Paciencia, M.L.B.
530	*		Paciencia, M.L.B.

* Para o indivíduo 530 não houve indexação, somente coleta das folhas e identificação em campo.

As folhas de indivíduos adultos de *Iryanthera polyneura* foram coletadas por 15 vezes durante os anos de 2009 a 2011, perfazendo 43 amostras de material vegetal. As coletas foram realizadas no município de Manaus, AM, em floresta de terra firme, às margens do rio Cuieiras, afluente do rio Negro.

Obtenção dos óleos voláteis e diluição para análises biológicas

Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação, realizada em aparelho de Clevenger (SIMÕES *et al.* 1999), durante quatro horas. Os óleos foram completamente coletados do aparelho de Clevenger com auxílio de pentano, em seguida, a água foi retirada com a adição de sulfato de sódio anidro e posterior evaporação em aparelho de evaporação rotativa (Buchi). Os óleos foram pesados para se avaliar seu rendimento e foram estocados a -10 °C, até o uso. Para as análises por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas, 20 µL de cada óleo foram diluídos em 980 µL acetona

Análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Universidade de Campinas.

A cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um equipamento Shimatzu 14B/QP5050A, com analisador do tipo

quadrupolo de mesma marca (Figura 7). 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, 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 (ADAMS, 2007). Os dados foram comparados com bibliotecas de compostos, como Willey229, NIST107, SHIM1607 e NIST21 e com livros de referência (ADAMS, 2007). Foram injetadas 41 amostras relativas às diferentes coletas. O volume injetado de cada amostra foi de 1µL.

Obtenção do Índice de Retenção

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 Retenção (IR), 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.

$$Ix=100n+100(t_x-t_n)/(t_{n+1}-t_n)$$

Onde:

Ix é o valor que quero encontrar

T_x é O tempo de retenção da molécula desconhecida

T_n é o tempo de retenção do alcano de menor número de carbonos

Ensaio da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (MDC) (SUFFREDINI et. al. 2004). Os óleos voláteis foram diluídos a uma concentração de 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Colônias frescas de *Candida albicans* (ATCC10231), cultivada em placa Sabouraud dextrose; *Escherichia coli* (ATCC25922/AVA51/A, 31/1A e 35A), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027/27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), cultivadas em placas de Petri com meio Müller-Hinton e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

e *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556), cultivadas em placas de Petri com meio Brain heart infusion, foram usadas para o preparo da suspensão bacteriana. O meio agar foi utilizado para o cultivo dos micro-organismos, enquanto o mel caldo para a micro-diluição.

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 em “U”. Depois, 10 µL de cada uma das amostras de óleos voláteis foram adicionados aos seus respectivos poços. Dois poços foram deixados como padrões negativos (só meio de cultura, sem micro-organismo) e positivos (meio de cultura mais inóculo). Para a análise da viabilidade microbiana, foram feitas subculturas em meio específico para cada um dos micro-organismos. A leitura visual dos resultados foi feita segundo estes parâmetros: “X” = formação de botão, não houve inibição.

Os óleos voláteis que apresentaram atividade, portanto, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CBM (concentração bactericida mínima). Na análise dos óleos essenciais por conta destes produzirem uma turbidez no meio de cultura, os valores de CIM e de CBM foram considerados os mesmos.

Ensaio da atividade antitumoral (citotóxica)

A atividade antitumoral (citotóxica) dos óleos voláteis foi testada em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3) (SUFFREDINI et al. 2006, 2007). Os óleos voláteis foram dissolvidos em DMSO na concentração de 40 mg/mL. As linhagens celulares foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (2 mM), gentamicina mM, a 37°C com 5% de CO₂. As células foram semeadas em microplacas de 96 cavidades de fundo chato a uma densidade de 10.000 células/cavidade para as células de mama, e de 7.500 células/cavidade para as células de próstata, transferidas em 100 µL/poço. As placas foram levadas à incubação por 24 h, a 37°C com 5% de CO₂. Após essas 24 h, os óleos voláteis foram adicionados aos respectivos poços em cinco diferentes concentrações. Nos poços, essas concentrações foram de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µL/mL, acrescentados em meio de cultura RPMI1640. Depois, as

placas foram novamente incubadas por mais 48 h, nas mesmas condições. Cada concentração de óleo foi testada em 6 replicatas de cada amostra. Grupos controle receberam o mesmo volume de meio RPMI. O crescimento das células tumorais foi quantificado pelo método sulforodamina B (SRB) (MONKS et al., 1991). Os resultados da atividade antitumoral (citotóxica) foram apresentados como inibição de crescimento 50%, obtidos da leitura das células viáveis coradas com SRB, em leitor de ELISA ao comprimento de onda de 515 nm.

Delineamento experimental

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, realizada em duas etapas, foram utilizadas todas as 42 amostras de óleos obtidas, sendo 15 amostras obtidas do indivíduo 22, e 13 amostras obtidas do indivíduo 80 e 14 do indivíduo 530. Em uma primeira etapa, os óleos voláteis foram avaliados em dose única, para se identificar aqueles ativos. Na segunda etapa, foram obtidos os valores de concentração inibitória mínima para os óleos identificados como ativos na primeira etapa.

Para avaliação da atividade citotóxica, foram utilizados os 15 óleos obtidos do indivíduo 22, 12 óleos obtidos do indivíduo 80 e 14 óleos obtidos do indivíduo 530, totalizando 41 óleos testados.

Para a avaliação da variação dos terpenos que ocorrem em todos os óleos voláteis, foram utilizadas as 41 amostras, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de terpenos anteriormente obtidas. Foram feitas análises de variância dos tipos ANOVA de uma via com teste posterior de Tukey para a comparação da ocorrência de cada composto volátil comum, entre os três indivíduos. Também foi feita uma análise de variância de duas vias, com teste posterior de Tukey, para se verificar a variação dos sete terpenos comuns nos três indivíduos estudados, 22, 80 e 530. Para estes ensaios, foi considerada significância de $\alpha < 0,05$.

Para a avaliação da correspondência entre a ocorrência dos terpenos dos óleos e as atividades antimicrobiana e citotóxica foram usadas as 41 amostras de óleos, sendo 15 obtidas do indivíduo 22, 12 obtidas do indivíduo 80 e 14 obtidas do indivíduo 530. Essa análise foi realizada a partir das porcentagens de

terpenos anteriormente obtidas e dos valores de concentração inibitória mínima para a atividade antimicrobiana e de concentração inibitória 50% para a citotoxicidade. Análises multivariadas do tipo análise de correspondência canônica foram executadas.

Análise matemática e estatística

Para este trabalho, foi utilizada a análise de correspondência canônica (ACC) que foi realizada pelo programa *Multi Variate Statistical Package* (MVSP). Foram também empregadas as análises de variância do tipo ANOVA de uma entrada e análise de variância do tipo ANOVA de duas entradas, com teste posterior de Tukey 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, para obtenção dos compostos orgânicos voláteis que ocorriam em comum em todas as amostras de óleos voláteis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

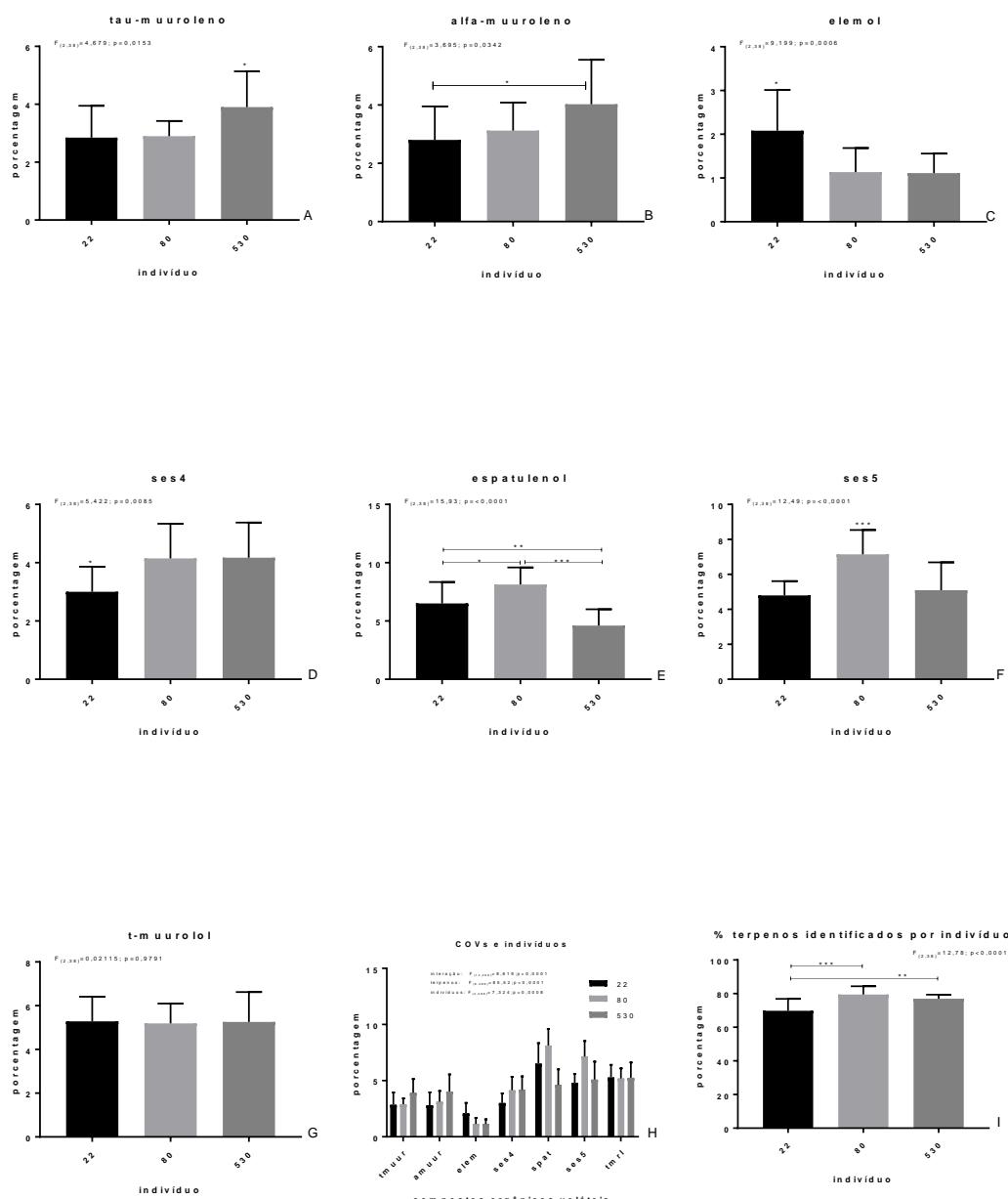
Segundo as análises químicas realizadas com os óleos voláteis das 15 coletas das folhas feitas com os três indivíduos de *I. polyneura*, verificou-se que o espatulenol, α -cadinol e τ -muurolol foram os principais compostos encontrados. Trabalhos anteriores ressaltaram a importância do componente espatulenol na atividade antibacteriana (Limberger *et al.*, 2004; Amaral *et al.* 2015). Foram identificados sete terpenos que ocorrem em todos os óleos voláteis analisados (τ -muuroleno, α -muuroleno, elemol, espatulenol, τ -muurolol, Ses4 e Ses5), obtidos dos três indivíduos que participaram do estudo, 22, 80 e 530.

Foi observado que as porcentagens médias desses terpenos, obtidas para cada um dos três indivíduos, variou entre si (Figura 14). A porcentagem média de ocorrência de τ -muuroleno foi significativamente maior nos óleos obtidos do indivíduo 530, em relação aos outros dois indivíduos ($F_{(2,38)}=4,679$; $p=0,00153$; figura 14A), já α -muuroleno ocorreu em maior quantidade nos óleos do indivíduo 530, em relação aos óleos do indivíduo 22 ($F_{(2,38)}=3,695$; $p=0,0342$; figura 14B). A figura 14C mostra que o elemol ocorreu em maior quantidade, nos óleos do indivíduo 22 ($F_{(2,38)}=9,199$; $p=0,0006$). Ses4 ocorreu em menor

quantidade nos óleos obtidos do indivíduo 22, em relação aos outros óleos obtidos dos indivíduos 80 e 530 ($F_{(2,38)}=5,422$; $p=0,0085$; figura 1D). Cada um dos indivíduos apresentou uma média distinta das outras duas quanto à quantidade de espatulenol, sendo que os óleos do indivíduo 530 apresentaram menor quantidade do que os óleos de 22 que, por sua vez apresentaram menor quantidade em relação aos óleos de 80 ($F_{(2,38)}=15,93$; $p<0,0001$; figura 1E). Ses5 ocorreu em maior quantidade nos óleos do indivíduo 80, em relação aos óleos obtidos dos outros dois indivíduos ($F_{(2,38)}=12,49$; $p<0,0001$; figura 1F). Já a média de ocorrência de τ -muurolol entre os três indivíduos não apresentou diferenças significativas ($F_{(2,38)}=0,02115$; $p=0,9791$; figura 1G). A figura 14H mostra a variância dos terpenos entre os três indivíduos. Nesta figura, é possível se observar que o espatulenol é o composto que ocorre em maior quantidade e o elemol, em menor quantidade. Por fim, a figura 14I demonstra a quantidade de terpenos que foi identificada, para todos os óleos de cada um dos três indivíduos, significativamente menor para os óleos do indivíduo 22, em relação aos outros dois.

Na figura 14, fica evidente a importância do τ -muurolol na análise, visto que sua ocorrência se mantém elevada e constante para os três indivíduos, em quaisquer épocas do ano, uma vez que não há diferenças estatísticas observadas na análise da porcentagem de ocorrência ($p>0,05$). A razão pela qual este terpeno deve se manter constante nos indivíduos ainda é incerta, podendo estar relacionada à sua função alelopática, ou à sua função na rota biossintética desta espécie, para manutenção de funções primordiais fundamentais de reprodução e proteção, porém, estudos mais aprofundados devem ser feitos para se verificar essas hipóteses. Lorenzetti (2012), relatou uma ação mais efetiva de τ -muurolol na inibição do crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* e de ser eficiente no controle de crescimento micelial de outras espécies, que são patógenos do solo e que podem causar prejuízos na agricultura, indicando uma possível função antifúngica.

FIGURA 14: Análises de variância realizadas com as porcentagens dos compostos orgânicos voláteis comuns a todos os óleos voláteis obtidos de folhas coletadas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*, denominados 22, 80 e 530. A. ANOVA de uma entrada da ocorrência de τ -muuroleno; B. ANOVA de uma entrada da ocorrência de α -muuroleno; C. ANOVA de uma entrada da ocorrência de elemol; D. ANOVA de uma entrada da ocorrência de sesqui b; E. ANOVA de uma entrada da ocorrência de espatulenol; F. ANOVA de uma entrada da ocorrência de sesqui c; G. ANOVA de uma entrada da ocorrência de τ -muurolol; H. ANOVA de duas entradas relacionando os compostos orgânicos voláteis comuns e os indivíduos 22, 80 e 530; I. ANOVA de uma entrada comparando a quantidade de compostos orgânicos voláteis que foram identificados nos óleos voláteis dos três indivíduos, 22, 80 e 530. Foi aplicado teste posterior de Tukey com nível de significância de $\alpha < 0,05$ para todas as analyses realizadas.



De acordo com as análises dos 43 óleos voláteis testados contra cepas de bactérias e de levedura a ação antibacteriana, medida pela concentração bactericida mínima, variou de 0,75 mg/mL a 6 mg/mL (Tabela 4). Na análise, verificou-se que os óleos de *I. polyneura* não inibiram o crescimento das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, nem da levedura *Candida albicans*, sendo mais eficiente para as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Esses resultados são esperados, uma vez que as membranas das bactérias Gram positivas as tornam mais susceptíveis à ação de agentes antimicrobianos (Auer; Weibel, 2017).

Em estudos anteriores (MORAIS, 2008) realizados com pericarpo do fruto de *Iryanthera juruensis*, resultados semelhantes ao observado no presente estudo foram obtidos, particularmente na avaliação da atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*; por outro lado, os autores verificaram a efetividade de *I. juruensis* contra a levedura *C. albicans*. Enquanto que no presente estudo não foi observada a inibição do crescimento de *C. albicans*, no estudo anterior os autores observaram o aparecimento de potencial antifúngico.

No trabalho de Cuca *et. al.* (2009), os óleos de *I. ulei* foram ineficazes contra *E. coli*, assim como os resultados encontrados no presente trabalho (Tabela 4), verificado para os todos os óleos obtidos de *I. polyneura*. Por sinal, os óleos aqui avaliados não inibiram o crescimento de nenhuma bactéria Gram-negativa analisada. Segundo estes autores, *S. aureus* foram os micro-organismos mais sensíveis aos óleos testados, e estes resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho (Tabela 4), no qual a maior atividade foi observada justamente para o mesmo micro-organismo, cuja cepa é ATCC29213. No presente estudo, foram avaliadas as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para cada óleo. Visto que a solubilidade dos óleos voláteis é parcial, em meio de cultura, os valores obtidos para CIM foram considerados iguais aos valores obtidos para CBM, uma vez que, para se determinar se houve crescimento bacteriano após o tratamento da suspensão microbiana com os óleos foi empregada a técnica de subcultura, ou seja, parte da suspensão é submetida a uma cultura em meio ágar para se verificar a viabilidade dos micro-organismos. Os óleos considerados ativos foram

aqueles que impossibilitaram haver crescimento microbiano, na subcultura. Deste modo, os óleos que foram considerados ativos apresentaram atividade microbicida, ou seja, os valores referentes ao CBM foram anotados. Nas figuras 15A a 15D pode-se observar a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis para os micro-organismos testados.

TABELA 4: Atividade antimicrobiana dos óleos voláteis obtidos de 15 coletas de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura*, denominados 22, 80 e 530, frente a 10 cepas de micro-organismos. Os micro-organismos que apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidos a análise da concentração inibitória mínima, expressa na tabela em mg/mL. Os óleos não ativos estão representados com “X” e os não testados com “NT”.

Óleo volátil	Calb ATCC 10231	Ecoli 31/1	Ecoli 35A	Ecoli AVE 51/A	Ecoli ATCC 25922	Psa ATCC 9027	Efae ATCC 29212	Sau ATCC 29213	Smut ATCC 25175	Ssang ATCC 10556
22OE1	X	X	X	X	X	X	X	3,00	X	2,00
22OE2	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
22OE3	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	3,00
22OE4	X	X	X	X	X	X	X	1,50	2,00	3,00
22OE5	X	X	X	X	X	X	3,00	0,75	X	X
22OE6	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
22OE7	X	X	X	X	X	X	X	3,00	3,00	2,00
22OE8	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	3,00
22OE9	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	X
22OE10	X	X	X	X	X	X	3,00	3,00	X	X
22OE11	X	X	X	X	X	X	3,00	3,00	X	X
22OE12	X	X	X	X	X	X	X	3,00	3,00	2,00
22OE13	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
22OE14	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
22OE15	X	X	X	X	X	X	X	3,00	X	2,00
80OE1	X	X	X	X	X	X	X	3,00	2,00	2,00
80OE2	X	X	X	X	X	X	X	1,50	2,00	2,00
80OE3	X	X	X	X	X	X	X	0,75	2,00	2,00
80OE4	X	X	X	X	X	X	X	3,00	X	2,00
80OE5	X	X	X	X	L	X	X	1,50	2,00	2,00
80OE6	X	X	X	X	X	X	3,00	0,75	2,00	2,00

TABELA 4 (Cont.)

Óleo volátil	Calb ATCC 10231	Ecoli 31/1	Ecoli 35A	Ecoli AVE 51/A	Ecoli ATCC 25922	Psa ATCC 9027	Efae ATCC 29212	Sau ATCC 29213	Smut ATCC 25175	Ssang ATCC 10556
80OE7							X	6,00	X	2,00
80OE8	NT	NT	NT	X	NT	NT	X	X	X	X
80OE9	NT	X	NT	X	X	X	NT	NT	NT	NT
80OE10	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	2,00
80OE11	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	2,00
80OE12	X	X	X	X	X	X	3,00	3,00	X	3,00
80OE13	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
80OE14	X	X	X	NT	X	X	3,00	1,50	X	2,00
530OE2	X	X	X	X	X	X	X	0,75	X	2,00
530OE3	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	2,00
530OE4	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	2,00
530OE5	X	X	X	X	X	X	X	1,50	X	3,00
530OE6	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	3,00
530OE7	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	2,00
530OE8	X	X	X	X	X	X	3,00	0,75	X	2,00
530OE9	X	X	X	X	X	X	X	1,50	3,00	2,00
530OE10	X	X	X	X	X	X	X	0,75	X	1,00
530OE11	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	X	2,00
530OE12	X	X	X	X	X	X	3,00	0,75	X	X
530OE13	X	X	X	X	L	X	X	1,50	X	X
530OE14	X	X	X	X	X	X	3,00	0,75	X	2,00
530OE15	X	X	X	X	X	X	3,00	1,50	3,00	1,00

Calb=*Candida albicans* (ATCC10231); Ecoli=*Escherichia coli* (ATCC25922) e Ecoli=*E. coli* cepas AVE51/A, 31/1A e 35A, Efae=*Enterococcus faecalis* (ATCC29212), Psa=*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 e 27853, Sau=*Staphylococcus aureus* (ATCC29213), Smut=*Streptococcus mutans* (ATCC25175) e Ssang=*Streptococcus sanguinis* (ATCC10556). X=cresceu; NT=não foram testadas.

Em relação aos estudos de citotoxicidade, os resultados de viabilidade celular de celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3), tratadas com diferentes concentrações (0,01 a 100 μ g/mL) do óleo volátil de *I. polyneura*, estão representados na figura 16, sendo a figura 16A a representação para os óleos do indivíduo 22, a figura 16B para o indivíduo 80 e a figura 16C para o indivíduo 530. Segundo os dados de IC₅₀ para os óleos dos três indivíduos, verifica-se que as células de tumor de próstata apresentaram-se mais sensibilizadas à ação dos óleos do que as células de mama, uma vez que apresentaram valores de IC₅₀ menores (Tabela 5).

Em média, os óleos voláteis obtidos do indivíduo 22 apresentaram o menor valor de IC₅₀ (22,28 \pm 3,83 μ g/mL), enquanto o indivíduo 80 apresentou IC₅₀ de 22,90 \pm 10,11 μ g/mL e o indivíduo 530 apresentou IC₅₀ de 28,48 \pm 3,57 μ g/mL contra células tumorais humanas de mama, sendo os óleos obtidos do indivíduo 22 os mais ativos, para este ensaio. Já para as células tumorais humanas de próstata, os óleos voláteis obtidos do indivíduo 22 apresentaram IC₅₀ de 14,69 \pm 4,33 μ g/mL, enquanto o indivíduo 80 apresentou IC₅₀ de 13,63 \pm 3,23 μ g/mL e o indivíduo 530 apresentou IC₅₀ de 12,48 \pm 4,03 μ g/mL, sendo este último, em média, o indivíduo que forneceu os óleos mais ativos contra câncer de próstata. A partir dessa análise, é possível identificar o óleo com maior citotoxicidade para cada indivíduo sendo que para o indivíduo 22 o óleo 22OE6 apresenta IC₅₀ menor, ou seja, uma atividade citotóxica mais efetiva, tanto contra as células de mama como para as de próstata. Para o indivíduo 80, verificou-se que o óleo 80OE11 apresentou IC₅₀ mais baixo contra células de tumor de mama, enquanto que o 80OE12 apresentou os IC₅₀ menor contra células de tumor de próstata. Para o indivíduo 530, os óleos 530OE3 e 530OE7 apresentaram IC₅₀ com valores menores, o que demonstrou atividade citotóxica significativa contra células de tumor de mama e de próstata, respectivamente. Segundo Aponte *et al.* (2007) e Santos *et al.* (2009), *I. juruensis*, também apresentou citotoxicidade para algumas linhagens celulares, como por exemplo K562 da medula óssea, o que evidencia o potencial citotóxico do gênero contra células tumorais.

FIGURA 15: Concentração bactericida mínima de cada óleo obtidos das 15 coletas das folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* contra as bactérias *Enterococcus faecalis* (15A); *Staphylococcus aureus* (15B); *Streptococcus mutans* (15C) e *Streptococcus sanguinis* (15D).

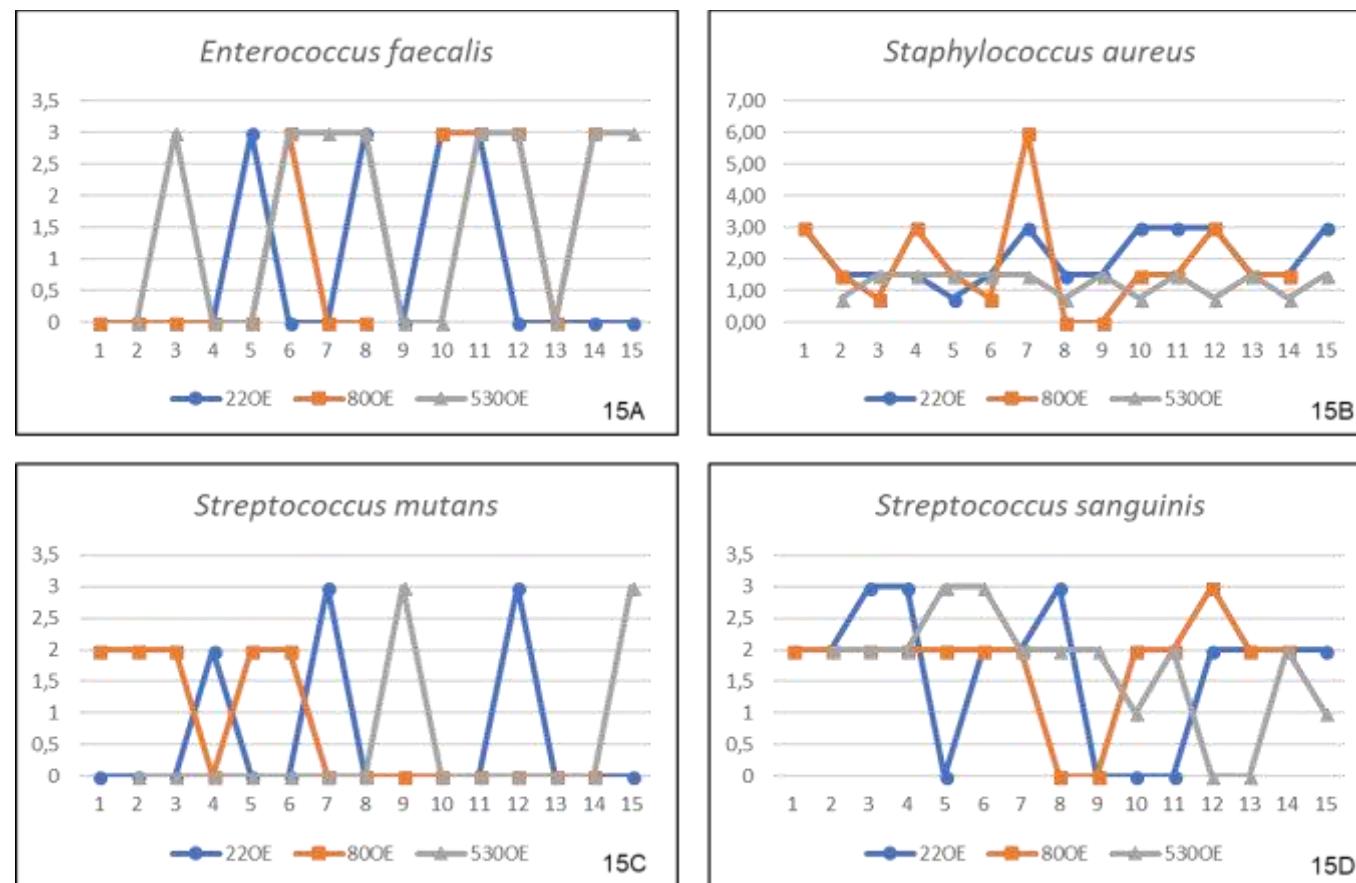


FIGURA 16: Gráficos dos resultados de viabilidade celular de celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3), tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos voláteis obtidos das coletas das folhas do indivíduo 22 (16A), indivíduo 80 (16B) e do indivíduo 530 (16C) de *Iryanthera polyneura*.

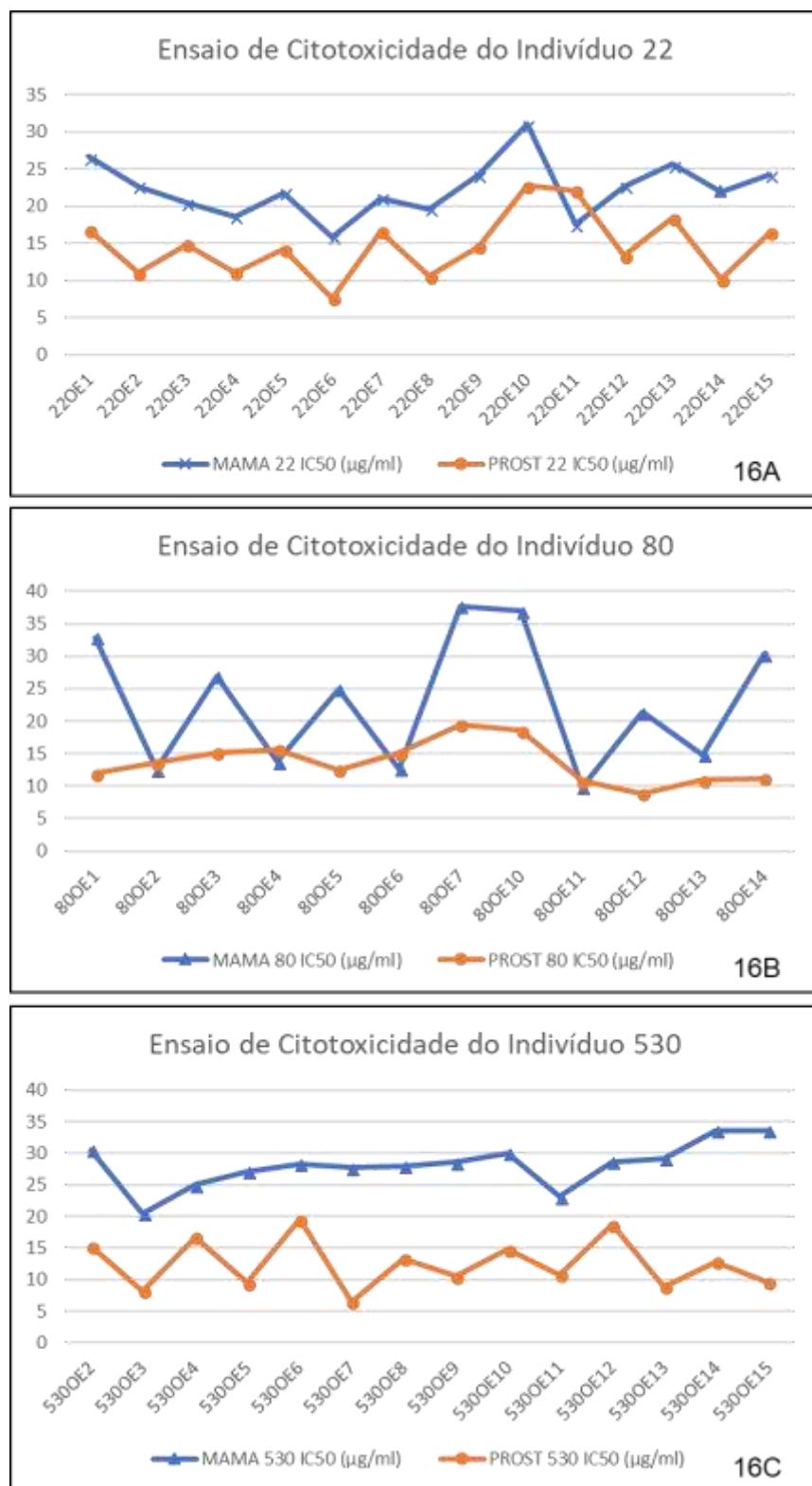


TABELA 5: Valores de IC₅₀ para linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3) resultantes da análise dos óleos voláteis das folhas coletadas dos três indivídos de *Iryenthala polyneura*, identificados como 22, 80 e 530.

Óleo	Mama IC ₅₀ (µg/mL)	Póstata IC ₅₀ (µg/mL)	Óleo	Mama IC ₅₀ (µg/mL)	Póstata IC ₅₀ (µg/mL)	Óleo	Mama IC ₅₀ (µg/mL)	Póstata IC ₅₀ (µg/mL)
22OE1	26,65	16,8	80OE1	32,87	11,91			
22OE2	22,66	10,99	80OE2	12,56	13,54	530OE2	30,49	15,23
22OE3	20,45	14,86	80OE3	26,93	15,13	530OE3	20,46	8,218
22OE4	18,65	11,08	80OE4	13,78	15,67	530OE4	24,97	16,68
22OE5	21,81	14,18	80OE5	24,96	12,54	530OE5	27,14	9,482
22OE6	15,87	7,611	80OE6	12,67	15,08	530OE6	28,34	19,49
22OE7	21,13	16,59	80OE7	37,68	19,43	530OE7	27,74	6,465
22OE8	19,61	10,56				530OE8	27,98	13,29
22OE9	24,2	14,58				530OE9	28,54	10,5
22OE10	31,12	22,74	80OE10	36,97	18,53	530OE10	30,05	14,77
22OE11	17,55	22,14	80OE11	9,818	10,74	530OE11	23,11	10,73
22OE12	22,7	13,33	80OE12	21,4	8,825	530OE12	28,66	18,69
22OE13	25,67	18,41	80OE13	14,82	10,95	530OE13	29,18	8,88
22OE14	21,97	10,13	80OE14	30,36	11,19	530OE14	33,62	12,8
22OE15	24,22	16,42				530OE15	33,58	9,524

A figura 17 representa a análise de correspondência canônica referente aos três indivíduos (22, 80 e 530), cujas folhas foram coletadas para obtenção dos óleos voláteis, analisados em função da ocorrência de todos os terpenos e sua porcentagem e em função dos resultados biológicos efetivos (ACC). A porcentagem acumulada foi de 95,704 no segundo eixo. Observa-se que o gráfico representado na figura 17 demonstra uma relação efetiva da atividade antibacteriana contra *S. sanguinis* mais evidente para os óleos voláteis 22OE5, obtido do indivíduo 22, e 80OE5, obtido do indivíduo 80. Ambos os óleos voláteis foram obtidos de folhas coletadas no mesmo dia de seus respectivos indivíduos, no período de chuvas. Os óleos voláteis 80OE2, 80OE3 e 80OE11, obtidos do indivíduo 80, estão mais relacionados com a atividade contra *S. mutans* e foram obtidos no período de chuvas, com exceção do óleo volátil 80OE2, obtido de folhas coletadas no período de seca. Vários óleos voláteis foram ativos contra *S. aureus*, e por isso, é possível se observar a correlação existente entre este micro-organismo e os óleos 22OE4, 22OE6, 22OE9, 22OE11, 22OE12, 22OE13,

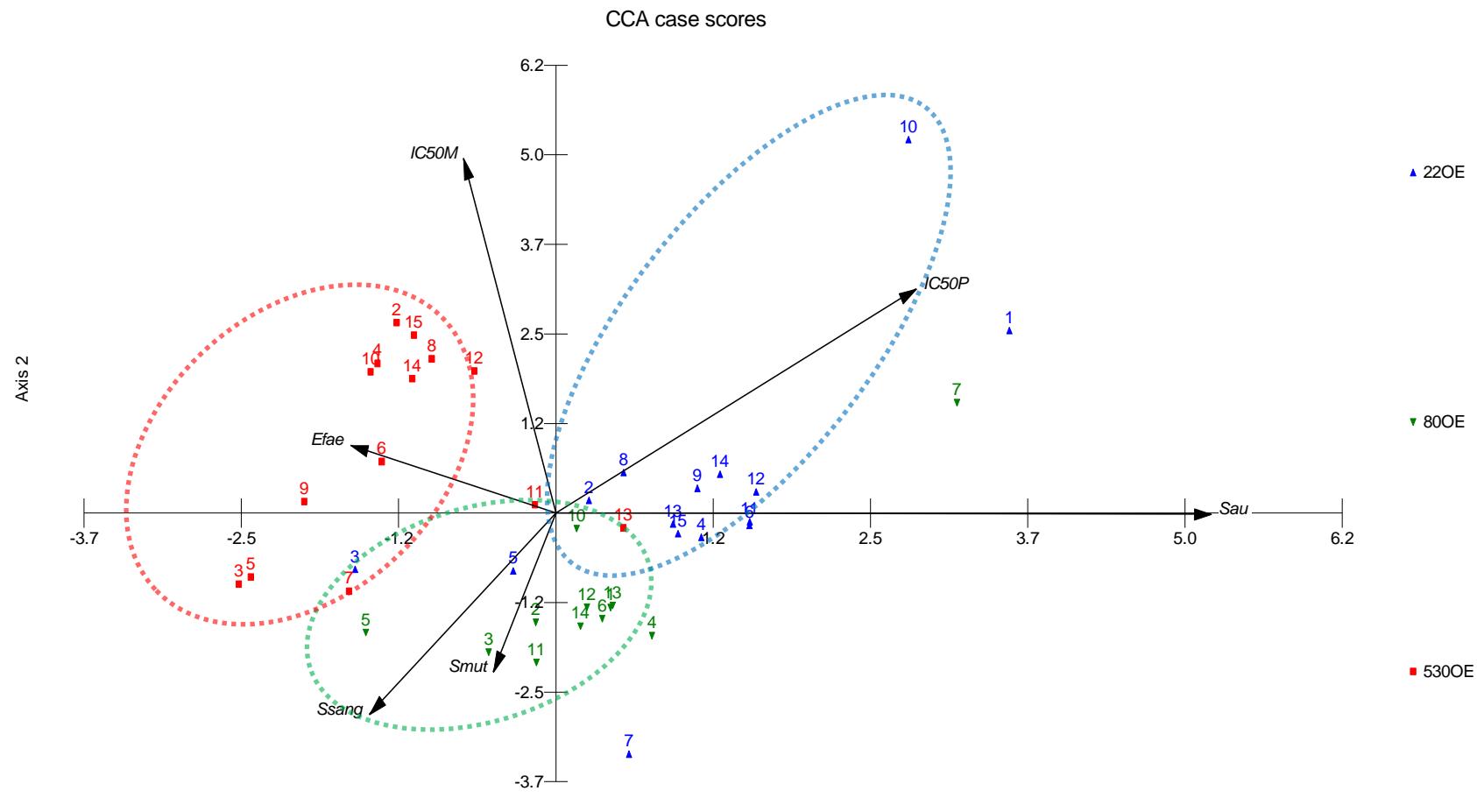
22OE14, 22OE15, 80OE10 e 530OE13, tendo sido a maioria destes coletados na estação seca. Observa-se também que os óleos voláteis 530OE6 e 530OE11, ambos coletados na estação seca, foram os mais relacionados com a atividade contra *E. faecalis*. Observa-se também que, de modo geral, os óleos do indivíduo 530 apresentaram-se menos ativos contra a célula de tumor de mama, confirmado os resultados dispostos na figura 16 e na tabela 5. Os óleos obtidos do indivíduo 22 foram menos ativos contra as células de tumor de próstata, em particular os óleos 22OE1, 22OE2 e 22OE8, coletados no período de seca, e o óleo 22OE10, coletado no período chuvoso.

A análise de correspondência canônica efetuada para os óleos e seus terpenos com destaque para a época do ano cujas folhas foram obtidas para obtenção dos terpenos (estação chuvosa e estação seca), em função dos resultados biológicos, pode ser visualizada na figura 18. Esta figura mostra que os óleos mais ativos para os micro-organismos foram coletados na estação chuvosa, assim como os óleos mais ativos contra células de mama. Já os óleos ativos contra próstata foram coletados no período de seca. Deve-se lembrar que os vetores apresentados nas figuras são obtidos em função dos valores de cada variável, e portanto, para os valores de IC₅₀ obtidos na análise de citotoxicidade para células de mama e de próstata, quanto maior o IC₅₀, menos citotóxico é o óleo, e portanto, menos interessante, em termos de atividade antitumoral (pois há a necessidade de se ter uma eficácia na morte celular). Deste modo, os maiores vetores representam, neste caso, os piores resultados entre os obtidos.

Considerando-se os terpenos dos três indivíduos e a relação com as atividades antimicrobianas, como mostra a figura 19, observou-se que α -bisaboleno, α -gurjuneno e cis-jasmona exercem influência sobre a atividade anti-*S. mutans* e anti- *S. sanguis*, bem como para a efetividade da atividade citotóxica contra células de câncer de próstata. A atividade contra células de tumor de mama é dada pelos óleos voláteis que apresentam em sua constituição globulol e δ -elemol. Já a atividade contra *S. aureus* é melhor observada nos óleos que apresentam a-cadinol e os monoterpenos p-cimen-8-ol, terpinen-4-ol e linalol. Segundo Dorman e Deans (2000), compostos voláteis que apresentam fenóis são mais ativos, assim como os que apresentam hidroxilas fenólicas, quando comparados a compostos que apresentam monoterpenos hidrocarbonetos,

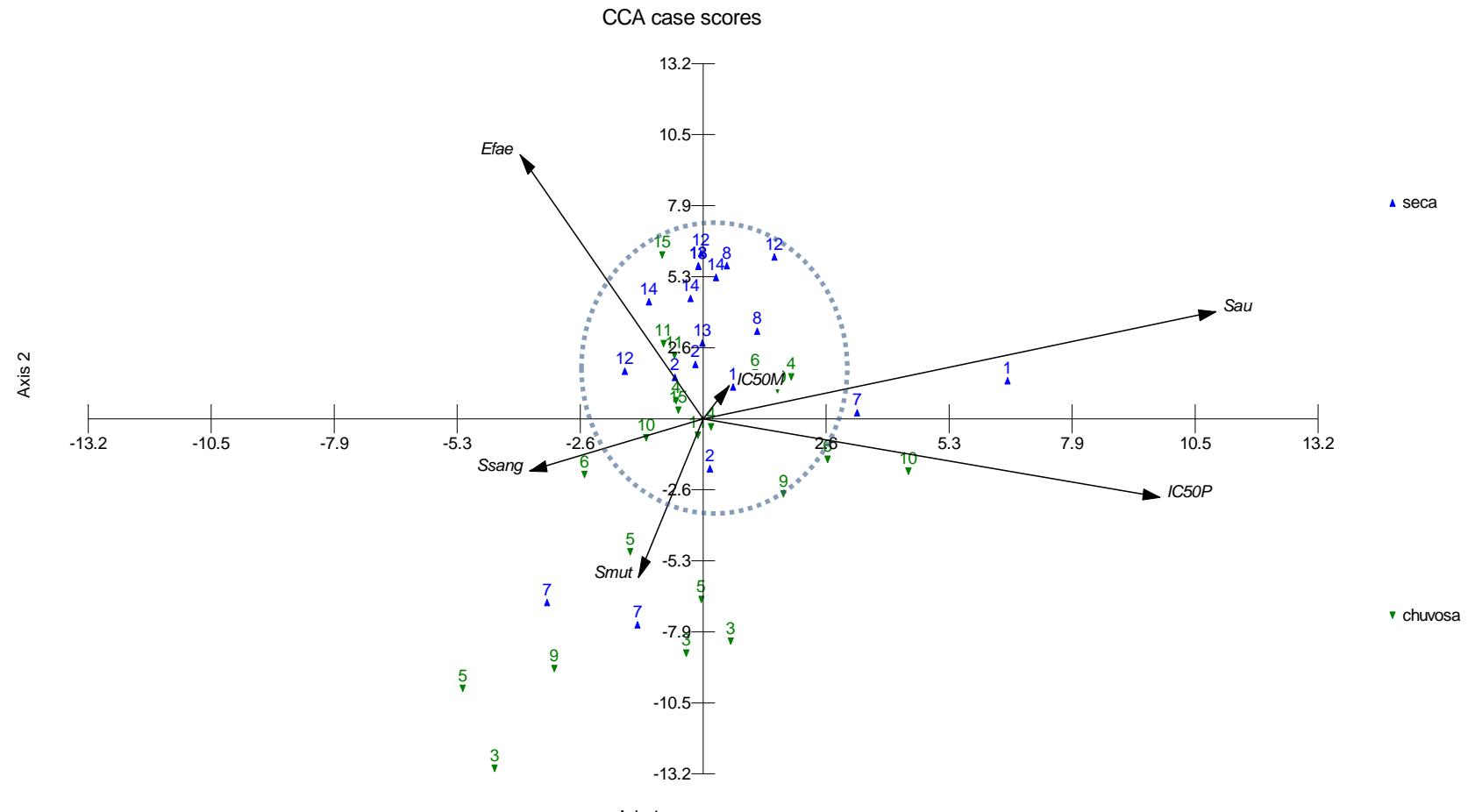
mesmo que cílicos. Deste modo, espera-se uma atividade antimicrobiana representativa nos compostos p-cimen-8-ol e terpinen-4-ol. Contrariando essa informação, os óleos voláteis mais ativos contra *E. faecalis* continham γ -eudesmol e eremofileno.

Figura 17. Análise de correspondência canônica feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando os óleos voláteis e a relação com as atividades antimicrobiana e citotóxica, com destaque para os indivíduos 22, 80 e 530.



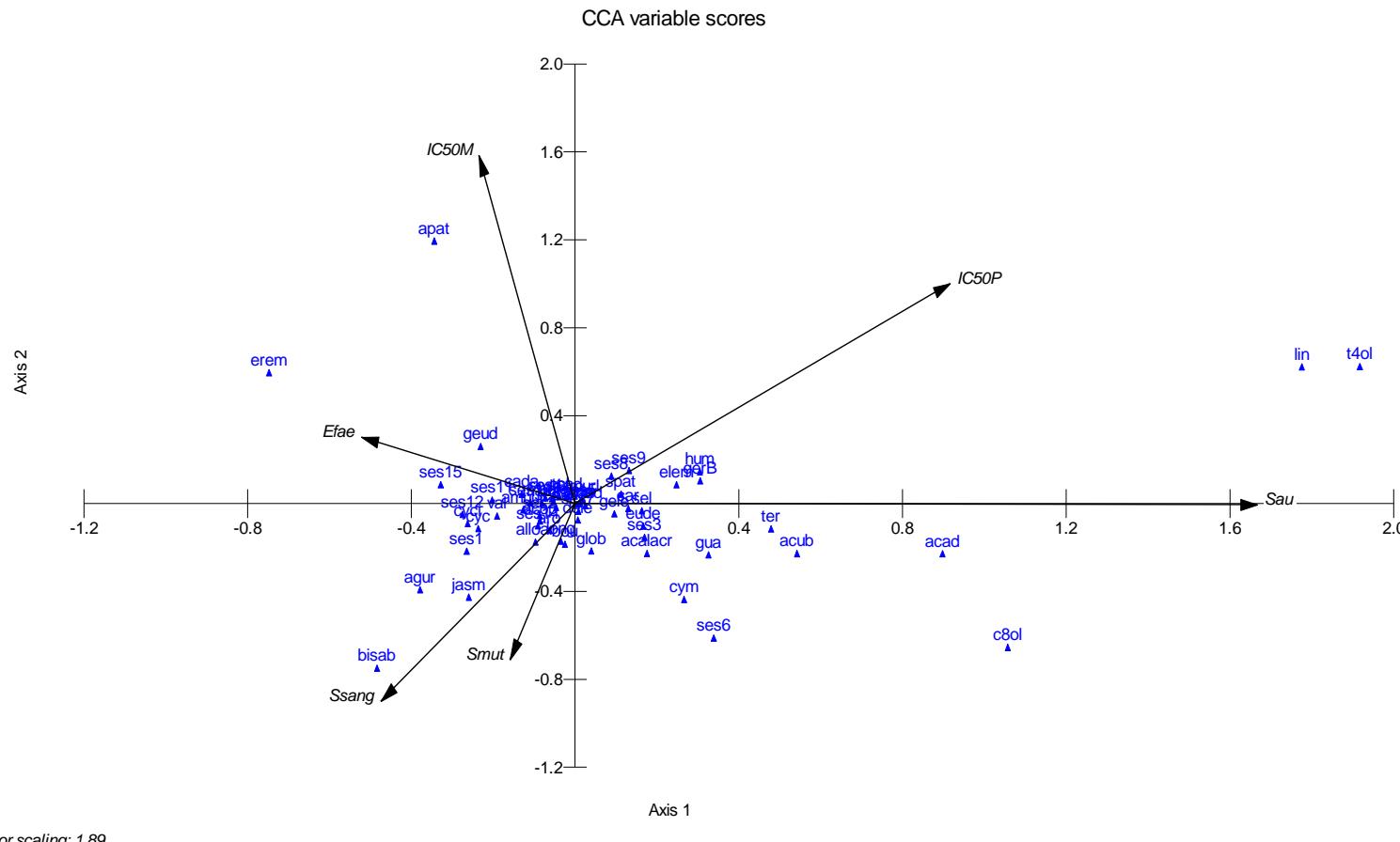
Vector scalina: 5.93

Figura 18. Análise de correspondência canônica feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando os óleos voláteis e a relação com as atividades antimicrobiana e citotóxica, com destaque para as estações do ano, seca e chuvosa.



Vector scaling: 13.62

Figura 19. Análise de correspondência canônica feita com 41 óleos essenciais obtidos de folhas de três indivíduos de *Iryanthera polyneura* mostrando os óleos voláteis e a relação com as atividades antimicrobiana e citotóxica, com destaque para os compostos orgânicos voláteis.



Conclusões

Verificou-se atividade antibacteriana significativa para os óleos obtidos de *I. polyneura*, em particular para as bactérias Gram-positivas. Também, de modo geral, os óleos apresentaram-se mais tóxicos para as células de tumor de próstata do que contra células de tumor de mama. Existem diferenças relacionadas a cada um dos indivíduos de *I. polyneura* estudados: embora todos apresentaram atividade antibacteriana e citotóxica, a pequena variação qualitativa na composição dos óleos voláteis de cada um dos indivíduos fez com que houvesse diferença nas respostas das atividades biológicas observadas.

Referências Bibliográficas

- APONTE, J.C.; VERÁSTEGUI, M.; MÁLAGA, E.; ZIMIC, M.; QUILIANO, M.; VAISBERG, A.J.; GILMAN, R.H.; HAMMOND, G.B. Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-Trypanosoma cruzi Activity of New Chalcones. *J. Med. Chem.* 51, 6230–6234. 2008.
- AUER, G.K.; WEIBEL, D.B. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry*, Vol.56(29), pp.3710-3724. 2017.
- CUCA, L.E.; BERNAL, F.A.; COY, C.A.; COY, E.D. Essential oil composition and antimicrobial activity of fruits of *Iryanthera ulei* W. from Colombia. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54, Nº 4. 2009.
- DORMAN HJD, DEANS SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* V. 88, p. 308-316, 2000.
- FERREIRA, G.C.; STURARO, M.J.; PELOSO, P.L.V. Amphibians and reptiles from Floresta Nacional de Pau-Rosa, Amazonas, Brazil: an important protected area at the heart of Amazonia. 47(3) p. 259 – 268. 2017.
- FÜRSTENBERG-HÄGG J.; ZAGROBELNY M.; BAK S. Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci*14: 10242–10297, 2013.
- HOPKINS, MJG. Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *J. Biogeogr.*, vol. 34, no. 8, p. 1400-1411. 2007.
- LISBOA, P.L.B.; LOUREIRO, A.A.; SILVA J.C.A. Identificação macroscópica do lenho das Myristicaceae da Amazônia Brasileira. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Botânica*. Vol. 1 (1/2): 37-65. 1984.
- LORENZETTI, E.M. Controle de doenças do morango com óleos essenciais e *Trichoderma* spp. (Tese Doutorado) Lavras. Brasil. 2012.
- MORAIS, S.K.R. Constituintes químicos de algumas espécies da Myristicaceae. Tese de doutorado. São Paulo, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. S.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from *sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 37-40. 2001.

PIRES, J.M.; PRANCE, G.T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (Eds). *Key environments Amazonia*. Pergamon Press. Oxford. New York. p.109145. 1985.

SANTOS, A.B.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, L.A.; SCHMIDT, T.M.; BAFFA, O. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 8, 1483-1492, 2009.

SHULTES, R.E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: Miscellaneous notes on biodynamic Plants of the Northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.14, n.1, p.125-158, 1985.

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.

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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.37, n.3, p. 379-384, 2004.

SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., PACIENCIA, M.L.B. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Die pharmazie* 61: 722-724. 2006.

SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., FRANA, S.A., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. *In vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Die pharmazie* 62: 798-800. 2007.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. 4ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 804p. 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(3): 472-508. 2008.
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; ALMEIDA, M.E.L.; BRAZ FILHO, R.; VON Bulow, M.V.; CORRÊA, J.J.L.; GOTTLIEB, O.R.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.S. Diarylpropanoids from Iryanthera polyneura. *Phytochemistry*. Vol. 18, pp.1015-1016. 1979.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, p. 10-15. 2001.
- AMARAL, L.P. *et al.* Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. V.58, n.1, p.12-21.2015.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 16(2): 189-203. 2002.
- ANVISA. Fitoterápicos. Disponível em: <https://goo.gl/EPs8xu> (Acesso em: 04.03.2018) 2018.
- AZIZ AB'SÁBER. Dossiê Amazônia brasileira I. In: Aziz Ab'Sáber: problemas da Amazônia brasileira. *ESTUDOS AVANÇADOS* 19 (53). 2005.
- BARBIERI, E. Biodiversidade: a variedade de vida no planeta Terra. In: Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. 16 p. 2010.
- BRAGA, P.I.S. Subdivisão fitogeográfica, tipos de vegetação, conservação e inventário florístico da floresta amazônica. *Supl. Acta Amazonica*, 9(4): 53-80. 1979.
- BRISKIN, D. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology* 124: 507-514. 2000.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CABRERRAA, D.C.; GOMESA, G.L.S.; FLACHB, A.; COSTAB, L.A.M.A.; ROSAA, G.R.; MOURAA, N.F. Evaluation of climatic factors on the yield and chemical composition of the essential oil of *Myrcarpus frondosus*. *Natural Product Research* Vol. 29, No. 7, 667–670. 2015.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*. v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 179-189. 2000.
- CAMPÉLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo volátil de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos

após convulsões induzidas pela pilocarpine. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10 (2): 116 – 126. 2011.

CAMPOS, A.C.F.B.; SOUZA, N.R.; SILVA, P.H.C.; SANTANA, A.P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. *Pesq. Vet. Bras.* 33(5):575-580. 2013.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis. *Journal of Dental Research*, Washington, v. 74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

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.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C , IV) da composição química dos óleos voláteis de quatro plantas do Cerrado. *CERNE*, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A.B.; Avaliação do teor e composição do óleo volátil de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Rev. Ciênc. Agron.* V.41 n.2, 2010.

CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 5663, 2005.

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

CONDÉ, T.M.; TONINI, H. Fitossociologia de uma Floresta Ombrófila Densa na Amazônia Setentrional, Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*, v.43, n.3, p.247-259, 2013.

COSTA, E.V.; DUTRA, L.M.; JESUS, H.C.R.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S.; SALVADOR, M.J.; PRATA, A.P.N. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil das folhas de *Annona veprerorum* Mart. (Annonaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34. Florianópolis. 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M. & LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: B. Buchanam, W. Gruissem & R. Jones (eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p.1367. 2000.

CUCA, L.E.; BERNAL, F.A.; COY, C.A.; COY, E.D. Essential oil composition and antimicrobial activity of fruits of *Iryanthera ulei* W. from Colombia. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54, Nº 4. 2009.

DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, E.S.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy Reserch*, v.22, n.10, p.1307-1310, 2008.

- DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. And *Clavibacte michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 22(1):39-4. 2003
- FERREIRA, G.C.; STURARO, M.J.; PELOSO, P.L.V. Amphibians and reptiles from Floresta Nacional de Pau-Rosa, Amazonas, Brazil: an important protected area at the heart of Amazonia. 47(3) p. 259 – 268. 2017.
- FERREIRA, L.V.; PRANCE, G.T. Species richness and floristic composition in four hectares in the Jaú National Park in upland forests in Central Amazonia. *Biodiversity and Conservation*, v.7, n.10, p.1349-1364, 1998.
- FLORA DO BRASIL. Myristicaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB169>>. Acesso em: 09 Mar. 2018.
- FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde, Brasília-DF/Brasil. 2007.
- FRIBERG I.M.; LITTLE S.; RALLI C. Macroparasites at peripheral sites of infection are major and dynamic modifiers of systemic anti-microbial pattern recognition responses. *Molecular Ecology*, 22, 2810–2826, 2013.
- FÜRSTENBERG-HÄGG J.; ZAGROBELNY M.; BAK S. Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci* 14: 10242–10297, 2013.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, M.R.F.; SCHUHI, R.S.; JACQUESI, A.L.B.; DORNELESI, G.G.; MONTANHAI, J.; ROEHEII, P.M.; BORDIGNONIII, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M.B.; LIMBERGERI, R.P. 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, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISITIN, J.A., COSTA, L.F.S. Produção in vitro de embriões. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca. p.261-291. 2008.
- GOTTLIEB, O.R. Chemical studies on medicinal Myristicaceae from Amazonia. *Journal of Ethnopharmacology*, v.1, n.4, p.309-323, 1979.
- GRANDLEMIRE, S.J. An Ecological Comparison of two Sympatric Primates *Saguinus fuscicollis* and *Callicebus moloch* of Amazonian Peru. In: *Primates*, 29 (4): p. 465-475. 1988.
- HANKS, G.W., DE CONNO, F., CHERNY, N., HANNA, M., KALSO, E., MCQUAY, H.J., MERCADANTE, S., MEYNADIER, J., POULAIN, P., RIPAMONTI, C., RADBRUCH, L., ROCA, I., CASAS, J., SAWE, J., TWYCROSS, R.G., VENTAFRIDDA, V. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. *British journal of cancer* 84(5): 587-593. 2001.
- HANLIDOU, E., KAROUSOUA, R., LAZARIB, D. Essential-Oil Diversity of *Salvia tomentosa* Mill. in Greece. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* – Vol. 11 pp. 1205-1215. 2014.
- HARTMANN, T. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831-2846. 2007.

HASENCLEVER, L., ANTUNES, A., KLEIN, H., MENDES, F., LOPES, R. HOEFLE, D., CASTRO, L.L., DONATI, L., CACICEDO, T. Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos brasileiro. Relatório Final do Centro de Gestão de Estudos Estratégicos – CGEE. Brasília-DF/Brasil. 2009.

HEINZMANN, B.M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C.M.O. Óleos voláteis. In: C.M.O. SIMÕES, E.P. SCHENKEL, G. GOSMANN, J.C.P. DE MELLO, L.A. MENTZ & P.R. PETROVICK eds. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento, Porto Alegre, Artmed, p. 168-183. 2017.

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 voláteis de condimentos e especiarias, B. CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20.1999.

HOPKINS, M.J.G. Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *J. Biogeogr.*, vol. 34, no. 8, p. 1400-1411. 2007.

INCA. Instituto Nacional de câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em: 05.06.2018.

JULIÃO, L. D. S.; PICCINELLI, A. L.; MARZOCCO, S.; LEITÃO, S. G.; LOTTI, C.; AUTORE, G.; RASTRELLI, L. Phenylethanoid Glycosides from Lantana fucata with in Vitro Anti-inflammatory Activity. *J. Nat. Prod.* [S.I.], v. 72, p. 1424-1428, 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.

KAROUSOU, R., KOUREAS, D.N., KOKKINI, S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry* 66: 2668-2673. 2005.

KINZEY, W.G. The Titi Monkeys, Genus *Callicebus*. In: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Vol. I. Eds. Coimbra-Filho A. & R.A. Mittermeier. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 241-276. 1981.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R.M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento, Porto Alegre, Artmed. 1999.

LEMOS, J.A.; QUIVEY R.G.; KOO, JR.H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigma. *Microbiology*. 159, 436–445. 2013.

LIMA, R. P., KAPLAN, M.A.C., CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*. v.10, n.2, p.71-77, 2003.

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

LISBOA, P.L.B.; LOUREIRO, A.A.; SILVA J.C.A. Identificação macroscópica do lenho das Myristicaceae da Amazônia Brasileira. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Botânica*. Vol. 1 (1/2): 37-65. 1984.

- LOPES, N.P.; SANTOS, P.A.; KATO, M.O. YOSHIDA, M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, n.10, p.1255-1257, 2004.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p. 2009:
- LOUREIRO, A.; DE FREITAS, M.D.; DE VASCONCELLOS F.J. Estudo anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae) da Amazônia. *Acta Amazônica* 19 : 415-465. 1989.
- MACIAS, F.A., GALINDO, J.L.G., GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917-2936. 2007.
- MAREGESI, S. M., L. PIETERS, O. D. NGASSAPA, S. APERS, R. VINGERHOETS, P. COS, D. A. V. BERGHE; A. J. VLIETINCK. Screening of Some Tanzanian Medicinal Plants from Bunda District for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activities. *Journal of ethnopharmacology*, 119, 58-66. 2008.
- MCKEY, D. The ecology of coevolved seed dispersal systems. *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin. Vol. 246. 158-191. 1975.
- MESA-SIVERIO, D.; MACHÍN, R.P.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; LOCK, O. Structure and estrogenic activity of new lignans from *Iryanthera lancifolia*. *Bioorg Med Chem*. 16(6):3387-94. 2008.
- MING, D.S.; LÓPEZ, A.; HILLHOUSE, B.J.; FRENCH, C.J.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Bioactive Constituents from *Iryanthera megistophylla*. *J. Nat. Prod.*, 65 (10), pp 1412–1416. 2002.
- MONKS A.; SCUDIERO D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766. 1991.
- MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos voláteis. *Horticultura Brasileira* 27: S4050S4063. 2009.
- MORAIS, S.K.R. Constituintes químicos de algumas espécies de Myristicaceae. Tese de doutorado. São Paulo, 2008.
- MORAIS, S.K.R.; TEIXEIRA, A.F.; TORRES, Z.E. S.; NUNOMURA, S.M.; KANASHIRO, E.H.Y.; LINDOSOF, J.A.L.; YOSHIDA, M. Biological Activities of Lignoids from Amazon Myristicaceae Species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 6, 1110-1118, 2009.
- MOTILA, S.; MAHARAJ, R.G. Nutmeg extracts for painful diabetic neuropathy: a randomized, double-blind, controlled study. *J. Altern. Complement. Med.*, v.19, n.4, p.347-52, 2013.
- MURRAY P.R. *Microbiologia Médica*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 24; 403 (6772):853-8. 2000.
- NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

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 voláteis: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 17, n. 1, p. 2 e 5, 2007.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022-1037. 2003.

NOLLA, D.; SEVERO, B.M.A.; MIGOTT, A.M.B.M. *Plantas Medicinais*. 2 ed. Passo Fundo: UPF, 2005.

NOVAES FILHO, J.P.; SELVA, E.C.; COUTO, E.G.; LEHMANN, J.; JOHNSON, M.S.; RIHA, S.J. Distribuição espacial de carbono em solo sob floresta primária na Amazonia Meridional. *Revista Árvore*, v.31, n.1, p.83-92, 2007.

NUNOMURA, S.; YOSHIDA, M. Lignans and benzoic acid derivatives from pericarps of *Virola multinervia* (Myristicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, n.10, p. 985-987, 2002.

OLIVEIRA, A.N.; AMARAL, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v.34, n.1, p.21-34, 2004.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E. The Global 200: A Representation Approach to Conserving the Earth's Most Biologically Valuable Ecoregions. *Conserv. Biol.* 12, nº. 3, p.502. 1998.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D'AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. *BioScience* 51(11):933-938. 2001.

PAS - Plano Amazônia Sustentável. Diretrizes para o desenvolvimento sustentável da Amazônia brasileira. / Presidência da República. – Brasília: MMA, 2008.

PAULO, M. Q.; Estudo fitoquímico das folhas de *Virola surimamensis* e *Osteophloeum platyspermum*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.; 1983.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. S.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from *sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 37-40. 2001.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10. 2004.

PERRY, N.B., ANDERSON, R.E., BRENNAN, N.J., DOUGLAS, M.H., HEANEY, A.J., MCGIMPSEY, J.A., SMALLFIELD, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plantp, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2048-2054. 1999

PINHEIROA, C.G., MACHADOB, C.M., AMARALA, L.P., SILVAA, D. T., ALMEIDAC, C. A. A., LONGHIA, S.J., MALLMANC, C.A., HEINZMANNA, B.M. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. *Braz. J. Biol.* vol. 76, no. 1, pp. 176-184. 2016.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: UFLA/Faepe, 2002.

- PIRES, J.M. 1973. Tipos de vegetação da Amazônia. *Publicações Avulsas Museu Goeldi*, Belém. 20: 179-202.
- PIRES, J.M.; PRANCE, G.T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. In: Prance, G.T.; Lovejoy, T.E. (eds.) *Key Environments: Amazonia*. Pergamon Press, Oxford, p. 109-145. 1985.
- PIRES-O'BRIEN, M.J.; O'BRIEN, C.M. Ecologia e modelamento de florestas tropicais. Belém:FCAP. 400p. 1995.
- PITAROKILIA, D., CONSTANTINIDIS, T., SAITANIS, C., TZAKOU, O. Volatile Compounds in *Thymus* sect. *Teucrioides* (Lamiaceae): Intraspecific and Interspecific Diversity, Chemotaxonomic Significance and Exploitation Potential. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* – Vol. 11 pp. 593-618. 2014.
- PITMAN, N.C.M.; TERBORG, S.R.; SILVAN, S.R.; NUNES, P.V.; NEIL, D.A.; CERON, C.E.; PALACIOS, W.A. Dominance and distribution of tree species in upper Amazonia terra firme. *Ecology*, v. 82, n.11, p. 2101-2117, 2001.
- RAGUSA, A., CENTONZE, C., GRASSO, M.E., LATRONICO, M.F., MASTRANGELO, P.F., FANIZZI, F.P., MAFFIA, M. Composition and Statistical Analysis of Biophenols in Apulian Italian EVOOs. *Foods* 6, 90. 2017.
- REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Manaus: INPA/SEBRAE, 2002.
- RIBEIRO, J.E.L. DA S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A. DA S.; BRITO, J.M. DE; SOUZA, M.A.D.DE; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C.F.DA; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA.816p. 1999.
- RIZZINI, C.T. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. Âmbito Cultural Edições Ltda. 2a ed.747p. 1997.
- RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. *Acta Amazonica*, v.10, n.1, p.5-127, 1980.
- ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical constituents from Myristicaceae. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.49, n.5/6, p. 354-353, 1997.
- ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulphydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, v. 189, p. 82-89, 2011.
- RUSSO T.A, JOHNSON J.R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*.181:1753-4. 2000
- SAATCHI, S.; HOUGHTON, R.; ALVALA S.R.; SOARES, J.; YU, Y. Distribution of aboveground live biomass in the Amazon basin. *Global Change Biology*, 13:816-837. 2007.
- SARTORELLI, P.; YOUNG, C.M.M.; KATO, M.J. AntifungaLignans from the arils of *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, v.47, n.6, p. 1003-1006, 1998.

- SCHULTES, R.E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: Miscellaneous notes on biodynamic Plants of the Northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.14, n.1, p.125-158, 1985.
- SCHULTES, R.E. Ethnopharmacological Conservation: a key to progress in medicine. *Supl. Acta amazônica*, 18(1-2):393-06. 1988.
- SCHULTES, R.E.; HOLMSTED, B. De plantis toxicaris et. mundo novo tropicale commentationes. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous Plants of South America. *Lloydia*, v.34, p.61-78, 1971.
- SCHWOB, I., BESSIERE, J.M., MASOTTI, V., VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical systematics and ecology* 32: 735-745. 2004.
- SETZ, E.Z.F. Ecologia alimentar de um grupo de parauacus (*Pithecia pithecia chrysocephala*) em um fragmento florestal na Amazônia Central. Unpublished PhD thesis, Inst. Biol. Unicamp, Campinas, SP. 1993.
- SILVA, D.H.S. Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*. Tese de doutorado. Inst. Química. Universidade de São Paulo. 1997.
- SILVA, D.H.S.; PEREIRA, F.C.; ZANONI, M.V.B.; YOSHIDA, M. Avaliação do comportamento eletroquímico de antioxidantes extraídos dos frutos da *Iryanthera juruensis* (Myristicaceae). *Eclet. Quím.*, v.30 n.3, p. 15-21, 2005.
- SILVA, D.H.S.; PEREIRA, F.C.; ZANONI, M.V.B.; YOSHIDA, M. Lipophylic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. *Phytochemistry*, v.57, n.3, p.437-442, 2001.
- SILVA, D.H.S.; ZHANG, Y. SANTOS, L.A.; BOLZANI, V.S.; NAIR, M.G. Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 e 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.77, p. 2569-2574, 2007.
- SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, v.19, n.3, p.689-694, 2005.
- SILVA, M. F.; SILVA, J. A. C.; Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil – II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. *Acta Amazônica*. vol. 38(2), 207 – 212, 2008.
- SILVA-JÚNIOR, N.J., CINTRA, C.E.D., SILVA, H.L.R., COSTA, M.C., SOUZA, C.A., PACHÊCO-JÚNIOR, A.A., GONÇALVES, F.A. Herpetofauna, Ponte de Pedra hydroelectric power plant, states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 5(3): 518-525.
- SIMÕES, C.M.O. & SCHENCKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12(1), 35-40. 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. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.1102. 2010.
- SIMPSON, B.S. Dioecy in plants – Is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Medica* 79: 613-615. 2013.

- 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. *Horticultura Brasileira* 26: 40-44. 2008.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. São Paulo: Instituto Plantarum. 639p. 2005
- SUFFREDINI, I.B.; DALY, D.C. O Rio Negro como Cenário na Busca de Novos Medicamentos. In: Varella, D. (coord.). *Florestas do Rio Negro*. São Paulo: Companhia das Letras, p.255-281. 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.37, n.3, p. 379-384, 2004.
- SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., PACIENCIA, M.L.B. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Die pharmazie* 61: 722-724. 2006.
- SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., FRANA, S.A., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. In vitro breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Die pharmazie* 62: 798-800. 2007.
- SUFFREDINI, I.B.; SOUSA, S.R.N.; FRANA, S.A.; SUFFREDINI, H.B.; DÍAZ, I.E.C.; PACIENCIA, M.L.B. Multivariate Analysis of the Terpene Composition of *Osteophloeum platyspermum* Warb. (Myristicaceae) and Its Relationship to Seasonal Variation Over a Two-Year Period. *TEOP* 19 (6) 1380 – 1393. 2016.
- TAIZ L., ZEIGER E. *Fisiologia vegetal*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed. 720 p., 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.
- 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. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.
- TINOCO, M.T.; MARTINS, M.R.; CRUZ-MORAIS, J. Actividade antimicrobiana do óleo volátil do *Foeniculum vulgare* Miller. *Rev. de Ciências Agrárias*, v. 30, n. 1, p.448-454, 2007.
- TURNER, I. M. *The Ecology of Trees in the Tropical Rain Forest*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001.
- VAN DER PIJL, L. *Principles of dispersal in higher plants*. 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin. 1982.
- VAN ROOSMALEN, M.G.M. *Fruits of the Guianan flora*. Utrecht University, Netherlands, p. 483. 1985.
- VAN ROOSMALEN, M.G.M.; BARDALES, M.P.D.; GARCIA, O.M.C.G. Frutos da Floresta Amazônica. Parte I: Myristicaceae. *Acta Amazonica* 26(4): 209-264.1996.
- VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE. Rio de Janeiro. 124 p. 1991.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism, 1 ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29, 2000.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

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

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos voláteis e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Journal of Pharmacognosy*, Aimbiré, v. 19, n. 4, p 828-933, 2009.

APÊNDICE 1

Tabela com a composição dos compostos voláteis contidos nos óleos essenciais obtidos das folhas do indivíduo 22OE de *Iryanthera polyneura*. São dados: Índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e suas porcentagens.

Correção	Composição dos compostos voláteis contidos nos óleos essenciais obtidos das folhas do indivíduo 22OE de <i>Iryanthera polyneura</i> . São dados Índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e suas porcentagens.																																															
	Coleta 1 (22OE1)			Coleta 2 (22OE2)			Coleta 3 (22OE3)			Coleta 4 (22OE4)			Coleta 5 (22OE5)			Coleta 6 (22OE6)			Coleta 7 (22OE7)			Coleta 8 (22OE8)			Coleta 9 (22OE9)			Coleta 10 (22OE10)			Coleta 11 (22OE11)			Coleta 12 (22OE12)			Coleta 13 (22OE13)			Coleta 14 (22OE14)			Coleta 15 (22OE15)					
	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%															
p-Cimeno	1027	*	0.08	1109	*	0.40	1109	*	0.43	1109	*	0.15	1109	*	0.09	1027	*	0.08	1109	*	0.16	1109	*	0.13	1109	*	0.13	1109	*	0.13	1109	*	0.13	1109	*	0.13												
Linalool	1109	*	0.40	1109	*	0.43	1109	*	0.15	1109	*	0.09	1109	*	0.08	1109	*	0.16	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12												
Terpeno-4-ol	1162	*	0.43	1109	*	0.15	1109	*	0.09	1109	*	0.15	1109	*	0.09	1109	*	0.16	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12	1109	*	0.12												
p-Cimeno-8-ol	1109	*	0.15	1109	*	0.09	1109	*	0.08	1109	*	0.14	1109	*	0.08	1109	*	0.15	1109	*	0.16	1109	*	0.15	1109	*	0.16	1109	*	0.15	1109	*	0.16	1109	*	0.15												
o-Terpinedio	1337	1335	0.36	1337	1335	1.28	1337	1335	0.98	1337	1335	1.11	1337	1335	1.27	1337	1335	1.08	1337	1335	2.67	1337	1335	0.63	1337	1335	1.35	1337	1335	0.68	1337	1335	0.85	1337	1335	0.54	1337	1335	1.26									
o-Citral	1348	1345	0.17	1348	1345	1.49	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93	1348	1345	0.93									
Citrofuranoleno	1364	*	0.36	1364	*	1.63	1364	*	0.23	1364	*	0.88	1364	*	0.23	1364	*	0.66	1364	*	0.19	1364	*	0.37	1364	*	0.35	1364	*	0.17	1364	*	0.30	1364	*	0.30	1364	*	0.30									
Ciclopentaneno	1366	1369	1.00	1366	1369	0.46	1366	1369	0.62	1366	1369	1.80	1366	1369	1.01	1366	1369	1.24	1366	1369	0.56	1366	1369	1.07	1366	1369	0.95	1366	1369	0.25	1366	1369	0.95	1366	1369	0.95	1366	1369	0.95									
o-Illangene	1370	1373	0.13	1370	1373	0.39	1370	1373	0.32	1370	1373	0.40	1370	1373	0.25	1370	1373	0.22	1370	1373	0.47	1370	1373	0.17	1370	1373	0.17	1370	1373	0.17	1370	1373	0.17	1370	1373	0.17												
o-Copaeno	1375	1374	0.47	1375	1374	0.78	1375	1374	0.25	1375	1374	0.87	1375	1374	0.25	1375	1374	0.22	1375	1374	0.47	1375	1374	0.17	1375	1374	0.39	1375	1374	0.37	1375	1374	0.37	1375	1374	0.37												
B-Buturomoeno	1383	1387	0.68	1383	1387	1.52	1383	1387	0.50	1383	1387	1.55	1383	1387	0.72	1383	1387	1.60	1383	1387	0.63	1383	1387	0.63	1383	1387	0.23	1383	1387	0.19	1383	1387	0.46	1383	1387	0.46												
p-Elemento	1391	1389	2.57	1391	1389	3.00	1391	1389	3.61	1391	1389	3.24	1391	1389	3.47	1391	1389	3.29	1391	1389	2.68	1391	1389	2.79	1391	1389	1.76	1391	1389	3.38	1391	1389	1.84	1391	1389	2.08	1391	1389	1.47	1391	1389	2.28						
B-Carafoleno	1417	1417	0.28	1417	1417	0.61	1417	1417	0.43	1417	1417	0.47	1417	1417	0.53	1417	1417	0.47	1417	1417	1.47	1417	1417	0.35	1417	1417	1.47	1417	1417	0.51	1417	1417	0.51	1417	1417	0.51	1417	1417	0.51									
o-Eugenol	1421	*	0.38	1421	*	1.00	1421	*	0.88	1421	*	0.74	1421	*	0.88	1421	*	0.74	1421	*	0.88	1421	*	0.61	1421	*	0.88	1421	*	0.61	1421	*	0.88	1421	*	0.61	1421	*	0.88									
o-Eugenona	1424	*	0.56	1424	*	1.53	1424	*	0.51	1424	*	1.43	1424	*	0.51	1424	*	1.43	1424	*	0.51	1424	*	0.61	1424	*	1.43	1424	*	0.51	1424	*	1.43	1424	*	0.51	1424	*	1.43									
Aromadendreno	1437	1439	0.43	1437	1439	0.77	1437	1439	0.89	1437	1439	0.66	1437	1439	1.08	1437	1439	0.42	1437	1439	1.28	1437	1439	0.58	1437	1439	0.51	1437	1439	0.44	1437	1439	0.44	1437	1439	0.44	1437	1439	0.44									
o-Humuleno	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40	1442	*	0.43	1442	*	1.40						
o-Pathenoeno	1452	*	0.16	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45	1452	*	0.15	1452	*	1.45						
Alo-Aromadeno	1459	1458	0.20	1459	1458	0.20	1459	1458	0.26	1459	1458	0.39	1459	1458	0.16	1459	1458	0.21	1459	1458	0.16	1459	1458	0.18	1459	1458	0.18	1459	1458	0.22	1459	1458	0.22	1459	1458	0.22	1459	1458	0.22									
t-Muuleno	1475	1476	1.19	1475	1476	3.46	1475	1476	4.66	1475	1476	2.40	1475	1476	4.78	1475	1476	2.16	1475	1476	4.48	1475	1476	2.31	1475	1476	4.78	1475	1476	2.89	1475	1476	4.78	1475	1476	2.89	1475	1476	4.78	1475	1476	4.78						
o-Amoreno	1479	1483	0.56	1479	1483	1.15	1479	1483	1.40	1479	1483	1.19	1479	1483	1.08	1479	1483	0.84	1479	1483	1.62	1479	1483	1.62	1479	1483	1.01	1479	1483	1.01	1479	1483	0.97	1479	1483	1.01	1479	1483	1.01									
Sesqui-1	1484	*	0.47	1484	*	0.70	1484	*	1.50	1484	*	0.64	1484	*	0.99	1484	*	0.47	1484	*	0.94	1484	*	0.61	1484	*	0.69	1484	*	0.62	1484	*	0.40	1484	*	0.55	1484	*	0.38	1484	*	0.55	1484	*	0.38			
o-Linalool	1493	*	1.66	1493	*	1.39	1493	*	1.41	1493	*	1.48	1493	*	1.48	1493	*	1.65	1493	*	1.20	1493	*	1.49	1493	*	1.60	1493	*	1.30	1493	*	1.61	1493	*	1.30	1493	*	1.61	1493	*	1.30						
o-Muuleno	1499	1500	0.69	1499	1500	3.24	1499	1500	4.69	1499	1500	2.92	1499	1500	2.67	1499	1500	1.50	1499	1500	4.63	1499	1500	2.18	1499	1500	4.69	1499	1500	1.50	1499	1500	3.23	1499	1500	1.50	1499	1500	3.23									
o-Cinoleno	1513	1513	*	1513	1513	2.63	1513	1513	3.09	1513	1513	1.02	1513	1513	2.77	1513	1513	2.65	1513	1513	1.92	1513	1513	2.27	1513	1513	1.54	1513	1513	1.54	1513	1513	1.54	1513	1513	1.54	1513	1513	1.54									
Sesqui-3	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61	1504	*	2.61
Calatemon	1522	1521	0.74	1522	1521	1.82	1522	1521	2.29	1522	1521	1.99	1522	1521	2.23	1522	1521	2.58	1522	1521	2.80	1522	1521	2.31	1522	1521	2.52	1522	1521	2.73	1522	1521	2.11	1522	1521	1.48	1522	1521	1.48	1522	1521	1.48						
Valenceno	1533	1533	0.72	1533	1533	0.75	1533	1533	0.70	1533	1533	0.82	1533	1533	0.52	1533	1533	0.75	1533	1533	0.52	1533	1533	0.70	1533	1533	0.62	1533	1533	0.52	1533	1533	0.44	1533	1533	0.44	1533	1533	0.44									
e-Cedrino	1541	1544	0.98	1541	1544	1.81	1541	1544	0.93	1541	1544	1.01	1541	1544	0.64	1541	1544	0.92	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72	1541	1544	0.72									
o-Cedrino	1547	1548	4.77	1549	1548	1.73	1549	1548	1.56	1549	1548	1.36	1549	1548	1.25	1549	1548	1.03	1549	1548	1.25	1549	1548	1.19	1549	1548	1.05	1549	1548	1.05	1549	1548	1.05	1549	1548	1.05	1549	1548	1.05									
o-Cedrino B	1601	1601	1.30	1601	1601	1.60	1601	1601	1.79	1601	1601	1.19	1601	1601	1.16	1601	1601																															

Tabela com a composição dos compostos voláteis contidos nos óleos essenciais obtidos das folhas do indivíduo 80OE de *Iryanthera polyneura*. São dados: índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e suas porcentagens.

Tabela com a composição dos compostos voláteis contidos nos óleos essenciais obtidos das folhas do indivíduo 5300OE de *Iryanthera polyneura*. São dados: Índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e suas porcentagens.

Óleo	Composição dos compostos voláteis contidos nos óleos essenciais obtidos das folhas do indivíduo 5300OE de <i>Iryanthera polyneura</i> . São dados: Índices de Retenção, ordem de saída dos compostos e suas porcentagens.																																									
	Coleta 2 (5300E2)			Coleta 3 (5300E3)			Coleta 4 (5300E4)			Coleta 5 (5300E5)			Coleta 6 (5300E6)			Coleta 7 (5300E7)			Coleta 8 (5300E8)			Coleta 9 (5300E9)			Coleta 10 (5300E10)			Coleta 11 (5300E11)			Coleta 12 (5300E12)			Coleta 13 (5300E13)			Coleta 14 (5300E14)			Coleta 15 (5300E15)		
	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%	IR	IR ref.	%									
p-Cineno																																										
Linalol																																										
Terpen-4-ol																																										
p-Cimeno-6-ol																																										
a-Terpined																																										
8-Elemeno	1337	1335	0,84	1337	1335	3,11	1337	1335	0,95	1337	1335	3,10	1337	1335	1,92	1337	1335	1,87	1337	1335	1,60	1337	1335	1,38	1337	1335	1,01	1337	1335	0,70	1337	1335	1,16	1337	1335	0,82						
a-Cubebeno	1349	1345	0,33	1349	1345	0,43	1349	1345	0,40	1349	1345	0,25	1349	1345	0,28	1349	1345	0,24	1349	1345	0,17	1349	1345	0,13	1349	1345	0,17	1349	1345	0,17	1349	1345	0,17	1349	1345	0,17						
Cicloisotetreno	1364	1364	0,96	1364	1364	1,35	1364	1364	0,32	1364	1364	0,86	1364	1364	0,48	1364	1364	0,80	1364	1364	0,27	1364	1364	0,66	1364	1364	0,37	1364	1364	0,24	1364	1364	0,36	1364	1364	0,25	1364	1364	0,16			
Ciclopenteno	1375	1374	0,35	1375	1374	1,00	1375	1374	0,68	1375	1374	0,17	1375	1374	0,34	1375	1374	0,29	1375	1374	0,26	1375	1374	0,44	1375	1374	0,16	1375	1374	0,23	1375	1374	0,23	1375	1374	0,45						
a-Isopreno																																										
a-Crotono																																										
8-Bourboneno	1383	1387	1,02	1383	1387	0,33	1383	1387	0,87	1383	1387	0,42	1383	1387	0,61	1383	1387	0,31	1383	1387	0,40	1383	1387	0,29	1383	1387	0,23	1383	1387	0,21	1383	1387	0,25	1383	1387	0,25						
8-Esmereno	1381	1389	3,88	1391	1389	4,72	1391	1389	3,26	1391	1389	4,11	1391	1389	3,65	1391	1389	3,36	1391	1389	3,02	1391	1389	3,33	1391	1389	3,74	1391	1389	2,93	1391	1389	3,46	1391	1389	2,73	1391	1389	2,63	1391	1389	2,08
g-Gurumeno																																										
8-Casteleno	1417	1417	0,36	1417	1417	1,41	1417	1417	0,50	1417	1417	1,58	1417	1417	1,12	1417	1417	1,03	1417	1417	1,09	1417	1417	1,04	1417	1417	0,84	1417	1417	0,64	1417	1417	0,68	1417	1417	0,54						
Sesq 1																																										
y-Elemeno	1433	1434	0,35	1433	1434	1,04	1433	1434	0,42	1433	1434	1,20	1433	1434	0,83	1433	1434	0,76	1433	1434	0,20	1433	1434	0,68	14-E+4533	1434	0,66	1433	1434	0,53	1433	1434	0,49	1433	1434	0,49						
Aromadendreno	1437	1437	0,97	1437	1437	1,71	1437	1437	0,82	1437	1437	1,45	1437	1437	0,98	1437	1437	0,69	1437	1437	0,23	1437	1437	0,27	1437	1437	0,27	1437	1437	0,27	1437	1437	0,57									
a-Humuleno																																										
a-Patchouleu																																										
Alfa-Aromadendreno																																										
t-Muureno	1475	1478	3,63	1475	1478	6,20	1475	1478	3,20	1475	1478	5,60	1475	1478	4,16	1475	1478	5,28	1475	1478	2,37	1475	1478	5,32	1475	1478	3,65	1475	1478	2,86	1475	1478	3,84	1475	1478	2,63	1475	1478	3,27	1475	1478	2,60
a-Morreno	1479	1483	1,18	1479	1483	2,84	1479	1483	1,24	1479	1483	4,05	1479	1483	2,34	1479	1483	0,66	1479	1483	2,22	1479	1483	2,43	1479	1483	1,45	1479	1483	1,67	1479	1483	1,59	1479	1483	1,37						
Sesq 2	1484	1484	0,74	1484	1484	1,46	1484	1484	0,76	1484	1484	1,22	1484	1484	0,84	1484	1484	1,30	1484	1484	0,68	1484	1484	1,30	1484	1484	0,93	1484	1484	0,76	1484	1484	0,99	1484	1484	0,62						
a-Elemeno	1493	1493	1,24	1493	1493	2,75	1493	1493	1,59	1493	1493	3,17	1493	1493	2,10	1493	1493	2,25	1493	1493	1,24	1493	1493	2,33	1493	1493	1,96	1493	1493	1,85	1493	1493	1,64									
a-Muureno	1499	1500	3,56	1499	1500	6,21	1499	1500	3,31	1499	1500	6,40	1499	1500	5,52	1499	1500	2,32	1499	1500	5,79	1499	1500	4,02	1499	1500	2,96	1499	1500	3,70	1499	1500	2,97	1499	1500	2,46						
g-Borneoleno	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11	1506	1506	0,11						
a-Catideno																																										
g-Catideno																																										
8-Elemeno	1513	1513	2,25	1513	1513	1,70	1513	1513	2,59	1513	1513	2,49	1513	1513	2,90	1513	1513	2,70	1513	1513	2,75	1513	1513	1,37	1513	1513	2,86	1513	1513	1,63	1513	1513	1,82	1513	1513	1,20						
Sesq 3																																										
Calameno	1522	1521	1,84	1522	1521	4,00	1521	1521	1,66	1522	1521	4,61	1522	1521	2,52	1522	1521	1,14	1522	1521	3,51	1522	1521	2,61	1522	1521	1,96	1522	1521	2,08	1522	1521	1,21	1522	1521	2,07						
Valeceno	1533	1532	0,95	1533	1532	1,54	1533	1532	0,76	1533	1532	1,54	1533	1532	0,94	1533	1532	1,25	1533	1532	0,78	1533	1532	1,53	1533	1532	0,99	1533	1532	0,76	1533	1532	0,76	1533	1532	0,76						
a-Catideno																																										
g-Catideno																																										
8-Elemeno	1541	1541	0,90	1541	1541	0,90	1541	1541	0,59	1541	1541	0,83	1541	1541	0,83	1541	1541	0,77	1541	1541	0,77	1541	1541	0,46	1541	1541	0,46	154														

ANEXO 1

Certificado do Comitê de ética da UNIP



C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 048/16 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS VEGETAIS DE IRYANTHERA POLYNEURA E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS**, sem utilização de animais. Sob a responsabilidade de **"IVANA BARBOSA SUFFREDINI e ERIKA RAMOS MARTINS, ELIELSON RODRIGO e MATHEUS POTSCSLAM BARRO I**, está de acordo com os Princípios Éticos e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 17 dias do mês de agosto de 2016.

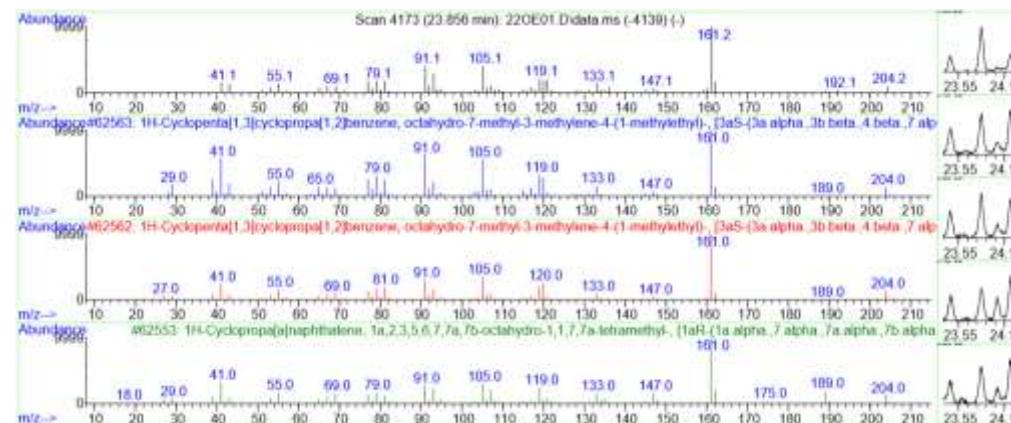
A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Juliana Guizi', is placed here.

Juliana Guizi
Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP

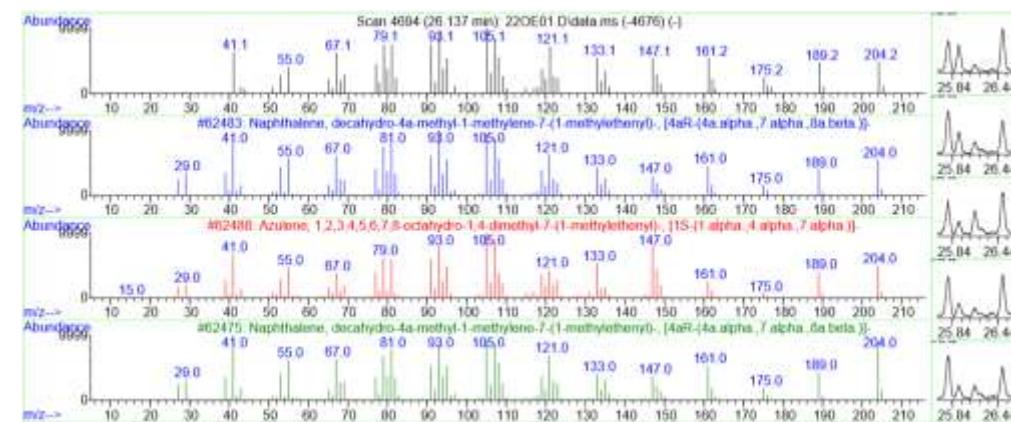
ANEXO 2

Espectros de massa dos compostos que não foram identificados

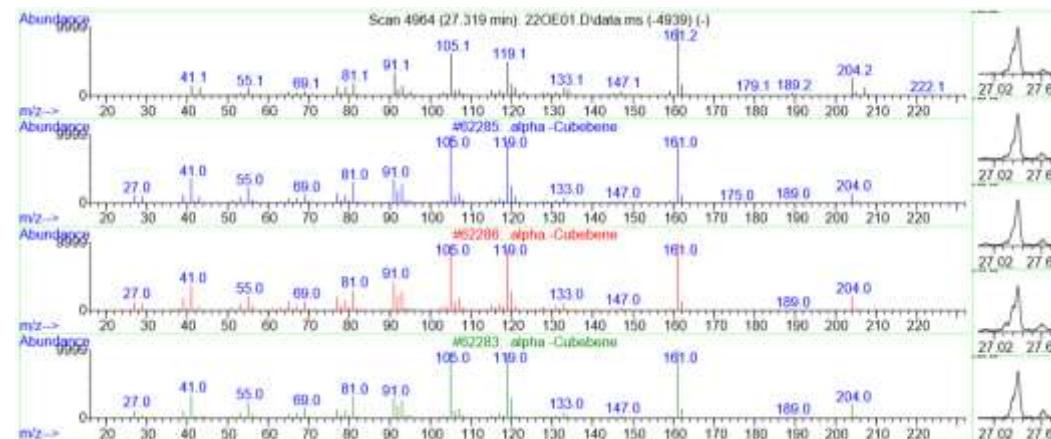
Espectros relativo ao Sesqui 1 do óleo volátil 22OE1 pico 12



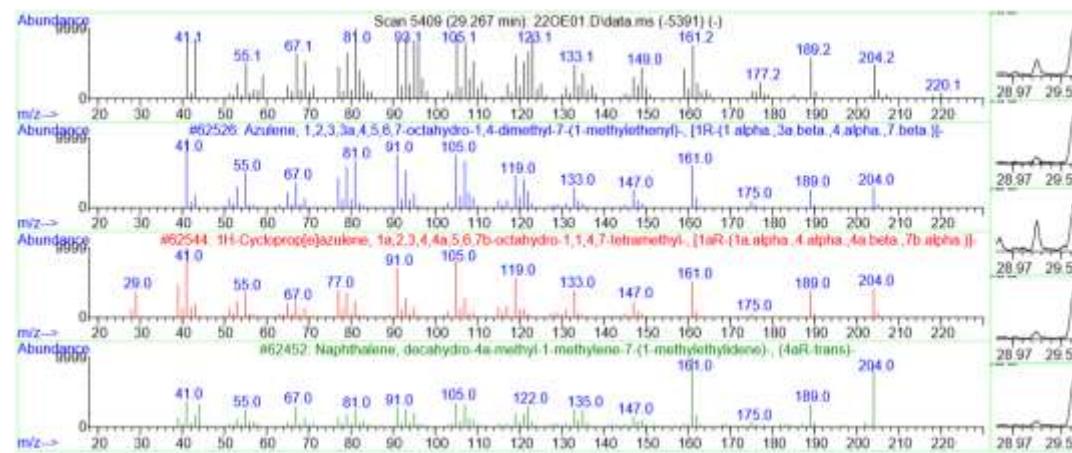
Espectros relativo ao Sesqui 2 do óleo volátil 22OE1 pico 16



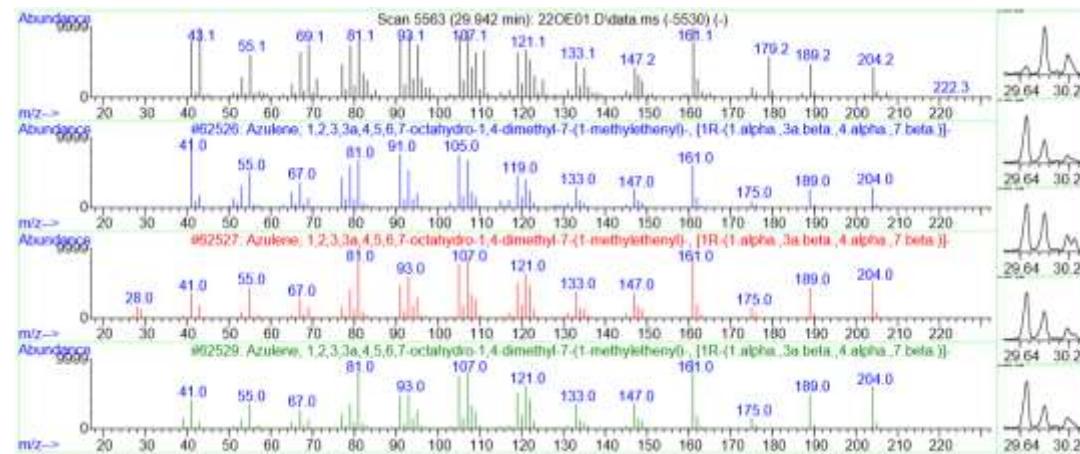
Espectros relativo ao Sesqui 3 do óleo volátil 22OE1 pico 21



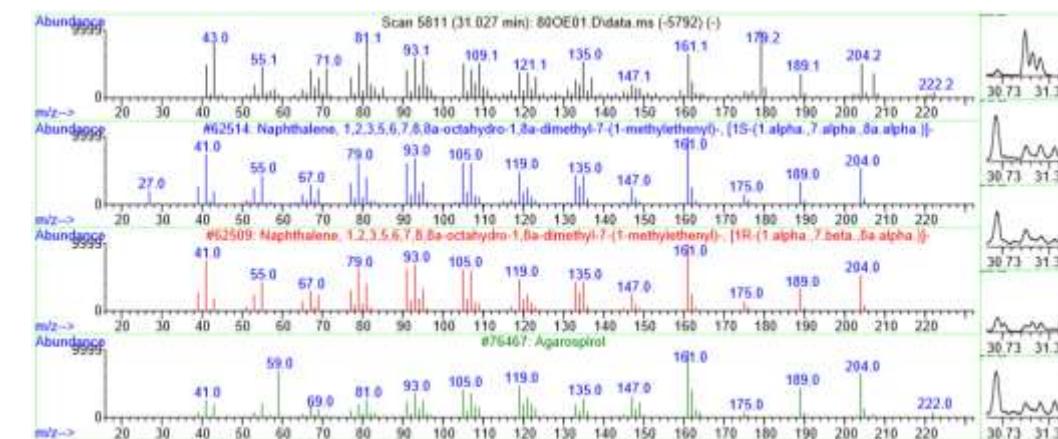
Espectros relativo ao Sesqui 4 do óleo volátil 22OE1 pico 29



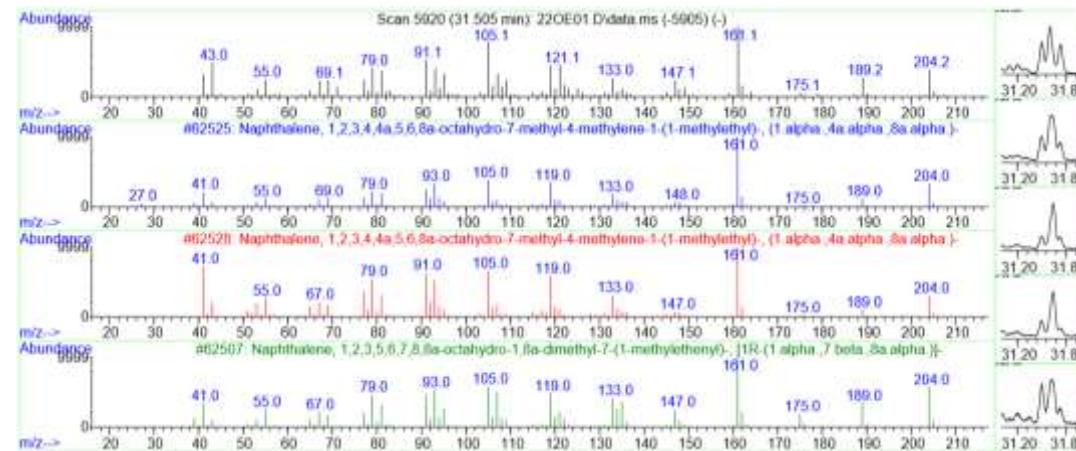
Espectros relativo ao Sesqui 5 do óleo volátil 22OE1 pico 31



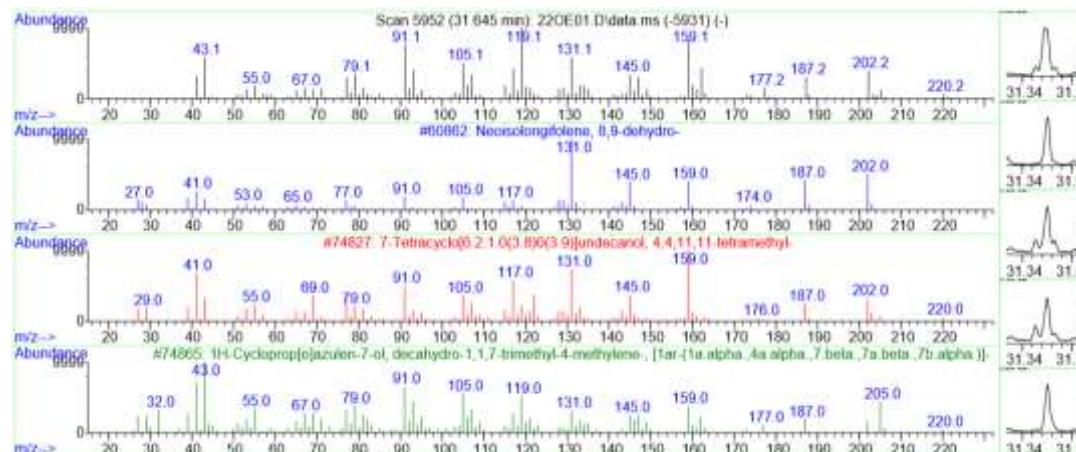
Espectros relativo ao Sesqui 6 do óleo volátil 80OE1 pico 45



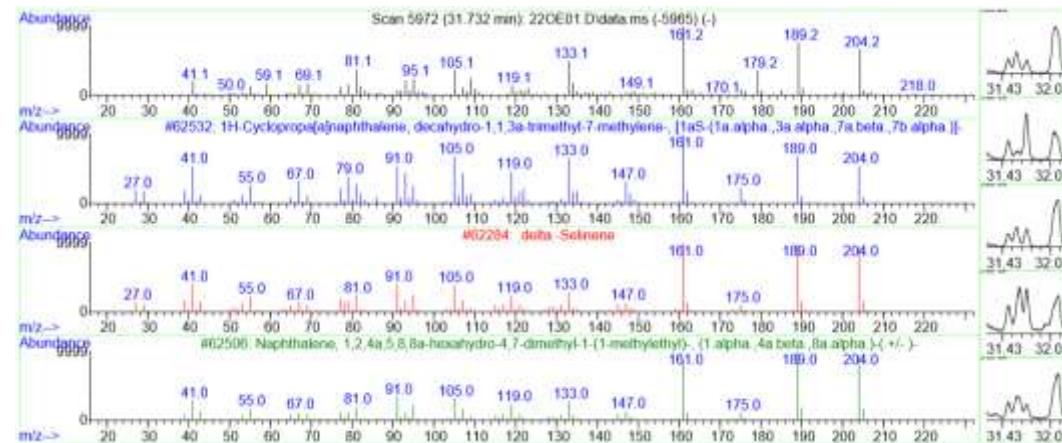
Espectros relativo ao Sesqui 7 do óleo volátil 22OE1 pico 38



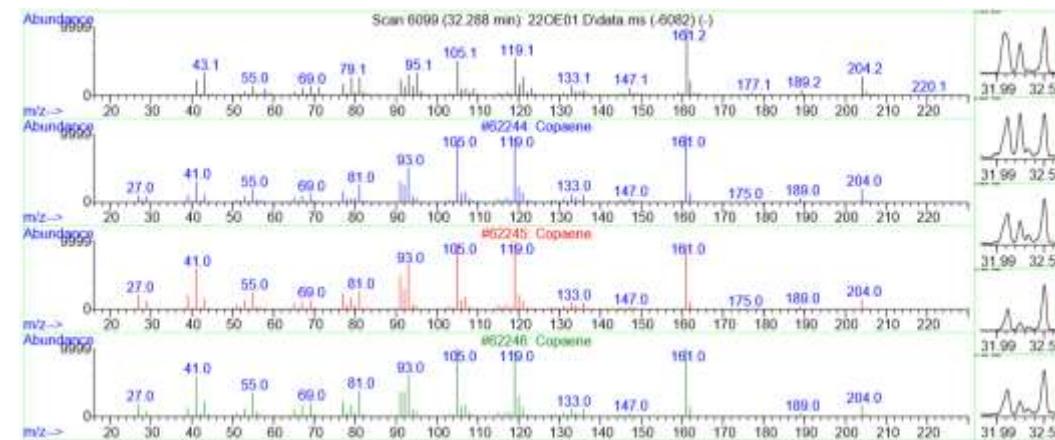
Espectros relativo ao Sesqui 8 do óleo volátil 22OE1 pico 39



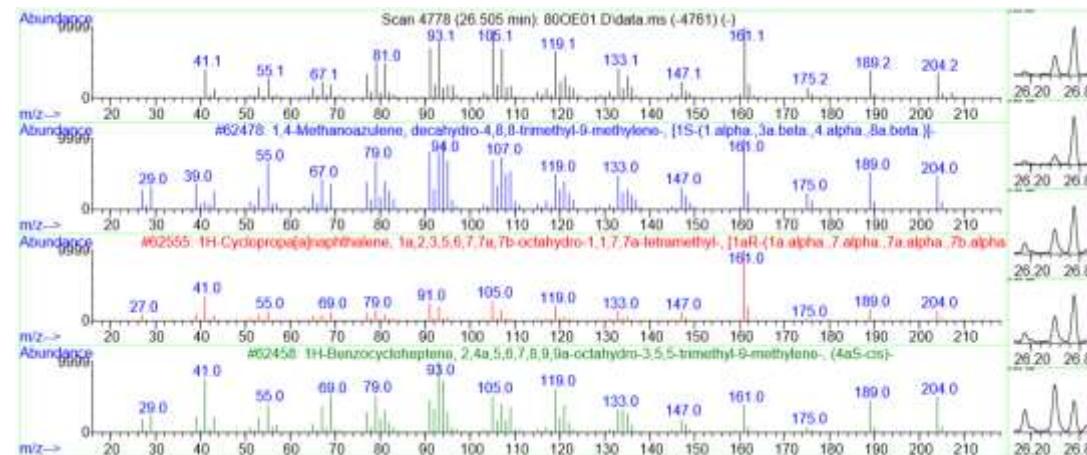
Espectros relativo ao Sesqui 9 do óleo volátil 22OE1 pico 40



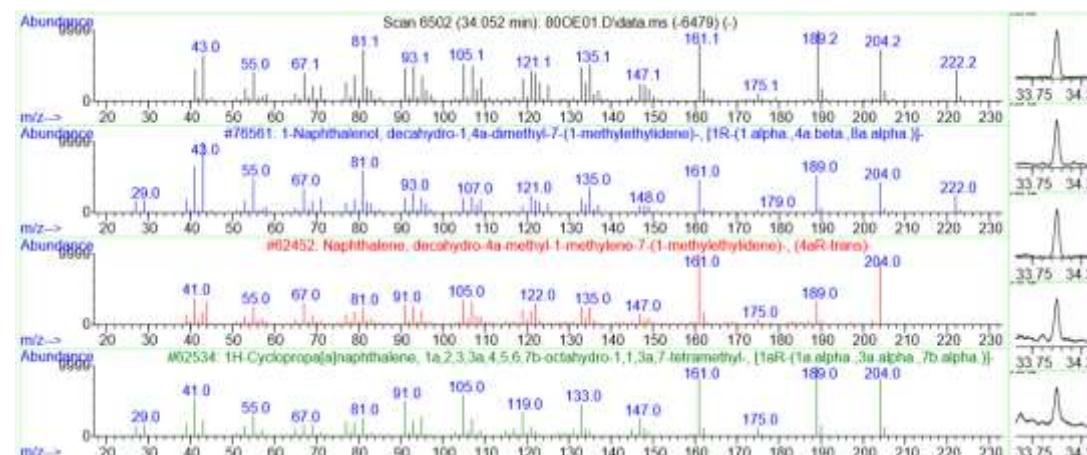
Espectros relativo ao Sesqui 10 do óleo volátil 22OE1 pico 42



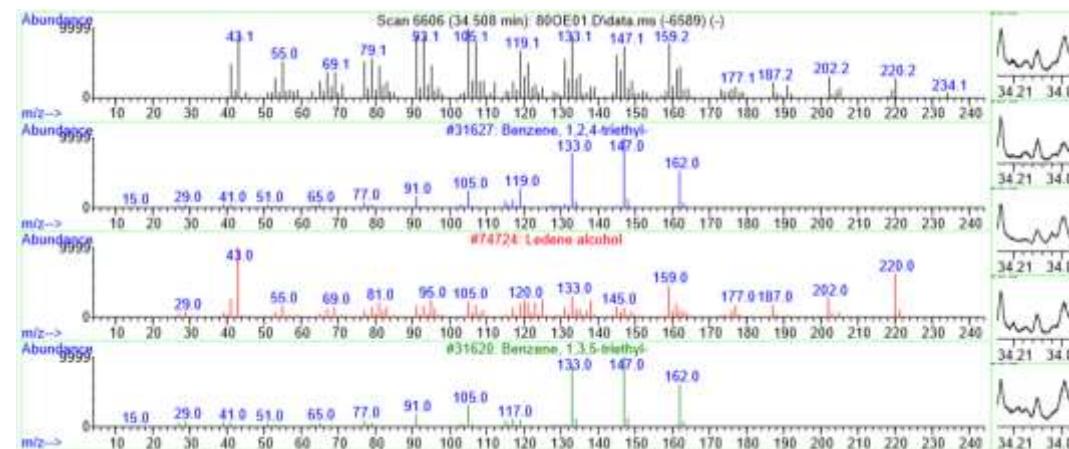
Espectros relativo ao Sesqui 11 do óleo volátil 800E1 pico 24



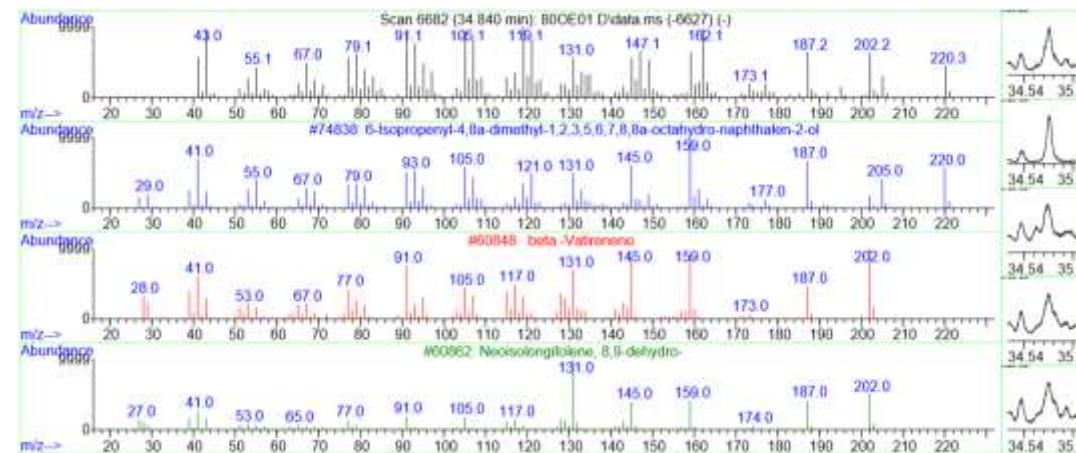
Espectros relativo ao Sesqui 12 do óleo volátil 800E1 pico 62



Espectros relativo ao Sesqui 13 do óleo volátil 800E1 pico 65



Espectros relativo ao Sesqui 14 do óleo volátil 800E1 pico 66



Espectros relativo ao Sesqui 15 do óleo volátil 800E1 pico 71

