



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOLOGIA EXPERIMENTAL

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia sylvatica*
(G.Mey.) DC. (MYRTACEAE)

LEOMARA ANDRADE DA SILVA

Santarém, PA
Abril de 2015

LEOMARA ANDRADE DA SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia sylvatica*
(G.Mey.) DC. (MYRTACEAE)**

ORIENTADORA: Dr^a. ROSA HELENA VERAS MOURÃO

COORIENTADOR: Dr. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos – **Linha de pesquisa** Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, PA
Abril de 2015**

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Maria Andrade
e ao meu coração, Cárllison Oliveira.*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida;

À UFOPA e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, pela oportunidade em dar continuidade a minha formação, bem como apoio para o desenvolvimento da dissertação de mestrado;

À minha orientadora, Dr^a Rosa H. Veras Mourão pela confiança depositada e parceria desde os tempos de iniciação científica, consolidando também uma amizade e prestatividade ao oferecer todo auxílio possível, muito obrigada! És um exemplo para minha vida, como professora e profissional e tenho muito orgulho de ter sido sua aluna...

Ao meu coorientador, Dr^o Ricardo Bezerra que também depositou toda confiança antes mesmo de fazer a seleção do mestrado e pelas valiosas contribuições no dia a dia, ou nas simples conversas.

Ao Cárilson Silva de Oliveira, por ter sido mais que um companheiro, um presente em minha vida, que contribui imensamente, seja para me ajudar nas horas tristes ou para me fazer feliz em momentos únicos. Obrigada pelo incentivo, compreensão, pelas inúmeras vezes que me auxiliou nas coletas, na revisão do trabalho, e até mesmo quando me "obrigava" a comer (rs). Agradeço por tudo, carinho, amor, amizade e principalmente paciência!

Agradeço imensamente, desde a explicação das metodologias que iríamos usar, a discussão dos resultados, por toda paciência em ensinar, e mais ainda em contribuir mesmo que estivessem bastante ocupadas. Com certeza, esse trabalho não teria caminhado na forma que caminhou se não fosse pelas parceiras e amigas, Juliana Raposo e Sandra Sarrazin. Me espelho em vocês também, por toda dedicação e capricho nos trabalhos que realizam... Muito obrigada!

Ao Victor Perez e ao Prof^o José Guilherme Maia pela parceria, contribuindo nas análises químicas do óleo essencial.

Ao laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental que se tornou meu lar. E ao grupo que constitui esse laboratório, uma família alegre, voluntária e capacitada, agradeço por todas as colaborações. Em especial a Ana Paula Assunção companheira de experimentos, Victor

Perez que auxiliou também em algumas análises, Meive Freire e Amanda Azevedo pelas dicas, companhia, estudos e momentos de descontração.

Agradeço à Laila Portil, da Universidade Federal de Goiás, assim como todo o grupo (LPPN-Laboratório de Produção de Produtos Naturais) que proporcionou uma nova experiência, muito aprendizado e em parte a concretização da pesquisa realizada. Sou grata também a Rejanne Arruda por ter me acolhido em seu lar, assim como toda sua família, fazendo minha estadia em Goiânia a melhor. Aprender e obter novas informações é essencial, e com essa "turma" foi maravilhosamente empolgante e estimulador.

As amigas Luciana Souza, Valéria Mourão, Luana Travassos, por continuarem comigo nessa caminhada, apoiando não somente na amizade mas em tudo que fosse possível e estivessem ao seu alcance. Sou grata de coração e espero poder retribuir um pouquinho para vocês, por tanto carinho...

À Daniela Almeida, Tácia Dayane e Yasmim Taketomi, amigas guerreiras que mesmo distantes sempre torcendo pelo meu melhor e mesmo que raros, fazendo de alguns momentos livres que tive, mesmo que sejam por SMS, momentos tão agradáveis.

Não menos importante, por estar no finalzinho, mas para finalizar com minha eterna gratidão... Agradeço à Deus e minha família, em especial minha mãe Maria Andrade pelo apoio, seja ele discreto e desconhecendo quase tudo o que eu pesquiso (rs). Agradeço pela paciência, das muitas vezes que não entendia o que estava sendo feito, mas que era para o meu bem... Que permaneçam sempre do meu lado!

Por final, a cada pessoa que aqui não foi citada diretamente, mas que com certeza contribuiu de alguma forma, meus sinceros agradecimentos!!!

EPÍGRAFE

*O que realmente importa na vida não é o destino
e sim a jornada...*

(Autor desconhecido)

SILVA, Leomara Andrade da. Composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE), 2015. 85 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2015.

RESUMO

Myrcia sylvatica (Myrtaceae), conhecida popularmente como ginja, vassourinha, ou pedra uma caá, é uma espécie arbustiva de ocorrência comum principalmente em savanas de Santarém, Pará. Por seu uso ser bastante diversificado na região, e ainda ser uma espécie com poucos estudos em relação a atividade biológica, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e as atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (OEMS) em função da biomassa fresca e/ou seca. Foram realizadas análises do OEMS de folhas frescas e secas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), e realizada a atividade antimicrobiana das mesmas amostras frente a cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Para avaliar a capacidade antioxidante, foi utilizado o OEMS de folhas frescas, empregando os métodos: DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno. O OEMS de folhas frescas e secas apresentou como seus principais compostos 1-*epi*-cubenol, *ar*-curcumeno, cadaleno, β -selineno, β -calacoreno, *cis*-calameneno, *ar*-tumerol, muscatona, δ -cadineno, e cubenol. E quando avaliada a atividade antimicrobiana das duas amostras, houve inibição significativa, comparada ao padrão, somente para as bactérias Gram-positivas. O OEMS quando testado sua capacidade antioxidante foi capaz de reduzir o radical DPPH, com variação na inibição de 8,6 a 52,0 % e valor de $IC_{50} = 1,94 \pm 0,12$ mg/mL em 60 minutos de reação e de capturar o cátion radical ABTS com valor de TEAC de $32,85 \pm 0,86$ μ M de trolox/g de amostra de OEMS. No método FRAP, apresentou valor de $z = 193,47 \pm 2,63$ de μ M de sulfato ferroso/g de OEMS, em 45 minutos de reação. No sistema do β -caroteno/ácido linoleico, o óleo essencial inibiu 26,1% da oxidação do β -caroteno em 120 min de reação. O óleo essencial de *M. sylvatica* em sua composição química possui maior porcentagem de sesquiterpenos cíclicos. O mesmo apresenta potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas independente do processamento das amostras (folhas frescas ou secas) e capacidade antioxidante, embora sendo baixa quando comparado aos padrões. De acordo com a pesquisa realizada amplia-se o conhecimento acerca da espécie, destacando o uso do OEMS para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antimicrobiana e antioxidante.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, composição química, *Myrcia sylvatica*, óleo essencial.

SILVA, Leomara Andrade da. Composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE), 2015. 85 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2015.

ABSTRACT

Myrcia sylvatica (Myrtaceae) popularly known as ginja, vassourinha, or pedra ume caá, is a shrubby species with common occurrence in mostly of savannas at Santarém, Pará. For its use to be quite diverse in the region, and still be a species with few studies on the biological activity, the aim of this study was to evaluate the chemical composition and the antimicrobial and antioxidant activities from the essential oil of *Myrcia sylvatica* (OEMS) on the basis of fresh and /or dry biomass. OEMS from fresh and dried leaves analyzes were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG/EM), and performed the antimicrobial activity of the same samples front of strains of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts. To evaluate the antioxidant capacity, OEMS of fresh leaves was used, employing the methods: DPPH, ABTS, FRAP and β -carotene. The OEMS of fresh and dried leaves presented as major compounds 1-*epi*-cubenol, *ar*-curcumene, cadalene, β -selinene, β -calacorene, *cis*-calamenene, *ar*-tumerol, muskatone, δ -cadinene, and cubenol. And when evaluated the antimicrobial activity of the two samples, there was significant inhibition, compared to standard, only for Gram-positive bacterium. The OEMS when tested their antioxidant capacity was able to reduce the DPPH radical, with inhibition ranging from 8,6 to 52,0%, and $IC_{50} = 1,94 \pm 0,12$ mg/ml in 60 minutes of reaction, and capturing the radical cation ABTS with TEAC value of $32,85 \pm 0,86$ μ M of Trolox/g of OEMS sample. The FRAP method, showed a value of $z = 193,47 \pm 2,63$ μ M of ferrous sulfate / g of OEMS in 45 minutes of reaction. In β -carotene/linoleic acid system the essential oil inhibited 26,1% of the β -carotene oxidation at 120 min of reaction. The essential oil of *M. sylvatica* in its chemical composition has a higher percentage of cyclic sesquiterpenes. The same has antimicrobial activity against Gram-positive bacteria independent from the processing of samples (fresh or dried leaves) and antioxidant capacity, while being low when compared to standards. According to the research conducted widens the knowledge about the species, highlighting the use of OEMs to develop new drugs with antimicrobial and antioxidant properties.

Palavras-chave: antimicrobial activity, antioxidant activity, gas chromatography, *Myrcia sylvatica*, essential oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1.1 Óleos essenciais: características gerais.....	14
1.1.2 Aspectos biológicos dos óleos essenciais	16
1.1.2.1 Atividade antimicrobiana	17
1.1.2.2 Atividade antioxidante.....	18
1.1.2.2.1 - Método de sequestro do radical livre DPPH.....	20
1.1.2.2.2- Método de captura do radical livre ABTS	20
1.1.2.2.3 - Método de redução do ferro – FRAP	21
1.1.2.2.4 - Método de oxidação do Sistema β -caroteno/Ácido linoleico	21
1.1.3 Família Myrtaceae	21
1.1.4 Gênero <i>Myrcia</i>	22
1.1.5 <i>Myrcia sylvatica</i> (G.Mey.) DC.....	23
1.2 OBJETIVOS.....	25
1.2.1 Geral	25
1.2.2 Específicos.....	25
2. REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE <i>Myrcia sylvatica</i> (G. MEY.) DC. (MYRTACEAE).....	33
Introdução	35
<i>Rendimento do óleo essencial e análise da composição</i>	36
<i>Atividade antimicrobiana</i>	40
<i>Conclusão</i>	42
Experimental.....	43
Material vegetal e processamento.....	43
Extração do óleo essencial.....	43
<i>Análise da composição do óleo</i>	43
<i>Ensaio Antimicrobiano (microrganismos e padronização do inóculo)</i>	44

<i>Ensaio antimicrobiano (Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM))</i>	45
<i>Análise estatística</i>	45
Agradecimentos.	46
Referências.....	46
CAPÍTULO 2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DE <i>Myrcia sylvatica</i> (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE) POR DIFERENTES MÉTODOS ANTIOXIDANTES (DPPH, ABTS, FRAP, β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO).....	49
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
Material vegetal e obtenção do óleo essencial de <i>Myrcia sylvatica</i>	52
Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH	52
Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS.....	53
Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	54
Determinação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	54
RESULTADOS	55
Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH	55
Determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS	56
Atividade antioxidante pelo método FRAP.....	56
Determinação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico	57
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
ANEXO A: Cromatogramas da análise do óleo essencial das folhas frescas e desidratadas de <i>M. sylvatica</i>	645
ANEXO B: Instruções aos autores para submissão da revista Natural Products Comunnications.	646
ANEXO C: Instruções aos autores para submissão da revista Brasileira de Farmacognosia...	71
ANEXO D: Artigo (referente ao capítulo 1)	78

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ABTS** - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AMH**- ágar Mueller Hinton
- ASD**- Agar Sabouraud Dextrose Agar
- ATCC** – American Type Culture Collection
- BHA** - Butilhidroxianisol
- CBM** – Concentração Bactericida Mínima
- CIM**- Concentração Inibitória Mínima
- CCCD** - Coleções de Culturas Cefar Diagnósticas
- CFM** – Concentração Fungicida Mínima
- CDB** – Caldo Sabouraud Dextrose
- CG-EM** - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
- DP**- Desvio padrão
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EROs**- Espécies reativas de oxigênios
- ERNs**- Espécies reativas de nitrogênio
- Fe (II)** - ferroso
- Fe (III)** - férrico
- FRAP** - Ferric Reducing Antioxidant Power
- IAN** - Instituto Agrônômico do Norte
- IR** - Índice de retenção
- NCCLS** - National Commite for Clínical Standards
- OE** - Óleo essencial
- OEMS** - Óleo essencial de *Myrcia sylvatica*
- TPTZ** - (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina
- UFC**- Unidade Formadora de Colônia
- α** - Alfa
- β** - Beta

p - Pê

δ - Delta

°C - Graus Celsius

g - Gramas

mg - miligrama

mL - Mililitros

mM - Milimolar

μ M - Micromolar

μ L - Microlitro

nm - Nanometro

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e/ou aromáticas têm sido ao longo dos tempos, usadas para diferentes fins terapêuticos, principalmente por pessoas que vivem mais afastadas dos grandes centros urbanos. Porém, esta prática tem crescido também entre a comunidade médica, desde que as plantas utilizadas tenham um embasamento científico comprovado que garanta sua eficácia e segurança (Cechinel Filho; Yunes, 1998; Kinghorn, 2001).

Muitas plantas utilizadas frequentemente pela população não foram estudadas cientificamente ou seus compostos ativos são desconhecidos, o que tem limitado seu uso como fitoterápicos ou aproveitamento econômico (Berg, 1993). No entanto, o uso de plantas medicinais não se trata mais apenas de uma cultura ou tradição de um povo, mas de uma Ciência que vem sendo estudada, aprimorada e utilizada por grande parte da população mundial, ainda que seja como terapia alternativa, proporcionando inúmeros benefícios aos usuários (Tomazzoni *et al.*, 2006).

Entre os diferentes produtos naturais originados de plantas, podem ser destacados os óleos essenciais (OE), os quais são misturas complexas de compostos orgânicos, originados do metabolismo secundário das plantas e utilizados para a preparação de misturas aromatizantes, licores, perfumes, artigos de higiene, para mascarar o cheiro de tinta e borracha, na síntese orgânica fina, como matéria-prima para a elaboração de produtos, entre outras aplicações (Craveiro *et al.*, 1981). A qualidade dos OE é variável podendo ser encontrados quimicamente diferentes, de acordo com a parte da planta utilizada ou com o processamento da planta, e condições ambientais onde esta se encontra (Bandoni, 2000; Stashenko, 2009).

Os óleos essenciais podem atuar com efeitos combinados que ativam ou inativam estruturas, no qual sua atividade biológica pode ser comparada a produtos sintéticos (Svoboda; Deans, 1995; Cowan, 1999). Dessa forma, os OE podem ser uma alternativa, pois estes apresentam diferentes ações biológicas, bem como podem ter uma aplicabilidade em diferentes linhas de produção, em práticas terapêuticas e populares (Machado; Júnior, 2011).

Como parte do projeto de investigação de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae da região Oeste do Pará, realizada pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – LabBBEx), com potencial uso na indústria farmacêutica, alimentícia ou cosmética, o objetivo deste trabalho foi avaliar o teor, a composição

química e o potencial antimicrobiano e antioxidante do OE de folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. coletadas em Santarém Pará.

A escolha de *M. sylvatica*, entre as diversas espécies da família Myrtaceae, para realização deste estudo, foi baseada também em vários fatores como a abundância da espécie na região, principalmente em áreas de savana; o desaparecimento destas savanas pela ação antrópica e conseqüentemente da espécie; o uso para fins medicinais; alto teor em óleo essencial com aroma agradável e a inexistência de estudos para aproveitamento da espécie em diferentes seguimentos da indústria, além da preservação dos recursos naturais não madeireiros da Amazônia.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA. A dissertação está dividida em uma breve INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA sobre os óleos essenciais e suas características, aspectos biológicos dos óleos essenciais, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, além de uma abordagem sobre a família Myrtaceae, o gênero *Myrcia*, concluindo com a espécie alvo deste estudo *M. sylvatica*. Segue com os OBJETIVOS geral e específicos. A METODOLOGIA e RESULTADOS foram apresentados em forma de capítulos de acordo com as normas do periódico **Natural Products Communications** (cap. 1) e do periódico **Revista Brasileira de Farmacognosia** (cap. 2). Como encerramento da dissertação, as CONSIDERAÇÕES GERAIS e ANEXOS.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Óleos essenciais: características gerais

Os óleos essenciais (OE), também conhecidos como voláteis, são produtos do metabolismo secundário das plantas. Apresentam-se como líquidos, límpidos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente mais baixa do que da água (Burt, 2004). Além dessas características, exercem funções importantes à sobrevivência da planta, como proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda excessiva de água e aumento da temperatura (Bourgaud *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2010).

Os OE são geralmente produzidos por diferentes estruturas especializadas, como: pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Essas estruturas estão localizadas em algumas partes específicas ou em toda planta. Assim, o OE pode estar presente nas flores, folhas, cascas, raízes, rizomas, frutos ou sementes (Simões; Spitzer, 1999). De acordo com a localização na planta e finalidade de uso, diferentes métodos de extração podem ser empregados (Simões *et al.*, 2010). Dessa forma, os óleos podem ser extraídos pelo método de hidrodestilação, prensagem (frutos cítricos), extração por solventes orgânicos, enfleurage, CO₂ supercrítico, micro-ondas por hidrodestilação e destilação a vapor (Simões *et al.*, 2004).

Os compostos presentes nos OE são originados por meio de duas rotas metabólicas principais, derivadas da glicose, que são: a do ácido chiquímico e a do acetato. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides. Os derivados do acetato são aminoácidos alifáticos, e os alcaloides derivados dele são terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (Bakkali *et al.*, 2008).

Quanto a composição química, em geral os OE são constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, ésteres, e outras substâncias de baixo peso molecular, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (Siani, 2000). A variação desta composição química em uma planta aromática é influenciada por condições ambientais, como sazonalidade e ritmo-circadiano, processamento do vegetal para obtenção do OE, assim como o desenvolvimento da planta (Globo-Neto; Lopes, 2007).

Outros fatores como, a variação genética, variedade da planta, nutrição, aplicação de fertilizantes, localização geográfica, clima, estresse hídrico, secagem pós-colheita e armazenamento influenciam na composição química do OE (Morais, 2009). Além disso, a parte do material vegetal usada e o método de extração podem determinar o rendimento e a composição química, designando as propriedades biológicas e suas respectivas características (Croteau, 1986; Alvarez-Castellanos *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais, caracterizados por um amplo grupo de constituintes químicos, têm estimulado novas pesquisas e a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente contra microrganismos através de ensaios antimicrobianos (Figueiredo *et al.*, 2008). No entanto, pela sua ampla utilização, o estudo dos óleos essenciais, apresentam-se de

maneira multidisciplinar, devido a grande abrangência de ações biológicas, bem como por sua aplicabilidade em diferentes linhas de produção, em práticas terapêuticas e popular (Machado; Júnior, 2011).

1.1.2 Aspectos biológicos dos óleos essenciais

As propriedades biológicas conferidas aos óleos essenciais são atribuídas aos seus constituintes químicos, os quais podem agir de forma de sinérgica ou refletir apenas a ação de alguns constituintes principais. É possível que a atividade biológica atribuída aos componentes majoritários seja compartilhada pelos compostos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, distribuição celular e fixação destes nas paredes e membranas, por exemplo (Bakkali *et al.*, 2008). Pelo fato de apresentarem particularidades medicinais, os OE são caracterizados como substâncias de propriedades farmacológicas (Cavaleiro, 2007). Essas propriedades farmacológicas são inúmeras e algumas são recomendadas por suas importantes vantagens, como a sua volatilidade, tornando-as ideal para uso em nebulizações, inalações ou banhos de imersão. O OE dentro dessas propriedades auxilia pelo seu baixo peso molecular dos componentes que podem ser rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (Bandoni; Czepak, 2008).

De acordo com Dormam e Deans (2000), a atividade biológica que é conferida a constituintes químicos isolados de um OE, pode estar relacionada com a estrutura química, com os grupos funcionais e com a estereoquímica dos compostos. Como por exemplo, um terpenoide com um grupamento acetato, que evidencia o potencial antibacteriano de uma determinada substância. No entanto, o mecanismo exato de ação dos óleos essenciais não é amplamente conhecido, mas suas atividades biológicas, entretanto, podem ser comparadas com a atividade de produtos farmacológicos produzidos (Svoboda; Deans, 1995; Baratta *et al.*, 1998; Ramzi *et al.*, 2010).

Dessa forma, frequentemente são descritas em diversas áreas as diferentes aplicações dos OE, a exemplos algumas atividades: antiespasmódica - *Salvia officinalis* (Simões *et al.*, 2004); anticancerígeno - *Cinnamomum verum* (Hammer *et al.*, 2006); inseticida - *Salvia hydrangea* (Kotan *et al.*, 2008); anti-helmíntica - *Lippia sidoides* (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2008); antioxidante e anti-inflamatória- *Vetiveria zizanioides* (Chou *et al.*, 2012); anticonvulsivante -

Bunium persicum (Mandegary *et al.*, 2012); anticâncer - *Curcuma zedoaria roscoe* (Chen *et al.*, 2013); analgésica - *Cymbopogon flexuosus* (Chandrashekar; Prasanna, 2010); antimalárica - *Cedrelopsis grevei* (Afoulous *et al.*, 2013) e toxicidade - *Alpinia purpurata* (Lira *et al.*, 2015).

Entre as diversas propriedades biológicas relacionadas aos OE, serão enfatizadas duas atividades que apresentam um crescente interesse nas pesquisas atuais, também relacionadas ao trabalho aqui realizado. Trata-se da atividade antimicrobiana e antioxidante que oferecem uma alternativa à utilização de aditivos naturais em diferentes produtos.

1.1.2.1 Atividade antimicrobiana

A busca por novos antimicrobianos tem sido intensificada, pois, atualmente um dos maiores desafios é obter agentes antimicrobianos mais eficazes. De acordo com a orientação e uso popular de espécies nativas, o uso de vegetais com propriedades medicinais está contribuindo com diversas pesquisas, uma vez que os microrganismos prejudiciais à saúde têm se mostrado resistentes à maioria dos antimicrobianos existentes. Dessa forma, é bastante incentivada a investigação por antibióticos de ocorrência natural (Duarte, 2006).

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais frente a uma diversidade de microrganismos tem sido atribuído aos fenilpropanoides éter etílico de carvacrol, cinamaldeído, eugenol, *p*-cimeno e timol. Assim como para os terpenoides acetato de bornila, acetato de geranila, α - bisabolol, α e β -pineno, aromadendreno, carvona, citronelal, 1,8-cineol, geraniol, mentona, mirceno, nerol e terpin-4-ol (Burt, 2004).

Os flavonoides inibem enzimas virais importantes, como a transcriptase reversa e protease, e destroem alguns protozoários patogênicos (Havsteen, 2002). A ação destes sobre a membrana bacteriana, pode também ocorrer devido à eficácia dos grupos funcionais, à características lipofílicas e ao grau de solubilidade em água. Já os taninos agem inibindo as enzimas celulares e a precipitação de proteínas (Scalbert, 1991).

Além disso, é importante destacar que os métodos *in vitro* desenvolvidos têm por objetivo produzir resultados confiáveis, assim como reprodutíveis e validados. No entanto, deve se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, os microrganismos, e o tipo de óleo essencial. De acordo com as características apresentadas em um OE, como volatilidade,

insolubilidade em água e complexidade, os resultados podem ser interferidos e talvez não identificar o potencial antimicrobiano da amostra (Nascimento *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais não está ainda claramente compreendido, mas há uma conformidade de que a ação dos constituintes presentes nos OE exercem seus efeitos antimicrobianos diretamente sobre a membrana plasmática, gerando alterações nas suas funções e estrutura (Holley; Patel, 2005). É presumível que a atividade antimicrobiana não esteja relacionada a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula, como alterações da membrana plasmática, perturbações na força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (Burt, 2004).

Existem vários mecanismos em que os microrganismos podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos, tais como: alteração na estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas dos pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (Catão *et al.*, 2005). Geralmente, as bactérias apresentam disponibilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas. E esta problemática, acarreta um uso indefinido dos antibióticos e sugere-se um controle na sua utilização, bem como a ampliação de pesquisas que auxiliem na compreensão deste mecanismo genético de resistência (Nascimento *et al.*, 2000; Amoroso, 2002).

1.1.2.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes estão cada vez mais conhecidos atualmente. Funcionam como bloqueadores dos processos de oxirredução promovido pelas espécies reativas livres, que são átomos ou moléculas com elétrons não pareados (Fig.1) (Halliwell; Gutteridge, 2000). São substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, como pela inibição de radicais livres, complexação de metais e redução de oxidantes (Duarte-Almeida *et al.*, 2006). É definido ainda, pela sua habilidade em doar elétrons, de transportar ou estabilizar um elétron desemparelhado, reagir com outro antioxidante ou com o oxigênio molecular, ou seja, são capazes de destivar os radicais livres antes que ataquem células alvos (Morales; Colla, 2006).

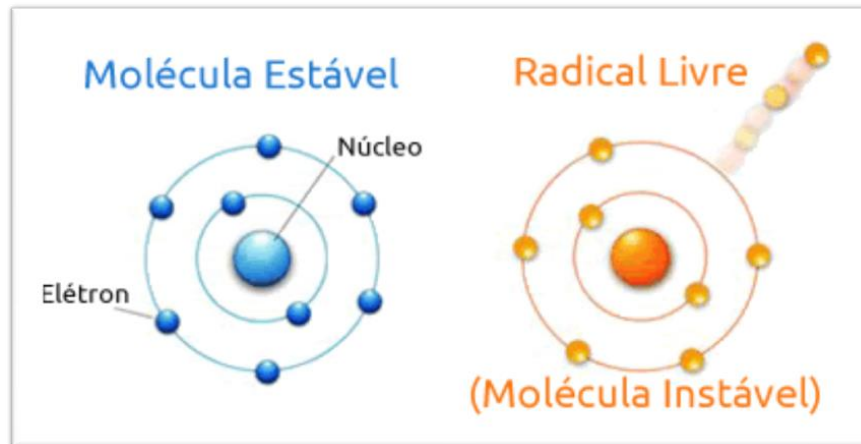


Figura 1: Processo de oxido redução promovido pelas espécies reativas livres ou radical livre.

Fonte: //www.google.com.br/search?q=processo+de+oxidação

Existem, no entanto, compostos que são igualmente reativos, mas não possuem elétron pareado, por tanto não são classificados como radicais livres, mas que indiretamente os geram. Essas substâncias são denominadas Espécies Reativas de Oxigênio ou Espécies Reativas de Nitrogênio (EROs/ERNs), a exemplo : hidroxila (HO) e superóxido (O_2^-) – EROs; óxido nítrico (NO) e ácido nitroso (HNO_2) - ERNs. Esses radicais livres e espécies reativas, no geral, quando produzidas em grande quantidade pela célula, causam o estresse oxidativo, acarretando danos celulares com diversas desordens fisiológicas, doenças cancerígenas, entre outras patologias degenerativas como o mal de *Alzheimer* (Dröger, 2002).

A concentração de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos antioxidantes, estes que podem ser sintéticos ou naturais. Dentre os antioxidantes sintéticos mais importantes estão o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BTH) e os naturais, destacam-se o ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (Rice-Evans *et al.*, 1996). De forma natural, os antioxidantes estão presentes nos vegetais, sendo mais ativos e frequentes em compostos fenólicos sendo diretamente proporcional a sua eficiência antioxidante (Junqueira, 2010).

Há um grande interesse de fontes naturais como antioxidantes, e estes tem sido descrito através de compostos presentes em frutas, ervas, vegetais e extratos, frente aos radicais livres (Ramalho; Jorge, 2006). Além desses, destaca-se o efeito de plantas aromáticas com presença de um grupamento hidroxila e compostos fenólicos, presentes em classes como polifenóis, flavonoides, taninos e óleos essenciais (Morais *et al.*, 2009).

Dessa forma, os antioxidantes apresentam uma vasta aplicação, através de sua importância na alimentação e conseqüentemente na saúde, com função principalmente nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de plásticos, óleos de lubrificação, entre outras (Miguel, 2007). E para funcionalidade como antioxidante, são utilizadas diferentes técnicas para determinar a atividade antioxidante, em especial para testes *in vitro*. Com o objetivo de permitir uma rápida seleção de substâncias ou misturas potencialmente interessantes (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

E de acordo com diferentes métodos e distintos produtos vegetais está sendo intensamente investigado o seu potencial antioxidante, visando substituir os sintéticos que tem provocado inúmeros problemas, como efeitos nocivos a saúde humana (Valentão *et al.*, 2002). Dentre os diversos métodos, destacam-se:

1.1.2.2.1 - Método de sequestro do radical livre DPPH

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela (Brand-Willians *et al.*, 1995). O método é baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de antioxidantes, o mesmo recebe H^+ , sendo então reduzido. O mesmo pode ser facilmente identificado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível (Ionita, 2005).

1.1.2.2.2- Método de captura do radical livre ABTS

Este método é baseado na formação do radical $ABTS^{*+}$ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), pelo radical ferrilmioglobina gerado pela reação entre a metamioglobina e H_2O_2 na presença de peroxidase. A atividade antioxidante é avaliada pela diminuição da intensidade da cor do radical quando substâncias antioxidantes são adicionadas, ou seja, ocorre um decaimento do radical ocasionado pela oxidação do ABTS, causado pela adição de compostos fenólicos (Ribeiro, 2007).

1.1.2.2.3 - Método de redução do ferro – FRAP

Baseia-se em reações de transferência de elétrons. A reação ocorre pela formação de um complexo TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina) com o Fe(III), de cor amarela. Com a presença do antioxidante, o ferro é reduzido ao $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$, formando uma coloração azul escura (Ou *et al.*, 2002). É uma alternativa desenvolvida para determinação da redução do ferro em fluídos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (Rufino *et al.*, 2006).

1.1.2.2.4 - Método de oxidação do Sistema β -caroteno/Ácido linoleico

É baseado na descoloração da solução de β -caroteno e ácido linoléico, que ocorre em função da oxidação do ácido linoleico que ataca as duplas ligações do β -caroteno, resultando na descoloração da pigmentação alaranjada, específica da solução (Silva *et al.*, 1999). O método avalia inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

1.1.3 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae, pertencente à ordem Myrtales conta com aproximadamente 132 gêneros e mais de 5600 espécies (Govaerts *et al.*, 2008). Estão espalhadas nas florestas brasileiras e distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (De Oliveira *et al.*, 2005). Tradicionalmente, a família Myrtaceae era compreendida em duas grandes subfamílias, sendo Myrtoideae, representada por espécies com frutos, com maior concentração nas Américas do Sul e Central. E as Leptospermoideae, de espécies de frutos carnosos permanecendo mais concentradas na Austrália (Briggs; Johnson, 1979; Souza; Lorenzi, 2005).

No entanto, essa classificação das subfamílias foi substituída a partir de dados moleculares, que possibilitaram evidenciar que o grupo representado pelos frutos carnosos não é monofilético, pois a evolução desse fruto ocorreu diversas vezes na família (Wilson *et al.*, 2001). Desta forma, Wilson *et al.*, (2005) sugeriram uma nova organização, dividindo-as nas subfamílias Psiloxylloideae e Myrtoideae.

Myrtoideae é composta por 15 tribos, sendo que destas, Myrtae é a mais rica (Wilson *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2007). A subfamília é localizada em regiões tropicais, subtropicais e marítimas, e abrange todas as mirtáceas americanas, com exceção do gênero andino *Tepualia* Griseb. (Landrum, 1986; Landrum; Kawasaki, 1997). Todas as espécies de Myrtaceae brasileiras estão incluídas na tribo Myrtae. A intenção de facilitar a identificação dos espécimes de Myrtaceae confronta com a semelhança das características encontradas na família, principalmente nas partes florais que são muito uniformes, até mesmo entre os gêneros (McVaugh, 1968; Landrum; Kawasaki, 1997).

No Brasil, a família destaca-se entre as mais importantes na maioria das formações vegetacionais (Souza; Lorenzi, 2005), sendo as espécies membros da família dominantes dentre as espécies arbustivas-arbóreas na Floresta Ombrófila Densa (Reitz *et al.*, 1978; Assis *et al.*, 2004). É bem representada também na maioria dos estudos florísticos e fitossociológicos (Gomes *et al.*, 2006; Narvaes *et al.*, 2008), e está entre as dez famílias com maior riqueza de espécies, com 976 espécies e 23 gêneros (Sobral *et al.*, 2013).

A família Myrtaceae também simboliza uma das mais conhecidas, devido ao grande potencial de suas espécies (Vieira *et al.*, 2004). Apresenta grande importância ecológica a partir da produção de frutos comestíveis, apreciados pelo homem e também pela fauna silvestre, consumidos principalmente por aves, roedores, macacos e peixes (Mabberley, 1997; Barroso *et al.*, 1999). Muitas de suas espécies também são cultivadas, seja por conta dos frutos, seja com finalidade ornamental ou, ainda, para a extração de essências de valor comercial (Joly, 1993; Vieira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Além disso, espécies da família Myrtaceae também têm sido frequentemente indicadas para a revegetação de áreas perturbadas (Lorenzi, 1992; 1998; Pott; Pott, 1994; Backes; Irgang, 2002).

1.1.4 Gênero *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é considerado como um dos maiores da família Myrtaceae (McVaugh, 1969), muito bem representado em todo o território brasileiro, apresentando cerca de 300 espécies distribuídas desde a América Central até o sul do Brasil, habitando ambientes de savanas e florestas primárias e secundárias (Landrum; Kawasaki, 1997).

De acordo com levantamento realizado por Cruz e Kaplan (2004), 74,1% das espécies da família Myrtaceae empregadas para fins medicinais, popularmente conhecidas por pedra-ume-caá, é atribuída a diversas espécies do gênero *Myrcia* DC. e *Eugenia* L. No uso popular, é proferido como efeito hipoglicemiante de pedra-ume-caá designando-a como insulina vegetal. A população a utiliza em decocto das folhas ou até mesmo das raízes para diabetes, enterite, hemorragia, agente cicatrizante e anti-inflamatório (Kalill *et al.*, 2000).

Outros estudos têm demonstrado atividade de extratos de folhas de *M. fallax* (Rich.) DC. frente a células cancerígenas humana do tipo KB5 e atividade hipoglicemiante de mirciatricina I e mirciafenona B, isoladas das folhas de *M. multiflora*, associada à inibição da atividade das enzimas aldose redutase e α -glicosidase (Yoshikawa *et al.*, 1998). Em estudos químicos, foram descritos a presença de flavonas, acetofenonas e flavonóis em folhas de *M. multiflora*. E para as folhas de *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., foram identificados a presença de β -amirina e eucaliptina (Gottlieb *et al.*, 1971).

Além das atividades farmacológicas observadas para o extrato de espécies do gênero *Myrcia*, é demonstrado o potencial do óleo essencial dessas espécies. Estes óleos, por sua vez, podem apresentar variações e intervir nas suas propriedades biológicas (Vieira *et al.*, 2001; Ronse *et al.*, 1997). Gottlieb *et al.*, (1981) descreveram a composição do óleo volátil de *M. cuprea* (O. Berg) Kiaersk., caracterizando a presença de (E)-nerolidol. Henriques *et al.*, (1997) analisaram a composição química do óleo volátil de folhas de *M. acuminatissima* (O. Berg), *M. bombycina* (O. Berg) Kiaersk., *M. fallax*, *M. glabra* (O. Berg) D. Legrand e *M. multiflora*, identificando como constituintes majoritários linalol, pinenos, germacreno D, β -cariofileno, α -bisabolol e selinenos.

Zoghbi *et al.*, (2003) também analisaram os óleos voláteis de partes aéreas de *M. bracteata* (Rich.) DC., *M. cuprea* e *M. sylvatica* (G. Mey.) DC. e relataram a presença de mirceno, (E)-nerolidol, (E)- β -farneseno, espatulenol, β -cariofileno, germacreno D, selin-11-en-4- α -ol e *cis*-calameneno, como os componentes mais representativos para as espécies.

1.1.5 *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.

Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC., sinônimo *M. ambigua* DC., *M. ambigua* var. *mergulhos* O. Berg, *M. ambigua* var. *multiflora* O. Berg, *M. ambigua* var. *pauciflora* DC., *Myrtus lucida* L., *M. sylvaticus* G. Mey. (Sobral, 2013), é um arbusto de aproximadamente 2,5 m, com folhas

pequenas, opacas, puntiformes (Fig. 2) distribuídas no leste da América do Sul, na Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Panamá, Peru, Suriname, Venezuela até o leste do Brasil (McVaugh, 1968; Holst *et al.*, 2003).

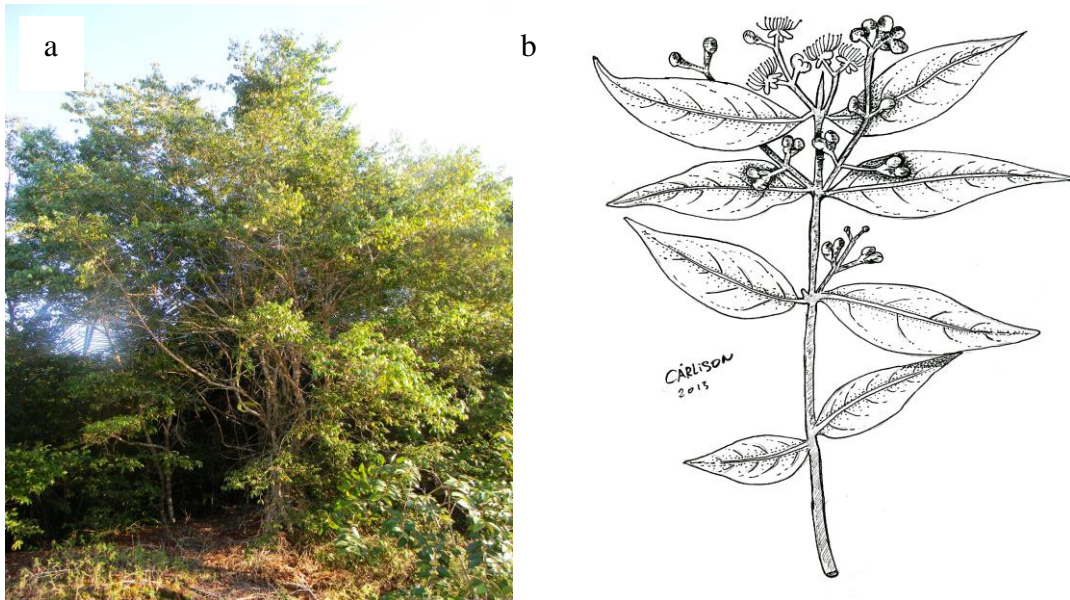


Figura 2: *Myrcia sylvatica* (G.Mey) DC. (a) arbusto da espécie; (b) representação morfológica de parte da planta. Foto: Leomara Andrade, 2012.

Sobral (2013) relatou que *M. sylvatica* possui uma distribuição geográfica no Norte, Nordeste e Centro Oeste do Brasil. É uma das espécies da família Myrtaceae mais difundidas e habitualmente coletadas no continente sul americano, sendo frequentemente encontrada em solos pobres em nutrientes e solos arenosos (Holst *et al.*, 2003).

Myrcia sylvatica floresce nos meses de junho a dezembro e seus frutos tendem a amadurecer de outubro a fevereiro. Popularmente a espécie é conhecida como cumatê-folhamiúda, murtinha e pedra-ume-caá. Na cidade de Belém- Pará é comercializada como pedra-ume-caá indistintamente da espécie (Complexo *Myrcia*) e suas folhas são utilizadas na forma de chá. As indicações variam entre tratamento de diabetes, diarreia, afta, inflamação intestinal e hemorragia ou utilizada em banhos, através da maceração das folhas, para tratamento de inflamações uterinas (Da Silva, 2012).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Avaliar o teor, composição química e as atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. em função da biomassa fresca e/ou seca.

1.2.2 Específicos

- ✓ Determinar o teor do óleo essencial de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica*;
- ✓ Determinar os constituintes químicos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM) do óleo essencial de folhas frescas e desidratadas de *Myrcia sylvatica*;
- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica* frente à cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia sylvatica* por meio dos métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico.

2. REFERÊNCIAS

- AFOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COUDERC, F.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and chemical toxicology**, v. 56, p. 352-362, 2013.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS MARIA, J. Efficacy of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 77-81, 2003.
- AMOROSO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n. 2, p.189-203, 2002.
- ASSIS, A. M. D.; THOMAS, L. D.; PERMEIRA, O. J. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.1, p. 191-201, 2004.
- BACKES, P.; B. IRGANG. Árvores do Sul: Guia de Identificação e Interesse Ecológico. **As Principais Espécies Nativas Sul-Brasileiras**. 2. ed. Porto Alegre: CD Vaz e Ricardo Correa, 2002. 325p.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D, IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and chemical toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.
- BANDONI, A. L. **Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores**. 2. ed. Argentina: Red de Editoriales Universitarias: La Plata, 2000, 417 p.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 2008. 624 p.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; BIONDI, D. M.; RUBERTO, G. Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oils Research**, v. 10, p. 618-627, 1998.
- BARROSO, G. M.; MORIN. P. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. 443 p.
- BERG, M. E. V. D. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. 207p.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839–851, 2001.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRIGGS, B. G.; JOHNSON, L. A. S. Evolution in the Myrtaceae: evidence from inflorescence structure. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 102, p. 157–256, 1979.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food**. v. 94, p. 223–253, 2004.

- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, 154, p. 167-170, 2008.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, n.4, p.247-279, 2005.
- CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In: FIGUEIREDO, A. C.; J. G. BARROSO, L. G. PEDRO (Eds.). **Potencialidades e Aplicações e Mediciniais. Curso: Teórico-Prático**. 3ª Ed. Lisboa: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007, p. 55-62.
- CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova. São Paulo**, v. 21, p. 99, 1998.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.
- CHANDRASHEKAR, K. S.; PRASANNA, K. S. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, p. 23-25, 2010.
- CHEN, C. C.; CHEN, Y.; HSI Y. T.; CHANG C. S.; HUANG, L. F.; HO C. T.; WAY T. D.; KAO JY. Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11418–11427, 2013.
- CHOU, S.-T.; LAI, C.-P.; LIN, C.-C.; SHIH, Y. Study of the chemical composition, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of essential oil from *Vetiveria zizanioides*. **Food Chemistry**, v. 134, p. 262-268, 2012.
- CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.210 p.
- CROTEAU, R. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In: Herbs, spices and medicinal plants. **Recent Adv. Bot. Horticult. Pharmacol.** v.1, p. 81–135, 1986.
- CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v.11, n.1, p.47-52, 2004.
- DA SILVA, F. K. S. **Sinopse e composição química dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae comercializadas como pedra-ume-caá em Belém-Pará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Belém, 2012.
- DE OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.
- DORMAN, H. J.D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–315, 2000.

- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiências**, v.7, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils affecting volatile and essential oil production in plants. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213–226, 2008.
- GLOBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, A. P. S.; RODAL, M. J. N.; MELO, A. L. M. Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifólia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 37-48, 2006.
- GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 3 p. 1185, 1971.
- GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHAES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 143-148, 1981.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, L. H. S.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. J. World Checklist of Myrtaceae. **Kew, Royal Botanic Garden**, v. 1, p. 57-59, 2008.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. USA: Oxford University Press. 2000. 704 p.
- HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V., NIELSEN, J. B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia*(tea tree) oil. **Food Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 616–62, 2006.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoid. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67–202, 2002.
- HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Essential oils from five southern brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 1, p. 13-18, 1997.
- HOLLEY R, A., PATEL, D. Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005.
- HOLST, B. K.; LANDRUM, L.; GRIFO, F. Myrtaceae. In: STEYERMARK, J. A.; BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLTZ, B. K. (eds.) **Flora of the Venezuelan Guayana**. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, v.7, p. 1-99, 2003.

- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; Przybylski, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.
- IONITA P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen active species. **Chemical Papers**, v. 59, n, 1, p. 11-16, 2005.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. v. 1, p. 777.
- JUNQUEIRA, P. C. **Determinação do conteúdo orgânico-mineral e avaliação do potencial antioxidante da insulina vegetal (*Cissus sicyoides*, L.)**. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimento) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- KALIL F. A. N.; KALIL, G. P. C.; LUZ, A. I. R. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Conservação de Germoplasma de Plantas Aromáticas e Medicinais da Amazônia Brasileira para Uso Humano**. EMBRAPA, 2000. n. 50, p. 1-4.
- KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21 st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, n. 2, p. 135-148, 2001.
- KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A.; KESDEK, M.; KAYA, Y.; KILIC, H. 2008. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 360-368, 2008.
- LANDRUM, L. R. Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium and Luma, Myrtaceae. **Flora Neotropica**, v. 45, p. 1-178, 1986.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LIRA, C. S.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; PAIVA, L. M.; PAIVA, P. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; NAPOLEÃO, T. H.; NAVARRO, D. M. A. F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v. 71, p. 95-100, 2015.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil** . 1 ed. São Paulo: Plantarum, Nova Odessa. 1992. v.1, 450p.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil** . 2. ed. São Paulo: Plantarum, Nova Odessa. 1998, v. 2, 480p.
- LUCAS, E. V.; HARRIS, S. A., MAZINE, F. F.; BELSHAM, S. R.; LUGHADHA, E. M. N.; TELFORD, A.; GASSON, P. E.; CHASE, M. W. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). In: **International Association for Plant Taxonomy. Táxon**. v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.
- MANDEGARY, A.; ARAB-NOZANI, M.; RAMIAR, H.; SHARIFIFAR, F. Anticonvulsant activity of the essential oil and methanolic extract od *Bunium persicum* (Boiss). B. Fedtsch. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 447-451, 2012.
- MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Caderno acadêmico**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

- MCVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae – an interim report. **Taxon**, v. 17, n. 4, p. 354-418, 1968.
- MCVAUGH, R. Myrtaceae. In MAGUIRE, B.; BOOM, B. M.; STEYERMARK, J. A. **The Botany of the Guayana highland**. Memoirs of The New York Botanical Garden, 1989, v. 18. p. 55-286.
- MIGUEL, M. G. Plantas aromáticas e medicinais como antioxidantes naturais: métodos de análise. In FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, L. G. PEDRO (Eds.) **Potencialidades e Aplicações e Medicinais. Curso: Teórico-Prático**, 3ª Ed. Lisboa: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007, p. 55-62.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MORAIS LAS. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27: n. 2, p.4050- 4063.
- NARVAES, L. S.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Florística e classificação da regeneração natural em floresta Ombrófila Mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 18, n. 2, p. 233-245, 2008.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. E. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K.; Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122–3128, 2002.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**, 1 ed. Brasília, DF: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Serviço de Produção de Informação, 1994. 320 p.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n 4, p 755-760, 2006.
- RAMZI, A. A. M.; SALAH, A. A. A.; SIDGI, H.; FAISAL, M. N. A.; SAMA, A. Z. A.; ULRIKE, L. Atimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. **eCam**, v. 7, n. 3, p. 323–330, 2010.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projecto Madeira de Santa Catarina. Sellowia, **Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 28, 320 p. 1978.
- RIBEIRO, E. T. S. **Emprego de Técnicas de Extração a Alta e Baixa Pressão para Obtenção de Polifenóis Antioxidantes do Subproduto Agroindustrial de Maçã**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RONSE, A.; DE POTTER, H. D.; DE PROFT, M. Essential oils of *Otacanthus*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 1365-1368, 1997.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SHAHIDI F.; NACZK, M. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Technomic Publishing Co, Lancaster, Basel, 1995. 281 - 319p.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos Essenciais: Potencial Anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, C. V.; BILIA D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 86-92, 2005.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, p. 95-103, 1999.

SIMÕES C. M. O; SPITZER V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN,G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade-UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC. 1999, p. 387-415.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed, Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFSC, 2004. 1102 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010, 415 p.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 1 Nov. 2013

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II** . 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 703 p.

STASHENKO, E. **Aceites Esenciales. División de Publicaciones**. UIS - Universidade Industrial de Santander: Bucaramanga, 2009, 124p.

SVOBODA, K. P.; DEANS, S. G. Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. **Acta Horticulturae**, v. 390, n. 1, p. 203-209, 1995.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem** v. 15, n.1, p. 115 – 121, Fev. 2006.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p.4989-4993, 2002.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 3, p. 287 - 304, 2001.

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

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**. Editora Springer-Verlag, v. 251, p. 3-19, 2005.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II.1) Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, p. 113-119, 1998.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. Essential oils from three *Myrcia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 421–424, 2003.

CAPÍTULO 1

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE *Myrcia sylvatica* (G. MEY.) DC. (MYRTACEAE)

Leomara Andrade da Silva
Sandra Layse F. Sarrazin
Victor Yased Perez Calão
José Guilherme S. Maia
Ricardo B. de Oliveira
Rosa H. Veras Mourão

*Capítulo escrito de acordo com as normas da revista **Natural Products Communications** (em anexo a versão do artigo em inglês submetido no mês de março de 2015).

Composição e Atividade Antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE)

Leomara A. da Silva^{a,b}, Sandra Layse F. Sarrazin^{b,c}, Victor Y. P. Calao^{a,b}, Ricardo B. Oliveira^{a,b}, Chieno Shumitsu^d, José Guilherme S. Maia^{a,b,e*} Rosa Helena V. Mourão^{a,b,c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brasil

^b Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, AM, Brasil

^d Laboratório de Botânica, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brasil

^e Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, 66075-900 Belém, PA, Brasil

gmaia@ufpa.br; mouraorhv@yahoo.com.br

RESUMO

Os constituintes de óleos essenciais de *Myrcia sylvatica* (folhas frescas e secas) foram identificados por GC-EM e submetidos à análise antimicrobiana. A planta foi coletada em uma área de savana na região do Oeste do Pará, Brasil. As composições do óleo não são muito diferentes dos obtidos anteriormente com as outras espécies de *Myrcia* brasileira. Foram identificadas sessenta e três constituintes, com grande predominância de sesquiterpenos pertencentes às rotas de ciclização dos grupos cariofilano, germacrano, cadinano e bisabolano, tais como 1-*epi*-cubenol, *ar*-curcumeno, cadaleno, β -selineno, β -calacoreno, cis-calameneno, artumerol, muscatona, δ -cadineno, e cubenol. Com base nos resultados, os óleos podem ser considerados bactericidas para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (0,15 μ L / mL e de 2,5 μ L/mL, respectivamente) e bacteriostáticas para *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (20 μ L/mL, para ambos), todas as bactérias Gram-positivas. Os óleos não foram ativos para as bactérias Gram-negativas e leveduras.

Palavras - chave: *Myrcia sylvatica*, Myrtaceae, Óleo essencial, Composição química, Atividade antimicrobiana.

Introdução

Myrtaceae compreende 142 gêneros e 5.500 espécies de árvores e arbustos, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América tropical e Oceania, e algumas espécies na África (Wilson et al., 2001). Na América do Sul é representada principalmente por árvores frutíferas e no Brasil, é uma das mais diversificadas, onde são encontrados 23 gêneros e cerca de 1000 espécies, todas pertencentes à subfamília Myrtoideae, tribo Myrteae [1a, 1b, 1c].

O gênero *Myrcia*, considerado um dos maiores de Myrtaceae, com cerca de 300 espécies distribuídas da América Central ao Sul do Brasil, habita os ambientes de savanas de florestas primárias e secundárias [1a, 1d]. *Myrcia Sylvatica* (G. Mey.) DC. [Syn. *M. sylvatica* G. Mey., *M. ambigua* DC., *M. ambigua* var. mergulhos O. Berg, *M. ambigua* var. multiflora O. Berg, *M. ambigua* var. pauciflora DC., *Myrtus lucida* L.] [1e] (<http://www.tropicos.org/Name/22101901>, acessado em dezembro de 2014), é um arbusto de 2,5 m de altura, com pequenas folhas opacas puntiformes, que ocorre a partir das Guianas ao leste do Brasil [1d] e é conhecida como "pedra-ume-caá", "murta" ou "vassourinha".

Óleos essenciais e extratos de algumas espécies de *Myrcia* foram avaliados para várias propriedades biológicas. As folhas de *Myrcia multiflora* DC. têm sido usadas no tratamento para diabetes no Norte do Brasil, que apresentam atividade de inibição da redutase de aldose e α -glicosidase, e no aumento do nível de glicose no soro [2a]. O extrato metanólico de *Myrcia uniflora* Barb. Rodr. foi capaz de inibir *in vitro* a peroxidase da tireoide e dois flavonoides isolados mearnsitrina e miricitrina, têm mostrado uma significativa inibição da tireoide peroxidase [2b]. O óleo de *Myrcia pubiflora* DC. apresentou propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias, que ocorre provavelmente através da inibição de mediadores inflamatórios liberados por via de periféricos de ratos [2c]. O óleo da flor de *Myrcia fallax* (Rich.) DC. foi eficaz contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [2d]. O óleo de *Myrcia alagoensis* O. Berg. apresentou atividade antibacteriana contra cinco bactérias [2e]. As amostras de óleo de *Myrcia ovata* Cambess., existente em Guaramiranga, Ceará, Brasil, foram eficazes contra o crescimento de microorganismos gastrointestinais e formação de biofilme de *E. faecalis* [2f], e mostraram também propriedades antinociceptiva e anti-inflamatórias [2 g].

Nos óleos essenciais de *Myrcia* tem ocorrido com mais frequência compostos sesquiterpênicos, com predominância dos sesquiterpenos cíclicos [3a, 3b]. O sesquiterpeno hidrocarboneto (*E*)-cariofileno é o constituinte mais comum em óleos de *Myrcia* [3c], mas alguns hidrocarbonetos monoterpênicos foram também identificados, tais como os grandes conteúdos de mirceno e α -pineno nos óleos de *M. cuprea* (O. Berg.) Kiaersk e *M. myrtifolia*, respectivamente [3d, 3e]. Constituintes alifáticos e aromáticos são raros nos óleos essenciais de *Myrcia* [3f]. As composições dos óleos de folhas e talos finos de *Myrcia sylvatica* amostrados em Tocantins, Brasil, foram relatados anteriormente, com uma predominância do sesquiterpeno oxigenado selin-11-en-4- α -ol, óxido de cariofileno e espatulenol [3d].

No Baixo Amazonas, no município de Santarém, Oeste do Pará, Brasil, espécies de *Myrcia* são abundantes e diversificadas. Entretanto, poucos estudos relacionados tem sido relatados quanto à composição de seus óleos essenciais, bem como sobre o seu potencial biológico. Este trabalho, que está associado com o inventário das plantas aromáticas e medicinais do oeste do Pará, tem como objetivo avaliar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. A espécie é bastante abundante nas imediações da cidade de Santarém, e com uso popular para o controle da disenteria e parasitose intestinal.

Rendimento do óleo essencial e análise da composição:

Os óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica* mostraram rendimento médio de $0,9 \pm 0,05\%$ e $1,1\% \pm 0,05$, respectivamente. Ambos os óleos têm cor verde musgo, com um forte aroma picante e levemente amadeirado. Os óleos foram analisados por GC e GC-MS. No total, foram identificados sessenta e três componentes, com uma grande predominância de sesquiterpenos cíclicos, listadas na Tabela 1. No óleo da planta fresca foram encontrados 32,3% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 40,2% de sesquiterpenos oxigenados, enquanto no óleo da planta seca foram identificadas 41,7% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 39,6% de sesquiterpenos oxigenados. Os hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados foram representados secundariamente nos óleos. Nesta ordem, os números foram de 5,6% e 10,5% para a planta fresca, enquanto que os números foram de 4,1% e 7,7% para a planta seca, respectivamente. Os dez principais sesquiterpenos cíclicos encontrados nos óleos foram 1-*epi*-cubenol (9,9% e 6,9%), *ar*-curcumeno (1,9% e 7,6%), cadaleno (7,2% e 5,8%), β -selineno (7,0%

e 6,0%), β -calacoreno (5,4% e 5,5%), *cis*-calameneno (4,8% e 5,2%), *ar*-tumerol (0,0% e 4,9%), muscatona (4,4% e 3,4%), δ -cadineno (4,2% e 4,2%), e cubenol (4,2% e 4,2%). Estes resultados corroboram com resultados obtidos anteriormente com outras espécies de *Myrcia* brasileira, com predominância de sesquiterpenos pertencentes às rotas de ciclização dos grupos cariofilane, germacrano, cadinano e bisabolano [4]. O conteúdo de sesquiterpenos cíclicos, *ar*-curcumeno, β -curcumeno e *ar*-tumerol, pertencentes ao grupo bisabolane, contribuiu com mais de 12,0% para o percentual total do óleo essencial das folhas secas se comparado com o óleo essencial das folhas frescas.

Tabela 1: Rendimento e composição dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica*.

Rendimento do óleo (%)			Folhas frescas	Folhas secas
			0,9	1,1
Constituintes	IR _{Calc}	IR _{Lit}	Óleo %	
α - pineno	937	932	2,1	1,8
Thuja-2,4(10)-dieno	955	953	0,1	0,1
β - pineno	977	974	2,3	1,5
δ -3- careno	1007	1008	-	0,1
<i>p</i> - cimeno	1023	1020	0,3	0,2
Limoneno	1028	1024	0,3	0,2
(<i>E</i>)- β - ocimeno	1046	1044	0,1	-
Terpinoleno	1088	1086	0,1	-
<i>p</i> -Cimeneno	1094	1089	0,3	0,2
Linalol	1100	1095	0,1	0,1
<i>Exo</i> - fenchol	1126	1118	0,1	0,1
α - camfelenal	1126	1122	0,1	0,1
Momoterpeno oxigenado N.I. , MM=150	1136	-	0,3	0,6
Nopinona	1140	1135	0,6	0,3
<i>Trans</i> - pinocarveol	1144	1135	2,9	1,8
<i>p</i> - menta-1,5-dien-8-ol	1162	1166	0,3	0,2
Pinocarvona	1165	1160	0,7	0,6
Monoterpeno oxigenado N.I., M.M.=150	1177	-	0,6	0,6

(3Z)- hexenil butanoato	1189	1184	0,1	0,2
<i>p</i> - cimeno-8-ol	1184	1179	0,4	0,6
α - terpineol	1195	1186	0,7	0,6
Mirtenol	1198	1194	3,7	2,3
Monoterpeno oxigenado N.I., M.M.=152	1211	-	-	0,2
Verbenona	1209	1204	0,4	0,6
<i>Trans</i> - carveol	1218	1215	0,3	0,2
Carvona	1244	1239	0,1	0,1
Álcool perila	1299	1294	0,1	0,1
α - cubebeno	1349	1345	0,3	0,2
α - ilangeno	1380	1373	0,4	0,4
Isoledeno	1382	1374	0,6	0,4
α - copaeno	1380	1374	1,5	1,3
β - elemeno	1396	1389	0,3	0,4
(Z)- cariofileno	1417	1408	0,9	1,1
(E)- cariofileno	1422	1417	-	0,4
β - ylangeno	1424	1419	0,3	0,6
β - copaeno	1440	1430	0,1	-
(E)- α - bergamoteno	1442	1433	-	0,2
(E)-muuroala-3,5-dieno	1456	1451	0,2	0,2
α - humuleno	1463	1452	-	0,2
β - santaleno	1464	1457	0,1	-
γ - muuroleno	1483	1478	1,0	1,0
<i>ar</i>- curcumeno	1483	1479	1,9	7,6
10,11- epoxy-calameneno	1496	1491	0,4	0,4
α - zingibereno	1497	1489	-	0,2
β- selineno	1498	1490	7,0	6,0
γ - amorfeoe	1504	1495	0,9	-
β - curcumeno	1509	1503	-	2,1
β - bisaboleno	1510	1503	-	1,0
δ- cadineno	1528	1522	4,2	4,2

cis- calameneno	1534	1528	4,8	5,2
Sesquiterpeno oxigenado N.I., M.M.=220	1540	-	-	1,0
α - calacoreno	1546	1544	2,0	3,1
Silfiperfol-5-en-3-ol A	1562	1557	2,2	2,5
β- calacoreno	1565	1564	5,4	5,5
Sesquiterpeno oxigenado N.I., M.M.=220	1569	-	1,0	-
Sesquiterpeno oxigenado N.I., M.M.=218	1575	-	2,0	-
Espatulanol	1585	1577	1,8	1,7
ar- tumerol	1586	1582	-	4,9
Óxido de cariofileno	1588	1582	3,7	-
Gleenol	1591	1586	3,2	2,1
β - copaen-4- α -ol	1597	1590	1,5	-
β - óxido himacaleno	1615	1615	2,8	2,1
Helifolen-12-al C	1622	1619	1,8	1,8
Helifolen-12-al D	1624	1619	-	1,7
1-epi- cubenol	1636	1627	9,9	6,9
Cubenol	1650	1645	4,2	4,2
Cadaleno	1680	1675	7,2	5,8
Muscatona	1686	1676	4,4	3,4
10-nor-calamenen-10-one	1712	1702	1,2	1,4
ar- curcumeno-15-al	1716	1712	-	1,1
Hidrocarbonetos monoterpenicos			5,6	4,1
Monoterpenos oxigenados			10,5	7,7
Hidrocarbonetos sesquiterpenos			32,3	41,7
Sesquiterpenos oxigenados			43,9	39,6
Monoterpenos e sesquiterpenos, N.I.			3,9	2,4
Total			96,2	95,5

N.I.: não identificado; M.M.: massa molecular; IR: índice de retenção

Previamente, três amostras de folhas (S1, S2 e S3) de *M. sylvatica*, foram coletadas em áreas de cerrado do estado de Tocantins, Brasil, rendeu óleos essenciais de diferentes

composições: S1, selin-en-4- α -ol (24,7%), óxido de cariofileno (16,6%) e espatulenol (13,8%); S2, cis-calameneno (30,1%), espatulenol (18,7%) e α -calacoreno (11,5%); S3, espatulenol (40,2%), β -bisaboleno (14,7%) e α -cadinol (9,4%) [3d]. Estes sesquiterpenos também mostraram as rotas de ciclização dos grupos cariofileno, germacrano, cadineno e bisabolano. A composição de óleos normalmente varia com a estação, a idade da planta, e composição do solo. Por esta razão, estes resultados se baseiam numa única amostra de óleo em cada local de coleta. Desta forma, pensamos que a composição química dos óleos analisados apresentaram variação qualitativa e quantitativa, devido a influência das condições ambientais de locais de coleta. Estes resultados sugerem a presença de diferentes tipos químicos de *M. sylvatica* na Amazônia brasileira. Ao mesmo tempo, esses tipos químicos podem ter significado ecológico e taxonômico na gestão e utilização econômica desta espécie.

Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais de *M. sylvatica* apresentaram zonas de inibição igual ou superior a 8 mm (Tabela 2). Os resultados de CIM e CBM estão representados na Tabela 3. Os óleos de folhas frescas e secas apresentaram ação antimicrobiana apenas contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 2228, *Bacillus cereus* CCCD-B001 e *Enterococcus faecalis* ATCC-2942, sendo a menor zona de inibição observada para *S. aureus* (11,06 mm e 11,05 mm) e a maior para *S. epidermidis* (18,65 mm e 14,77 mm), respectivamente. Os halos de inibição de bactérias Gram-negativas e leveduras foi igual ou inferior a 8 mm.

Tabela 2: Halos de inibição do óleo de *M. sylvatica* e gentamicina (padrão) contra bactérias Gram-positivas.

Micro-organismos	Halo de inibição (mm)		
	Óleo da planta fresca 10 μ L	Óleo da planta seca 10 μ L	Gentamicina 10 μ g
<i>S. aureus</i>	11,06 \pm 0,4	11,05 \pm 0,2	20,12 \pm 0,0
<i>S. epidermidis</i>	18,65 \pm 0,2	14,77 \pm 0,1	28,07 \pm 0,2
<i>B. cereus</i>	15,77 \pm 1,4	15,36 \pm 1,8	16,33 \pm 4,2
<i>E. faecalis</i>	16,16 \pm 2,7	13,14 \pm 0,8	15,69 \pm 0,4

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos de *M. sylvatica* que apresentaram zonas de inibição superior à 8 mm.

Micro-organismos	Óleo da planta fresca		Óleo da planta seca	
	CIM	CBM	CIM	CBM
	($\mu\text{L}/\text{mL}$)	($\mu\text{L}/\text{mL}$)	($\mu\text{L}/\text{mL}$)	($\mu\text{L}/\text{mL}$)
<i>S. aureus</i>	2,5	≥ 20	2,5	≥ 20
<i>S. epidermidis</i>	20	≥ 20	20	≥ 20
<i>B. cereus</i>	0,15	0,3	0,15	2,5
<i>E. faecalis</i>	20	≥ 20	20	≥ 20

Frente a bactérias Gram-positivas, o óleo essencial obtido de folhas frescas apresentou maiores zonas de inibição ($p \leq 0,05$) para o *S. epidermidis* e *E. faecalis*, quando comparados ao óleo essencial de folhas frescas. Quando comparamos os diâmetros das zonas de inibição dos óleos essenciais obtidos de folhas frescas e secas com os valores apresentados pelo padrão gentamicina, a zona de inibição do padrão foi estatisticamente superior ($p \leq 0,05$) frente às bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus*, e estatisticamente semelhantes às bactérias *B. cereus* e *E. faecalis* (Figura 1). Nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para as bactérias Gram-negativas e fungos testados.

Ambos os óleos das folhas (frescas e secas) apresentaram valores da CIM de 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ contra a bactéria *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente. Para as outras duas bactérias Gram-positivas, o valor da CIM igual ou maior do que 20,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Portanto, os óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Myrcia sylvatica* podem ser considerados bactericida para as bactérias *B. cereus* e *S. aureus* e bacteriostáticas para as bactérias *S. epidermidis* e *E. faecalis* ($\geq 20\mu\text{L}/\text{mL}$).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. sylvatica*, observada apenas frente a bactérias Gram-positivas, pode estar relacionada à ausência de lipopolissacarídeos nas membranas celulares destes micro-organismos. Ao contrário, em bactérias Gram-negativas, lipopolissacarídeos impedem o transporte de compostos inibidores através das suas células [6a]. De acordo com Sikkema e colaboradores (1995) [6b], as membranas celulares das bactérias podem ser diferentes entre um organismo e outro, afetando sua permeabilidade e, portanto, a sua

resposta para os compostos inibidores. Além disso, não se podem descartar outros possíveis mecanismos, tais como bombas de efluxo, mudanças nos sítios de destino e modificação enzimática do composto inibidor.

O óleo essencial de *Myrcia sylvatica* tem componentes com potencial antimicrobiano já descritos na literatura, com ação isolada ou sinérgica em patógenos humanos. Por exemplo, limoneno e germacreno D são considerados eficazes como compostos antimicrobianos [5]. Os monoterpenos α -pineno, β -pineno e *p*-cimeno mostraram atividade antimicrobiana no óleo essencial de *M. myrtifolia* em bioensaios contra bactérias Gram-positivas [3e]. Estes mesmos compostos foram identificados no óleo essencial de *M. sylvatica*. O óleo essencial de *M. fallax*, também apresentou potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas [2D], corroborando com os resultados deste estudo.

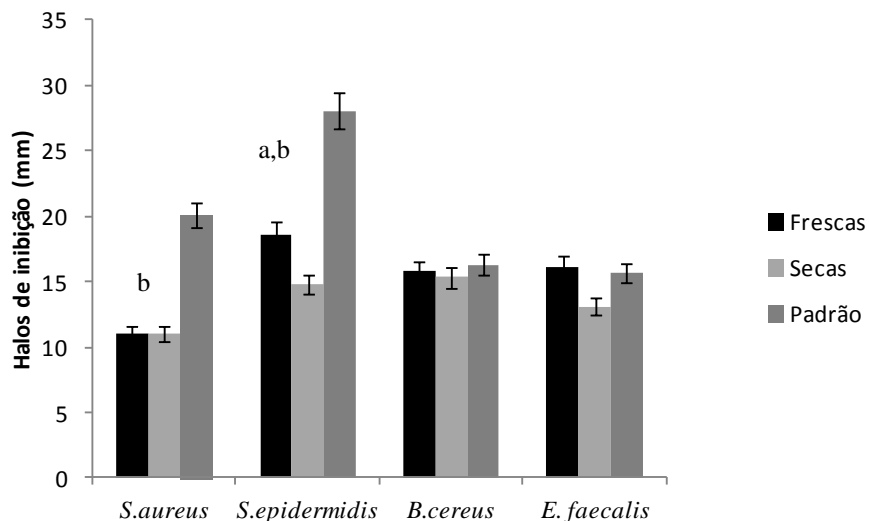


Figura 1: Zonas de inibição para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* e *E. faecalis* quando tratados com o óleo de *M. sylvatica*. (a) é a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os óleos de folhas frescas e secas. (b) é a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os óleos e gentamicina (padrão).

Conclusão

O óleo essencial de *M. sylvatica*, obtido de folhas frescas e secas, são de origem terpênic e tem agradável fragrância picante e amadeirada. Apresentam predominância de sesquiterpenos (76,2% - folhas frescas e 81,3% - folhas secas) em sua composição, como já observado em outras espécies de *Myrcia*. Estes óleos apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-positivas.

Experimental

Material vegetal e processamento

Folhas de *Myrcia sylvatica* foram coletadas em uma área de savana (coordenadas 02 ° 30'31.7 "S e 54 ° 50'59.9" W), perto da Comunidade São Pedro, estrada Everaldo Martins, Km 21, cidade de Santarém, estado do Pará, Brasil. A coleta de dados foi realizada no período da manhã (7h30 - 08h30), de agosto de 2012. A amostra testemunha foi depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental, da cidade de Belém, estado do Pará, Brasil, sob o número IAN 184696. Parte do material coletado foi seco em estufa (Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com circulação de ar (40 °C) até massa constante, cujos dados foram utilizados para o cálculo do rendimento de óleo.

Extração do óleo essencial

Folhas frescas e secas foram moídas e submetidas à hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger (3h). Os óleos foram secos sobre sulfato de sódio anidro, e seus teores percentuais foram calculados com base no peso seco da planta. Os conteúdos de umidade das amostras foram calculados de acordo com a matéria livre de umidade, utilizando uma balança de umidade para medir a perda de água. O procedimento foi realizado em triplicata.

Análise da composição do óleo

A análise dos óleos foi realizada em equipamento Tecnologic Agilent: série Plus CG 6890 acoplado a um detector seletivo de Espectrometria de Massa 5973 e amostrador automático 7863, sob as seguintes condições: DB-5 ms (60 m × que 0,25 mm; 0,25 milímetros de espessura de filme) de sílica fundida coluna capilar; temperatura programada, 50 °C (5 min em modo isotérmico), 150 °C (4 °C / min + 2 min de modo isotérmico), 250 °C (5 °C / min + 5 min em modo isotérmico), 275 °C (10 °C/min, acrescido de 15 min no modo isotérmico); temperatura do injetor, 250 °C; tipo de injeção split (1 mL); fluxo de divisão ajustado para produzir razão de 30:1 ; gás de transporte, hélio; pressão de entrada de 16,5 psi; EIMS, a energia do elétron, 70 eV; temperatura da fonte de íons e linha de transferência, 230 e 285 °C, respectivamente. Os dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por pico normalização de área usando um GC 6890 Plus Series, acoplado a FID Detector, operado em condições semelhantes do sistema de GC-MS. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis,

utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C30, Sigma-Aldrich), de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz (1963) [7a]. Os componentes individuais foram identificados por comparação de ambos os dados de espectro de massa e de retenção de GC com compostos autênticos que foram anteriormente analisados e armazenados na biblioteca particular, bem como com o auxílio de bibliotecas comerciais contendo índices de retenção e espectros de massa dos compostos voláteis comumente encontrados em óleos essenciais [7b, 7c].

Ensaio Antimicrobiano (microrganismos e padronização do inóculo)

A padronização do inóculo de microrganismos seguiu metodologia previamente descrita [8a]. As cepas testadas a partir da American Type Culture Collection (ATCC) e Culture Collection Cefar Diagnostic (CCCD) foram adquiridas comercialmente na forma liofilizada. Os microrganismos utilizados no teste foram escolhidos com base em sua importância clínica: *Enterococcus faecalis* ATCC-2942, *Bacillus cereus* CCDD-B001, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-2228 (bactérias Gram-positivas); *Escherichia coli* ATCC-35218; *Salmonella enterica* CCDD-5004, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-13883 (bactérias Gram-negativas); *Candida albicans* ATCC-10231, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Candida parapsilosis* ATCC-22019 (leveduras patogênicas) [8b]. As cepas bacterianas foram hidratadas em 1 mL de caldo Nutriente e incubadas à 36 °C ± 1 por 24 h. Após este período, foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (MHA-Himedia®) e re-incubados nas condições descritas acima. O mesmo procedimento foi realizado para fungos, com utilização de Caldo Saboraund-Dextrose (CSD) para hidratação e Ágar Saburando-Dextrose (ASD), para semeio, em temperatura de 30 °C ± 1 e tempo de incubação de 48 h. Uma pequena fração de colônias em crescimento foi retirada das culturas em placa e diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%) para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de Mac Farland, equivalente a 1,5 x 10⁸ UFC/mL.

Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. sylvatica* foi determinada inicialmente pelo método padrão de difusão em disco. Neste método, ágar Mueller-Hinton (AMH) foi utilizado como meio de crescimento para bactérias e SD agar, para fungos. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram esterilizados, embebidos em 10 µL de óleo essencial não diluído, e depositados sobre o ágar previamente semeado com os micro-organismos teste. Discos

comerciais de gentamicina (10 µg) foram utilizados como padrões positivos. Após 30 min. à temperatura ambiente, as culturas foram incubadas por 24 h à 37 ± 1 °C (bactérias) ou 48 h à 30 ± 1 °C (fungos). Os resultados foram registrados através da medida, em mm de diâmetro, das zonas de inibição de crescimento. Os testes foram realizados em triplicata, e os valores obtidos foram comparados ao controle positivo.

Ensaio antimicrobiano (Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM))

A diluição do óleo essencial foi feita em solução de Tween 80 (0,5%) para se obter a concentração de ensaio (20 µL/ mL) e, em seguida, realizou-se diluição em série utilizando CMH e CSD para a preparação das outras concentrações. O teste foi realizado em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica do óleo, 90 µL dos meios de Caldo MH ou CSD, e 20 µL do inóculo. O controle do crescimento microbiano, o controle de esterilidade do meio e o controle do solvente foram realizados simultaneamente. Cada poço comportou volume final de 200 µL. Após incubação (24 h, 36 ± 1 °C), a inibição do crescimento de micro-organismos foi revelada pela adição de solução estéril resazurina (20 µL, 0,02%, p/v) (Vetec), após reincubação por 3 h. A CIM, a qual é definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, foi determinada pela permanência da coloração azul (resazurina) nos poços. Os poços que não apresentaram crescimento aparente (mudança de coloração azul para vermelho) foram selecionados para avaliar a CBM e CFM, que foram determinadas pela ausência de crescimento microbiano nas placas contendo meio MHA e ASD, respectivamente [8c].

Análise estatística

Para a avaliação dos dados sobre rendimento, composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, os resultados foram expressos como média (M) \pm desvio padrão (DP). Diferenças entre os grupos foram avaliados por análise de variância e teste de Tukey, utilizando o Programa BioEstat 5.0, considerando valores significativos para $p \leq 0,05$.

Agradecimentos - Os autores agradecem ao CNPq/Bionorte, CAPES/Pró-Amazônia e FAPESPA pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] (a) Landrum LR, Kawasaki, ML. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, **49**, 508-536; (b) Barroso G.M, Peron V. (1994) Myrtaceae. In *Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares*. Vol **1**, Lima, MPM., Guedes-Bruni, RR. (Eds). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 404 pp.; (c) Sobral M, Proença C, Souza M, Mazine F, Lucas E. (2010) Myrtaceae. In *Lista de Espécies da Flora do Brazil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2010. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>; (d) McVaugh R. (1969) Myrtaceae. The Botany of the Guayana highland. *Memoirs of The New York Botanical Garden*, **18**, 55-286; (e) Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org/Name/22101901>).
- [2] (a) Matsuda H, Nishida N, Yoshikawa M. (2002) Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2); Structures of myrciacitrins III, IV and V. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **50**, 429-431; (b) Ferreira ACF, Neto JC, Alba CMS, Kuster RM, Carvalho DP. (2006) Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, **19**, 351-355; (c) Andrade GS, Guimarães AG, Santana MT, Siqueira RS, Passos LO, Machado SMF, Ribeiro AS, Sobral M, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ. (2012) Phytochemical screening, antinociceptive and antiinflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacology*, **22**, 181-188; (d) Alarcón LD, Peña AE, Gonzales NC, Quintero A, Meza M, Usubillaga A, Velasco J. (2009) Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia fallax* (Rich.) DC. from Venezuela. *Revista da Sociedade de Química do Perú*, **75**, 221-227; (e) Silva AD, Uetanabaro APT, Lucchese AM. (2013) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). *Natural Product Communications*, **8**, 269-271; (f) Cândido CS, Portella CSA, Laranjeira BJ, Silva SS, Arriaga AMC, Santiago GMP, Gomes GA, Almeida PC, Carvalho CBM. (2010) Effects of *Myrcia ovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm

formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, 621-627; (g) dos Santos GCM, Gomes GA, Gonçalves GM, de Sousa LM, Santiago GMP, de Carvalho MG, Marinho BG. (2014) Essential oil from *Myrcia ovata*: composition, antinociceptive and antiinflammatory properties in mice. *Planta Medica*, **80**, 1588-1596.

[3] (a) Henriques AT, Sobral M, Bridi R, Lamaty G, Menut C, Bessièrè JM. (1997) Essential oils from five Southern Brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **9**, 13-18; (b) Pereira RA, Zoghbi MGB, Bastos MNC. (2010) Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the Sandbank of the Resex Maracanã, state of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **13**, 440-450; (c) Cerqueira MD, Marques EJ, Martins D, Roque NF, Cruz FG. (2009) Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Quimica Nova*, **32**, 1544-1548; (d) Zoghbi MGB, Andrade EHA, Silva MH, Carreira, LMM, Maia JGS. (2003) Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**, 421-424; (e) Cerqueira MD, Souza-Neto LC, Passos MGVM, Lima EO, Roque NF, Martins D, Guedes MLS, Cruz FG. (2007) Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, **18**, 998-1003; (f) Stefanello MEA, Pascoal ACRF, Salvador MJ. (2011) Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 73-94.

[4] Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. (2004) Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quimica Nova*, **27**, 916-919.

[5] Dorman HJD, Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.

[6] (a) Kabara JJ. (1979) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents - a review. *AOCS Monograph*, **5**, 1-14; (b) Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59**, 201-222.

[7] (a) Van den Dool H, Kratz PDJA. (1963) Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**, 463-471.; (b) Adams RP. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA; (c) NIST (National Institute of Standards and Technology). (2005) *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, V. 2.0d)*. The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, USA.

[8] (a) NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute). (2003) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard, document M2-A8, Wayne, Pennsylvania, USA; (b) ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2007) *Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes*. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e Eventos Adversos (Gipea), Brasília, DF, 21 pp.; (c) NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard, document M2-A9, Wayne, Pennsylvania, EUA.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DE *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE) POR DIFERENTES MÉTODOS ANTIOXIDANTES (DPPH , ABTS, FRAP, β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO)

Leomara Andrade da Silva

Juliana Divina A. Raposo

Laila Portil

Ricardo B. de Oliveira

Rosa H. V. Mourão

*Capítulo escrito de acordo com as normas da revista **Brasileira de Farmacognosia**, a ser submetido.

Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas frescas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (MYRTACEAE) por diferentes métodos antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno)

Leomara A. da Silva^{a,b}, Juliana D. A. Raposo^{b,c}, Laila P. Garcino^d, Ricardo B. Oliveira^{a,b}, Rosa Helena V. Mourão^{a,b,c}*

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brasil.

^b Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, 66075-900 Belém, PA, Brasil.

^d Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74605-220 Goiânia, GO - Brasil.

RESUMO

Muitas plantas medicinais e/ou aromáticas, e em particular seus óleos essenciais, constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Dessa forma, com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia sylvatica* (OEMS), a amostra foi testada por meio do sequestro do radical livre DPPH, captura do cátion ABTS⁺, e pela redução do ferro FRAP e pela peroxidação de lipídeos em sistema β -caroteno/ácido linoleico. Foram utilizados para comparação dos resultados, os padrões trolox e BHA, e todos os testes foram realizadas em triplicata. O OEMS foi capaz de reduzir o radical DPPH, com variação na inibição de 8,6 a 52,0 % e valor de IC₅₀ = 1,94 ± 0,12 mg/mL em 60 minutos de reação e de capturar o cátion radical ABTS com valor de TEAC de 32,85 ± 0,86 μ M de trolox/g de amostra de OEMS. No método FRAP, apresentou valor de z = 193,47 ± 2,63 de μ M de sulfato ferroso/g de OEMS, em 45 min. de reação. No sistema do β -caroteno/ácido linoleico o óleo essencial inibiu 26,1% da oxidação do β -caroteno em 120 min. de reação. O óleo essencial de *M. sylvatica* apresentou atividade antioxidante, porém, com baixa capacidade comparado aos padrões trolox e BHA, por diferentes mecanismos.

Palavras-chave: atividade antioxidante, *Myrcia sylvatica*, óleo essencial.

INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação quando ocorre a produção excessiva de radicais de oxigênio durante processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais (Huang et al., 2005). Através de um ou mais mecanismos, têm como função reduzir a oxidação, como por exemplo, por meio da inibição de radicais livres e complexação de metais (Duarte-Almeida et al., 2006). Naturalmente, os radicais livres são produzidos pelo organismo ou adquiridos de forma exógena, e seu excesso gera o estresse oxidativo (Núñez-Sellés, 2005). Essas substâncias são cada vez mais conhecidas, incitando um maior interesse para o uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, capazes de substituir antioxidantes sintéticos que podem causar carcinogenicidade (Sasaki et al., 2002; Djeridane et al., 2006).

Há um crescente interesse pelos antioxidantes naturais provenientes dos extratos vegetais (Wolfe et al., 2003), principalmente a partir de plantas aromáticas e medicinais, consideradas fontes de antioxidantes naturais. Metabólitos secundários, como os compostos fenólicos entre eles os fenilpropanóides, têm ação antioxidante, que agem impedindo a formação de radicais livres (Singer et al., 2003; Lapornik et al., 2005).

Dessa forma, os óleos essenciais e seus constituintes, têm proporcionado aceitação devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, como potenciais fontes de antioxidantes (Batish et al., 2008). Entre as várias espécies que possuem ampla diversidade para atividades biológicas, estão as espécies da família Myrtaceae, que apresentam alto teor de óleo essencial (Vieira et al., 2004). Algumas espécies da família Myrtaceae foram testadas quanto ao potencial antioxidante, a exemplo, *Eucalyptus citriodora*, pelos métodos FRAP e DPPH (Singh et al., 2012); *Eugenia stipitata*, testadas pelas metodologias Folin-Ciocalteu e DPPH (Neri-Numa et al., 2013); *Eucalyptus rostrata* testada *in vitro* com membrana de coelhos (Okamura et al., 1993); *Myrciaria dubia*, pelos métodos ABTS e FRAP (Villanueva-Tiburcio et al., 2010), *Myrtus comunis* L, pelos métodos DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu, (Gardeli et al., 2008), entre outras.

Em virtude da ausência de estudos com atividade antioxidante do gênero *Myrcia* (Myrtaceae), o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey) DC., pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção do óleo essencial de *Myrcia sylvatica*

Folhas de *Myrcia sylvatica* foram coletadas em uma área de savana (coordenadas 02 ° 30'31.7 "S e 54 ° 50'59.9" W), perto da Comunidade São Pedro, estrada Everaldo Martins, Km 21, cidade de Santarém, estado do Pará, Brasil. A coleta de dados foi realizada no período da manhã (7h30 - 08h30), de agosto de 2012. A amostra testemunha foi depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental, da cidade de Belém, estado do Pará, Brasil, sob o número IAN 184696. Parte do material coletado foi seco em estufa (Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com circulação de ar (40 °C) até massa constante, cujos dados foram utilizados para o cálculo do rendimento de óleo.

Folhas frescas e secas foram moídas e submetidas à hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger (3h). Os óleos foram secos sobre sulfato de sódio anidro, e seus teores percentuais foram calculados com base no peso seco da planta. Os conteúdos de umidade das amostras foram calculados de acordo com a matéria livre de umidade, utilizando uma balança de umidade para medir a perda de água. O procedimento foi realizado em triplicata.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH

A atividade antioxidante do OEMS pelo sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hdrazil) foi determinada de acordo com método de Kondo et al., (2002) com modificações. A amostra de óleo essencial testada foi solubilizada em etanol nas concentrações de 8, 20, 40 e 80 mg/mL. Para a comparação dos resultados foi utilizado trolox (Sigma) como padrão antioxidante. Foi preparada uma solução etanólica de DPPH (60 µM) com absorvância inicial entre 0,6 e 0,7, a temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi analisada a 517 nm em espectrofotômetro UV-visível (NOVA 3300UV).

As determinações foram realizadas pela adição de 1950 µL da solução de DPPH e 50 µL da amostra do óleo, o mesmo procedimento foi realizado para o controle (etanol) e o padrão trolox, nas concentrações de 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mg/mL. A mistura reacional foi agitada, protegida da luz e oxigênio e a absorvância foi monitorada até o ponto final de cada reação, quando a absorvância se manteve constante. A atividade de sequestro do radical DPPH foi

expressa por meio da porcentagem de inibição (%I), onde A_c é a absorbância do controle e A_m a absorbância da amostra, segundo a equação:

$$\%I: (A_c - A_{am}) / A_c \times 100$$

O valor de IC_{50} , ou seja, a concentração mínima da amostra que inibiu 50% do radical DPPH, no meio reacional, foi obtido por regressão linear utilizando os valores de concentração da amostra versus porcentagem de inibição.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre ABTS

A atividade antioxidante do OEMS através da captura do cátion radical $ABTS^+$ (2,2'-azinobis 3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico) foi determinada conforme metodologia descrito por Rufino et al., (2007). A amostra foi comparada com o padrão trolox e os resultados foram expressos em termos da capacidade antioxidante do composto equivalente ao trolox, expresso em valor de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). A solução do cátion radical foi preparada pela reação do ABTS 3,5 mM com persulfato de potássio 140 mM. Para completa reação e estabilização do radical, a solução radical ABTS permaneceu ao abrigo de luz, à temperatura ambiente, por um período de 16 horas. A solução de $ABTS^+$ foi diluída em etanol até obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. A curva de calibração do padrão trolox foi feita nas concentrações de 100, 250, 500, 1000 μM . As concentrações utilizadas para construção da curva de calibração capacidade antioxidante do OEMS foram de 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 mg/mL.

Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 30 μL de cada solução padrão, para tubos de ensaio e adicionado 3,0 mL do radical $ABTS^+$. As absorbâncias foram medidas a 734 nm após 6 min. da reação, e o etanol foi utilizado como branco. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra do OEMS.

A atividade do OEMS em capturar o cátion radical ABTS foi expressa em μM trolox/g de amostra (Z), obtida a partir das equações das retas das curvas concentração de trolox versus absorbância e concentração da amostra versus absorbância (Rufino et al, 2007) .

Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante do OEMS pelo poder antioxidante do ferro, conhecida como método FRAP, foi determinada conforme metodologia descrito por Rufino et al., 2006. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-Tris(2-piridil)-triazina) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, sendo usado imediatamente. Com padrão foi utilizado sulfato ferroso e a curva de calibração foi feita nas concentrações que de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 μM . Para avaliação da capacidade antioxidante do OEMS foram testadas diferentes concentrações da amostra (1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 mg/mL). Para comparação dos resultados também foi avaliada a atividade antioxidante do trolox, testado nas concentrações 25, 62,5, 125 e 250 mg/L. O ensaio foi realizado através da adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 90 μL da solução padrão sulfato ferroso, 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria a 37 °C durante 30 min. e a leitura da absorbância foi medida a 595 nm. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra e trolox.

O poder antioxidante do OEMS em reduzir o ferro foi expresso em μM sulfato ferroso/g de amostra (Z), obtido a partir das equações das retas das curvas concentração de sulfato de ferro versus absorbância e concentração da amostra versus absorbância (Rufino et al., 2007).

Determinação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (Duarte et al., 2006). Assim, a habilidade do OEMS em prevenir o descoloramento do β -caroteno foi avaliada conforme descrito por Koleva et al., (2002) e Rufino et al., (2006). A amostra de óleo essencial e os padrões antioxidantes (BHA e trolox) foram solubilizados em etanol em três concentrações (0,5; 1; 4,0 mg/mL). Uma solução de β -caroteno e ácido linoleico foi preparada a partir de 0,2 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 20 μL de ácido linoléico e 265 μL de Tween 40. O clorofórmio foi completamente evaporado com auxílio de oxigenador. Em seguida, foi adicionado cerca de 100 mL de água ultra-pura previamente saturada com oxigênio por 30 minutos. A mistura foi agitada

vigorosamente apresentando uma coloração amarelo-alaranjada e com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm.

O ensaio foi realizado através da adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 2,5 mL da mistura reativa e 0,2 mL da amostra de OEMS nas diferentes concentrações e a leitura realizada imediatamente no tempo zero a 470 nm. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria à temperatura de 50 °C, e a absorvância foi monitorada por 120 min em intervalos contínuos de 15 min. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (etanol), e os padrões BHA e trolox.

A capacidade do OEMS de proteger um substrato lipídico da oxidação foi expressa em termos de porcentagem de inibição da oxidação (%I), que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle (Ac) e da amostra (Aam) do tempo 0 e 120 min. Segundo a equação:

$$\%I = (Ac - Aam) / Ac \times 100$$

RESULTADOS

Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH

O óleo essencial de *M. sylvatica* reagiu com radical DPPH com estabilização da absorvância em 60 min. A inibição variou de 8,6 a 52,0 % nas concentrações de 0,2 a 2,0 mg/mL, com valor IC₅₀ de 1,94 ± 0,12 mg/mL, na mistura reacional. A curva de concentração versus inibição da amostra exibiu boa correlação linear com valor de R² de 0,99. O padrão antioxidante trolox foi testado de maneira análoga à amostra do OE. A curva de inibição do trolox foi feita nas concentrações de 1,0 a 5,0 µg.mL⁻¹, com variação na inibição de 10,7 a 63,2 %, na mistura reacional (R² = 0,99). A reação foi bastante rápida em torno de 10 min. O OE de *M. sylvatica* foi capaz de reduzir o radical DPPH, porém apresentou baixa potencial antioxidante do OEMS gente ao padrão trolox. Os valores de IC₅₀ da amostra OEMS determinados em diferentes tempos de reação, assim como o valor de IC₅₀ do trolox, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante do OEMS pelo método DPPH.

Amostra	IC ₅₀
OE 30 min	2,55 ± 0,25 mg/mL
OE 45 min	2,17 ± 0,15 mg/MI
OE 60 min	1,93 ± 0,12 mg/ml
Trolox 10 min	0,003 ± 0,30 mg/ml

*IC₅₀: concentração do antioxidante na mistura reacional que reduz 50% o radical DPPH.

OEMS: óleo essencial de *M. sylvatica* ; DPPH: (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS

Para a avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS⁺ os resultados foram expressos como valor TEAC (capacidade antioxidante total do composto equivalente ao trolox). Assim, o óleo essencial de *M. sylvatica* apresentou atividade antioxidante correspondente a 32,85 ± 0,86 µM de trolox/ g de amostra de OEMS.

Atividade antioxidante pelo método FRAP

O resultado da atividade antioxidante pela redução do ferro para o óleo essencial foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de sulfato ferroso ($R^2 = 0,999$), onde foi possível quantificar a concentração de Fe²⁺ presente em solução, sendo z de 193,47 ± 2,63 de µM de sulfato ferroso/g de OEMS (no tempo de reação de 45 min). Desta forma, foi realizado um estudo do tempo de reação para a redução do ferro a partir da amostra do OE de *M. sylvatica*, realizando a leitura da absorbância das amostras nos tempos de 30, 45 e 60 min. Logo, para esta espécie o melhor tempo de reação para redução do ferro pela amostra do OE foi no tempo de 45 min. O trolox apresentou maior poder antioxidante com valor de z de 3735,9 ± 0,007, no tempo de reação de 10 min. de acordo com o resultado apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Atividade antioxidante do OEMS pelo método FRAP (tempo 45 min.)

Amostras	Valor de Z (μM sulfato ferroso/g de amostra)
OEMS	$193,47 \pm 2,63$
trolox	$3735,9 \pm 0,007$

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; OEMS: óleo essencial de *M. sylvatica*

Determinação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico

Os padrões trolox e BHA, e o OE de *M. sylvatica* foram testadas em diferentes concentrações, contudo com exceção dos padrões, a amostra de OEMS apresentou um percentual com valores de inibição positivo somente após a segunda concentração testada (1 mg/mL). No entanto, comparado aos padrões, a inibição do OEMS foi baixa. O mesmo inibiu 26,1% da oxidação do β -caroteno em 120 min de reação, na concentração de 4 mg/mL (concentração testada mais eficaz). Esta atividade corresponde a 28% e 27,6% das atividades dos padrões trolox (93,4%) e BHA (94,3%), respectivamente (Figura 1).

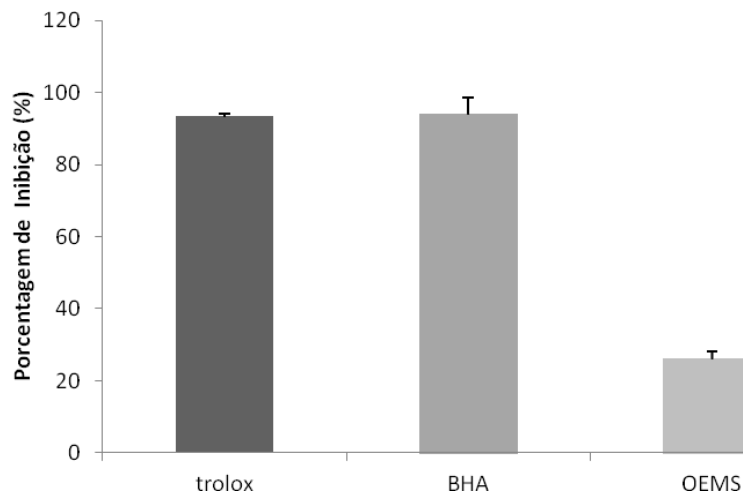


Figura 1.: Porcentagem de inibição pelo método β -caroteno/ácido-linoleico, dos padrões (trolox, BHA) e do OEMS na concentração de 4 mg/mL.

BHA: Butil hidroxianisol ; OEMS: óleo essencial de *M. sylvatica*.

DISCUSSÃO

Não há um método único que avalie satisfatoriamente a atividade antioxidante de uma amostra, pois alguns critérios devem ser levados em consideração, como: técnica de extração, tipo de amostra, componentes químicos presentes, além de parâmetros metodológicos, como tempo, temperatura, tempo de oxidação, mecanismo de ação, presença de componentes interferentes, entre muito outros (Bertoldi, 2006; Becker et al., 2004).

De acordo com a literatura, são poucas as pesquisas que descrevem a capacidade antioxidante de espécies do gênero *Myrcia*. Mas além da carência de pesquisas, alguns trabalhos têm apontado a falta de padronização dos testes antioxidantes *in vitro* realizados, o que dificulta a comparação ou análise dos resultados relatados por diferentes grupos de pesquisadores (Meyer, 2000; Huang et al, 2005; Prior et al., 2005; Frankel; Meyer, 2000).

No entanto, há estudos sobre a atividade antioxidante de outros gêneros da família Myrtaceae. A exemplo, *Eucalyptus citriodora*, a qual apresentou no óleo essencial das folhas frescas de moderada a forte atividade antioxidante (Singh et al., 2012), para *Eugenia stipitata* Mc Vaugh os resultados obtidos a partir do extrato etanólico dos frutos apresentaram para o ensaio de sequestro do radical DPPH $IC_{50} = 0,69 \pm 0,23 \mu\text{g} / \text{mL}$ e TAC-ORAC FL $371,98 \mu\text{mol.TE} / 100 \text{ g}$ (Neri-Numa et al., 2013). Para o extrato etanólico dos frutos de *Psidium guajava* (KBK) Mc Vaugh, a amostra resultou em uma maior atividade antioxidante dos frutos da polpa branca testados nos ensaios de captura do radical DPPH e ABTS (Flores et al., 2015). No extrato metanólico dos frutos de *Myrciaria dubia* (KBK) MC Vaugh a capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH foi mais eficaz conforme testados frutos mais maduros (Chirinos et al., 2010), enquanto que com o extrato do fruto de *Eugenia uniflora* os resultados foram contrários ao de *M. dubia*, avaliado também pelo mesmos ensaios (Celli et al., 2011).

Nos ensaios realizados com o OEMS foram encontrados resultados distintos entre as metodologias com maior ou menor eficiência. No ensaio de sequestro do radical por DPPH, por exemplo, o óleo essencial, mesmo apresentando a capacidade de agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons para que ocorresse a redução do radical DPPH, não se mostrou tão eficaz quando comparado ao padrão trolox. Da mesma forma ocorreu no ensaio de captura do cátion radical ABTS. No método FRAP a amostra apresentou capacidade antioxidante de redução do ferro, porém com redução de 5,2% equivalente ao padrão trolox. No sistema β -caroteno/ácido linoleico, o OEMS não foi capaz de inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação do

ácido linoleico nas concentrações 0,5 e 1 mg/mL, no entanto, na concentração de 4 mg/mL a amostra apresentou capacidade de inibir a oxidação do β -caroteno.

Esses resultados podem ser decorrentes possivelmente pela habilidade dos compostos químicos presentes na *M. sylvatica* em atuar como antioxidante. Dessa forma, esse comportamento pode ser explicado pela composição química do OEMS, pois o mesmo apresenta baixas concentrações de constituintes fenólicos (Silva et al., 2015; Submetido), considerando por tanto que tais compostos em baixa porcentagem podem estar influenciando em uma ação antioxidante menor. Pois já estabelecido, fenóis são antioxidantes eficazes e bem conhecidos (Deighton et al., 1993, Madsen: Bertelsen, 1995; Yanishlieva et al., 1999).

De acordo com Ruberto e Baratta (2000), em particular, alguns hidrocarbonetos monoterpenos, ou seja, terpinoleno, α - e γ -terpineno mostram uma ação antioxidante protetora significativa. No entanto, a atividade antioxidante de hidrocarbonetos sesquiterpênicos no geral é baixa, sendo os sesquiterpenos oxigenados mais ativos. Conforme estudos realizados por Silva et al., 2015 (Submetido), o OEMS apresenta em sua composição química maior porcentagem de sesquiterpenos oxigenados (43,9%) e de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (32,3%), por tanto para os ensaios realizados neste trabalho, provavelmente os compostos sesquiterpenos oxigenados são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante do óleo essencial de *M. sylvatica*.

Desta forma, nos diferentes ensaios realizados com o OEMS foi observado que os valores obtidos, tanto pela porcentagem de inibição, valor de IC₅₀ quanto o valor equivalente ao trolox (antioxidante sintético), mostram que o OEMS apresentou capacidade antioxidante, porém, os valores foram baixos comparados aos resultados dos padrões trolox e BHA.

AGRADECIMENTOS - Os autores agradecem ao CNPq; CAPES / Pró-Amazônia e FAPESPA pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S 2008. Eucalyptus essential oil as a nature pesticide. *For. Ecol. Manage.* 256: (2166-2174).
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH 2004. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 219: (561-571).
- Bertoldi MC 2006. *Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi)*. Viçosa, 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- Celli GB, Pereira-Netto AB, Beta T 2011. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Res. Int.* 44: (2442-2451).
- Chirinos R, Galarza J, Betalleluz-Pallardel I, Pedreschi J, Campos D 2010. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chem.* 120: (1019-1024).
- Deighton N, Glidewell SG, Deans SG, Goodman BA 1993. Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major source of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *J. Sci. Food Agric.* 63: (221-225).
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: (654-660).
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26: (446-452).
- Flores G, WU, S, Negrin A, Kennelly, EJ 2014. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chem.* 170: (327–335).
- Frankel EN, Meyer AS 2000. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80: (1925-1941).
- Gardeli C, Vassiliki, P, Athanasias M, Kibouris T, Komaitis M. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem.* 107: (1120–1130).
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005 The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: (1841-1856).
- Koleva I I, van BTA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. anal.* 13: (8-17).

- Kondo S, Tsuda K, Muto N, Ueda J 2002. Antioxidant activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development no selected apple cultivars. *Sci. Hortic.* 96: (177-185).
- Lapornik B, Prosek M, Wondra AG 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food. Eng.* 71: (214-22).
- Madsen HL, Bertelsen G 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science e Technology.* 6: (271-277).
- Neri-Numa IA, Carvalho-Silva LB, Pinto Morales J., Gomes Malta L., Muramoto MT., Macêdo Ferreira JE, Carvalho JE, Tasca Gois Ruiz AL, Maróstica Junior MR, Pastore GM 2013. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. *Food Res. Int.*50: (70-76).
- Núñez-Sellés, AJ 2005. Antioxidant Therapy: Myth or Reality?. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 : (699-610).
- Okamura H, Mimura A, Niwano M, Yokahara Y 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, New York, 33: (557-561). 1993.
- Prior RL, Wu X, Schaich K 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*53: (4290-4302).
- Ruberto G, Baratta MT 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69: (167-174).
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Mancini Filho J, Moreira AVB 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico.
- Rufino MSM., Alves RE, Brito E S, Morais SM, Sampaio CG 2006. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jiménez JP, Calixto FDS 2007. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S . 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519: (103-119).
- Silva LA, Sarrazin SLF, Calão VYP, Oliveira RB, Shuemitsu C, Maia JGS, Mourão, RHV 2015. Composition and Antimicrobial Activity from Leaf Essential Oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Nat. Prod. Commun.* Submetido para publicação.
- Singer AC, Crowley D E, Thompson IP 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 21: (123-130).

Singh HP, Kaur S, Negi K, Kumari S, Saini V, Batish DR, Kohli RK 2012. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemonscented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *Food Sci. Technol.* 48: (237-241).

Vieira TR, Barbosa LCA, Maltha CRA, Paula VF, Nascimento EA 2004. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Quim. Nova.* 27: (536-539).

Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Asquieri ER 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en lá cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30 : (151-160).

Wolfe K, Wu X, Liu RH 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food. Chem.* 51: (609-614).

Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Ravena VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 64: (59-56).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* é formado com predominância de sesquiterpenos, sem diferença na composição química de amostras do óleo essencial de folhas frescas e de folhas secas. O OEMS apresenta atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e é capaz de inibir a ação dos radicais livres, através da atividade antioxidante em maiores concentrações do óleo essencial, apresentando respostas diferentes de acordo com o método aplicado. É necessário dar continuidade à pesquisa para compreender melhor a ação do OEMS de acordo com sua capacidade antimicrobiana e antioxidante, relacionando à sua composição química.

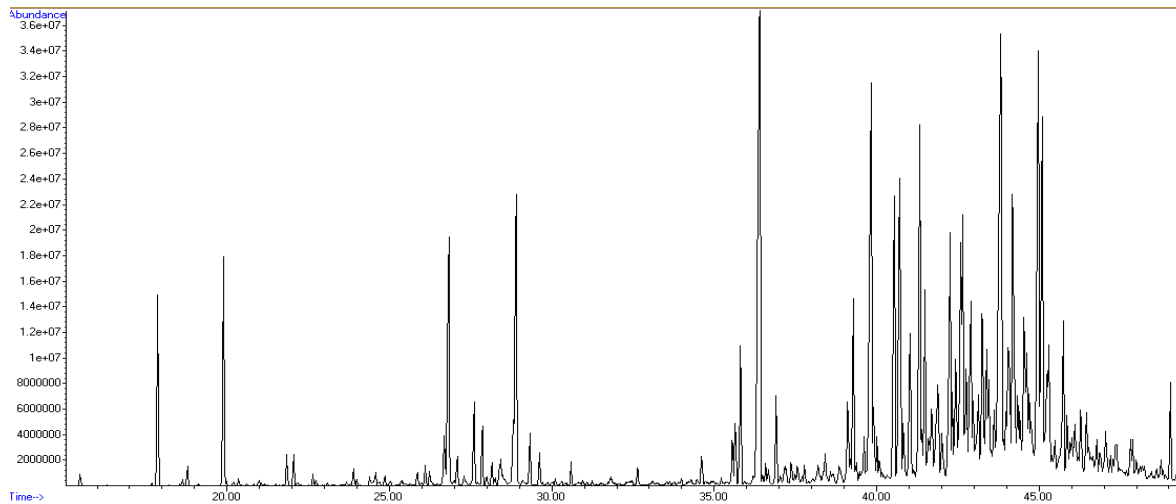
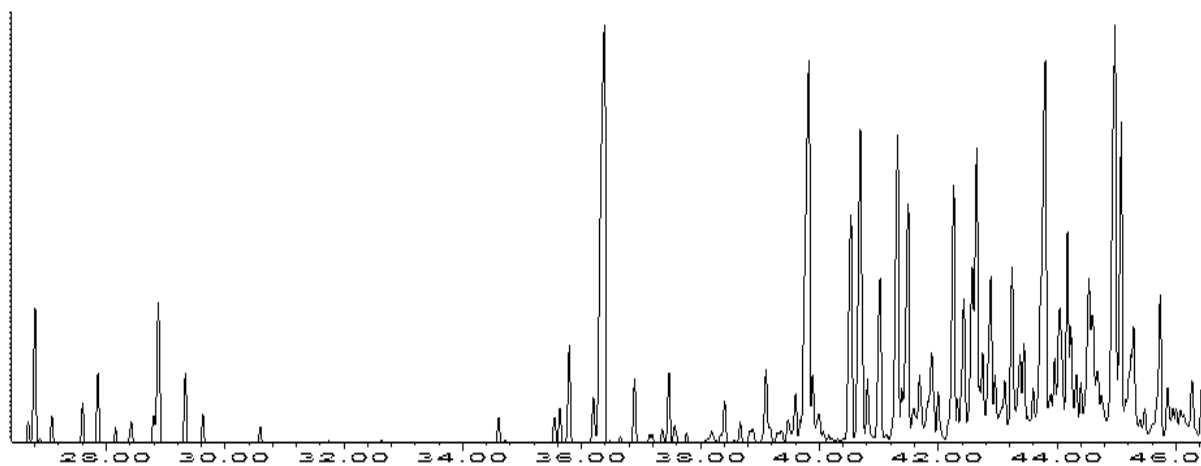
ANEXOS

ANEXO A: Cromatogramas da análise do óleo essencial das folhas frescas e desidratadas de *M. sylvatica*.

ANEXO B: Instruções aos autores para submissão da revista Natural Products Communications.

ANEXO C: Instruções aos autores para submissão da revista **Brasileira de Farmacognosia**.

ANEXO D: Artigo (referente ao capítulo 1) submetido na versão original.

ANEXO A**Cromatograma da Composição Química do Óleo Essencial de Folhas Frescas****Cromatograma da Composição Química do Óleo Essencial de Folhas Secas**

ANEXO B

Information for Authors: Natural Products Communications (Capítulo 1)

Preparation of manuscripts:

In order to achieve uniform presentation and to avoid unnecessary delays because of further inquiries, all authors are urged to observe the following guidelines.

Templates:

NPC Template

Authors are strongly encouraged to use templates for the preparation of manuscripts. The template offers the authors many features that ease manuscript preparation and submission; all graphics and Tables can be integrated into the manuscript where author wishes to place them. Moreover, the use of templates allow authors to view their paper in a style close to the final printed form. All manuscripts will be fully typeset from the author's electronic files. It should be noted that due to defined typesetting standards and the complex requirements of electronic publishing, the Publisher will not always be able to exactly match the layout the author has submitted. The use of journal templates is preferable and its' adoption will speed the publication process. To ensure successful use of template, author should save the final document as word file with a '.doc' extension (rather than the '.dot' extension).

Title Page:

Title : Concise and informative appearing at the top of page one should reflect the contents of the manuscript. First letters of all words should be capitalized except for conjunctions, articles and prepositions.

Author names and affiliations : Please provide fully spelled-out first name of each author and the addresses at which the research was performed. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of appropriate address. Provide

the full postal address of each affiliation, including the country name, and the email address of corresponding author.

Corresponding author: Please indicate the corresponding author with asterisk, who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing, and publications, also-post publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the email address and the complete postal address.

Abstract:

A concise abstract briefly stating the purpose of the research, major findings, and conclusions, should appear on the page.

Keywords:

At the end of textual abstract, authors are requested to provide a list (3-8) keywords which identify most important subjects covered in the manuscript.

Main text:

The manuscript should be written as clearly and concisely as possible. Common headings such as Introduction, Results and Discussion, and Conclusions should not be used as text within these sections should be self explanatory. Please avoid lengthy surveys of the literature, except when perspective (reviews) articles, are involved. Tables must be created in word format and must have a title. Designate footnotes as a, b, c, etc. Number tables consecutively.

Experimental:

Typically this section should be divided into subsections, the contents of which varies according to the subject matter of the article. This must contain all the information to guarantee reproducibility. In an introductory paragraph, special equipment, etc. should be detailed. A precise workup containing all details, e.g., the amount of solvent used for extraction, details of chromatographic purifications and yields etc., should be given. Products yield should be given in terms of g or mol as well as in %.

Physical and spectroscopic data can be included in the experimental section or, in case that a large number of compounds are prepared, presented in tables. Spectroscopic data should be stated in the order and format shown in following example:

PDF Example

¹H NMR: Always give coupling constants for well resolved peaks. After each chemical shift,

enter in parenthesis number of protons, multiplicity, coupling constants, and assignment in that order.

¹³C NMR: Carbon-13 NMR data should be reported to the nearest 0.1 ppm with the number of attached hydrogens designated as CH₃, CH₂, CH and C notion.

Many types of data can be effectively presented in tabular form and authors are encouraged to do so. The title of the table should accurately and concisely describe the contents of the table.

Acknowledgments:

The inclusion of an acknowledgments section is optional. It may include credit to technical assistance, financial support and other appropriate recognition, and should be brief and placed after the experimental section.

Figure legends, Tables, Figures, Schemes:

Every graphic file requires a unique title and must be referred to in the text. Drawings can only be named Scheme, Figure, or Equation.

Crystallographic Data: Complete X-ray data will not be published. They should be deposited at an appropriate international data institute, which is then cited in a reference. If a representation of the crystal structure (e.g., ORTEP) is to be included, it should be accompanied by the following data:

formula

crystal data

method of collection

methods of structure solution and refinement

selected bond lengths and angles

Supplementary data: NPC accepts electronic supplementary material to support and enhance scientific research. Therefore, spectral data all compounds should be included on separate sheets at the end of the manuscript which will be published online. The presence of these files will be signified by a footnote to the article title, and by a description included in a "Supplementary data" section at the end of the paper.

References:

References should be placed collectively after the acknowledgments section and numbered consecutively. Authors are encouraged to list all relevant references and cite extensively. Each

reference may have its own citation number, or alternatively, reference referring to the same topic may be grouped under a common number but separated as (a), (b) (c) etc. List all authors; including diacritical marks (umlaut, acute accent, etc.) when these appear in original. Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with authors. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications should not be in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as “in press” implies that the item has been accepted for publication. Indicate references by number(s) in square brackets in line with text. The actual authors can be referred to, but the reference number (s) must always be given.

Illustration: Line drawing should be supplied on a separate sheet at the same size as the intended version (so no enlargement or reduction is required), maximum width 83 mm(1 column) and 170 mm (2 columns). Lettering on the artwork must be set in 8pt type. Computer-generated artwork must be submitted as laser printed output at a resolution of 600 dots per inch on high quality paper. Dot matrix printer output is unacceptable. Tints are to be avoided; hatching should be used instead. Drawn artwork should be carefully lettered and drawn in black ink. Provide copies as well as the originals.

Black and white photographs should be supplied as sharp, glossy black and white prints (not photocopies or previously published material). Laser output photographs are to be avoided. Both drawings and photographs should be clearly identified on the back with the figure number and the author’s name. Artwork on disk is preferred. Each graphic should be in a separate file, should conform to the information above and be supplied as a source (original) file as well as .EPS file, if different. Provide hard copy print out of each figure, clearly identified.

Color: The facility exist for color reproduction, however the inclusion of color photographs in a paper must be agreed with Editor in advance. Charges for color reproduction will be at the discretion of the Editor and the Publisher.

Proofs: Page proofs for corrections of Publisher's errors only will be emailed to the corresponding author, and should be returned with corrections as quickly as possible, normally within 48 hours of receipt. Any other changes may be chargeable to the author. Proof reading is solely author's responsibility. Author should ensure that corrections are returned in one communication and are complete, as subsequent corrections will not be possible.

Book Reviews: The Editor-in-Chief will be pleased to receive books for possible reviews.

Copyright: By accepting a manuscript, the publisher acquires the copyright, including the right of translation, for the duration of copyrighted period. Therefore, upon acceptance of an article, authors are asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A form to facilitate transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included; the author(s) must obtain written permission from the copyright owner and credit the source(s) in the article.

Copyright Transfer Notice

Reprints: The corresponding author will receive electronic reprints in PDF format accompanied by one copy of the electronic issue free of charge.

Corrections: If errors of consequence are detected in a published paper, the author should send a correction to the Editor-in-Chief for publication as an addition or correction.

ANEXO C

Informação aos autores: Revista Brasileira de Farmacognosia

Forma e preparação de manuscritos

1. NORMAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A publicação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho em diferentes periódicos não é aceitável. Os direitos de publicação passam a ser da Revista Brasileira Farmacognosia, inclusive traduções; publicações subseqüentes são aceitas desde que citada a fonte.

1.2 A **Revista Brasileira Farmacognosia** recebe para publicação trabalhos científicos originais, revisões e comunicações. O conteúdo dos trabalhos é de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do [Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial](#).

1.3 O idioma para a publicação é o inglês. Manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o inglês devem ser verificados por um serviço de edição profissional de língua inglesa antes da submissão. Auxílio de serviços de edição independente pode ser encontrado em <http://journalexperts.com?rcode=BJP>. Este trabalho é pago e de responsabilidade dos autores e o uso de um desses serviços de tradução não garante o aceite ou preferência para publicação.

1.4 A **Revista Brasileira de Farmacognosia** submeterá todos os manuscritos recebidos à análise de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo e que emitirão pareceres para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, rerepresentá-los ao(s) autor(es) com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

1.5 Toda idéia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do [Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial](#).

1.6 Todos os artigos envolvendo estudos com humanos ou animais deverão ter Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

1.7 Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (inclusive coordenadas obtidas por GPS, se possível), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e a localização da exsicata. Os autores devem estar preparados para fornecer evidência documental de que a aprovação para a coleta foi concedida pela autoridade apropriada no país de origem.

1.8 Os seguintes critérios de rejeição têm aplicação imediata: i) o manuscrito não se enquadra nas áreas da Revista; ii) o manuscrito é muito preliminar, com apenas relato de atividade biológica sem a comparação com uma referência ou sem um controle positivo; iii) a origem botânica não está claramente identificada, autenticada e documentada; iv) trabalhos experimentais de atividade antimicrobiana e antioxidante com extrato bruto sem a identificação das substâncias ativas isoladas e identificadas.

2. NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 Os **autores** devem manter uma cópia eletrônica do manuscrito submetido, para o caso de possível perda ou danos causados ao original enviado à revista.

2.2 As **Figuras** (fotografias, gráficos, desenhos etc.) deverão ser apresentadas no final no texto, após as Referências, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas abaixo das figuras. Suas respectivas posições no texto deverão ser indicadas, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.3 As **Tabelas e os Quadros** também devem ser apresentados após as Referências, numerados consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não podem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior dos mesmos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto, onde as tabelas e os quadros serão intercalados, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.4 As **legendas de ilustrações botânicas** devem ser de acordo com as normas adotadas pela revista. Solicitar as normas pelo endereço revista@sbfgnosia.org.br.

3. FORMATAÇÃO DO TEXTO E CONTEÚDO DO TRABALHO

3.1 *Original papers.* Trabalhos originais são artigos de pesquisa original descrevendo

resultados experimentais. O manuscrito deve estar disposto na seguinte ordem: Título, Resumo, Unitermos, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figuras com legendas, Tabelas, Fórmulas estruturais. Resultados e Discussão podem aparecer como duas partes distintas, ou como um combinado "Resultados e discussão". O tamanho normal do texto principal de um trabalho original, excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras, é de cerca de 3000 palavras. Em casos excepcionais e casos devidamente justificados, manuscritos podem ser aceitos. Ao submeter tais manuscritos, os autores devem apresentar uma justificativa com as razões para o texto ser longo.

3.2 Short communication. Esta seção é destinada principalmente para artigos que descrevem isolamento de substâncias conhecidas de nova fonte neotropical, ou resultados complementares de um trabalho em andamento. A comunicação deve ser escrita na seguinte ordem: Título, Resumo com 200 palavras, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos com detalhes dos dados experimentais sem sub-título, Resultados e Discussão em um corpo de texto sem título, Agradecimentos, no máximo vinte Referências, e no máximo três Figuras e/ou Tabelas. Os autores deverão limitar o texto a no máximo 2000 palavras.

3.3 Revisões geralmente a partir de convites pelo editor-chefe. Os textos devem ser concisos e não é necessário incluir detalhes experimentais. O principal objetivo de revisões é fornecer, de uma forma concisa e precisa, o estado-da-arte de um assunto e informar o leitor os desenvolvimentos mais recentes nesta área.

3.4 Além dessas normas, modelos para formatação de trabalhos originais e da carta de submissão estão disponíveis em www.sbfgnosia.org.br/revista. Os autores são convidados a utilizar esses modelos ao preparar um manuscrito.

3.5 Os originais deverão ser redigidos em folhas de papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, quinze e, no mínimo, cinco páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

3.6 Título e subtítulo: Deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito e objetivos da Revista. Estes deverão estar escritos em caixa baixa, negritados, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Para os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola, providenciar também versão do título para a língua Inglesa, o qual acompanhará o Abstract. O nome das plantas no título deve estar completo, incluindo nome do autor e Família,

conforme <http://www.tropicos.org>.

3.7 Autores: Os nomes dos autores devem vir abaixo do título, centralizados. O nome e os sobrenomes devem aparecer na ordem correta, sendo obrigatório que o primeiro (nome) e o último (sobrenome) apareçam por extenso (e.g. Carlos N. U. Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por vírgulas.

3.8 Filiação dos autores: Após o nome de cada autor deverá constar um número Arábico, sobrescrito, que indica sua instituição de procedência e, deverá aparecer logo abaixo da nominata dos autores, também centralizado e com endereços completos, inclusive o CEP da cidade. Deve-se assinalar o nome do autor correspondente com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada. O endereço eletrônico institucional, telefone e fax do autor principal aparecerão na primeira página do trabalho como uma nota de rodapé. A revista não publica endereços eletrônicos comerciais.

3.9 Abstract: Deverá apresentar concisamente o trabalho destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho (máximo de 200 palavras). Os manuscritos devem vir acompanhados também da versão do resumo para a língua Portuguesa. Para autores não-brasileiros, o resumo em português será feito pela revista.

3.10 Keywords: Também em número máximo de seis e separados por vírgula.

3.11 Introdução: Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas e estejam disponíveis.

3.12 Material e Métodos: A descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

3.13 Resultados: Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes deverão ser submetidos a uma análise estatística.

3.14 Discussão: Deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados,

evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Opcionalmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados em um único item.

3.15 Agradecimentos: Este item é opcional e deverá vir antes das Referências Bibliográficas.

4. REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com as exigências da revista, como é mostrado abaixo:

4.1 Citações no texto: no início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. Pereira (1999); no final da citação: autor em caixa baixa e ano - ambos entre parênteses. Ex. (Silva, 1999) ou (Silva & Souza, 1998) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b); citação textual: colocar, também, a página Ex. (Silva, 1999, p.24).

4.2 As Referências Bibliográficas serão ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação. Levar em consideração as seguintes ocorrências:

4.2.1 Revista: Será utilizado a abreviatura do periódico, em itálico, definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: (100-105).

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de *Chemical Abstracts*, como segue:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

Numa citação de citação, colocar o nome das fontes em itálico

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.).

4.2.2 Livro:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:

Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova*

odontologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Tese e Dissertação: Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congressos: Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do *Chemical Abstracts* deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Páginas Internet:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5. ABREVIATURAS

As unidades devem ser de acordo com o Sistema Internacional (SI) como adotado na 11th *General Conference on Weights and Measures*. Abreviaturas comuns para serem usadas são: m metro; ppm partes por milhão; cm centímetros; cpm contagem por minuto; mm milímetro; dpm desintegrações por minuto; µm micrometro; nm nanometro; kg kilograma; g grama; mg miligramas; µg microgramas; ng nanogramas; LD50 dose letal média; mL mililitro; LC50 concentração letal média; µL microlitro; Hz hertz; s segundos; M molar; min minutos; mM milimolar; h horas; M molar; µM micro molar; SD desvio padrão; SE erro padrão; Ci Curie; X média. Ao usar uma palavra que é, ou está confirmada para ser, uma marca de propriedade comercial, os autores devem utilizar o símbolo ®.

6. ILUSTRAÇÕES

6.1 A qualidade das ilustrações depende da qualidade dos originais fornecidos. As Figuras não podem ser modificadas ou realçadas pela equipe de educação da revista. Os gráficos devem ser

apresentados como parte do arquivo do manuscrito. O contraste é importante.

6.2 Remover as cores das ilustrações, exceto para os gráficos em que o autor gostaria de tê-los publicados coloridos (ver a seção de Custos abaixo para informações).

6.3 Coloque as figuras em formato .TIFF, .jpg ou .eps, indicando o número e o título da figura. Tons não são aceitáveis. IncriçõesAs legendas devem estar com fonte Times New Roman, em um tamanho razoável que possa estar legível após redução, quando necessário.

7. CUSTOS

A Revista custeará integralmente os trabalhos de até quinze páginas, incluindo tabelas e figuras. Acima deste número de páginas, as despesas correrão por conta do(s) autor(es). Não serão aceitas fotografias coloridas, a não ser que o(s) autor(es) custeiem sua publicação, independente do número de páginas do trabalho.

8. PROVAS TIPOGRÁFICAS

As provas tipográficas serão enviadas ao autor correspondente em arquivo PDF. Modificações de frases ou adições não são permitidas nesta fase. É da responsabilidade do autor correspondente garantir que todos os autores do manuscrito estejam de acordo com as alterações feitas sobre as provas. As provas tipográficas devem retornar no prazo de cinco dias, a contar da data do recebimento das mesmas a fim de garantir a publicação do manuscrito no prazo.

Todo contato com a revista deve ser feito ao Editor, conforme endereço abaixo:

Revista Brasileira de Farmacognosia Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor Laboratório de Farmacognosia Departamento de Farmácia - UFPR Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico 80210-170, Curitiba-PR, Brasil

revista@sfgnosia.org.br

ANEXO D

NPC

Natural Product Communications

2015

Vol. 0

No. 0

Composition and Antimicrobial Activity from Leaf Essential Oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC.

Leomara A. da Silva^{a,b}, Sandra Layse F. Sarrazin^{b,c}, Victor Y. P. Calao^{a,b}, Ricardo B. Oliveira^{a,b}, Chieno Shumitsu^d, José Guilherme S. Maia^{a,b,e*} Rosa Helena V. Mourão^{a,b,c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brazil

^b Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Amazonas, 60077-000 Manaus, AM, Brazil

^d Laboratório de Botânica, Universidade Federal do Oeste do Pará, 68035-110 Santarém, PA, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, 66075-900 Belém, PA, Brazil

gmaia@ufpa.br; mouraorhv@yahoo.com.br

Received: February XX, 2015; Accepted: XX, 2015

The constituents of *Myrcia sylvatica* oils (fresh and dried leaves) were identified by GC and GC-MS and submitted to antimicrobial analysis. The plant was sampled in a savanna area in the Western Pará state, Brazil. The oil compositions are not very different from those obtained previously with other Brazilian *Myrcia* species. Sixty-three constituents were identified, with large predominance of sesquiterpenes belonging to the cyclization routes of the cariofilane, germacrane, cadinane and bisabolane groups, such as 1-*epi*-cubenol, *ar*-curcumene, cadalene, β -selinene, β -calacorene, *cis*-calamenene, *ar*-tumerol, muskatone, δ -cadinene, and cubenol. Based on the results, the oils can be considered bactericidal for *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (0.15 μ L/mL and 2.5 μ L/mL, respectively) and bacteriostatic for *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* (20 μ L/mL, for both), all Gram-positive bacteria. The oils were not active for Gram-negative bacteria and yeasts.

Keywords: *Myrcia sylvatica*, Myrtaceae, Essential oil composition, Antimicrobial activity

Myrtaceae comprises 142 genera and 5,500 species of trees and shrubs, distributed in tropical and subtropical regions of the world, with centers of diversity in tropical America and Oceania, and a few species in Africa (Wilson et al., 2001). In South America it is mainly represented by fruit trees and in Brazil it is one of the most diverse, where there are found 23 genera and about 1000 species, all belonging to the Myrtoideae subfamily, tribe Myrteae [1a,1b,1c].

Myrcia genus, considered one of the greatest of Myrtaceae, with about 300 species distributed from Central America to Southern Brazil, inhabits the environments of savannas to primary and secondary forests [1a,1d]. *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. [syn. *M. sylvatica* G. Mey., *M. ambigua* DC., *M. ambigua* var. *dives* O. Berg, *M. ambigua* var. *multiflora* O. Berg, *M. ambigua* var. *pauciflora* DC., *Myrtus lucida* L.] [1e] (<http://www.tropicos.org/Name/22101901>, accessed December 2014), is a shrub 2.5 m high, with small, opaque punctate leaves, occurring from the Guyanas to the Eastern Brazil [1d] and known as “pedra-ume-caá”, “murta” or “vassourinha”.

Essential oils and extracts from some *Myrcia* species have been evaluated for various biological properties. The leaves of *Myrcia multiflora* DC. have been used as remedy for diabetes in North Brazil, showing inhibition activity on aldose reductase and α -glucosidase, and in the increase of serum glucose level [2a]. The methanolic extract of *Myrcia uniflora* Barb. Rodr. was able to inhibit the thyroid peroxidase in vitro and two isolated flavonoids, mearnsitrin and myricitrin, have shown a significant thyroid peroxidase inhibition [2b]. The oil of *Myrcia pubiflora* DC. showed antinociceptive and anti-inflammatory properties, which occurs probably by the inhibition of inflammatory mediator released by the peripheral pathway of mice [2c]. The flower oil of *Myrcia fallax* (Rich.) DC. was effective against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [2d]. The oil of *Myrcia alagoensis* O. Berg. showed antibacterial activity against five bacteria [2e]. Oil samples of *Myrcia ovata* Cambess., existing in Guaramiranga, Ceará state, Brazil, were effective against the growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm

formation of *E. faecalis* [2f], and have showed also antinociceptive and anti-inflammatory properties [2g].

In the essential oils of *Myrcia* have occurred more frequently sesquiterpene compounds, with a predominance of the cyclic sesquiterpenes [3a,3b]. The sesquiterpene hydrocarbon (*E*)-caryophyllene is the more common constituent in *Myrcia* oils [3c], but some hydrocarbon monoterpenes have been also identified, such as the large contents of myrcene and α -pinene in the oils of *M. cuprea* (O. Berg.) Kiaersk and *M. myrtifolia*, respectively [3d,3e]. Aliphatic and aromatic constituents are rare in the oils of *Myrcia* [3f]. The compositions of the oils of leaves and fine stems from *Myrcia sylvatica* sampled in Tocantins, Brazil, were previously reported, with a predominance of the oxygenated sesquiterpenes selin-11-en-4- α -ol, caryophyllene oxide and spathulenol [3d].

In the Lower Amazon River, municipality of Santarém, western Pará state, Brazil, *Myrcia* species are abundant and diverse. However, few studies related to yield and composition of their essential oils, as well as about its biological potential, have been reported. This work, which is associated with the inventory of the aromatic and medicinal plants of western Pará state, is aimed to evaluate the composition and antimicrobial activity of the essential oil from fresh and dried leaves of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. It is wide distributed to the vicinity of the city of Santarém, and with popular use for the control of dysentery and intestinal parasitosis.

Oil yield and composition analysis: The essential oils of fresh and dried leaves of *Myrcia sylvatica* showed an average yield of $0.9 \pm 0.05\%$ and $1.1\% \pm 0.05$, respectively. Both oils have moss green color, with a strong spicy and slightly woody aroma. The oils were analyzed by GC and GC-MS. In total, sixty-three constituents were identified, with a large predominance of cyclic sesquiterpenes. They are listed in Table 1. In oil of the fresh plant were found 32.3% of sesquiterpene hydrocarbons and 40.2% of oxygenated sesquiterpenes, while in oil of the dried plant were identified 41.7% of sesquiterpene hydrocarbons and 39.6% of oxygenated sesquiterpenes. The monoterpene hydrocarbons

and oxygenated monoterpenes were represented secondarily in the oils. In this order, the figures were 5.6% and 10.5% for fresh plant, while the figures were 4.1% and 7.7% for the dry plant, respectively. The ten main cyclic sesquiterpenes found in the oils were 1-*epi*-cubenol (9.9% and 6.9%), *ar*-curcumene (1.9% and 7.6%), cadalene (7.2% and 5.8%), β -selinene (7.0% and 6.0%), β -calacorene (5.4% and 5.5%), *cis*-calamenene (4.8% and 5.2%), *ar*-tumerol (0.0% and 4.9%), muskatone (4.4% and 3.4%), δ -cadinene (4.2% and 4.2%), and cubenol (4.2% and 4.2%). These results are not very different from those obtained previously with other species of Brazilian *Myrcia*, with a predominance of sesquiterpenes belonging to the cyclization routes of the groups cariofilane, germacrane, cadinane and bisabolane [4]. The content of cyclic sesquiterpenes, *ar*-curcumene, β -curcumene and *ar*-tumerol, belonging the bisabolane group, contributed more than 12.0% for the total percentage of the dried plant oil if compared to fresh plant oil.

Table 1: The yield and composition of the oils from fresh and dried leaves of *Myrcia sylvatica*.

Oil yield (%)	Fresh plant		Dried plant	
			0.9	1.1
Constituents	RI _{Calc}	RI _{Lit}	Oil %	
α -Pinene	937	932	2.1	1.8
Thuja-2,4(10)-diene	955	953	0.1	0.1
β -Pinene	977	974	2.3	1.5
δ -3-Carene	1007	1008		0.1
<i>p</i> -Cymene	1023	1020	0.3	0.2
Limonene	1028	1024	0.3	0.2
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1046	1044	0.1	
Terpinolene	1088	1086	0.1	
<i>p</i> -Cymenene	1094	1089	0.3	0.2
Linalool	1100	1095	0.1	0.1
<i>exo</i> -Fenchol	1126	1118	0.1	0.1
α -Campholenal	1126	1122	0.1	0.1
Oxygenated monoterpene unidentified, MW=150	1136		0.3	0.6
Nopinone	1140	1135	0.6	0.3
<i>trans</i> -Pinocarveol	1144	1135	2.9	1.8
<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1162	1166	0.3	0.2
Pinocarvone	1165	1160	0.7	0.6
Oxygenated monoterpene unidentified, MW=150	1177		0.6	0.6
(3 <i>Z</i>)-Hexenyl butanoate	1189	1184	0.1	0.2
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1184	1179	0.4	0.6
α -Terpineol	1195	1186	0.7	0.6
Myrtenol	1198	1194	3.7	2.3
Oxygenated monoterpene unidentified, MW=152	1211			0.2
Verbenone	1209	1204	0.4	0.6
(<i>trans</i> -Carveol	1218	1215	0.3	0.2
Carvone	1244	1239	0.1	0.1
Perilla alcohol	1299	1294	0.1	0.1
α -Cubebene	1349	1345	0.3	0.2
α -Ylangene	1380	1373	0.4	0.4
Isolodene	1382	1374	0.6	0.4
α -Copaene	1380	1374	1.5	1.3
β -Elemene	1396	1389	0.3	0.4
(<i>Z</i>)-caryophyllene	1417	1408	0.9	1.1
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1422	1417		0.4
β -Ylangene	1424	1419	0.3	0.6
β -Copaene	1440	1430	0.1	
(<i>E</i>)- α -Bergamotene	1442	1433		0.2
(<i>E</i>)-Muurolo-3,5-diene	1456	1451	0.2	0.2
α -Humulene	1463	1452		0.2
β -Santalene	1464	1457	0.1	
γ -Muurolole	1483	1478	1.0	1.0
<i>ar</i>-Curcumene	1483	1479	1.9	7.6
10,11-Epoxy-calamenene	1496	1491	0.4	0.4
α -Zingiberene	1497	1489		0.2
β-Selinene	1498	1490	7.0	6.0
γ -Amorphene	1504	1495	0.9	
β -Curcumene	1509	1503		2.1
β -Bisabolene	1510	1503		1.0
δ-Cadinene	1528	1522	4.2	4.2
<i>cis</i>-Calamenene	1534	1528	4.8	5.2
Oxygenated sesquiterpene unidentified, MW=220	1540			1.0
α -Calacorene	1546	1544	2.0	3.1
Silphiperfol-5-en-3-ol A	1562	1557	2.2	2.5
β-Calacorene	1565	1564	5.4	5.5
Oxygenated sesquiterpene unidentified, MW=220	1569		1.0	
Oxygenated sesquiterpene unidentified, MW=218	1575		2.0	
Spathulenol	1585	1577	1.8	1.7
<i>ar</i>-Tumerol	1586	1582		4.9
Caryophyllene oxide	1588	1582	3.7	
Gleenol	1591	1586	3.2	2.1
β -Copaen-4- α -ol	1597	1590	1.5	
β -Himachalene oxide	1615	1615	2.8	2.1
Helifolen-12-al C	1622	1619	1.8	1.8
Helifolen-12-al D	1624	1619		1.7
1-<i>epi</i>-Cubenol	1636	1627	9.9	6.9
Cubenol	1650	1645	4.2	4.2
Cadalene	1680	1675	7.2	5.8
Muskatone	1686	1676	4.4	3.4
10- <i>nor</i> -Calamenen-10-one	1712	1702	1.2	1.4
<i>ar</i> -Curcumen-15-al	1716	1712		1.1

Monoterpene hydrocarbons	5.6	4.1
Oxygenated monoterpenes	10.5	7.7
Sesquiterpene hydrocarbons	32.3	41.7
Oxygenated sesquiterpenes	43.9	39.6
Monoterpenes and sesquiterpenes, unidentified	3.9	2.4
Total	96.2	95.5

RI_{Calc} = Calculated retention time (on DB-5 capillary column, using *n*-alkane series). RI_{Lit} = Literature retention time (Adams, 2007).

Previously, three leaf samples (*S*₁, *S*₂ and *S*₃) of *M. sylvatica*, collected in savanna areas of Tocantins state, Brazil, yielded essential oils with different composition: *S*₁, selin-en-4- α -ol (24.7%), caryophyllene oxide (16.6%) and spathulenol (13.8%); *S*₂, *cis*-calamenene (30.1%), spathulenol (18.7%) and α -calacorene (11.5%); *S*₃, spathulenol (40.2%), β -bisabolene (14.7%) and α -cadinol (9.4%) [3d]. These sesquiterpenes also have showed the cyclization routes of the groups caryophyllane, germacrane, cadinane and bisabolane. The composition of oils typically varies with season, plant age, and soil composition. For this reason, these results are based on a single oil sample at each collection site. This way, we think that the chemical composition of the analyzed oils showed qualitative and quantitative variation due the influence of environmental conditions of collection sites. These findings suggest the presence of chemical types of *M. sylvatica* in the Brazilian Amazon, a broad collection site. At the same time, these chemical types may have ecological and taxonomic significance in the management and economic utilization of this species.

Antimicrobial activity: The MIC and MBC values of the essential oils of *M. sylvatica* and the standard gentamicin showing inhibition zones of equal or greater than 8 mm are summarized in Tables 2 and 3. The oils of fresh and dried leaves have showed antimicrobial action only against the Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 2228, *Bacillus cereus* CCD-B001 and *Enterococcus faecalis* ATCC-2942, being the lowest inhibition zone observed for *S. aureus* (11.06 mm and 11.05 mm) and the highest for *S. epidermidis* (18.65 mm and 14.77 mm), respectively. The inhibition halos to gram-negative bacteria and yeast was equal to or less than 8 mm.

Table 2: Inhibition halos for the oils of *M. sylvatica* and gentamicin (standard) against Gram positive bacteria.

Microorganisms	Halo inhibition (mm)		
	Fresh plant oil	Dried plant oil	Gentamicin
<i>S. aureus</i>	11.06 \pm 0.4	11.05 \pm 0.2	20.12 \pm 0.0
<i>S. epidermidis</i>	18.65 \pm 0.2	14.77 \pm 0.1	28.07 \pm 0.2
<i>B. cereus</i>	15.77 \pm 1.4	15.36 \pm 1.8	16.33 \pm 4.2
<i>E. faecalis</i>	16.16 \pm 2.7	13.14 \pm 0.8	15.69 \pm 0.4

Table 3: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for the oils of *M. sylvatica* which showed inhibition zones against the microorganisms.

Microorganisms	Fresh plant oil		Dried plant oil	
	MIC (μ L/mL)	MBC (μ L/mL)	MIC (μ L/mL)	MBC (μ L/mL)
<i>S. aureus</i>	2.5	\geq 20	2.5	\leq 20
<i>S. epidermidis</i>	20	\leq 20	20	\leq 20
<i>B. cereus</i>	0.15	0.3	0.15	2.5
<i>E. faecalis</i>	20	\neq 20	20	\leq 20

The antimicrobial action of the two oils (fresh and dried leaves) against the strains of Gram-positive bacteria, when compared, showed more significant inhibition for *S. epidermidis* and *E. faecalis*, where the oils from fresh leaves showed greater inhibition halos ($p \leq 0.05$). But when the oils were compared with gentamicin, the inhibition halo of the standard was statistically superior ($p < 0.05$) in relation to bacteria *S. epidermidis* and *S. aureus*, and statistically similar to bacteria *B. cereus* and *E. faecalis* (Figure 1). No antimicrobial activity was observed for Gram-negative bacteria and yeast tested.

Both leaf oils (fresh and dried) showed MIC values of 0.15 μ L/mL and 2.5 μ L/mL against the bacteria *B. cereus* and *S. aureus*, respectively. For the other two Gram-positive bacteria, the MIC value was equal to or greater than 20.0 μ L/mL. Therefore, the essential oils from fresh and dried leaves of *Myrcia sylvatica* can be considered bactericidal for the bacteria *B. cereus* and *S. aureus* and bacteriostatic for bacteria *S. epidermidis* and *E. faecalis* (≥ 20 μ L/mL).

The antimicrobial activity of the oil of *M. sylvatica*, which was observed only in Gram-positive bacteria can be

understood by the absence of lipopolysaccharides in their cell membranes. On contrary, in the Gram-negative bacteria, the lipopolysaccharides prevent the transport of inhibiting compounds through their cells [6a]. According to Sikkema and colleagues (1995) [6b], the cell membranes of bacteria may appear differently between one organism and another, affecting permeability and, therefore its response to inhibitory compounds. Moreover, one cannot rule out other possible mechanisms, such as efflux pumps, changes in the target sites and enzymatic modification of the inhibitory compound.

Myrcia sylvatica oil has constituents with antimicrobial potential already described in the literature, with isolated or synergistic action in human pathogens. For example, limonene and germacrene D are considered effective as antimicrobial compounds [5]. The monoterpenes α -pinene, β -pinene and p-cymene identified in the oil of *M. sylvatica*, showed antimicrobial activity in the oil of *M. myrtifolia* in bioassays against Gram-positive bacteria [3e]. In the oil of *M. fallax*, it was also identified antimicrobial potential against Gram-positive bacteria [2d], corroborating the findings of this study.

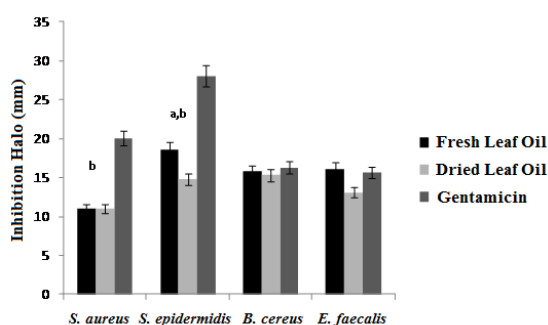


Figure 1: Inhibition zones for *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* and *E. faecalis* when treated with the oil of *M. sylvatica*. (a) Is the significant difference ($p < 0.05$) between the fresh and dried oils. (b) Is the significant difference ($p < 0.05$) between the oils and gentamicin (standard).

Conclusion: The oils of *M. sylvatica* (fresh and dried plant) are from terpenic origin and have excellent spicy and woody fragrance, with a predominance of sesquiterpenes (76.2% and 81.3%, respectively) in their composition, as already observed

for *Myrcia* species. These oils showed significant antimicrobial activity against Gram-positive bacteria.

Experimental

Plant material and processing: The leaves of *Myrcia sylvatica* were collected in a savanna area (coordinates 02°30'31.7" S and 54°50'59.9" W) near of the São Pedro Community, Road Everaldo Martins, Km 21, Santarém city, Pará state, Brazil. Data collection was conducted in the morning (between 7.30 am and 8:30 am), August 2012. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of EMBRAPA Eastern Amazon, Belém city, Pará state, Brazil, under the number IAN 184696. Part of the collected material was dried in an oven (Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil) with air circulation (40 °C) until constant mass, whose data were used for calculation of the oil yield.

Extraction of the essential oil: The fresh and air-dried leaves were ground and submitted to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus (3 h). The oils were dried over anhydrous sodium sulfate, and their percentage contents were calculated on the basis of the plant dry weight. The moisture contents of the samples were calculated using an Infrared Moisture Balance for water loss measurement. The procedure was performed in triplicate.

Oil composition analysis: The analysis of the oils was carried on Agilent Technology Equipments: a GC 6890 Plus Series coupled to a selective Mass Spectrometry Detector 5973 and an Auto Sampler 7863, under the following conditions: DB-5ms (60 m \times 0.25 mm; 0.25 mm film thickness) fused-silica capillary column; programmed temperature, 50 °C (5 min in isothermal mode), 150 °C (4 °C/min plus 2 min in isothermal mode), 250 °C (5 °C/min plus 5 min in isothermal mode), 275 °C (10 °C/min plus 15 min in isothermal mode); injector temperature, 250 °C, injection type, split (1 μ L) and split flow adjusted to yield 30:1 ratio; carrier gas, helium, with an inlet pressure of 16.5 psi; EIMS, electron energy, 70 eV; temperature of the ion source and transfer line, 230 and 285 °C, respectively. The quantitative data regarding the volatile constituents were obtained by peak area normalization using a GC 6890 Plus Series, coupled to FID Detector, operated under

similar conditions of the GC-MS system. The retention index was calculated for all the volatiles constituents using a homologous series of n-alkanes (C8–C30, Sigma-Aldrich), according the linear equation of Van den Dool and Kratz (1963) [7a]. Individual components were identified by comparison of both mass spectrum and GC retention data with authentic compounds which were previously analyzed and stored in private library, as well as with the aid of commercial libraries containing retention indices and mass spectra of volatile compounds commonly found in essential oils [7b,7c].

Antimicrobial assay (Microorganisms and inoculum standardization): The standardization of the inoculum of microorganisms has followed a previously described methodology [8a]. The tested strains from the American Type Culture Collection (ATCC) and Cefar Culture Collection Diagnostic (CCCD) were commercially purchased in lyophilized form. The microorganisms used in the test were chosen based on their clinical importance: *Enterococcus faecalis* ATCC-2942, *Bacillus cereus* CCCD-B001, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-2228 (Gram-positive bacteria); *Escherichia coli* ATCC-35218; *Salmonella enterica* CCDD-5004, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-13883 (Gram-negative bacteria); *Candida albicans* ATCC-10231, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Candida parapsilosis* ATCC-22019 (pathogenic yeasts) [8b]. Bacterial strains were hydrated in 1 mL of nutrient broth (NB) and incubated for reactivation at 36 ± 1 °C for 24 hours. After this period, were placed on Mueller Hinton Agar (MHA-Himedia®) and re-incubated at 36 ± 1 °C for 24h.

Fungal strains were reactivated from the inoculation in 1 mL of Sabouraud's broth at 30 °C for 48 hours. After reactivation, the cultures were subcultured on Sabouraud Dextrose Agar 2% (SDA) and incubated at 30 ± 1 °C for 48 hours. A small fraction of growing colonies was taken and diluted in sterile saline (0.9% NaCl) to obtain the turbidity of the inoculum 0.5 standard and suspension of 1.5×10^8 CFU/mL, approximately, according to Mac Farland scale.

Antimicrobial assay (Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC): The dilution of oil was done in solution of Tween 80 (0.5%) to obtain the test concentration (20 µL/mL) and then with serial dilution using MHB and SDB for the preparation of other concentrations. The test was performed in 96 well plates, where each well received 90 µL of the specific concentration of the oil, 90 µL of the MHA or SDA media, and 20 µL of the inoculum. The control of microbial growth, control of sterility of the medium and the solvent control were done simultaneously. Each well kept final volume of 200 µL. The inhibition of growth of bacteria and fungi was revealed by addition of resazurin sterile solution (20 uL, 0.02%, w/v) (Vetec), after incubation (24h, 36 ± 1 °C). Then the plates were incubated for another 3 h. The MIC, which is defined as the lowest concentration of oil capable of inhibiting the growth of microorganisms, was determined by the permanence of blue coloration (resazurin) in the wells. The wells that showed no apparent growth were selected to evaluate the MBC and MFC, which were determined by the absence of microbial growth on plates containing MHA and SDA media, respectively [8c]. The halo formed around the disk was measured using a digital caliper and compared to standards antimicrobial discs: amoxicillin (10 µg) and gentamicin (10 µg) for bacteria and fluconazole (10 µg) for fungi.

Statistical analysis: For the evaluation of the data on the yield, chemical composition and antimicrobial activity of essential oils, the results was expressed as mean (μ) \pm standard deviation (SD). Differences between groups were evaluated by ANOVA and Tukey's test, using the BioEstat 5.0 Program and considering significant values for $p \leq 0.05$.

Acknowledgments - The authors are grateful to CNPq/Bionorte, CAPES/Pró-Amazônia and FAPESPA/PA for financial support.

References

- [1] (a) Landrum LR, Kawasaki, ML. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, **49**, 508-536; (b) Barroso G.M, Peron V. (1994) Myrtaceae. In *Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares*. Vol **1**, Lima, MPM., Guedes-Bruni, RR. (Eds). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 404 pp.; (c) Sobral M, Proença C, Souza M, Mazine F, Lucas E. (2010) Myrtaceae. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2010. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>; (d) McVaugh R. (1969) Myrtaceae. The Botany of the Guayana highland. *Memoirs of The New York Botanical Garden*, **18**, 55-286; (e) Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org/Name/22101901>).
- [2] (a) Matsuda H, Nishida N, Yoshikawa M. (2002) Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2); Structures of myrciacitrins III, IV and V. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **50**, 429-431; (b) Ferreira ACF, Neto JC, Alba CMS, Kuster RM, Carvalho DP. (2006) Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, **19**, 351-355; (c) Andrade GS, Guimarães AG, Santana MT, Siqueira RS, Passos LO, Machado SMF, Ribeiro AS, Sobral M, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ. (2012) Phytochemical screening, antinociceptive and antiinflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Brazilian Journal of Pharmacology*, **22**, 181-188; (d) Alarcón LD, Peña AE, Gonzales NC, Quintero A, Meza M, Usubillaga A, Velasco J. (2009) Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia fallax* (Rich.) DC. from Venezuela. *Revista da Sociedade de Química do Perú*, **75**, 221-227; (e) Silva AD, Uetanabaro APT, Lucchese AM. (2013) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). *Natural Product Communications*, **8**, 269-271; (f) Cândido CS, Portella CSA, Laranjeira BJ, Silva SS, Arriaga AMC, Santiago GMP, Gomes GA, Almeida PC, Carvalho CBM. (2010) Effects of *Myrcia ovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**, 621-627; (g) dos Santos GCM, Gomes GA, Gonçalves GM, de Sousa LM, Santiago GMP, de Carvalho MG, Marinho BG. (2014) Essential oil from *Myrcia ovata*: composition, antinociceptive and antiinflammatory properties in mice. *Planta Medica*, **80**, 1588-1596.
- [3] (a) Henriques AT, Sobral M, Bridi R, Lamaty G, Menuet C, Bessière JM. (1997) Essential oils from five Southern Brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **9**, 13-18; (b) Pereira RA, Zoghbi MGB, Bastos MNC. (2010) Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the Sandbank of the Resex Maracanã, state of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **13**, 440-450; (c) Cerqueira MD, Marques EJ, Martins D, Roque NF, Cruz FG. (2009) Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Química Nova*, **32**, 1544-1548; (d) Zoghbi MGB, Andrade EHA, Silva MH, Carreira, LMM, Maia JGS. (2003) Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**, 421-424; (e) Cerqueira MD, Souza-Neto LC, Passos MGVM, Lima EO, Roque NF, Martins D, Guedes MLS, Cruz FG. (2007) Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, **18**, 998-1003; (f) Stefanello MEA, Pascoal ACRF, Salvador MJ. (2011) Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 73-94.
- [4] Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. (2004) Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, **27**, 916-919.
- [5] Dorman HJD, Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.

- [6] (a) Kabara JJ. (1979) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents - a review. *AOCS Monograph*, **5**, 1-14; (b) Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59**, 201-222.
- [7] (a) Van den Dool H, Kratz PDJA. (1963) Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**, 463-471.; (b) Adams RP. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA; (c) NIST (National Institute of Standards and Technology). (2005) *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, V. 2.0d)*. The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, USA.
- [8] (a) NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute). (2003) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard, document M2-A8, Wayne, Pennsylvania, USA; (b) ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2007) *Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e Eventos Adversos (Gipea)*, Brasília, DF, 21 pp.; (c) NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard, document M2-A9, Wayne, Pennsylvania, EU