



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES INDICADOS COMO  
PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) DO OESTE DO PARÁ**

**DIANA RÊGO AMAZONAS**

**Santarém, Pará**  
**Março, 2012**

**DIANA RÊGO AMAZONAS**

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES INDICADOS COMO  
PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) DO OESTE DO PARÁ**

**ORIENTADORA:** DRA ROSA HELENA VERAS MOURÃO

**CO-ORIENTAÇÃO:** DR. LAURO EUCLIDES SOARES BARATA

DRA. LYDIA FUMIKO YAMAGUCHI

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

**Área de Concentração:** Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará  
Março, 2012**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Gestão da Informação – SIGI/UFOPA**

---

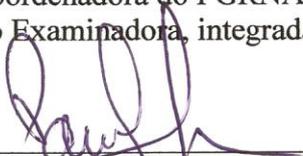
- A284v Amazonas, Diana Rêgo  
Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) do oeste do Pará. / Diana Rêgo Amazonas. – Santarém, 2012.  
70 f.: il.  
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Rosa Helena Veras Mourão; Co-orientador: Lauro Euclides Soares Barata; Lydia Fumiko Yamaguchi.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2012.
1. *Aniba duckei* – Composição – Essências e óleos essenciais. 2. Lauraceae – Santarém (PA). 3. Extrativismo vegetal. 4. Floresta Nacional do Tapajós (PA). 5. Reserva Extrativista do Tapajós-Arapiuns (Brasil). I. Mourão, Rosa Helena Veras, orient. II. Título.

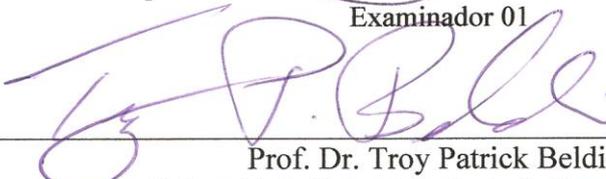
CDD: 21 ed. 583.2309811

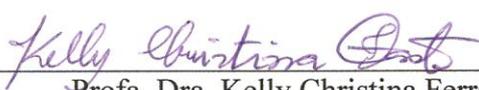
# VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES INDICADOS COMO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) DO OESTE DO PARÁ

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 23 de março de 2012.

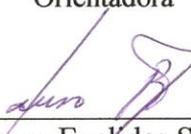
Prof. Dra. Rosa Helena Veras Mourão  
Coordenadora do PGRNA  
Apresenta à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:

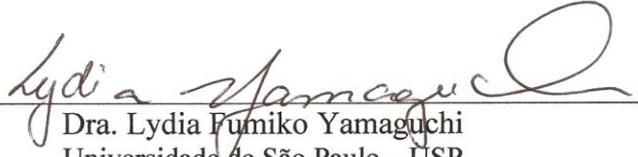
  
Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e Universidade do Estado do Amazonas – UEA  
Examinador 01

  
Prof. Dr. Troy Patrick Beldini  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA  
Examinador 02

  
Prof. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA  
Examinador 03

  
Prof. Dra. Rosa Helena Veras Mourão  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA  
Orientadora

  
Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata  
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA e Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Co-orientador

  
Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi  
Universidade de São Paulo – USP  
Co-orientadora

Santarém, Março, 2012

Aos meus pais, Rosinaldo e Nelma, pelo incentivo aos estudos e por confiar nas minhas escolhas, às minhas irmãs, Daniela e Denise, e ao meu namorado Mauro, por todo amor e apoio durante essa jornada.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Rosa Mourão**, pela orientação e dedicação a esta pesquisa, articulando todas as etapas para elaboração do trabalho, e por acreditar na minha capacidade em fazê-lo, sendo compreensiva com minhas falhas e ensinando a corrigi-las. E também, pela amizade e estima.

Ao Prof. Dr. **Massuo Kato**, por abrir as portas de seu laboratório mesmo conhecendo minhas limitações na área química, confiando o uso de equipamentos e contribuindo fortemente para minha formação e crescimento acadêmico.

À Dra. **Lydia Yamaguchi**, pela disponibilidade em me acompanhar e orientar, principalmente durante as análises químicas, e por todo cuidado e preocupação durante minha estada em São Paulo.

Ao Prof. Dr. **Lauro Barata**, pela co-orientação, ensinamentos, e pelas contribuições ao estudo do pau-rosa.

À **Thuanny Castro**, por ter contribuído efetivamente com os resultados desta pesquisa, desde as coletas até os testes de atividade biológica.

Ao **Celso de Oliveira Júnior**, por todo auxílio durante o processo de padronização da metodologia para as análises químicas, e também, pelo apoio e acolhimento quando cheguei ao IQ da USP, sempre muito compreensivo e paciente com minhas dificuldades.

À **Sandra Sarrazin**, pelas contribuições e orientação nos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. **Ricardo de Oliveira**, por contribuir e fazer parte, efetivamente, de minha formação acadêmica desde a graduação e iniciação científica, sempre repassando valiosos conhecimentos e sugestões para meu amadurecimento como pesquisadora.

Aos integrantes do **grupo BIRNA** e membros do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – **LabBBEx**, que nesses dois anos estiveram ajudando, de uma forma ou de outra, para a realização deste trabalho, principalmente àqueles que fizeram parte do mutirão para processamento do material vegetal. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido. Em especial, à **Juliana Raposo**, sempre prestativa e disposta a responder minhas incansáveis perguntas, e às bolsistas **Adrielle Bezerra** e **Leomara Andrade**, que foram companheiras em viagens de campo. Sem dúvida, todos vocês foram fundamentais para a obtenção deste título.

Aos professores, membros da **banca examinadora**, Prof. Dr. Paulo de Tarso Sampaio, Prof. Dr. Troy Beldini e Profa. Dra. Kelly Castro, que gentilmente aceitaram o convite para ler este manuscrito e contribuir para seu aperfeiçoamento.

Aos demais professores da UFOPA e da PGRNA que estiveram ligados à minha formação, por todo conhecimento transmitido e ajuda durante algumas dúvidas e questionamentos. Em especial, àqueles que em algum momento discutiram aspectos desta pesquisa, como os Professores **Troy Beldini**, **Luis Reginaldo**, **Marcos Prado**, **Socorro Mota** e **Pedro Dias**.

Ao Dr. **João Batista Baitello** pela identificação botânica da espécie.

Ao IBAMA e ICMBio, em nome de **Dárlison Andrade**, pela autorização do estudo e coleta nas Unidades de Conservação.

Ao **Juliano Gallo**, pela disponibilidade em preparar o mapa de localização das árvores e por me auxiliar na interpretação dos resultados da análise de solo.

Aos meus colegas de turma, que durante o mestrado, através do conhecimento de seus projetos de pesquisa, ensinaram-me assuntos diversos, compartilhando conhecimentos acerca dos recursos naturais da Amazônia. Aqui quero destacar **Paulo Bentes, Wilderclay Machado, Irislene Pereira, Fabiane Campos, Fabio Guerra, Helton Lameira, Jonas da Paz, Euclides Gomes e Josué Linhares**. E em especial, à **Valéria Mourão**, que além da troca de conhecimento, esteve acompanhando meu trabalho desde o início, dando muita força através de sua amizade e ajudando no que fosse possível.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Produtos Naturais – **LQPN**, pela receptividade e aprendizado, em especial, além dos já citados, à **Yasmin Gutierrez** por dividir gentilmente sua bancada e materiais de consumo, ao **Fábio Chaves** que me auxiliou com o cromatógrafo gasoso e ao **Mauro Vicentini**, que contribuiu substancialmente para meu entendimento acerca das metodologias analíticas.

À **APRUSPEBRAS** e à **COOMFLONA**, Associação e Cooperativa que representam os comunitários das Unidades de Conservação, por todo auxílio prestado durante as coletas, com destaque para o Sr. **Raimundo, Joel e Neuton**, sem os quais eu não teria conseguido material suficiente para as análises.

Aos órgãos financiadores, **CAPES, CNPq, FAPESPA, FAPESP** e à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica – **PROPPIT** da UFOPA, pelo apoio financeiro, tornando possível esta pesquisa.

Aos funcionários e técnicos da **UFOPA** e da **USP** que auxiliaram, de alguma maneira, a produção deste trabalho. Em especial ao **Marcos Archilha** pelas análises de RMN <sup>1</sup>H.

À **Leijiane, Sâmella e Beatriz**, pelo companheirismo e auxílio durante o tempo em que fiquei em São Paulo. Vocês foram minha família neste período. Muito obrigada por tudo!

E a todos aqueles não mencionados que de alguma forma ajudaram para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

**“Cada planta tem centenas de substâncias e uma delas  
pode ser mais importante do que uma galáxia”.**

Otto R. Gottlieb

AMAZONAS, Diana Rêgo. **Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) do Oeste do Pará.** 69 p. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2012.

## RESUMO

Identificar a ocorrência de espécies ameaçadas de extinção é de grande importância para garantir a perpetuação da diversidade genética contida em populações remanescentes. Propostas para manejo e conservação de uma espécie ameaçada só irão surgir a partir da identificação de exemplares em seu hábitat natural. O pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae), encontra-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção desde 1992, principalmente devido ao corte das árvores para extração do óleo essencial (OE), o qual tem importância econômica para a região, sendo matéria-prima para a composição do famoso perfume francês Chanel Nº 5. O uso de OEs e fragrâncias é comum em qualquer lugar do mundo, e as propriedades medicinais desses óleos podem variar dependendo de alguns fatores, como condições ambientais e composição química, podendo ter função bacteriostática, antisséptica, anti-inflamatória, anticoagulante, analgésica, dentre outras. Unidades de Conservação (UCs), do Oeste do Pará, constituem áreas com ocorrência natural de pau-rosa. A dificuldade em identificar botanicamente representantes de *A. rosaeodora* leva à exploração de outras espécies com características morfológicas semelhantes. Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar a composição química e a atividade antimicrobiana do OE de duas populações indicadas como pau-rosa, localizadas nas UCs Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns (RESEX), e também, comparar o perfil metabólico entre essas populações através da análise de seus extratos brutos, usando métodos analíticos como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H). Essas técnicas, associadas à análise multivariada, indicaram significativa divergência química entre as populações. A partir da comparação dos resultados obtidos neste estudo com os dados existentes na literatura para *A. rosaeodora*, verificou-se que as árvores da FLONA apresentaram perfil químico semelhante ao já descrito em diversos trabalhos, enquanto que as da RESEX fugiram ao padrão químico registrado para a espécie. O OE de ambas as populações apresentou atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. Porém, os OEs não foram ativos contra a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. O OE da FLONA teve atividade significativamente superior ao da RESEX para alguns dos microrganismos ensaiados, podendo este resultado ser atribuído ao maior teor de linalol no OE da FLONA que foi de 83,5% quando comparado ao da RESEX, de 39,6%.

Palavras-chave: Lauraceae, Óleo Essencial, Linalol, Metabólitos Secundários, Amazônia.

AMAZONAS, Diana Rêgo. **Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) do Oeste do Pará.** 69 p. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2012.

## ABSTRACT

Identification of the occurrence of endangered species is of great importance to ensure the perpetuation of the genetic diversity contained in remaining populations. Proposals for management and conservation of an endangered species will only arise from the identification of specimens in their natural habitat. The rosewood tree, *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae), is on the official list of endangered species since 1992, mainly due to cutting of trees for extraction of the essential oil (EO), which is of economic importance to the region and used as raw material for the composition of the famous French perfume Chanel N° 5. The use of EOs and fragrances is common throughout the world, and its medicinal properties may vary depending on factors such as environmental conditions and chemical composition, which may have function as bacteriostatic, antiseptic, anti-inflammatory, anti-coagulant, analgesic, among others. The protected areas that are cited in this study, have natural populations indicated as rosewood. The difficulty in botanically identifying representatives of *A. rosaeodora* leads to the exploitation of others species with similar morphological characteristics. This study aimed to analyze the chemical composition and antimicrobial activity of the EO from two populations indicated as rosewood, located in the protected areas Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) and Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns (RESEX) in Western Pará. Additionally, this study compared the metabolic profile among these populations through analysis of their crude extracts, using analytical methods such as Gas chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR). These techniques, coupled with multivariate analysis indicated significant chemical difference between the populations. Comparing the results obtained in this study with the data existent on the literature for *A. rosaeodora*, it was found that the trees of the FLONA showed chemical profile similar to that previously described in several studies, whereas that of the RESEX not followed the chemical pattern recorded for the specie. The EO of both populations showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. However, the EOs were not active against a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. The EO of the FLONA had activity significantly greater than that of the RESEX for some of the microorganisms tested, this result can be attributed to the higher concentration of linalool in the EO of the FLONA which was of 83.5% when compared to of the RESEX, of 39.6%.

Keywords: Lauraceae, Essential Oil, Linalool, Secondary Metabolites, Amazon.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>1.1.1. Família Lauraceae</b> .....	3
<b>1.1.2. <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke</b> .....	4
<b>1.1.3. Óleo essencial de Pau-rosa</b> .....	6
<b>1.1.4. Unidades de Conservação</b> .....	8
<b>1.1.5. Estudos de perfil metabólico em extratos vegetais</b> .....	10
<b>1.2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>1.2.1. Objetivo geral</b> .....	12
<b>1.2.2. Objetivos específicos</b> .....	12
<b>1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	13
<b>2. CAPÍTULO I</b> .....	19
<b>ABSTRACT</b> .....	21
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>Área de estudo e material vegetal</b> .....	23
<b>Coleta do solo</b> .....	24
<b>Extração e rendimento do Óleo Essencial</b> .....	25
<b>Identificação dos constituintes do óleo essencial</b> .....	25
<b>Preparação dos extratos brutos</b> .....	26
<b>Análise dos extratos por CLAE e por RMN <sup>1</sup>H</b> .....	26
<b>Ensaio antimicrobianos</b> .....	27
<i>Microrganismos e condições de cultivo</i> .....	27
<i>Método de disco difusão em Ágar</i> .....	28
<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i> .....	28
<b>Análise estatística</b> .....	29

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>Rendimento e composição química do OE</b> .....	30
<b>Análise dos Componentes Principais – PCA</b> .....	31
<b>Atividade antimicrobiana do OE</b> .....	33
<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	44
<b>3. SÍNTESE INTEGRADORA</b> .....	50
<b>ANEXO A</b> .....	51

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1:</b> Lista parcial das espécies da família Lauraceae com base no inventário feito na FLONA do Tapajós .....	9
---	---

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Rendimento do óleo essencial de pau-rosa coletado na FLONA do Tapajós e na RESEX Tapajós-Arapiuns .....	37
<b>Tabela 2:</b> Percentual dos constituintes químicos do óleo essencial das árvores de pau-rosa da FLONA do Tapajós .....	38
<b>Tabela 3:</b> Percentual dos constituintes químicos do óleo essencial das árvores de pau-rosa da RESEX Tapajós-Arapiuns .....	39
<b>Tabela 4:</b> Diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de pau-rosa extraído de folhas e ramos finos .....	43
<b>Tabela 5:</b> Interpretação dos resultados da análise de solo das áreas com ocorrência de pau-rosa na FLONA do Tapajós e na RESEX Tapajós-Arapiuns .....	49

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1:** Quadro com uso comum de algumas espécies da família Lauraceae. Adaptado de Marques (2001) ..... 3

**Figura 2:** Árvore de Pau-rosa na FLONA do Tapajós. **A.** Destaque para o tronco. **B.** Corte da casca. **C.** Folhas, galhos e frutos. **D.** Ramo com presença de inflorescência ..... 5

### CAPÍTULO I

**Figura 1:** PCA do óleo essencial de pau-rosa da FLONA e da RESEX. **(A)** gráfico de *scores* da variabilidade entre as populações. Nos códigos em azul os números indicam as árvores e as letras R e F significam RESEX e FLONA respectivamente; **(B)** gráfico de *loadings* indicando as substâncias responsáveis pela variação, as setas indicam o tempo de retenção ..... 40

**Figura 2:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa da FLONA e da RESEX a partir dos dados de RMN <sup>1</sup>H. **(A)** gráfico de *scores* mostrando os agrupamentos formados devido à variabilidade de metabólitos entre as populações; **(B)** gráfico de *scores* mostrando a variabilidade entre as populações considerando somente os extratos preparados da casca das árvores. Nota: FLONA total = todas as amostras de folhas, cascas e galhos da FLONA; RESEX total = todas as amostras de folhas, cascas e galhos da RESEX. Nos códigos em azul F= FLONA e R= RESEX, a numeração representa as árvores e CT1, CT2 e CT3 as triplicatas dos extratos da casca ..... 41

**Figura 3:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa da FLONA e da RESEX. **(A)** gráfico de *scores* mostrando os agrupamentos formados a partir das amostras de mudas analisadas por CLAE; **(B)** gráfico de *scores* indicando a variabilidade entre árvores e mudas através de análise RMN <sup>1</sup>H. Nota: AF= Árvore FLONA, AR= Árvore RESEX, MF= Muda FLONA e MR= Muda RESEX ..... 42

**Figura 4:** Localização dos espécimes de pau-rosa na área da FLONA do Tapajós e da RESEX Tapajós-Arapuians ..... 44

**Figura 5:** Cromatograma do óleo essencial de folhas e ramos de pau-rosa da FLONA Tapajós **(A)** e da RESEX Tapajós-Arapuians **(B)** ..... 45

**Figura 6:** Coloração do óleo essencial (OE) da FLONA do Tapajós **(A)** e da RESEX Tapajós-Arapuians **(B)** ..... 45

**Figura 7:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa obtidos de todas as partes da árvore através de análise em RMN <sup>1</sup>H. **(A)** FLONA e **(B)** RESEX. Não houve formação de grupos, indicando que não há diferença significativa entre o padrão de metabólitos produzidos por cada parte da árvore. Nota: nos códigos em azul F= FLONA e R= RESEX, a numeração representa as árvores, CT1, CT2 e CT3 as triplicatas da casca, GT1, GT2 e GT3 as triplicatas de galhos e FT1, FT2 e FT3 as triplicatas de folhas ..... 46

<b>Figura 8:</b> Espectros de RMN $^1\text{H}$ dos extratos brutos da casca de pau-rosa da FLONA ( <b>A</b> ) e da RESEX ( <b>B</b> ) .....	47
<b>Figura 9:</b> Cromatogramas dos extratos brutos de galhos de pau-rosa da FLONA ( <b>A</b> ) e da RESEX ( <b>B</b> ) analisados por CLAE .....	48

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

**ANOVA** – Análise de Variância.

**APRUSPEBRAS** – Associação dos Produtores Rurais Extrativistas da Margem Esquerda do Tapajós.

**ATCC** – *American Type Culture Collection*.

**CAP** – Circunferência à Altura do Peito.

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima.

**CG-EM** – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa.

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima.

**CITES** – Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção.

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

**DAP** – Diâmetro à Altura do Peito.

**DB-5HT** – (5%-fenil)-metilpolisiloxano.

**FLONA** – Floresta Nacional do Tapajós.

**GPS** – Sistema de Posicionamento Global.

**MDIC** – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.

**OE** – Óleo Essencial.

**PCA** – Análise dos Componentes Principais.

**PCs** – Componentes Principais.

**PFNM** – Produtos Florestais Não Madeireiros.

**RESEX** – Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns.

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

**UC** – Unidade de Conservação.

**UFLC** – Cromatografia Líquida Ultra Rápida.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia oferece grande potencial econômico através de produtos florestais não madeireiros (PFNM). Um exemplo são os óleos essenciais (OEs) também conhecidos por óleos voláteis, resultantes do metabolismo secundário de plantas aromáticas, dentre as quais, podemos citar o pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke, sinônimo botânica *A. duckei* Kosterm. e *A. rosaeodora* Ducke var. *amazônica* Ducke, pertencente à família Lauraceae.

*Aniba rosaeodora* apresenta ampla distribuição geográfica, ocorre no Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela e Peru (KUBITZKI E RENNER, 1982). No entanto, no Brasil, as maiores populações encontram-se restritas à Amazônia Ocidental, possuindo atualmente uma densidade populacional muito baixa, menos de duas por hectare, e regeneração natural de populações nativas bastante restrita (MITJA E LESCURE, 2000). A espécie alcançou notório destaque no mercado nacional e internacional, principalmente no ramo da perfumaria, devido à presença do linalol que constitui aproximadamente 76 a 85% de seu óleo essencial (MORS *et al.*, 1957; MAIA *et al.*, 2007).

O extrativismo predatório do pau-rosa, caracterizado pelo corte da planta-matriz (SANTANA *et al.*, 2008) vem ocorrendo desde 1927 para obtenção do OE da madeira (MORS *et al.*, 1957), ameaçando a espécie de extinção (IBAMA, 1992) e fazendo-a entrar em 2010 para o anexo II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção – CITES (CITES, 2010).

Quanto às divergências taxonômicas de *A. rosaeodora*, pesquisadores como Gottlieb e colaboradores (1964) já levantavam questionamentos sobre a identificação de algumas variações da espécie, como pau-rosa itaúba e pau-rosa imbaúba. Outros, preocupados com o desaparecimento da espécie, propuseram a extração do OE a partir de folhas e ramos como alternativa para evitar o corte das árvores (MAY E BARATA, 2004).

Além disso, atividades farmacológicas de espécies do gênero *Aniba* têm sido relatadas, tais como o efeito sedativo de *A. rosaeodora* (ALMEIDA *et al.*, 2009), a atividade contra nematódeos de *A. canelilla*, *A. duckei* e *A. hastmanniana* (GOULART, *et al.*, 1975), efeito ansiolítico em *A. riparia* (MELO *et al.*, 2006), atividade antiespasmódica de *A. canelilla* (MAIA *et al.*, 2003), atividade larvicida de *A. duckei* (SOUZA *et al.*, 2007), atividade antimicrobiana de *A. riparia* (BARBOSA *et al.*, 1988) e atividade antifúngica de *Aniba rosaeodora* (SIMIC *et al.*, 2004). Os constituintes químicos presentes em óleos essenciais têm demonstrado diferentes atividades farmacológicas. De maneira geral, cerca de 60% desses

óleos possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVNANI E BALLOW, 2000).

Diante do exposto acima, aliado ao fato do pau-rosa ser considerado um dos principais produtos florestais não madeireiros da Amazônia brasileira, principalmente, por se tratar de uma espécie nativa e seu OE ser exportado apenas pelo estado do Amazonas (SOUZA, 2010) e ainda, adicionado à confusão para identificação de *A. rosaeodora* em áreas remanescentes, o presente trabalho teve como objetivo analisar o rendimento, a composição química dos OEs, comparar o perfil metabólico de extratos brutos, e também, a atividade biológica dos óleos voláteis através de ensaios antibacteriano e antifúngico de duas populações indicadas como pau-rosa, com ocorrência em Unidades de Conservação localizadas no Oeste do Pará.

Os resultados deste estudo poderão, ainda, contribuir para aumentar o conhecimento acerca de uma planta da Amazônia brasileira, visando à utilização sustentável dos recursos da floresta. Além do mais, a atividade antimicrobiana tem sido a base de várias pesquisas, pois doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (SILVA E FERNANDES JUNIOR, 2010). Este aspecto assume relevância devido ao aumento da resistência de algumas bactérias frente aos antibióticos mais comuns (ADAM, 2002).

A apresentação deste trabalho está de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará. A dissertação está dividida em: **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, a qual aborda aspectos relevantes sobre a família Lauraceae, a espécie *Aniba rosaeodora* e seu óleo essencial, além de aspectos gerais a respeito das Unidades de Conservação FLONA do Tapajós e RESEX Tapajós-Arapiuns, onde foram selecionadas as áreas de estudo. Adicionalmente, aborda conhecimento introdutório sobre análise do perfil metabólico associada à estatística multivariada, usada como uma das metodologias deste trabalho, seguida dos **OBJETIVOS** geral e específicos.

A **METODOLOGIA** e os **RESULTADOS**, assim como a **CONCLUSÃO**, estão no capítulo I apresentado em forma de artigo científico intitulado: “**Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) do Oeste do Pará**”, de acordo com as normas da revista QUÍMICA NOVA que se encontra em anexo neste documento e disponível no site <<http://www.scielo.br/revistas/qn/pinstruc.htm>>. E por fim, a **SÍNTESE INTEGRADORA** que consiste na fase de reflexão do processo de investigação.

## 1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1. Família Lauraceae

A família Lauraceae pertence à divisão Magnoliophyta e abrange cerca de 2500 espécies distribuídas em 52 gêneros. Ocorre em regiões tropicais e subtropicais do planeta com poucos representantes em regiões temperadas. Há em torno de 29 gêneros e 900 espécies nas Américas, sendo que a grande diversidade encontra-se em terras baixas da Amazônia e América Central (RIBEIRO *et al.*, 1999).

As Lauraceae são geralmente arbóreas e aromáticas, variando de arbustos a árvores de dossel (raramente ervas), com folhas simples e alternas (raramente opostas), sem estípulas e de margem inteira. As inflorescências podem ser paniculadas, apresentando flores geralmente pouco vistosas e hermafroditas. O fruto é do tipo baga com cúpula (SOUZA E LORENZI, 2008).

Marques (2001) mostra a importância econômica de 52 espécies pertencentes a 12 gêneros desta família, utilizadas em diferentes setores como culinária, fabricação de papel, marcenaria, construção civil, indústria química e medicina popular (Figura 1), com destaque para os gêneros *Aniba*, *Ocotea* e *Nectandra*.

<b>Culinária</b>	<i>Persea americana</i> Mill., <i>P. gratissima</i> L., <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyne e <i>C. cassia</i> (Nees) Nees & Ebert ex Blume.
<b>Fornecedoras de madeira</b>	<i>Ocotea puberula</i> Nees, <i>O. guianensis</i> Aubl., <i>O. organensis</i> (Meiss.) Mez, <i>O. diospyrifolia</i> (Mez), <i>O. acutifolia</i> Mez, <i>O. aciphylla</i> (Nees) Mez, <i>O. catharinensis</i> Mez, <i>O. canaliculata</i> (Rich.) Mez, <i>O. spectabilis</i> (Meiss.) Mez, <i>O. divaricata</i> (Nees) Mez, <i>O. porosa</i> (Nees) L. Barroso, <i>O. elegans</i> Nees, <i>Aniba terminalis</i> Ducke, <i>A. firmula</i> (Nees et Mart. ex Nees) Mez, <i>A. parviflora</i> (Meiss.) Mez, <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, <i>N. rigida</i> (H.B.K) Nees, <i>N. amazonum</i> Nees, <i>N. leucothyrsus</i> Meiss., <i>N. angustifolia</i> Nees, <i>N. rigida</i> (H.B.K) Nees e <i>Beilshmedia rigida</i> (Mez) Kosterm.
<b>Indústria química</b>	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) Presl., <i>Lindera benzoin</i> (L.) Blume, <i>Licaria guianensis</i> Aubl., <i>A. parviflora</i> , <i>A. rosaeodora</i> Ducke, <i>A. canellita</i> (H.B.K) Mez, <i>Sassafras albidum</i> Nutt., <i>Ocotea pretiosa</i> (Nees) Benth & Hooke e <i>O. costulata</i> Mez.
<b>Medicina popular</b>	<i>Sassafras albidum</i> Nutt., <i>Ocotea aciphylla</i> , <i>O. spectabilis</i> , <i>O. pulchella</i> Mart., <i>O. teleiandra</i> (Meissn.) Mez, <i>O. indecora</i> Schott., <i>O. guianensis</i> , <i>O. barcellensis</i> Mez, <i>O. pretiosa</i> , <i>O. cymbarum</i> , <i>Licaria puchury-major</i> Kosterm., <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez, <i>A. canellita</i> , <i>A. hastmanniana</i> (Nees) Mez, <i>A. rosaeodora</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Persea americana</i> , <i>P. gratissima</i> , <i>P. cordata</i> (Vell.) Mez, <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>C. cassia</i> , <i>Cryptocaria moschata</i> Nees et Mart., <i>Nectandra pichurim</i> (H.B.K) Mez e <i>N. rodiaei</i> Schomb.

**Figura 1:** Quadro com uso comum de algumas espécies da família Lauraceae. Adaptado de Marques (2001).

O autor ainda destaca que o uso de espécies de Lauraceae vem ocorrendo desde a Grécia antiga, porém, apesar de muitas já serem utilizadas para a fabricação de diversos produtos, ainda há muita informação restrita às comunidades tradicionais. Esta família possui representantes mundialmente conhecidos, principalmente pelo seu uso na culinária, como o abacate (*Persea americana*), o louro (*Laurus nobilis*) e a canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

A dificuldade em identificar espécies desta família é comum ou por indefinição na delimitação de espécies ou pela descrição comprometida devido à ausência de material de qualidade, como é o caso de algumas espécies dos gêneros *Aniba* e *Ocotea* que apresentam diferenças muito sutis (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A família Lauraceae recebe destaque na produção de óleo essencial e diferentes espécies desta família possuem atividade biológica comprovada, como por exemplo, atividade antimicrobiana de *Laurus nobilis* (BARATTA *et al.*, 1998), atividade acaricida de *Laurus novocanariensis* e de *L. nobilis* (MACCHIONI *et al.*, 2006), atividade larvicida de *Aniba duckei* (SOUZA *et al.*, 2007) e atividade antifúngica de *Aniba rosaeodora* (SIMIC *et al.*, 2004).

Artigos relatam o isolamento de neolignanais, flavonóides, estirilpironas, ésteres e amidas de Lauraceas nativas do Brasil (FERNANDES *et al.*, 1976; BARBOSA-FILHO, *et al.*, 1987; ROSSI *et al.*, 1997). Espécies do gênero *Aniba* podem ser separadas em três grupos de acordo com a natureza química do constituinte predominante no OE: o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri*, *A. burchellii*, *A. parviflora*, *A. permollis*, *A. guianensis*), o grupo do alilbenzeno (*A. canelilla*, *A. hostmanniana*, *A. pseudocoto*) e o grupo do linalol, representado pela espécie *A. roseodora* e suas variedades (MORAES *et al.*, 1972; GOTTLIEB *et al.*, 1981).

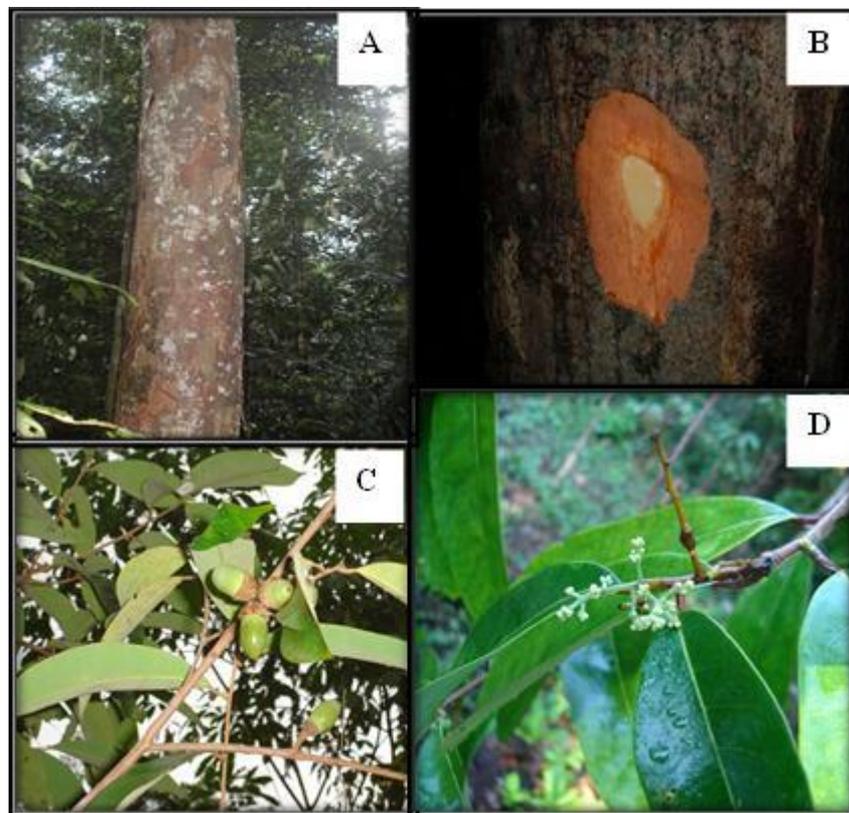
### **1.1.2. *Aniba rosaeodora* Ducke**

Dentre as espécies do gênero *Aniba*, o pau-rosa merece destaque pelo alto valor econômico no mercado internacional devido ao óleo essencial que pode ser extraído de todas as partes da árvore (GOTTLIEB *et al.*, 1964). A taxonomia do pau-rosa é um tanto confusa. Ducke classificou como *Aniba rosaeodora* Ducke (1930) árvores exploradas no norte da Amazônia e de *A. rosaeodora* var. *amazonica* Ducke (1930) as do sul da Amazônia ao notar certa diferença entre ambas as localidades (CHANTRAINE *et al.*, 2009). Kostermans propôs a elevação da variedade amazônica à categoria de espécie com o nome de *Aniba duckei* Kosterm. (1938). No entanto, devido à difícil distinção entre o material avaliado, atualmente

essas variedades são consideradas sinônimas botânicas de uma mesma espécie (KUBITZKI E RENNER, 1982).

*A. rosaeodora* ocorre na Amazônia Central em florestas altas não-inundáveis e em florestas baixas de areia branca na região do alto Rio Negro. É característica e exclusiva da mata pluvial amazônica de terra firme, com frequência ocasional, dispersão descontínua. A madeira é moderadamente pesada com densidade de aproximadamente  $0,66 \text{ g/cm}^3$  (LORENZI, 1998).

De acordo com a descrição feita por Ducke, é uma árvore de grande porte (Figura 2), atingindo até 30 m de altura, casca pardo-avermelhada, folhas coriáceas, com margens fortemente recurvadas e nervuras secundárias divergentes das nervuras primárias num ângulo de 35 a 40°, arqueadas para cima; flores entre as menores do gênero, filamentos dos estames curtos, lojas das anteras das duas séries exteriores minúsculas (DUCKE *apud* SUDAM, 1972). As flores são dispostas em panículas sobre raminhos novos; os cortes na casca despreendem um forte odor de botões de rosa; as folhas são simples e alternadas e os frutos são bagas lisas, oblongas, de até 4 cm de comprimento e 2 cm de largura, dispostas em pequenas cúpulas cheias de pequenas lenticelas salientes (PARROTTA *et al.*, 1995).



**Figura 2:** Árvore de pau-rosa na FLONA do Tapajós. **A.** Destaque para o tronco. **B.** Corte da casca. **C.** Folhas, galhos e frutos. **D.** Ramo com presença de inflorescência. FOTO: Diana Amazonas.

### 1.1.3. Óleo essencial de Pau-rosa

Óleos essenciais apresentam como principais características a volatilidade, seguida de aroma e sabor característicos. Geralmente, são extraídos de plantas através do método de arraste a vapor d'água e também pela prensagem a frio do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil, dominam o mercado de exportação deste produto (BIZZO *et al.*, 2009).

Os OEs são constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos além de fenilpropanóides (PICHERSKY *et al.*, 2006). Possuem grande aplicação na área de perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias isoladas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (MAIA E ANDRADE, 2009).

Segundo Bizzo e colaboradores (2009), há 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo. Estes autores citam que o Brasil tem lugar de destaque na produção de OEs, ao lado da Índia, China e Indonésia. A posição do Brasil deve-se aos OEs de cítricos. No passado, o país teve destaque como exportador do OE de pau-rosa, sassafrás e menta e ainda é o maior exportador do OE de pau-rosa.

Na pauta de exportação da região amazônica, o OE de pau-rosa já ocupou o terceiro lugar, perdendo apenas para a borracha e a castanha, primeiro e segundo lugares, respectivamente (MARQUES, 2001). Atualmente, devido ao esgotamento das populações nos estados do Amapá e Pará e na Guiana Francesa, apenas o estado do Amazonas é produtor desse óleo volátil, exportando-o principalmente para os Estados Unidos, França, Japão, Reino Unido e Alemanha (SOUZA, 2010).

O óleo essencial de pau-rosa foi o primeiro extraído em larga escala e exportado pelo Brasil. Este óleo possui cerca de 70-90% de linalol, um monoterpene amplamente utilizado na indústria cosmética mundial (SILVA *et al.*, 2003), e faz parte da composição do famoso perfume francês Chanel N° 5. No entanto, o surgimento do linalol sintético e a produção na China do OE das folhas de *Cinnamomum camphora*, também rico em linalol, fez com que as exportações do OE de pau-rosa fossem progressivamente reduzidas até mesmo pela própria escassez de árvores.

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC (MDIC, 2011), em 2008 o país exportou 21.137 kg líquido de OE de pau-rosa, já em 2010, esse número caiu para 4.164 kg, com valor respectivamente de US\$ 97,83/kg e de US\$

116,90/kg. Porém, a demanda por esta matéria-prima permanece considerável devido à característica peculiar de seus constituintes químicos, tornando-a insubstituível.

A exploração do pau-rosa começou em 1925, inicialmente no Pará e depois no Amazonas. Em 1927, a produção nacional atingiu 200 toneladas, não havendo mercado para absorver o volume produzido. A preocupação com a exploração predatória já era manifestada em 1933, apenas alguns anos após o início da extração do óleo. O pico de produção ocorreu nos anos 60, quando cerca de 500 toneladas anuais foram exportadas (BIZZO *et al.*, 2009).

O IBAMA através da portaria nº 37-N de 3 de abril de 1992 (IBAMA, 1992), incluiu o pau-rosa na lista das espécies ameaçadas de extinção e, entre outras normas, decretou o plantio de quatro mudas para cada metro cúbico de madeira utilizada, assim como: censo florestal de todas as árvores com DAP (Diâmetro à Altura do Peito) acima de 5 cm presentes na área a ser explorada; pelo menos dez por cento das árvores com DAP acima de 28 cm devem ser deixadas como matrizes; apenas árvores com tronco a partir de 20 cm de diâmetro devem ser cortadas e esse corte deve ser acima de 50 cm de altura do solo para haver rebrotamento (LEITE *et al.*, 2001). Segundo estes autores, o IBAMA tenta controlar a exploração desta espécie exigindo a reposição da matéria prima extraída através da plantação de 80 mudas para cada tambor de 180 kg de óleo essencial. Este fato aumentou a demanda por mudas e sementes desta espécie na Amazônia Central.

*A. rosaeodora* foi incluída no dia 17 de março de 2010 na lista de espécies de comércio controlado, aprovada na 15ª Reunião da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES, 2010). A aprovação aconteceu por unanimidade em Doha, no Catar. De acordo com o Decreto Nº 3.607, de 21 de setembro de 2000 (BRASIL, 2000), as espécies integrantes do anexo II da CITES estarão em perigo de extinção caso o comércio de espécimes não esteja sujeito à regulamentação rigorosa, além disso, a partir deste decreto, a comercialização só pode ser autorizada mediante a concessão de Licença ou emissão de Certificado pela Autoridade Administrativa (IBAMA). Assim, a Instrução Normativa Nº 9, de 5 de setembro de 2010 (MMA, 2010), exige declaração de estoque de pau-rosa em qualquer Unidade do IBAMA através do protocolo de uma planilha de dados.

O cultivo de pau-rosa e a extração do OE das folhas e galhos podem tornar-se uma alternativa sustentável, e de menores custos que os da indústria extrativista predatória (FERRAZ *et al.*, 2009). O OE das folhas possui cerca de 81% de linalol, quantidade semelhante à encontrada na madeira, com 85% (ZELLNER *et al.*, 2006). Estudos realizados por Sampaio e colaboradores (2007) revelaram que a poda da copa das árvores de pau-rosa,

realizada no ano de 1987, estimulou grande número de brotos por árvore. Na avaliação realizada no ano de 2000, a média do peso verde dessa rebrota (60,18 kg) foi significativamente superior ao peso verde da copa das árvores testemunhas não podadas anteriormente (37,43 kg), revelando que a poda estimulou a maior produção de biomassa aérea das árvores, maximizando, conseqüentemente, a produção de OE, que teve um rendimento maior a partir de galhos e folhas do que através da madeira (SAMPAIO *et al.*, 2005).

O rendimento médio do OE extraído da madeira fica em torno de 1%, sendo possível aumentar para 1,2% no setor industrial (MAY E BARATA, 2004). Estes autores ainda afirmam que com a escassez de indivíduos de pau-rosa, iniciou-se uma tendência a substituir seu óleo pelo de outras espécies de *Aniba*, ou por confusão devido à semelhança entre as espécies, ou por conveniência para aumentar a exploração.

Os produtores de óleo de pau-rosa do Amazonas são constantemente pressionados a adotar práticas que atendam a sustentabilidade da oferta. Para Santana e colaboradores (1997), a extração do óleo das folhas é uma atividade industrial potencial. Esta tendência pode ser confirmada pela exportação de dois mil quilogramas de OE das folhas de pau-rosa ocorridas no ano 2010-2011 pela Empresa Benchimol & Irmão de Manaus-AM ao preço médio de US\$ 183/kg (dados não publicados).

Apesar de toda legislação criada, na prática, ainda há muito que fazer para evitar a extinção da espécie. Pesquisas e o estabelecimento de práticas de manejo são necessários para que essa e outras espécies produtoras de óleo essencial possam ser cultivadas em escala comercial, diminuindo a pressão sobre populações remanescentes.

#### **1.1.4. Unidades de Conservação**

As Unidades de Conservação (UCs) podem ser de Proteção Integral ou de Uso Sustentável. A Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e a Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns (RESEX) são de uso sustentável, nas quais é permitido o uso de uma parcela de seus recursos naturais, em compatibilidade com a conservação da natureza (BORÉM E GIÚDICE, 2008).

A Floresta Nacional é considerada de posse e domínio públicos. É caracterizada por ter cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e seu objetivo básico é o uso múltiplo sustentável de recursos florestais e a pesquisa científica (SNUC, 2000). Enquanto que a Reserva Extrativista é aquela utilizada por populações extrativistas tradicionais, cuja

subsistência baseia-se no extrativismo e, complementarmente, na agricultura de subsistência e na criação de animais de pequeno porte. Os seus objetivos são proteger os meios de vida e a cultura dessas populações e assegurar o uso sustentável dos recursos naturais (BORÉM E GIÚDICE, 2008).

A FLONA do Tapajós é uma área de uso sustentável e foi a 13ª Floresta Nacional criada no país pelo Decreto nº 73.684 de 19 de fevereiro de 1974. Faz limite a oeste com o Rio Tapajós e ao sul com o Rio Cupari. Com uma área de 544.927 hectares (600 mil ha no Decreto de Criação) abrange os municípios de Aveiro, Belterra, Placas e Rurópolis (MMA, 2004).

Durante as primeiras décadas, os instrumentos de gestão estavam voltados para a exploração madeireira, mas atualmente o Plano de Manejo da FLONA envolve o incentivo ao ecoturismo e à exploração de produtos florestais não-madeireiros, como por exemplo, os óleos vegetais de copaíba (*Copaifera multijuga*) e andiroba (*Carapa guianensis*) (SANTANA *et al.*, 2008).

O clima é tropical úmido com variação térmica anual inferior a 5 °C. A temperatura média anual fica em torno de 25,5 °C e a evapotranspiração média anual de 122 mm. As maiores precipitações ocorrem nos meses de janeiro a maio, com média anual de 1820 mm, com uma estação seca curta de dois ou três meses, geralmente entre agosto e outubro. Quanto ao solo, predominam latossolos amarelo distróficos, solos profundos e com baixa capacidade de troca catiônica (MMA, 2005).

A partir dos inventários feitos na FLONA, a lista parcial de espécies florestais conta com dezessete representantes da família Lauraceae, pertencentes a cinco gêneros (Tabela 1). Segundo Parrotta e colaboradores (1995), durante os 20 ou 30 anos anteriores ao estabelecimento da FLONA, a madeira do planalto foi explorada, sendo principalmente o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* – Lauraceae), o Cedro (*Cedrela odorata* – Meliaceae) e o Freijó (*Cordia goeldiana* – Boraginaceae).

**Tabela 1:** Lista parcial das espécies da família Lauraceae com base no inventário feito na FLONA do Tapajós.

Nº	Nome científico	Nome popular
1	<i>Aniba burchellii</i> Kosterm.	Abacaterana
2	<i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez	Preciosa
3	<i>Aniba guianensis</i> Aubl.	Louro
4	<b><i>Aniba rosaeodora</i> Ducke</b>	<b>Pau rosa</b>
5	<i>Licaria brasiliensis</i> (Nees) Kosterm.	Louro amarelo
6	<i>Licaria canella</i> (Meisn.) Kosterm.	Louro-preto
7	<i>Mezilaurus lindaviana</i> Schw.&Mez	Itaúba abacate
8	<i>Mezilaurus itauba</i> (Meisn.) Taub. ex Mez	Itaúba preta

**Tabela 1:** Continuação

Nº	Nome científico	Nome popular
9	<i>Nectandra globosa</i> (Aubl.)Mez	Louro
10	<i>Nectandra cuspidata</i> Nees&Mart.	Louro preto
11	<i>Nectandra reticulata</i> (Ruiz&Pav.) Mez	Louro-preto
12	<i>Ocotea acutangula</i> (Miq.) Mez	Canela
13	<i>Ocotea canaliculata</i> (Rich.)Mez	Louro
14	<i>Ocotea cernua</i> (Nees) Mez	Louro
15	<i>Ocotea glomerata</i> (Nees) Mez	Louro abacate
16	<i>Ocotea baturitensis</i> Vattimo	Louro preto
17	<i>Ocotea rubra</i> Mez	Louro vermelho

Fonte: adaptado do Plano de Manejo da Floresta Nacional do Tapajós (MMA, 2004).

A Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns tem uma área de aproximadamente 650.000 ha, onde vive cerca de 20.000 pessoas pertencentes a 70 comunidades. Dados sobre esta Unidade são escassos e o plano de manejo está em fase de elaboração. A área desta Reserva, com espécimes indicados como pau-rosa, pertence à comunidade do Santi, a qual faz parte da APRUSPEBRAS (Associação dos Produtores Rurais Extrativistas da Margem Esquerda do Tapajós) junto com outras quatro comunidades: Solimões; Pedra Branca; Carão e Anumã. Esta Associação desenvolve um projeto de reflorestamento, baseado na produção e plantio de mudas de espécies nativas madeireiras, cujo objetivo é a venda de créditos de reposição florestal. Atualmente, a APRUSPEBRAS está incluindo o pau-rosa. O projeto beneficia hoje 57 comunidades da Reserva e é uma alternativa de renda para os moradores que vivem da agricultura de derruba e queima.

### 1.1.5. Estudos de perfil metabólico em extratos vegetais

Metaboloma é o conjunto dos metabólitos produzidos em organismos vivos; excluindo-se as biomoléculas poliméricas de alta massa molar como: polissacarídeos, ligninas, peptídeos, proteínas, DNA e RNA (KIM *et al.*, 2011). A palavra metaboloma aparece pela primeira vez em Oliver e colaboradores (1998). Em seguida, o termo metabolômica foi introduzido com o intuito de designar o conjunto de análises na qual todos os metabólitos de um organismo seriam supostamente identificados e quantificados (FIEHN, 2002). Recentemente, o termo metabolômica tem sido utilizado para descrever uma área da ciência ao invés de uma simples ferramenta analítica. O grande número de revisões sobre análise metabolômica em diferentes áreas de aplicação, tal como em descoberta de drogas (KADDURAH-DAOUK *et al.*, 2008; WISHART, 2008), análise de plantas (HALL *et al.*, 2008) e doenças humanas (KADDURAH-DAOUK E KRISHNAN, 2009), mostra que esse

novo ramo da ciência tem potencial para responder importantes perguntas em muitas áreas.

Segundo Villas-Bôas e colaboradores (2005), metabolômica ou análise metabolômica é a caracterização do fenótipo metabólico (metaboloma) em diferentes condições (como por exemplo, estágios de desenvolvimento, condições ambientais, modificações genéticas) e a ligação desse fenótipo com o correspondente genótipo.

As análises metabolômicas são classificadas em dois tipos (CEVALLOS-CEVALLOS *et al.*, 2009): direcionadas (RAMAUTAR *et al.*, 2006) e não-direcionadas (MONTON E SOGA, 2007). Enquanto nas análises direcionadas o intuito é a detecção, muitas vezes requerendo identificação e purificação dos metabólitos de uma classe ou grupo específico, nos estudos não-direcionados o objetivo é a detecção do maior número de metabólitos possíveis com o foco na obtenção de padrões, ou seja, a obtenção de uma impressão digital das amostras estudadas.

As análises não-direcionadas são comumente utilizadas como ferramenta em trabalhos de discriminação e classificação, como em controle de qualidade (RASMUSSEN *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2011) e quimiotaxonomia (LE GALL *et al.*, 2004; ROOS *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010), juntamente com o emprego de técnicas de estatística multivariada.

A obtenção dos dados na área de metabolômica envolve o uso de uma grande variedade de metodologias analíticas para a identificação, quantificação ou obtenção dos padrões dos metabólitos presentes nos organismos estudados. Entre elas, a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido as mais utilizadas, pois são técnicas baseadas nas propriedades físicas das substâncias, as quais não são influenciadas por características externas, sendo em consequência, metodologias bastante reprodutíveis (DUNN *et al.*, 2005; HOLMES *et al.*, 2006; COLQUHOUN, 2007). Comumente, com a finalidade de melhorar a resolução dos dados, a EM e a RMN são acopladas a técnicas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).

Entre as técnicas de estatística multivariada a mais utilizada têm sido a análise de componentes principais – PCA (sigla para *Principal Component Analysis*). (MELLINGER, 1987; WOLD *et al.*, 1987; MOITA NETO E MOITA, 1998). O PCA visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, mantendo a maior porcentagem de informação (variância) contida nos dados originais. O procedimento permite analisar a informação contida em grandes matrizes de dados em gráficos de duas ou três dimensões. A redução é obtida pelo estabelecimento de novas variáveis, ortogonais entre si, chamadas de componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais. Os PCs são organizados em ordem decrescente de importância, o primeiro PC explica a maior

porcentagem de variância contida nos dados, e os PCs subsequentes explicam o restante. O resultado da análise de componentes principais pode ser visualizado em gráficos cartesianos, nos quais as amostras são distribuídas entre eixos bi ou tridimensionais, os PCs.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo geral**

Analisar a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial e comparar o perfil metabólico de extratos brutos de duas populações indicadas como pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke, localizadas em Unidades de Conservação no Oeste do Pará.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Comparar o rendimento do óleo essencial entre as duas populações;
- Determinar e comparar a composição química dos óleos essenciais;
- Avaliar o perfil dos metabólitos secundários obtidos a partir de extratos brutos;
- Analisar a atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais.

### 1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, D. Global Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 50, p. 1-5, 2002.
- ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M.; GONÇALVES, J. C. R.; MONTENEGRO, F. C.; SOUSA, D. P.; LEITE, J. R. R. M.; BENEDITO, M. A. C.; CARVALHO, J. G. B.; CRUZ, J. S.; MAIA, J. G. S. Rosewood Oil Induces Sedation and Inhibits Compound Action Potential in Rodents. Journal of Ethnopharmacology, v. 124, n. 3, p. 440-443, 2009.
- 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 Oil Research, v. 10, n. 6, p. 618-627, 1998.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the Fruits of *Aniba riparia*. Phytochemistry, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.
- BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT A. M.; BARBOSA-FILHO J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da Atividade Antibiótica de Extratos de Lauraceae. Acta Amazônica, v. 18, p. 91-94, 1988.
- BHAVNANI, S. M.; BALLOW, C. H. New Agents for Gram-Positive Bacteria. Current Opinion In Microbiology, v. 3, n. 5, p. 528-534, 2000.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas. Química Nova, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P. D. Biotecnologia e Meio Ambiente. 2ª Ed. Viçosa, 2008.
- BRASIL. Presidência da República – Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto N° 3.607, de 21 de setembro de 2000. Dispõe sobre a implementação da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. REYES-DE-CORCUERA, J. I.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic Analysis in Food Science: A Review. Trends In Food Science & Technology, v. 20, n. 11-12, p. 557-566, 2009.
- CHANTRAINE, J.-M.; DHENIN, J.-M.; MORETTI, C. Chemical Variability of Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Essential Oil in French Guiana. Journal of Essential Oil Research, v. 21, n. 6, p. 486-495, 2009.
- CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Fifteenth Meeting of the Conference of the Parties Doha (Qatar), Cop15 Prop. 29, 13-25 March 2010. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/cop/15/prop/results.shtml>> Acesso em: Mar. de 2010.

COLQUHOUN, I. J. Use of NMR for Metabolic Profiling in Plant Systems. *Journal of Pesticide Science*, v. 32, n. 3, p. 200-212, 2007.

DUCKE, A. Lauraceas aromáticas da Amazônia. 1ª Reunião Sul-americana de Botânica. Rio de Janeiro, v. 3, 1938. *Apud* SUDAM – Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia. Documentos amazônicos. Belém, Brasil, 1972.

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the Metabolome: Current Analytical Technologies. *Analyst*, v. 130, n. 5, p. 606-625, 2005.

FERNANDES, J. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. Chemistry of Brazilian Lauraceae. 34. Neolignans from an *Aniba* Species. *Phytochemistry*, v. 15, n. 6, p. 1033-1036, 1976.

FERRAZ, J. B. S.; BARATA, L. E. S.; SAMPAIO, P. T. B.; GUIMARÃES, G. P. Perfumes da Floresta Amazônica: Em Busca de uma Alternativa Sustentável. *Ciência e Cultura*, v. 61, p. 40-43, 2009.

FIEHN, O. Metabolomics - The Link Between Genotypes and Phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 1-2, p. 155-171, 2002.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos Essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica*, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; FINEBERG M.; GUIMARÃES M. L.; MAGALHÃES M. T.; MARAVALHAS, N. Notes on Brazilian Rosewood. *Perfumery and Essential Oil Record*, v. 55, p. 253-257, 1964.

GOULART, E. G.; JOURDAN, M.C.; BRAZIL, B. G.; GILBERT, B.; LOPES, J. N. C.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKY, W. e THAMES, A. W. Atividade Bloqueadora de Produtos Naturais na Evolução Externa de *Strongyloides stercoralis* e *Ancilostomídeos*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 56, p. 123-137, 1975.

HALL, R. D.; BROUWER, I. D.; FITZGERALD, M. A. Plant Metabolomics and its Potential Application for Human Nutrition. *Physiologia Plantarum*, v. 132, n. 2, p. 162-175, 2008.

HOLMES, E. TANG, H.; WANG, Y.; SEGER, C. The Assessment of Plant Metabolite Profiles by NMR-based Methodologies. *Planta Medica*, v. 72, n. 9, p. 771-785, 2006.

IBAMA. Portaria Nº 037/92-N, de 03 de abril de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Brasília, Brasil. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=179&idConteudo=8121&idMenu=8618>> Acesso em: Mar. de 2010.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISHNAN, K. R. R. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to the Study of Central Nervous System Diseases. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 1, p. 173-186, 2009.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. In: (Ed.). Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.48, p. 653-683, 2008.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based Plant Metabolomics: Where Do We Stand, Where Do We Go? Trends in Biotechnology, v. 29, n. 6, p. 267-275, 2011.

KIM, H. K.; SAIFULLAH; KHAN, S.; WILSON, E. G.; KRICUN, S. D. P.; MEISSNER, A.; GORALER, S.; DEELDER, A. M.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolic Classification of South American *Ilex* Species by NMR-based Metabolomics. Phytochemistry, v. 71, n. 7, p. 773-784, 2010.

KUBITZKI, K.; RENNER, S. Lauraceae I (*Aniba* and *Aiouea*). Flora Neotropica, New York, v. 31, n. 5, 1982. 125 p.

LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M. Metabolite Profiling Using H-1 NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea, *Camellia sinensis* (L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 4, p. 692-700, 2004.

LEITE, A. M. C.; QUISEN, R. C.; SAMPAIO, P. T. B. Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke Lauraceae): Informações Sobre o Sistema de Plantio e o Manejo Sustentável da Espécie. Embrapa Amazônia Ocidental, documentos 13. Manaus-AM: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2001. 20 p.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2ª ed. Nova Odessa-SP: Plantarum, 1998.

MACCHIONI, F.; PERUCCI, S.; CIONI, P.; MORELLI, I.; CASTILHO P.; CECCHI, F. Composition and Acaricidal Activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* Essential Oils Against *Psoroptes cuniculi*. Journal of Essential Oil Research, v. 18, n. 1, p. 111-114, 2006.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon Aromatic Plants and Their Essential Oils. Química Nova, v. 32, p. 595-622, 2009.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; COUTO, H. A. R.; SILVA, A. C. M.; MARX, F.; HENKE, C. Plant Sources of Amazon Rosewood Oil. Química Nova, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.

MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; FONTES JUNIOR, E. A.; SANTOS, A. M. S. Volatile Compounds and Antispasmodic Activity of the Stem Bark Oil of *Aniba canelilla*. XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina. Rio de Janeiro, 2003.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. Floresta e Ambiente, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MAY, P. H.; BARATA, L. E. S. Rosewood Exploitation in the Brazilian Amazon: Options for Sustainable Production. Economic Botany, v. 58, n. 2, p. 257-265, 2004.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secex – Secretaria de Comércio Exterior. Exportação Brasileira. Aliceweb. Disponível em: <<http://alicesweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em: Ago. de 2011.

MELLINGER, M. Multivariate Data-Analysis - Its Methods. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 2, n. 1-3, p. 29-36, 1987.

MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, F. M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, B. G. S.; SOUSA, F. C. Anxiolytic-like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-Dihydroxybenzoyl-Tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in Mice. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa Nº 9, de 5 de setembro de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 Out. 2010. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br>>. Acesso em: Dez. de 2010.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de manejo: Floresta Nacional do Tapajós – a transformação para conservar está em nossas mãos. IBAMA, 2005.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de manejo: Floresta Nacional do Tapajós. Volume I – Informações gerais. IBAMA, 2004. Disponível em: <[http://www4.icmbio.gov.br/flona\\_tapajos/](http://www4.icmbio.gov.br/flona_tapajos/)>. Acesso em: Jan. 2011.

MITJA, D.; LESCURE, J. P. Madeira para Perfume: Qual Será o Destino do Pau-Rosa? In: Emperaire, L. (Ed.). A Floresta em Jogo. O Extrativismo na Amazônia Central. São Paulo: Unesp, p. 93-102, 2000.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados. Química Nova, v. 21, p. 467-469, 1998.

MONTON, M. R. N.; SOGA, T. Metabolome Analysis by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1168, n. 1-2, p. 237-246, 2007.

MORAES, A. A.; REZENDE, C. M. A. M.; VON BÜLOW, M. V.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHÃES, M. T. Óleos Essenciais de Espécies do Gênero *Aniba*. Acta Amazônica, v. 2, n.1, p. 41-44, 1972.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C. The Chemistry of Rosewood - Isolation and Structure of Anibine and 4-Methoxyparacotoin. Journal of the American Chemical Society, v. 79, n. 16, p. 4507-4511, 1957.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic Functional Analysis of the Yeast Genome. Trends in Biotechnology, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

PARROTTA, J. A.; FRANCIS, J. K.; ALMEIDA, R. R. Trees of the Tapajós: A Photographic Field Guide. Rio Piedras, Puerto Rico: United States Department of Agriculture, 1995.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. Science, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

RAMAUTAR, R.; DEMIRCI, A.; DE JONG, G. J. Capillary Electrophoresis in Metabolomics. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 5, p. 455-466, 2006.

RASMUSSEN, B.; CLOAREC, O.; TANG, H.; STAERK, D.; JAROSZEWSKI, J. W. Multivariate Analysis of Integrated and Full-Resolution H-1-NMR Spectral Data from Complex Pharmaceutical Preparations: St. John's Wort. *Planta Médica*, v. 72, n. 6, p. 556-563, 2006.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. Manaus: Inpa-DFID, 1999. 816 p.

ROOS, G.; RÖSELER, C.; BÜTER, K. B.; SIMMEN, U. Classification and Correlation of St. John's Wort Extracts by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Multivariate Data Analysis and Pharmacological Activity. *Planta Medica*, v. 70, n. 8, p. 771-777, 2004.

ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J. G. S. Neolignans, Styrylpyrones and Flavonoids from an *Aniba* Species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 6, p. 1263-1269, 1997.

SAMPAIO, P. T. B.; BARBOSA, A. P.; VIEIRA, G.; SPIRONELLO, W. R.; BRUNO, F. M. S. Biomassa da Rebrotada de Copas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em Plantios Sob Sombra Parcial em Floresta Primária. *Acta Amazônica*, v. 35, p. 491-494, 2005.

SAMPAIO, P. T. B.; SANTOS, M. C.; VIEIRA, G.; SPIRONELLO, W.; USECHE, F. L.; BRUNO, F. M. S. Avaliação Rebrotada da Copa das Árvores de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em Sistema de Podas Sucessivas. *Acta Amazônica*, v. 37, p. 55-60, 2007.

SANTANA, A. ; OHASHI, S. ; ROSA, L. ; GREEN, C. L. Brazilian Rosewood Oil: The Prospect for Sustainable Production and Oil Quality Management. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 8, n. 3, p. 16-20, 1997.

SANTANA, A. C.; SILVA, I. M.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, R. C.; FILGUEIRAS, G. C.; COSTA, A. D.; SOUZA, T. F.; HOMMA, A. K. O. Caracterização do Mercado de Produtos Florestais Madeireiros e Não-Madeireiros da Região Mamuru-Arapiuns. Belém-PA: FUNPEA, Relatório Final, 2008. 132 p.

SILVA, D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. S.; MOUCHREK FILHO, V. E. Quantificação do Linalol no Óleo Essencial da *Aniba duckei* Kostermans Utilizando uma Nova Coluna Capilar Polyh4-Md em Cromatografia Gasosa. *Química Nova*, v. 26, p. 461-465, 2003.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JUNIOR, A. Biological Properties of Medicinal Plants: a Review of Their Antimicrobial Activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 713-717, 2004.

SNUC. SISTEMA NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. Lei Nº 9.985, de 18 de Julho de 2000. Art. 17. Disponível em: <www.icmbio.gov.br>. Acesso em: Nov. 2010.

SOUZA, K. S.; CHAAR, J. S.; OLIVEIRA, K. M. T.; GOMES, E. O.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M.; QUIHNARD, E. L. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, D. D.; GALHIANE, M. S.; CHIERICE, G. O. Atividade Biológica de Extratos, Hidrolatos e Óleos Voláteis de Pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e Quantificação do Linalol no Hidrolato de Folhas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9, p. 1-7, 2007.

SOUZA, R. C. Z. Avaliação das Frações Voláteis de Espécies de *Aniba* por Microextração em Fase Sólida Acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME-CG) e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG × CG). (Dissertação De Mestrado). Unicamp, Campinas-SP, 2010.

SOUZA, R. C. Z.; EIRAS, M. M.; CABRAL, E. C.; BARATA, L. E. S.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. The Famous Amazonian Rosewood Essential Oil: Characterization and Adulteration Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting, *Analytical Letters*, v. 44, n. 15, p. 2417-2422, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógamas Nativas e Exóticas no Brasil, Baseado em APG II. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or Metabolite Profiles? *Trends in Biotechnology*, v. 23, n. 8, p. 385-386, 2005.

WISHART, D. S. Applications of Metabolomics in Drug Discovery and Development. *Drugs in R&D*, v. 9, n. 5, p. 307-322, 2008.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987.

ZELLNER, B. D`A.; PRESTI, M. L.; BARATA, L. E S.; DUGO, P.; DUGO G.; MONDELLO L. Evaluation of Leaf-Derived Extracts as an Environmentally Sustainable Source of Essential Oils by Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Enantioselective Gas Chromatography-Olfactometry. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 3, p. 883-890, 2006.

## 2. CAPÍTULO I

# VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES INDICADOS COMO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) DO OESTE DO PARÁ\*

**Diana Rêgo Amazonas**  
**Lydia Fumiko Yamaguchi**  
**Thuanny R. Lira Castro**  
**Celso R. de Oliveira Júnior**  
**Sandra L. Ferreira Sarrazin**  
**Ricardo Bezerra de Oliveira**  
**Massuo Jorge Kato**  
**Lauro E. Soares Barata**  
**Rosa H. Veras Mourão**

---

\* Regras da revista QUÍMICA NOVA. ISSN 0100-4042 versão impressa; ISSN 1678-7064 versão on-line.

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES  
INDICADOS COMO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE) DO OESTE DO PARÁ**

**Diana Rêgo Amazonas<sup>\*</sup>, Thuanny R. Lira Castro, Sandra L. Ferreira Sarrazin, Ricardo Bezerra de Oliveira, Lauro E. S. Barata e Rosa H. Veras Mourão**

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental e Laboratório de P & D de Produtos Naturais Bioativos, Universidade Federal do Oeste do Pará, Rua Vera Paz, S/N, 68040-250, Santarém – PA, Brasil

**Lydia Fumiko Yamaguchi, Celso R. de Oliveira Júnior e Massuo Jorge Kato**

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, nº 748, 05508-000, São Paulo – SP, Brasil

---

<sup>\*</sup> e-mail: [diana.amazonas@gmail.com](mailto:diana.amazonas@gmail.com)

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIMES  
INDICADOS COMO PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE) DO OESTE DO PARÁ**

**ABSTRACT**

Populations of rosewood, collected in protected areas in Western Pará, Brazil, were investigated for chemical variability and antibacterial activity. Essential oils (EOs) and metabolic profile of the investigated specimens differed chemically between locations (FLONA and RESEX). Main differences were highest yield (2.05%) and linalool content (83.5%) in EO of the FLONA when compared with RESEX, 0.85 and 39.6% respectively. The EO of the RESEX showed presence of  $\alpha$ -phellandrene (22.8%) that was not found in FLONA. In both locations, the EOs was active against microorganisms tested, except for *Pseudomonas aeruginosa*. The differences suggest the possibility that populations can be distinct species.

Keywords: Lauraceae; linalool; Amazon.

## INTRODUÇÃO

Espécies da família Lauraceae são muito utilizadas como matéria-prima para a indústria de perfumaria, cosméticos e materiais de higiene, com destaque para o gênero *Aniba*, que possui representantes popularmente conhecidos como louro e pau-rosa. Apesar do uso antigo do pau-rosa, que desde 1930 tem seu óleo essencial (OE) presente na composição do famoso perfume francês Chanel Nº 5, ainda é comum cometer equívocos com espécies que apresentam características morfológicas semelhantes<sup>1</sup>.

A dificuldade quanto à identificação de *Aniba rosaeodora* Ducke (1930) tem início já nos primeiros registros publicados por taxonomistas. Assim, o pau-rosa tem como sinonímia botânica *A. rosaeodora* Ducke var. *amazonica* Ducke (1930) e *A. duckei* Kostermans (1938), com variedades conhecidas como pau-rosa (Brasil), pau-rosa itaúba (Rio Solimões), bois de rose femelle (Guiana Francesa) e cara-cara (Guiana)<sup>2</sup>. Existem ainda, variações encontradas por produtores de acordo com a aparência e rendimento do OE, conhecidas como pau-rosa preciosa, pau-rosa tachi, pau-rosa itaúba e pau-rosa imbaúba<sup>3</sup>.

*Aniba rosaeodora* Ducke é comumente confundida com outras espécies do gênero *Aniba*, como por exemplo, com *A. parviflora* (Meissner) Mez sinonímia *A. fragrans* Ducke, conhecida popularmente como macacaporanga, devido às semelhanças morfológicas encontradas entre essas espécies na floresta<sup>1,4</sup>.

Considerando que *A. rosaeodora* é uma espécie de uso comercial, economicamente importante para a região amazônica, e atualmente ameaçada de extinção<sup>5</sup>, faz-se necessário um estudo intensivo desta espécie. Assim, um dos importantes aspectos deste trabalho, tendo em vista a exploração do OE, é a determinação da composição química e atividade microbiológica do OE de populações naturais, haja vista as atividades biológicas já descritas na literatura para o gênero *Aniba*<sup>6-11</sup>. E também, o reconhecimento de padrões de metabólitos secundários produzidos por essas populações já que há dificuldade em encontrar árvores

remanescentes e em reconhecer e separar morfológicamente representantes desta espécie. O nível dos metabólitos representa uma informação integrativa da função celular em nível molecular, definindo dessa forma, o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações ambientais ou genéticas<sup>12</sup>.

O metaboloma representa o conjunto de todos os metabólitos produzidos por um organismo em determinado nível de organização, como produto dos processos celulares<sup>13</sup>. Apesar das ferramentas metabolômicas ainda estarem em processo de desenvolvimento, estudos metabolômicos estão sendo aplicados com sucesso em diferentes objetivos tais como: identificar funções dos genes, descrever efeitos toxicológicos, auxiliar nas intervenções nutricionais e ambientais, e também, para construir bases de dados integrados de concentrações de metabólitos em diferentes populações e espécies, com importantes aplicações para a biotecnologia e medicina<sup>14</sup>.

Partindo do pressuposto de que o perfil metabólico pode contribuir para determinar a variabilidade existente no fenótipo de espécies de plantas e considerando a importância econômica do óleo essencial de *A. rosaeodora*, este trabalho teve como objetivo analisar a composição química e atividade antimicrobiana dos óleos voláteis e comparar o perfil metabólico dos extratos brutos de duas populações naturais indicadas como pau-rosa, com ocorrência em Unidades de Conservação localizadas no Oeste do Pará.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Área de estudo e material vegetal**

Os espécimes indicados como pau-rosa foram coletados em duas áreas de Unidades de Conservação localizadas no oeste do Pará: Floresta Nacional do Tapajós – FLONA, na Unidade de Produção Anual – UPA 5 do Plano de Manejo Florestal no quilômetro 83 da BR-163 (S 03°03'13,2''/ W 054°58'52,3'') e na Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns –

RESEX, comunidade do Santi (S 02°30'6,1"/ W 055°06'30,6"), figura 4 (material suplementar). O acesso às áreas de conservação foi autorizado através de cadastro no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob o nº 23293-3.

Na área da FLONA foram encontradas cinco árvores indicadas como pau-rosa, com diâmetro à altura do peito (DAP) na faixa de 27 a 45 cm. Na RESEX, foram encontradas 81 árvores também indicadas como pau-rosa, das quais 10 foram selecionadas para o estudo, com DAP variando de 20 a 35 cm. A posição de ocorrência das árvores foi determinada através de sistema GPS (*Global Positioning System*) seguida de identificação com placas de alumínio. A confirmação botânica de *A. rosaeodora* foi feita pelo Dr. João Batista Baitello e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário Dom Bento Pickel, do Instituto Florestal de São Paulo, sob o número de registro de 44874 a 44888.

Em ambas as localidades, amostras das árvores foram coletadas no período fértil, em abril de 2011, para extração do óleo essencial e preparo dos extratos. Nos dias das coletas, a média de temperatura e umidade relativa do ar (25 °C e 92% na FLONA e 24 °C e 92% na RESEX) foram medidas com termohigrômetro digital portátil, modelo ITHT 2220, marca Instrutemp. Para comparação do perfil metabólico entre os estágios de desenvolvimento da planta, duas mudas de cada localidade foram coletadas.

### **Coleta do solo**

Amostras de solo foram coletadas para verificar a disponibilidade de macro e micronutrientes nas duas áreas de estudo. O solo foi coletado em três pontos ao redor de cada árvore selecionada, a uma distância de dois metros do tronco, nas profundidades de 0 a 10 e de 10 a 20 cm. Sendo que na FLONA, as amostras de solo foram coletadas ao redor das cinco árvores, e na RESEX, ao redor de três árvores.

O material a ser analisado foi homogeneizado, limpo e seco à temperatura ambiente. A caracterização química foi determinada segundo metodologia adotada pela Embrapa, contida

no Manual e Métodos de Análise de Solo<sup>15</sup>. A interpretação dos dados foi feita de acordo com recomendações de adubação e calagem para o estado do Pará<sup>16</sup>.

### **Extração e rendimento do Óleo Essencial**

Amostras da parte aérea (folhas e galhos finos com aproximadamente 6 mm de diâmetro) foram trituradas com tesoura de poda e submetidas à hidrodestilação na proporção 1:10 (p:v) em aparelho tipo Clevenger<sup>17</sup>. O tempo de extração foi fixado em 180 min após a fervura, realizando-se três repetições extrativas para cada amostra. O OE obtido foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado em geladeira a 4°C. O cálculo de rendimento foi realizado através da relação do volume de óleo obtido, mensurado em proveta calibrada, com a massa seca do material vegetal<sup>18</sup>. A massa seca foi calculada em balança determinadora de umidade (modelo DHS-16 A da Celtac) em triplicata.

### **Identificação dos constituintes do óleo essencial**

A análise química dos OEs foi realizada mediante cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Amostras de OE diluído em metanol (1 mg/mL) foram injetadas em sistema de CG-EM modelo 6850 da Agilent Technologies, coluna capilar DB-5HT com medidas de 28,3 m x 320 µm x 0,10 µm, sendo utilizado hélio (He) como gás de arraste com fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 60 a 220 °C (isotérmico por 2 min), com rampa de 5 °C/min. A injeção tipo Split, razão 1:50, foi realizada com injetor a 250 °C num volume de 1 µL. A temperatura do detector foi de 230 °C e a da linha de transferência de 300 °C. A detecção foi feita por impacto de elétrons a 70 eV, com faixa de varredura de 20 a 500 m/z com 1,56 scans/s. Foram coinjetados padrões de hidrocarbonetos lineares para a determinação dos índices de retenção. Componentes individuais com área do pico  $\geq 0.5\%$  foram identificados através da comparação dos índices de retenção e dos espectros de massas com os da base de dados da biblioteca Nist versão 2.0 (2008) e da literatura<sup>19</sup>, através do software Enhanced ChemStation

(Agilent Technologies)<sup>20</sup>. A quantidade de cada componente foi expressa como porcentagem relativa da área total do cromatograma.

### **Preparação dos extratos brutos**

As partes a serem analisadas: folhas, galhos e cascas das árvores e também folhas, caule e raiz das mudas, foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 40 °C, seguida de trituração. Os extratos brutos de cada parte foram feitos em triplicata. Cada amostra foi preparada a partir de três extrações sucessivas com metanol na proporção 1:10 (p:v), à temperatura ambiente, em triturador rotativo (Ultra-Turrax T 25 basic IKA da Werke) por um minuto a 6.500 rpm. Os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador seguido de secagem.

### **Análise dos extratos por CLAE e por RMN <sup>1</sup>H**

Para análise do perfil metabólico dos extratos metanólicos foram utilizados dois métodos analíticos: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H). Para a análise por CLAE, as amostras foram dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/mL seguida de homogeneização e filtração (filtro de teflon 0,25 µm acoplado em seringa de vidro). Foi injetado 10 µL de cada amostra em equipamento UFLC, marca Shimadzu, com coluna C18 modelo Luna da Phenomenex, com medidas de 250 x 3 mm, apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm, injetor automático modelo SIL-20AHT, bomba modelo LC-20AD, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, forno da coluna modelo CTO-20A com temperatura máxima de 85 °C e análises realizadas a 30 °C. A interface de comunicação foi feita através de controlador modelo CBM-20A, acoplado a um computador com programa de integração LC-solution versão 1.21. A eluição gradiente de 45 minutos teve como fase móvel água (solvente da bomba A) e metanol (solvente da bomba B), variando-se o modificador orgânico de 20 a

100%, com vazão de 0,5 mL/min. O comprimento de onda utilizado pelo detector foi de 270 e 280 nm, com faixa de absorvância de 200 a 400 nm.

Para a análise através de RMN  $^1\text{H}$ , os extratos foram diluídos em clorofórmio e homogeneizados. A solução obtida foi filtrada e seca. As amostras foram preparadas com 12 mg do extrato dissolvido em 800  $\mu\text{L}$  de clorofórmio deuterado (99,8% Cambridge Isotopes Laboratories<sup>TM</sup>) contendo 0,05% de tetrametilsilano (TMS). A solução obtida foi filtrada e analisada em equipamento Bruker DPX 200 MHz, com sonda de 5 mm. Cada espectro foi adquirido através de 256 *scans*, pulso de 30 graus com tempo de 1,0 s e atraso de relaxamento de 2,0 s. O sinal foi convertido pela transformada de *Fourier* e os espectros foram integrados no programa MestreNova, versão 5.25<sup>21</sup>, com largura de 0,05 ppm, correspondentes à faixa de 0,5 a 10 ppm, usando TMS como padrão interno.

## **Ensaio antimicrobianos**

### *Microrganismos e condições de cultivo*

Os microorganismos utilizados foram bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231). As cepas, adquiridas comercialmente na forma liofilizada (CEFAR<sup>®</sup>), foram reativadas em Caldo Nutriente (Himedia) a 36 °C  $\pm$  1 por 24 h para bactérias e em Caldo Sabouraud (Himedia) a 30 °C  $\pm$  1 por 48 h para o fungo. As bactérias foram cultivadas em Agar Nutriente (Himedia) e o fungo em Agar Sabouraud Dextrose (Himedia) sob as mesmas condições de incubação utilizadas para reativar cada microorganismo. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro (BEL modelo 22ED) ao padrão de turbidez 0,5 da Escala McFarland, correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para bactérias e a  $2-5 \times 10^6$  UFC/mL para fungos<sup>22,23</sup>.

### *Método de disco difusão em Ágar*

O método de disco difusão em ágar<sup>24</sup> foi utilizado para determinar a atividade antimicrobiana do OE. Discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram individualmente impregnados com 10 µL de OE não diluído e colocados em placas de Petri inoculadas contendo Agar Mueller Hinton (Himedia) para bactérias, e Agar Sabouraud Dextrose para fungos, sob as mesmas condições de incubação já mencionadas anteriormente.

Os ensaios foram feitos em triplicata, usando como controle positivo os antibióticos ampicilina e gentamicina e o antimicótico fluconazol, obtidos na dose de 10 µg em discos comerciais da marca Cecon®. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com paquímetro digital (Digimess) e expressos em milímetros.

### *Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM)<sup>25</sup> de amostras com halo  $\geq 8$  mm. Os testes foram realizados em triplicata utilizando microplaca de 96 poços. Diluições em série de cada amostra de OE foram feitas com Tween 80 (Vetec) a 0,5% (v/v), obtendo-se concentrações que variaram de 0.07 a 10 µL/mL.

O inóculo, preparado com cepas de bactérias, foi ajustado ao padrão de turbidez 0,5 da Escala McFarland, e em seguida, submetido a diluições em série em solução salina estéril até atingir a concentração final de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL. Desta última diluição, feita em Caldo Muller Hinton, retirou-se 180 µL para adicionar em cada poço juntamente com 20 µL de OE nas diferentes concentrações. Controles positivo e negativo foram incluídos no teste, sendo: poços com ampicilina e gentamicina diluídas em solução salina estéril nas mesmas concentrações do OE; poços com o meio de cultura sem os microrganismos; poços com o meio de cultura inoculado e poços com o meio de cultura inoculado juntamente com 20 µL de Tween 80 a 0,5%. A incubação foi a  $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  por 24 h. Para análise do crescimento

bacteriano, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (Vetec) diluída em água destilada a 0,02% com reincubação por 3 horas.

A menor concentração de OE capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano foi indicada pela permanência da cor azul na cultura e a mudança para cor rosa indicou que a concentração não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias.

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), retirou-se 10  $\mu\text{L}$  dos poços com coloração azul para semear placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton (Himedia). Após incubação, a ausência de crescimento bacteriano, constatada visualmente, indicou qual a menor concentração de óleo essencial com função bactericida. Os testes foram realizados em triplicata.

### **Análise estatística**

Para avaliação dos dados referentes ao rendimento, composição química e atividade antimicrobiana do OE, os resultados foram expressos através da média ( $\bar{X}$ )  $\pm$  desvio padrão (DP). A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA e teste de Tukey usando o programa BioEstat 5.0<sup>26</sup>, considerando valores para  $p \leq 0,05$  significativos.

Para comparação da variabilidade química de *A. rosaeodora* entre as localidades, o método quimiométrico utilizado foi a Análise dos Componentes Principais (PCA), processado através do programa The Unscrambler versão 10.1<sup>27</sup>, com tratamento dos dados no Excel versão 2007. Esta análise, no caso do OE, foi baseada na CG a partir da extração dos dados da área dos picos num tempo de retenção variando de 2 a 34 min. Na CLAE, os dados utilizados foram os da absorvância de cada constituinte num tempo de retenção de 6 s a 45 min e, na RMN <sup>1</sup>H, foi a partir da intensidade do sinal na faixa de 0,5 a 10 ppm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Rendimento e composição química do OE

O rendimento médio do OE coletado da FLONA foi cerca de duas vezes maior que o da RESEX, tabela 1. Maia e colaboradores<sup>3</sup> em estudo sazonal de pau-rosa, coletado em Belém-PA, encontraram uma variação anual de 1,6 a 2,2% para o OE obtido de folhas, sendo que no mês de abril esse rendimento foi de 2,0%. Conforme observado na tabela 1, o rendimento médio dos OEs foi de 2,05% para o OE da FLONA e de 0,85% para o da RESEX.

No estudo de rebrotas de pau-rosa, em plantio de cinco anos, o rendimento do OE foi de 2,24% para galhos e de 3,37% para folhas<sup>28</sup>, indicando uma variação no rendimento de acordo com a parte da árvore utilizada. Além disso, variações no rendimento podem ocorrer devido a outros fatores como local, período vegetativo e desenvolvimento da planta.

Os resultados da análise qualitativa e quantitativa do OE obtida por CG-EM estão apresentados nas tabelas 2 e 3 e na figura 5. Foram identificados em torno de 95% dos constituintes químicos presentes nos OEs da FLONA e da RESEX, sendo caracterizados pela predominância de mono e sesquiterpenos.

O OE de *A. rosaeodora* coletada na FLONA teve como componente majoritário o linalol, com 83,5%, enquanto que o OE da RESEX apresentou 39,6% deste constituinte. Outra diferença significativa encontrada entre as populações de pau-rosa foi a presença de um segundo componente majoritário no OE da RESEX, o  $\alpha$ -felandreno com 22,8%, sendo este inexistente no OE da FLONA.

A ausência de  $\alpha$ -felandreno foi relatada em outros estudos com *A. rosaeodora*<sup>3,29,30</sup> e a presença desta substância foi constatada em diferentes espécies de Lauraceae, como por exemplo, em *Aniba parviflora*, sinônimo *A. fragrans*, na qual o OE extraído de folhas e galhos finos apresentou 7,98% deste componente<sup>31</sup>, e também, em *Licaria martiniana* com presença de 3,6% em folhas e 4,7% em caules<sup>30</sup> e como um dos componentes majoritários de

*A. terminalis* Ducke (32,8%) juntamente com linalol (21,7%) e *p*-cimeno (16,7%), sendo considerado o quimiotipo B de *A. terminalis* Ducke<sup>32</sup>.

Assim, o OE da FLONA constitui-se principalmente de monoterpenos oxigenados (87%) enquanto que o da RESEX divide-se entre monoterpenos oxigenados (41,31%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (43,16%). Os dados obtidos para o OE da FLONA podem ser equiparados a outros já descritos na literatura, em que o OE de *A. rosaeodora* contém 0,1% de hidrocarbonetos monoterpênicos e 89,3% de monoterpenos oxigenados<sup>30</sup>.

Em ambas as populações, manteve-se baixa a quantidade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, variando de 0 a 1,8% na FLONA e de 0,5 a 6,9% na RESEX, assim como de sesquiterpenos oxigenados, que foi de 4,2 a 9,3% na FLONA e de 4,1 a 12,3% na RESEX. Estudos também confirmam a baixa concentração de sesquiterpenos no OE de *A. rosaeodora*<sup>3,30,33</sup>.

Assim, quanto ao rendimento e composição química dos OEs obtidos dos espécimes coletados nas duas localidades, houve diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) tabelas 1, 2, 3 e figura 5. Embora a identificação botânica tenha sido a mesma para os exemplares coletados na FLONA e na RESEX, os dados químicos apontam que a identificação das populações deve ser melhor investigada.

Outro fato importante que cabe ressaltar refere-se a características organolépticas do OE, como cor e cheiro, as quais apresentaram diferenças notórias durante as extrações e análise sensorial. A coloração do OE da FLONA apresentou-se incolor, enquanto que o da RESEX apresentou-se amarelo para todas as amostras (Figura 6).

### **Análise dos Componentes Principais – PCA**

As diferenças químicas encontradas entre o OE da FLONA e o da RESEX foram também confirmadas através da Análise dos Componentes Principais (Figura 1). O gráfico de *scores* revela uma notável separação entre as populações e o de *loadings* mostra que as

substâncias que mais contribuíram para esta separação foram o linalol, o  $\alpha$ -felandreno e o *p*-cimeno.

Os extratos metanólicos analisados através de RMN  $^1\text{H}$  também apresentaram padrão de metabólitos distinto entre as populações (Figura 2A). Ao comparar separadamente cada parte da árvore, observa-se que as diferenças entre FLONA e RESEX foram mantidas, permanecendo a formação de dois grupos distintos, como pode ser observado para a casca na figura 2B. Entretanto, dentro da mesma população, não foi observado agrupamento de cada parte da árvore, mostrando que o perfil químico não sofre variação significativa entre folhas, galhos e casca (Figura 7).

A CLAE não se mostrou um método adequado para a obtenção de padrões quando se tem um grande volume de dados, entretanto, para as amostras de mudas, com quantidade de amostras reduzida, o uso deste método foi eficiente (Figura 3A). Uma alternativa para melhorar a reprodutibilidade deste método seria associá-lo à espectrometria de massas, o que facilitaria posteriormente a identificação das substâncias<sup>34</sup>.

De acordo com a figura 3A, a divergência na produção de metabólitos surge desde a fase jovem da planta. No entanto, percebe-se na figura 3B que não há uma nítida separação quando se compara todas as amostras referentes ao estágio de desenvolvimento da planta – fase jovem (mudas) e fase adulta (árvores). Um motivo provável pode ser devido a pouca quantidade de amostras de mudas quando comparada a de árvores.

A partir dos dados da análise de solo (Tabela 5 do material suplementar), e também, de umidade e temperatura durante as coletas, não foi observado diferenças significativas entre as localidades, não sendo possível, portanto, associar esses fatores ambientais às variações químicas entre as populações. Uma possibilidade para tais diferenças seria sugerir que as populações estudadas tratam-se de espécies distintas, embora tenham sido identificadas botanicamente como *A. rosaeodora* Ducke.

### Atividade antimicrobiana do OE

Os diâmetros de zonas de inibição de crescimento microbiano, CIM e CBM do óleo essencial dos espécimes coletados na FLONA e RESEX estão sumarizados na tabela 4. Ambos os óleos tiveram ação frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os diâmetros de halos de inibição variaram de 9,08 a >40 mm, sendo o menor halo de inibição observado para *E. faecalis* em ambos os OEs coletados na FLONA e RESEX. Por outro lado, os OEs não apresentaram ação contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), sendo, portanto, mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas já que tiveram ação contra todas as cepas Gram (+) ensaiadas.

O OE da FLONA foi mais ativo do que o OE da RESEX ( $p \leq 0,05$ ) frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*, inclusive quanto ao fungo *C. albicans* (Tabela 4). A eficácia do OE de *A. rosaeodora* frente a fungos deteriorantes de alimentos, fungos fitopatogênicos e fungos responsáveis por patologias em humanos já foi comprovada<sup>35</sup>.

Em relação à *S. aureus*, foram observados halos de inibição de 25,80 mm para o OE da FLONA e de 20,17 mm para o da RESEX. Quanto à cepa *S. epidermidis*, observou-se que a capacidade de inibição do OE da FLONA foi superior ao da ampicilina e não diferiu do halo observado para gentamicina. Enquanto que o OE da RESEX teve atividade inferior aos antibióticos padrões e ao OE da FLONA.

Observou-se ainda uma alta sensibilidade de *S. pyogenes* frente ao OE da FLONA e RESEX, com inibição superior a 40 mm. Esse resultado quando comparado ao controle realizado com gentamicina e ampicilina nos permite verificar a alta capacidade de inibição do crescimento de *S. pyogenes* pelos OEs brutos.

A eficácia do OE bruto de *A. rosaeodora* foi avaliada frente a bactérias<sup>36</sup>, bem como a eficácia das frações obtidas no processo de separação de compostos, sendo a fração linalol considerada a mais eficiente. Este constituinte, isolado do óleo de cítricos, exibiu propriedades antimicrobianas frente à *Shigella sonnei* e *Salmonella flexneri*<sup>37</sup>, demonstrando indícios de seu potencial como promissor agente antimicrobiano. Estes dados corroboram com a maior atividade observada neste trabalho para o OE da FLONA, o qual apresentou maior teor de linalol (Tabelas 2, 3 e 4).

Em outro estudo sobre o perfil antimicrobiano de *A. rosaeodora*, o efeito sinérgico entre o óleo essencial desta espécie, associado à gentamicina potencializou a eficácia do antibiótico padrão, provavelmente devido à presença dos terpenos álcoois linalol (60,1 %) e geraniol (7,8 %)<sup>38</sup>. Os terpenos têm a capacidade de romper e penetrar na estrutura lipídica da parede celular das bactérias, levando à desnaturação de proteínas e à desorganização da membrana celular, com o extravasamento do citoplasma e lise celular<sup>39</sup>.

A CIM do OE da FLONA foi de 10 µL/mL para *S. aureus* e *S. pyogenes*, e ficou acima de 10 µL/mL para as demais cepas sensíveis a esse óleo, não sendo, portanto, determinada. Por outro lado, o OE da RESEX apresentou CIM de 10 µL/mL para *S. epidermidis* e *S. pyogenes*, e ainda, o valor de 2,5 µL/mL para *E. faecalis*, indicando que algum dos constituintes do OE da RESEX, ou o sinergismo entre eles, seja responsável pela atividade biológica em uma menor concentração de OE frente a esta cepa (Tabela 4). Os dados da CIM nos permitem evitar interpretações errôneas que possam caracterizar como resistentes cepas de microrganismos sensíveis ao produto analisado caso venham a ser testadas concentrações inferiores.

De acordo com a CBM, o OE de ambas as localidades mostrou-se como agente bacteriostático, apenas inibindo o crescimento bacteriano.

## CONCLUSÃO

Os resultados da análise química e atividade microbiológica das populações coletadas na FLONA e RESEX diferem entre si. Levando-nos a sugerir que a espécie coletada na RESEX não seja *A. rosaeodora*, uma vez que, o perfil químico difere entre as localidades de coleta e entre o já descrito na literatura para a espécie. Por outro lado, as amostras obtidas na FLONA apresentaram características químicas semelhantes às descritas por vários autores para *A. rosaeodora*, indicando a importância do trabalho na seleção de matrizes para produção de mudas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq, FAPESPA e FAPESP pelo apoio financeiro, ao ICMBio e IBAMA pelo suporte para entrada nas Unidades de Conservação, à Associação dos Produtores Rurais Extrativistas da Margem Esquerda do Tapajós (APRUSPEBRAS) e à Cooperativa Mista da Flona do Tapajós (COOMFLONA) pelo apoio prestado durante as coletas, ao Dr. João Batista Baitello pela identificação botânica da espécie e ao Marcos Archilha da USP pelas análises RMN <sup>1</sup>H.

## REFERÊNCIAS

- (1) May, P. H.; Barata, L. E. S. *Economic Botany*. **2004**, *58*, 257.
- (2) Kubitzki, K.; Renner, S. *Flora Neotropica*. **1982**, *31*, 125.
- (3) Maia, J. G. S.; Andrade, E. H. A.; Couto, H. A. R.; da Silva, A. C. M.; Marx, F.; Henke, C. *Quim. Nova*. **2007**, *30*, 1906.
- (4) Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central*. Manaus: Inpa-DFID, **1999**. 816 p.
- (5) <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/33958/0>, acessada em Março 2010.
- (6) Almeida, R. N.; Machado Araújo, D. A.; Ramos Gonçalves, J. C.; Montenegro, F. C.; de Sousa, D. P.; Leite, J. R.; Mattei, R.; Campana Benedito, M. A.; Barbosa de Carvalho, J. G.; Cruz, J. S.; Soares Maia, J. G. *Journal of Ethnopharmacology*. **2009**, *124*, 440.
- (7) Goulart, E. G.; Jourdan, M. C.; Brazil, B. G.; Gilbert, B.; Lopes, J. N. C.; Sarti, S. J.; Vichnewsky, W.; Thames, A. W. *Rev Bras Farm*. **1975**, *56*, 15.
- (8) Melo, C. T. V.; Monteiro, A. P.; Leite, C. P.; de Araujo, F. L. O.; Lima, V. T. M.; Barbosa-Filho, J. M.; Fonteles, M. M. D.; de Vasconcelos, S. M. M.; Viana, G. S. D.; de Sousa, F. C. *F. Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, *29*, 451.

- (9) Maia, J. G. S.; Souza, P. J. C.; Fontes Junior, E. A.; Santos, A. M. S. In *XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina*. Rio de Janeiro, **2003**.
- (10) Souza, K. S.; Chaar, J. S.; Oliveira, K. M. T.; Gomes, E. O.; Portela, C. N.; Pohlit, A. M.; Quihnard, E. L. J.; Nunomura, S. M.; Tadei, W. P.; Mouchrek Filho, V. E.; Silva, D. D.; Galhiane, M. S.; Chierice, G. O. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **2007**, 7.
- (11) Barbosa, R. C. S. B. C.; Giesbrecht, A. M.; Barbosa-Filho, J. M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. *Acta Amaz.* **1988**, 18, 4.
- (12) Villas-Bôas, S. G.; Gombert, A. K. *Biotec. Ciência & Desenvolvimento*. **2006**, 9, 11.
- (13) Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W. B.; Harrigan, G. G.; Kell, D. B. *Trends in Biotechnology*. **2004**, 22, 245.
- (14) Watkins, S. M.; German, J. B. *Current Opinion in Biotechnology*. **2002**, 13, 512.
- (15) Embrapa. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. *Manual e métodos de análise de solo*; 2. ed. Embrapa – CNPS. Documentos, 1. Rio de Janeiro: Rev. atual, **1997**.
- (16) Cravo, M. S.; Viégas, I. J. M.; Brasil, E. C (Ed. Téc.). *Recomendações de Adução e Calagem para o Estado do Pará*. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, **2010**. 262 p.
- (17) Ming, L. C.; Figueiredo, R. O.; Machado, S. R.; Andrade, R. M. C. *Acta Horticulturae*. **1996**, 26, 5.
- (18) Santos, A. S.; Alves, S. M.; Figueirêdo, F. J. C.; Neto, O. G. R. *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório*; 1ª ed.; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Belém, **2004**.
- (19) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4ª ed.; USA: Allured Pub, **2007**. 804 p.
- (20) Stein, S.; Mirokhin, Y.; Tchekhovskoi, D.; Mallard, G.; 2ª ed, USA, **2008**.
- (21) Cobas, J. C.; Dominguez, S.; Larin, N.; Iglesias, I.; Geada, C.; Seoane, F.; Sordo, M.; Monje, P.; Fraga, S.; Cobas, R.; 5.2.5-4119 ed.; *Mestrelab Research S.L.*: **2008**.
- (22) NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2ª ed.; Norma aprovada (M27-A2), *NCCLS/CLSI*: Wayne: **2002**.
- (23) NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 9ª ed.; Norma aprovada (M2-A9). *NCCLS/CLSI*: Wayne: **2006**.
- (24) Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. *American Journal of Clinical Pathology*. **1966**, 45, 493.
- (25) NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 6ª ed; Norma aprovada (M7-A7), *NCCLS/CLSI*: Wayne: **2004**.
- (26) Ayres, M.; Ayres Junior, M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. S.; *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Ong Mamiraua. Belém-PA, **2007**.
- (27) CAMO software; 10.1 ed.; *CAMO software AS.*: Norway, 2009-2011.
- (28) Takeda, P. S.; *Dissertação de Mestrado*, INPA/UFAM, Brasil, **2008**.
- (29) Santana, A.; Ohashi, S.; Rosa, L.; Green, C. L. *The International Journal of Aromatherapy*. **1997**, 8, 5.
- (30) Alcântara, J. M.; Yamaguchi, K. K. d. L.; Veiga Junior, V. F. d.; Lima, E. S. *Quím. Nova*. **2010**, 33, 141.
- (31) Mattoso, E.; *Dissertação de Mestrado*, UNICAMP, **2005**.
- (32) Maia, J. G. S.; Andrade, E. H. A. *Quím. Nova*. **2009**, 32, 595.
- (33) Zellner, B. D.; Lo Presti, M.; Barata, L. E. S.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. *Analytical Chemistry*. **2006**, 78, 883.
- (34) Yamaguchi, L. F.; Freitas, G. C.; Yoshida, N. C.; Silva, R. A.; Gaia, A. M.; Silva, A. M.; Scotti, M. T.; Emerenciano, V. d. P.; Guimaraes, E. F.; Floh, E. I. S.; Colombo, C. A.; Siqueira, W. J.; Kato, M. J. *J. Braz. Chem. Soc*. **2011**, 22, 2371.
- (35) Simic, A.; Sokovic, M. D.; Ristic, M.; Grujic-Jovanovic, S.; Vukojevic, J.; Marin, P. *D. Phytotherapy Research*. **2004**, 18, 713.
- (36) Lobato, A. M.; Ribeiro, A.; Pinheiro, M. F. S.; Maia, J. G. S. *Acta Amaz.* **1989**, 19, 9.
- (37) Bagamboula, C. F.; Uyttendaele, M.; Debevere, J. *Food Microbiology*. **2004**, 21, 33.
- (38) Rosato, A.; Piarulli, M.; Corbo, F.; Muraglia, M.; Carone, A.; Vitali, M. E.; Vitali, C. *Current Medicinal Chemistry*. **2010**, 17, 3289.
- (39) Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. *Journal of Applied Microbiology*. **2000**, 88, 308.

**Tabela 1:** Rendimento do óleo essencial de pau-rosa coletado na FLONA do Tapajós e na RESEX Tapajós-Arapiuns.

Número da árvore	Rendimento do Óleo essencial (%)*	
	FLONA	RESEX
1	2,35±0,14 <sup>a</sup>	1,06±0,08 <sup>b</sup>
2	1,86±0,11 <sup>a</sup>	0,64±0,14 <sup>b</sup>
3	1,91±0,12 <sup>a</sup>	0,79±0,13 <sup>b</sup>
4	2,25±0,12 <sup>a</sup>	0,96±0,12 <sup>b</sup>
5	1,87±0,11 <sup>a</sup>	0,80±0,13 <sup>b</sup>
6	-	0,89±0,14 <sup>b</sup>
7	-	0,98±0,00 <sup>b</sup>
8	-	0,91±0,14 <sup>b</sup>
9	-	0,86±0,06 <sup>b</sup>
10	-	0,64±0,14 <sup>b</sup>
<b>Média geral</b>	2,05±0,24 <sup>a</sup>	0,85±0,14 <sup>b</sup>

Nota: os valores estão expressos como média ± desvio padrão. \*Médias seguidas por letras diferentes entre as colunas indicam que há diferença no teste de Tukey para  $p \leq 0,01$ .

**Tabela 2:** Percentual dos constituintes químicos do óleo essencial das árvores de pau-rosa da FLONA do Tapajós.

Constituintes	TR (min)	Nº da árvore / DAP (cm)					$\bar{X}$
		1 / 45	2 / 43	3 / 27	4 / 35	5 / 37	
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>		-	-	-	-	<b>0,5</b>	<b>0,1</b>
D-Limoneno	3,96	-	-	-	-	0,5	0,1
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>86,6</b>	<b>87,8</b>	<b>83,3</b>	<b>86,6</b>	<b>90,5</b>	<b>87,0</b>
Cis-óxido de linalol	4,76	1,0	2,6	1,8	2,1	1,4	1,8
Trans-óxido de linalol	5,08	1,1	2,4	1,7	2,0	1,3	1,7
Linalol	5,37	84,5	82,8	79,8	82,5	87,8	83,5
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>		<b>1,6</b>	<b>0,5</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	-	<b>1,1</b>
$\beta$ -selineno	14,38	0,8	0,5	1,0	0,7	-	0,6
$\gamma$ -gurjuneno	14,61	0,8	-	0,8	0,7	-	0,4
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>4,2</b>	<b>6,4</b>	<b>9,3</b>	<b>5,5</b>	<b>5,3</b>	<b>6,1</b>
Espatulenol	16,45	1,4	3,3	0,7	0,6	1,9	1,6
Viridiflorol	18,12	-	-	0,8	0,5	-	0,3
Lanceol (cis)	18,57	-	-	1,0	0,6	-	0,3
Santalol, cis, $\alpha$ -	19,45	0,9	1,2	2,6	1,4	1,2	1,4
Óxido de aromadendreno-(1)	19,56	1,9	1,9	4,2	2,4	2,2	2,5
<b>Identificado</b>		<b>93,6</b>	<b>96</b>	<b>96,9</b>	<b>95</b>	<b>96,9</b>	
<b>ni</b>		<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>2,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0,6</b>	
<b>Área <math>\leq 0,5\%</math></b>		<b>6,4</b>	<b>4</b>	<b>3,1</b>	<b>5</b>	<b>3,1</b>	
<b>TOTAL</b>		<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

TR = tempo de retenção, DAP = diâmetro à altura do peito,  $\bar{X}$  = média, ni = não identificado. Nota: Os valores estão expressos em porcentagem.

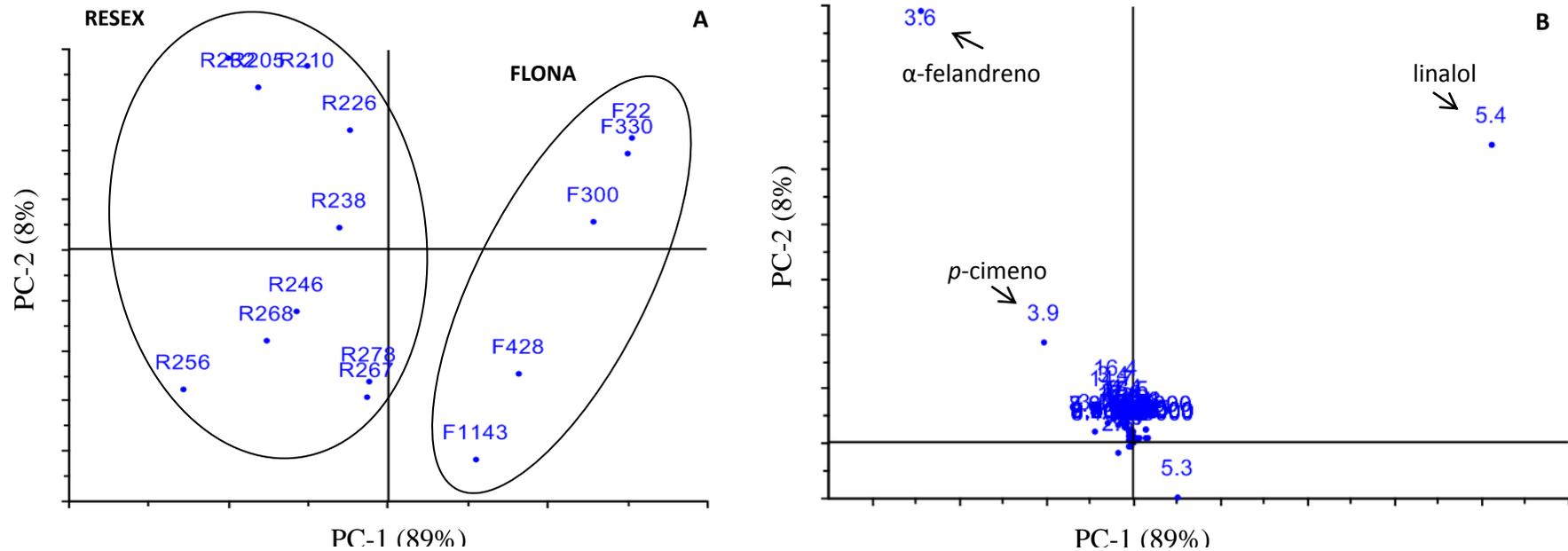
**Tabela 3:** Percentual dos constituintes químicos do óleo essencial das árvores de pau-rosa da RESEX Tapajós-Arapiuns.

Constituintes	TR (min)	Nº da árvore / DAP (cm)										$\bar{X}$
		1 / 20	2 / 22	3 / 21	4 / 20	5 / 27	6 / 27	7 / 24	8 / 28	9 / 28	10 / 35	
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>		<b>45,6</b>	<b>44,0</b>	<b>39,7</b>	<b>54,5</b>	<b>36,1</b>	<b>43,2</b>	<b>48,9</b>	<b>36,8</b>	<b>47,6</b>	<b>35,2</b>	<b>43,16</b>
$\alpha$ -pineno	2,64	1,1	-	1,9	2,2	1,1	2,6	2,5	4,3	1,3	-	1,70
$\beta$ -terpineno	3,16	0,5	-	1,0	1,2	0,7	1,4	1,2	2,5	-	-	0,85
$\beta$ -pineno	3,39	1,8	2,5	2,0	3,0	1,7	2,1	1,8	1,8	1,9	1,7	2,03
$\alpha$ -felandreno	3,55	26,0	24,6	22,1	30,5	21,6	24,1	31,1	10,7	26,9	10,6	22,80
<i>p</i> -cimeno	3,87	7,4	8,9	6,4	9,5	4,8	5,5	6,9	4,7	9,9	6,5	7,05
$\beta$ -tujeno	3,95	4,0	5,6	4,0	6,6	3,2	4,4	4,0	11,0	4,4	13,3	6,05
$\beta$ -ocimeno	4,35	4,3	2,4	2,3	1,5	3,0	3,1	1,4	1,8	2,6	2,6	2,50
Isoterpinoleno	5,09	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,5	0,16
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>33,3</b>	<b>40,3</b>	<b>47,2</b>	<b>32,2</b>	<b>47,9</b>	<b>43,4</b>	<b>23,5</b>	<b>51,6</b>	<b>40,8</b>	<b>52,9</b>	<b>41,31</b>
Linalol	5,37	30,5	39,0	46,2	29,7	46,0	42,1	22,0	49,3	39,8	51,4	39,60
$\alpha$ -terpineol	7,35	2,8	1,3	1,0	2,5	1,9	1,3	1,5	2,3	1,0	1,5	1,71
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>		<b>5,9</b>	<b>3,3</b>	<b>2,7</b>	<b>2,1</b>	<b>5,6</b>	<b>5,8</b>	<b>6,9</b>	<b>2,9</b>	<b>1,2</b>	<b>0,5</b>	<b>3,69</b>
$\gamma$ -Elemeno	14,65	5,9	3,3	2,7	2,1	5,1	5,3	6,9	1,7	1,2	0,5	3,47
$\gamma$ -gurjuneno	15,98	-	-	-	-	0,5	0,5	-	1,2	-	-	0,22
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>9,5</b>	<b>8,5</b>	<b>5,5</b>	<b>8,3</b>	<b>7,2</b>	<b>4,1</b>	<b>12,3</b>	<b>4,9</b>	<b>5,4</b>	<b>4,3</b>	<b>7,00</b>
Espatulanol	16,45	4,8	4,7	2,7	3,8	3,0	2,0	5,3	2,6	3,1	2,5	3,45
Viridiflorol	16,59	1,2	0,9	0,8	0,5	0,8	0,7	1,4	-	0,7	-	0,70
$\alpha$ -bisabolol	16,75	0,5	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	0,11
Guaiol	16,99	2,0	1,8	1,5	2,0	2,1	1,4	3,1	1,3	1,6	1,3	1,81
$\beta$ -eudesmol	18,02	-	-	-	0,6	0,5	-	-	-	-	-	0,11
$\alpha$ -eudesmol	18,11	0,5	0,5	0,5	0,6	-	-	0,7	0,5	-	-	0,33
Elemol	18,46	0,5	0,6	-	0,8	0,8	-	1,2	0,5	-	0,5	0,49

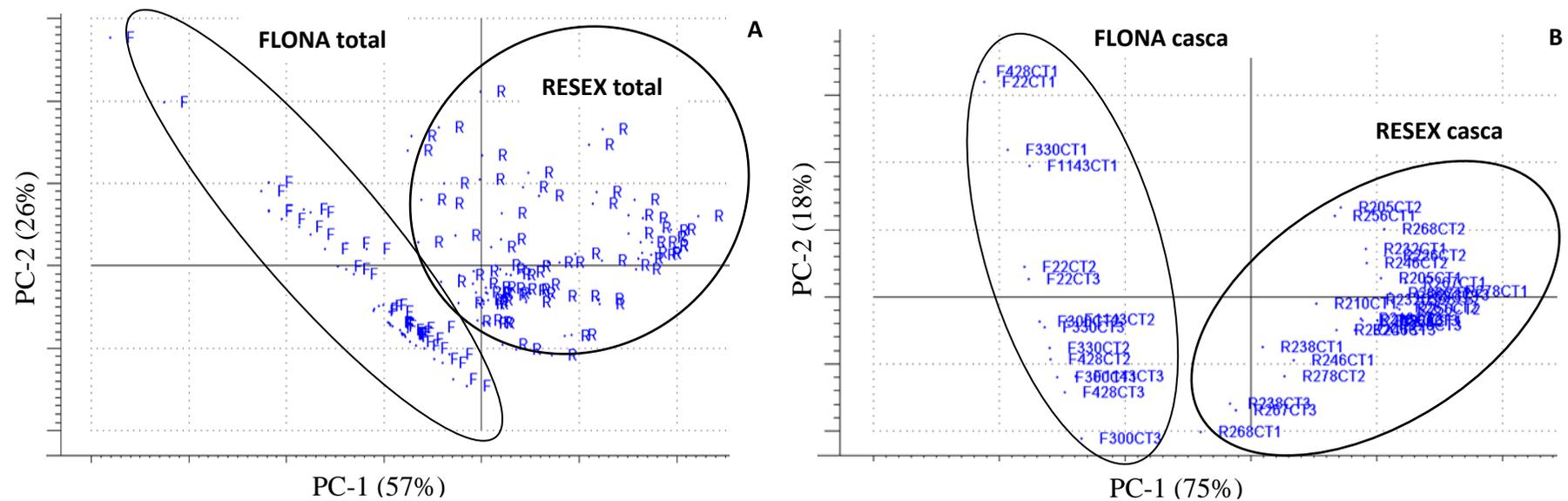
Tabela 3. Continuação

Constituintes	TR (min)	Nº da árvore / DAP (cm)										$\bar{X}$
		1 / 20	2 / 22	3 / 21	4 / 20	5 / 27	6 / 27	7 / 24	8 / 28	9 / 28	10 / 35	
<b>Identificado</b>		<b>94,9</b>	<b>96,7</b>	<b>95,1</b>	<b>97,6</b>	<b>96,8</b>	<b>97,9</b>	<b>92,2</b>	<b>96,2</b>	<b>96,5</b>	<b>93,4</b>	
<b>ni</b>		<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	-	<b>0,5</b>	-	<b>1,4</b>	<b>0,6</b>	-	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	
<b>Área ≤ 0,5%</b>		5,1	3,3	4,9	2,4	3,2	2,1	7,8	3,8	3,5	6,6	
<b>TOTAL</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

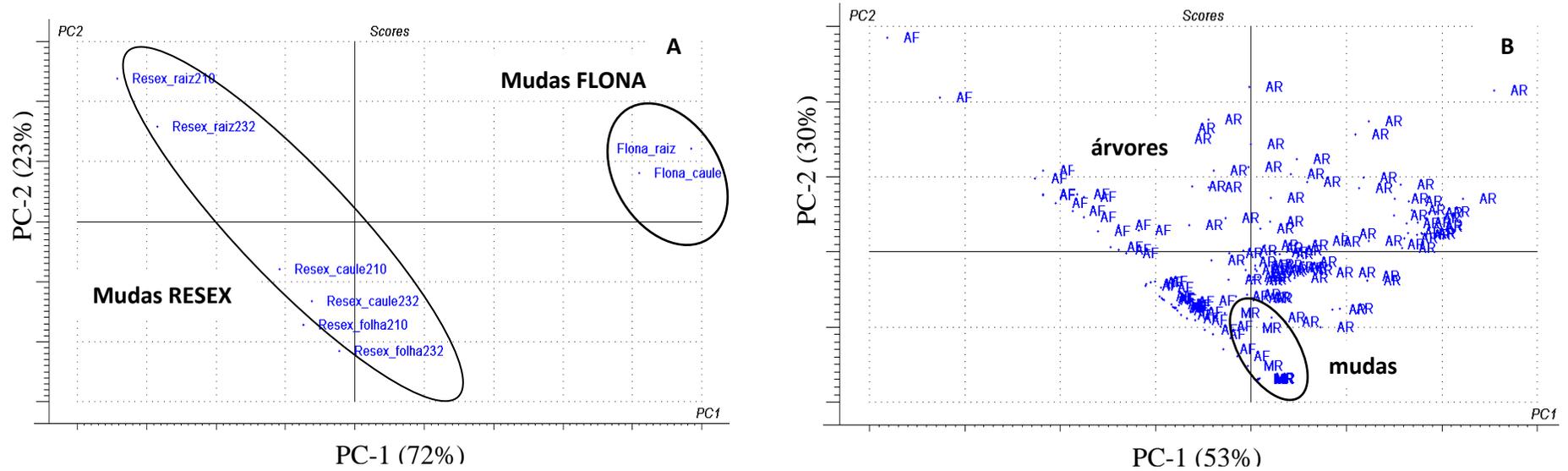
TR = tempo de retenção, DAP = diâmetro à altura do peito,  $\bar{X}$  = média, ni = não identificado. Nota: Os valores estão expressos em porcentagem.



**Figura 1:** PCA do óleo essencial de pau-rosa da FLONA e da RESEX. (A) gráfico de *scores* da variabilidade entre as populações. Nos códigos em azul os números indicam as árvores e as letras R e F significam RESEX e FLONA respectivamente; (B) gráfico de *loadings* indicando as substâncias responsáveis pela variação, as setas indicam o tempo de retenção.



**Figura 2:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa da FLONA e da RESEX a partir dos dados de RMN  $^1\text{H}$ . **(A)** gráfico de *scores* mostrando os agrupamentos formados devido à variabilidade de metabólitos entre as populações; **(B)** gráfico de *scores* mostrando a variabilidade entre as populações considerando somente os extratos preparados da casca das árvores. Nota: FLONA total = todas as amostras de folhas, cascas e galhos da FLONA; RESEX total = todas as amostras de folhas, cascas e galhos da RESEX. Nos códigos em azul F= FLONA e R= RESEX, a numeração representa as árvores e CT1, CT2 e CT3 as triplicatas dos extratos da casca.



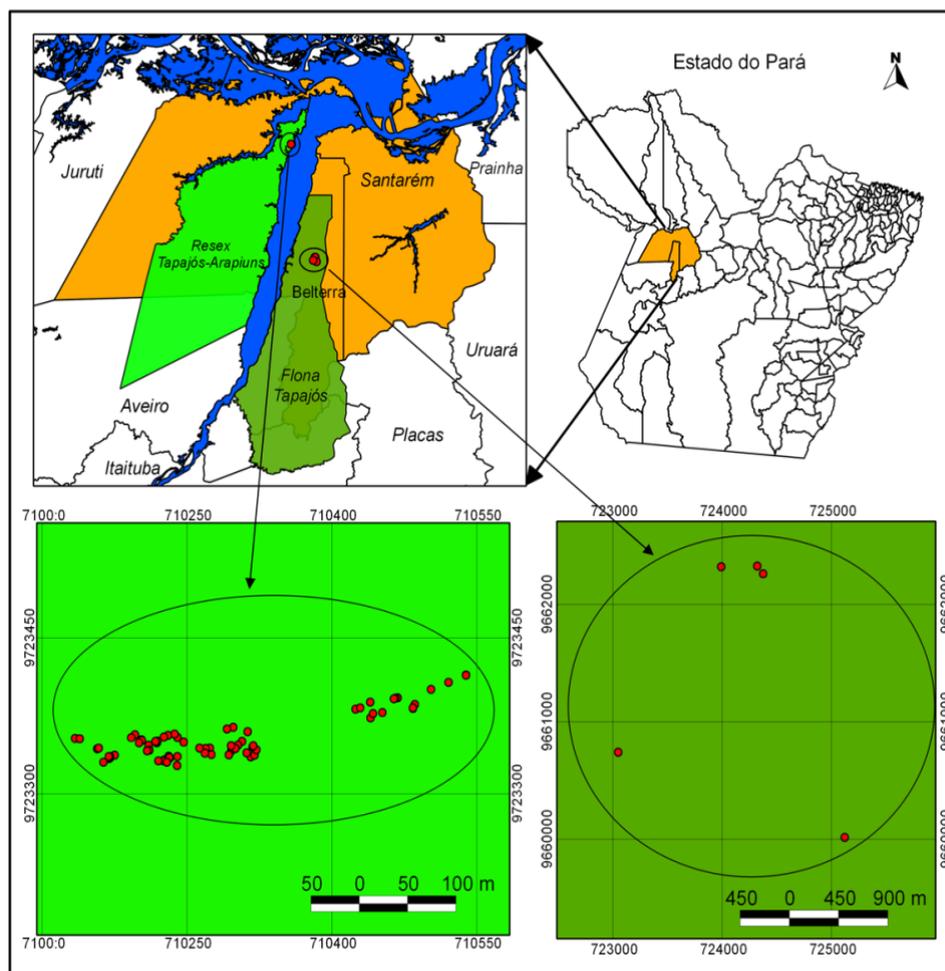
**Figura 3:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa da FLONA e da RESEX. **(A)** gráfico de *scores* mostrando os agrupamentos formados a partir das amostras de mudas analisadas por CLAE; **(B)** gráfico de *scores* indicando a variabilidade entre árvores e mudas através de análise RMN <sup>1</sup>H. Nota: AF= Árvore FLONA, AR= Árvore RESEX, MF= Muda FLONA e MR= Muda RESEX.

**Tabela 4:** Diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de pau-rosa extraído de folhas e ramos finos.

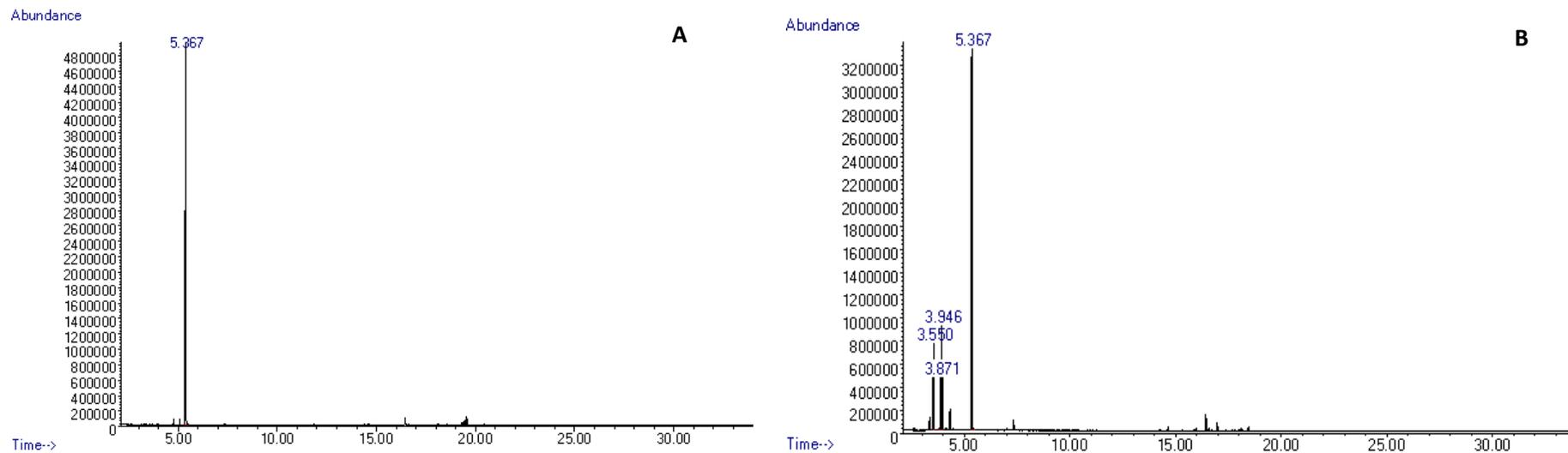
Microrganismos	Diâmetro do halo de inibição (mm)					CIM		CBM	
	Média ± Desvio padrão*					µL/mL		µL/mL	
	GEN 10 µg	AMP 10 µg	FLU 10 µg	Flona 10 µL	Resex 10 µL	Flona	Resex	Flona	Resex
(+) <i>S. aureus</i>	22,27±0 <sup>a</sup>	34,86±0,28 <sup>b</sup>	-	25,80±0 <sup>c</sup>	20,17±1,47 <sup>d</sup>	10	nd	nd	-
(+) <i>S. epidermidis</i>	25,43±0,1 <sup>a</sup>	20,65±0,1 <sup>b</sup>	-	24,92±0,05 <sup>a</sup>	14,12±0,56 <sup>c</sup>	nd	10	-	nd
(+) <i>E. faecalis</i>	14,23±0,37 <sup>a</sup>	23,39±0,6 <sup>b</sup>	-	9,18±0,2 <sup>c</sup>	9,08±0,09 <sup>c</sup>	nd	2,5	-	nd
(+) <i>S. pyogenes</i>	27,08±0,4 <sup>a</sup>	39,05±0,5 <sup>b</sup>	-	>40 <sup>c</sup>	>40 <sup>c</sup>	10	10	nd	nd
(-) <i>K. pneumoniae</i>	20,67±0 <sup>a</sup>	na <sup>b</sup>	-	17,87±0,92 <sup>c</sup>	12,40±0,14 <sup>d</sup>	nd	nd	-	-
(-) <i>P. aeruginosa</i>	21,37±0 <sup>a</sup>	na <sup>b</sup>	-	na <sup>b</sup>	na <sup>b</sup>	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	na <sup>a</sup>	28,68±1,52 <sup>b</sup>	16,06±0,16 <sup>c</sup>	nr	nr	nr	nr

GEN = Gentamicina, AMP = Ampicilina, FLU = Fluconazol, na = não ativo, nd = não determinado, nr = não realizado. \* Médias seguidas por letras diferentes entre as colunas indicam que há diferença no teste de Tukey para  $p \leq 0,05$ .

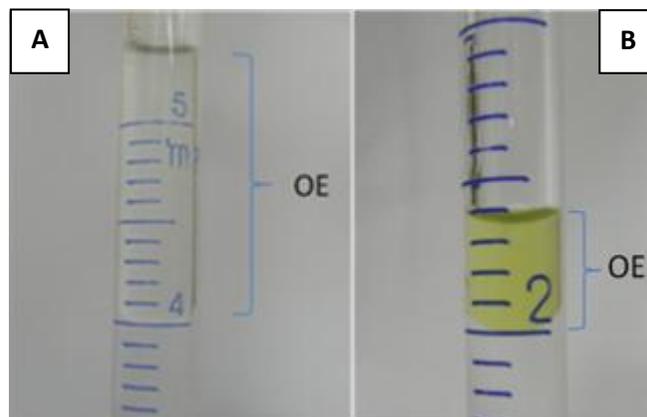
## MATERIAL SUPLEMENTAR



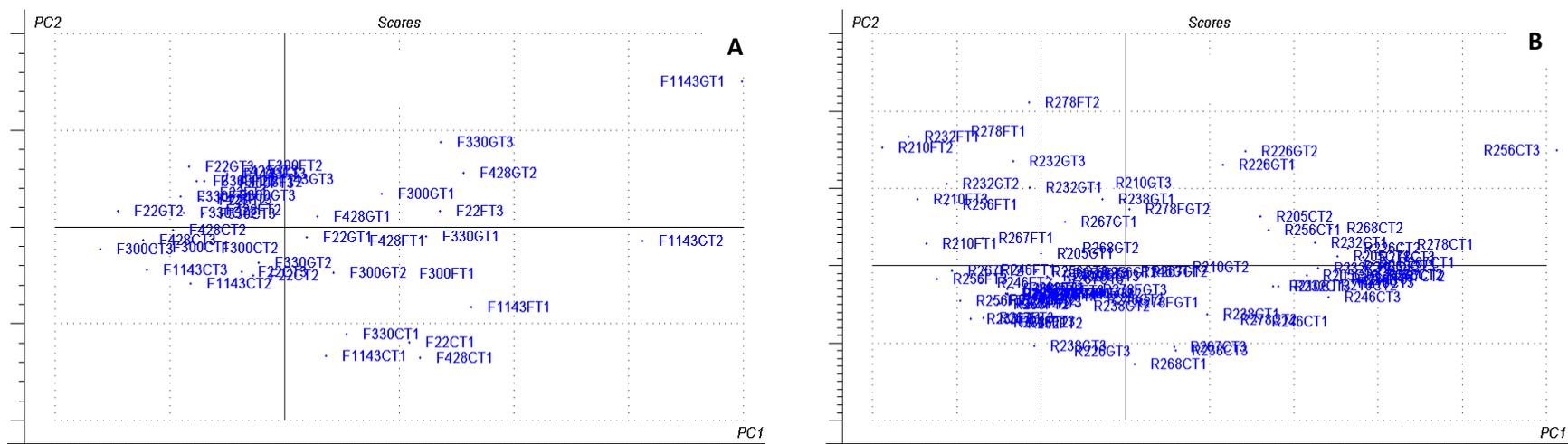
**Figura 4:** Localização dos espécimes de pau-rosa na área da FLONA do Tapajós e da RESEX Tapajós-Arapiuns.



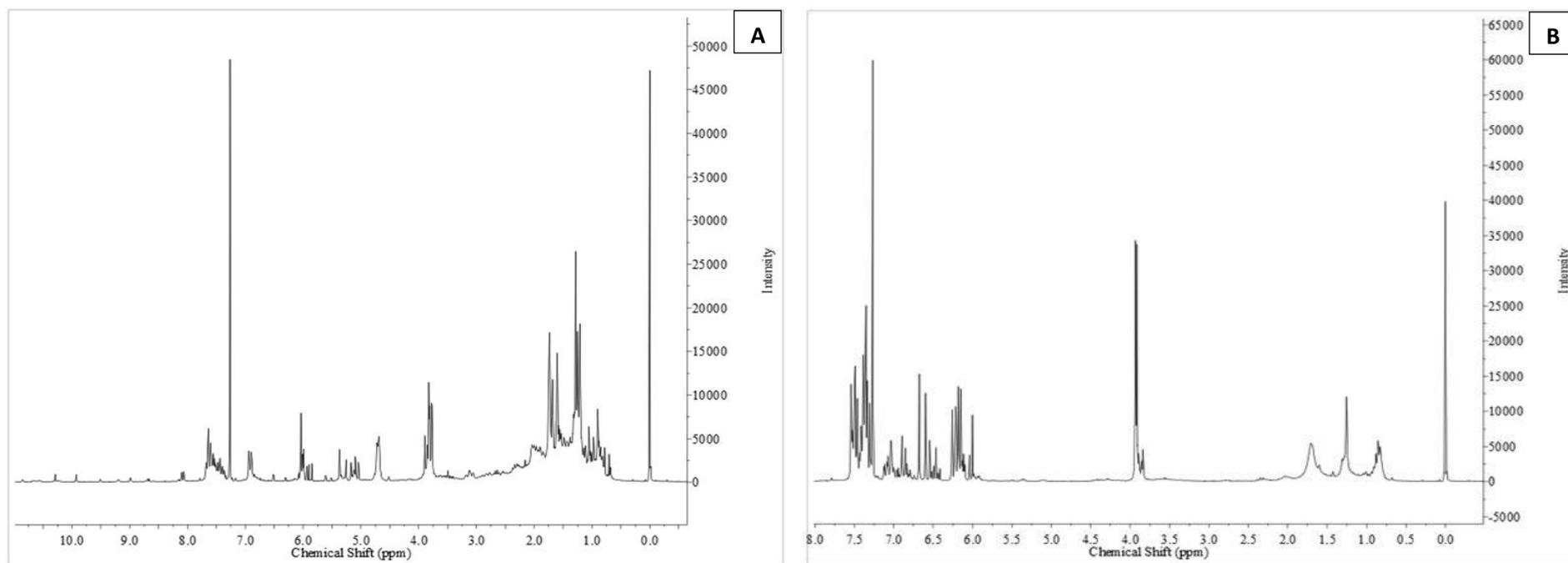
**Figura 5:** Cromatograma do óleo essencial de folhas e ramos de pau-rosa da FLONA Tapajós (A) e da RESEX Tapajós-Arapiuns (B).



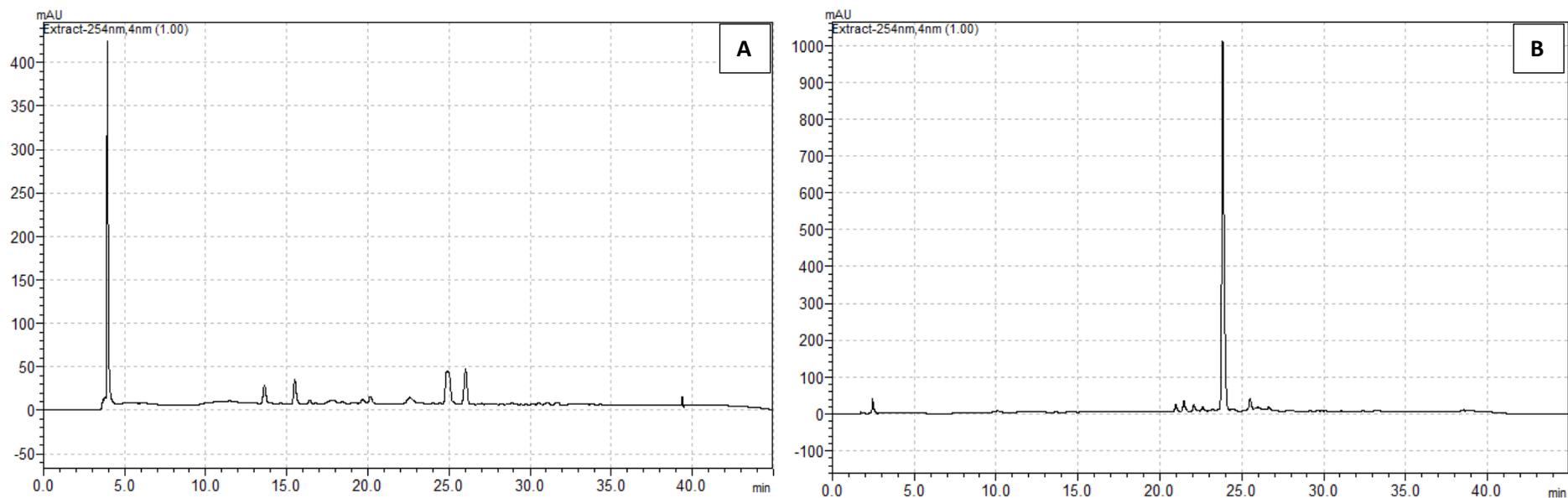
**Figura 6:** Coloração do óleo essencial (OE) da FLONA do Tapajós (A) e da RESEX Tapajós-Arapiuns (B).



**Figura 7:** PCA dos extratos brutos de pau-rosa obtidos de todas as partes da árvore através de análise em RMN  $^1\text{H}$ . (A) FLONA e (B) RESEX. Não houve formação de grupos, indicando que não há diferença significativa entre o padrão de metabólitos produzidos por cada parte da árvore. Nota: nos códigos em azul F= FLONA e R= RESEX, a numeração representa as árvores, CT1, CT2 e CT3 as triplicatas da casca, GT1, GT2 e GT3 as triplicatas de galhos e FT1, FT2 e FT3 as triplicatas de folhas.



**Figura 8:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos extratos brutos da casca de pau-rosa da FLONA (A) e da RESEX (B).



**Figura 9:** Cromatogramas dos extratos brutos de galhos de pau-rosa da FLONA (A) e da RESEX (B) analisados por CLAE.

**Tabela 5:** Interpretação dos resultados da análise de solo das áreas com ocorrência de pau-rosa na FLONA do Tapajós e na RESEX Tapajós-Arapiuns.

Amostra	Profundidade (cm)	PH da água	Disponibilidade dos nutrientes												
			Macronutrientes							m%	Micronutrientes				
			mg/dm <sup>3</sup>		cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>						mg/Kg				
			P	K	Ca	Ca + Mg	Mg	Al	CTC efetiva		Cu	Mn	Fe	Zn	
R267	0-10	4,4	média	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,9	86,2	média	baixa	alta	alta
	10-20	4,7	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,8	89,3	baixa	baixa	alta	alta
R226	0-10	4,3	alta	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,5	84,0	baixa	baixa	alta	alta
	10-20	4,6	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,4	83,3	média	baixa	alta	alta
R232	0-10	4,2	alta	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,6	80,8	alta	baixa	alta	alta
	10-20	4,4	alta	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,4	83,3	média	baixa	alta	alta
F1143	0-10	4,2	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,4	79,2	média	baixa	alta	alta
	10-20	4	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	3	80,0	alta	baixa	alta	média
F22	0-10	4,2	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	1,8	83,3	alta	baixa	alta	baixa
	10-20	4	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	1,7	82,4	alta	baixa	alta	média
F330	0-10	3,9	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	3,4	85,3	alta	baixa	alta	baixa
	10-20	4,2	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,3	87,0	alta	baixa	alta	média
F428	0-10	3,9	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,1	85,7	alta	baixa	alta	média
	10-20	4	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,2	81,8	alta	baixa	alta	média
F300	0-10	4,3	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	2,7	74,1	alta	baixa	alta	média
	10-20	4,2	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	3,3	63,6	alta	baixa	alta	média

CTC= Capacidade de Troca de Cátions, m%= porcentagem de saturação por alumínio. Nota: as amostras que começam com a letra R são da RESEX e com a letra F são da FLONA, a numeração subsequente indica o plaqueamento das árvores.

### 3. SÍNTESE INTEGRADORA

Esta pesquisa, a partir dos resultados obtidos, contribuirá para o uso sustentável das árvores de pau-rosa, as quais poderão ser selecionadas como matrizes para produção de mudas e possível geração de renda para os comunitários que residem naquelas Unidades de Conservação. A caracterização do perfil químico das populações foi importante para esclarecer dúvidas quanto às características do óleo essencial das árvores indicadas como pau-rosa nas áreas estudadas, considerando-se o valor econômico deste recurso.

Espécies de difícil identificação botânica, como é o caso de *Aniba rosaeodora*, precisam ser investigadas através de outros caracteres além dos morfológicos, usando outras ferramentas metodológicas. Ribeiro e colaboradores (1999), afirmam que as espécies *A. panurensis*, *A. rosaeodora*, *A. parviflora* e *A. burchellii* representam um complexo e geralmente não podem ser diferenciadas vegetativamente ou com frutos, e mesmo com flores, é difícil a sua identificação. Ainda segundo estes autores, o material estéril dessas espécies, quando difícil de reconhecer, pode ser identificado como *Aniba panurensis sensu lato*.

Apesar das conclusões apresentadas aqui, este trabalho ainda não foi terminado. A etapa seguinte será a tentativa de isolamento das substâncias majoritárias presentes no extrato bruto. Além disso, um outro objetivo futuro, será a produção de informações genéticas destas populações para inserção em árvore filogenética juntamente com outras angiospermas basais, como por exemplo, espécies da família Piperaceae.

Este trabalho também mostra o potencial das árvores da RESEX como produtoras de óleo essencial, tendo em sua composição uma concentração significativa de linalol, e agindo como inibidor do crescimento microbiano, podendo ser utilizada, assim como as árvores da FLONA, como produto florestal não madeireiro.

Dessa forma, as informações contidas nesta dissertação têm relevância na medida em que poderão servir como base para futuros projetos e planos com o intuito de gerar benefícios socioeconômicos para as comunidades ali residentes e ao mesmo tempo garantir a conservação da espécie.

**ANEXO A:** Normas da Revista Química Nova. Disponível no site: <<http://www.scielo.br/revistas/qn/pinstruc.htm>>.

**GERAL** - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de QN. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de

cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

## Referências

### *Revistas:*

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

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

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

**Patentes:**

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

**Livros:**

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, 1988.

**Programas de computação (Softwares):**

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

**Teses:**

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

**Material apresentado em Congressos:**

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

**Páginas Internet:**

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

**Material não publicado:**

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto

aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** – A *QN* oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de *QN*.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx ou opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*