

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**ESTUDO COMPARATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES
DA FAMÍLIA MYRTACEAE ATRAVÉS DO PERFIL
CROMATOGRÁFICO, ANÁLISE MULTIVARIADA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS**

FRANCES REGIANE DOS SANTOS

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES
DA FAMÍLIA MYRTACEAE ATRAVÉS DO PERFIL
CROMATOGRÁFICO, ANÁLISE MULTIVARIADA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS**

FRANCES REGIANE DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora

Rosane Nora Castro

e Co-orientação do Professor

Raimundo Braz Filho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Setembro de 2016

547
S237e
T

Santos, Frances Regiane dos, 1963-
Estudo comparativo dos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae através do perfil cromatográfico, análise multivariada e atividades biológicas / Frances Regiane dos Santos - 2016.
115 f.: il.

Orientador: Rosane Nora Castro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.
Bibliografia: f. 101-115.

1. Química orgânica - Teses. 2. Essências e óleos essenciais - Teses. 3. Análise cromatográfica - Teses. 4. Cromatografia a gás - Teses. I. Castro, Rosane Nora, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FRANCES REGIANE DOS SANTOS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências, com área de concentração em Química Orgânica (Química de Produtos Naturais).

TESE APROVADA EM 19/09/2016

Prof. Dra Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ)
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho (DEQUIM-UFRRJ)
Co-Orientador

Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins (IPPN-UFRJ)

Prof. Fernando Cotinguiba da Silva (IPPN-UFRJ)

Prof. Maria do Carmo de Araújo Fernandes (PESAGRO-RJ)

Prof. Dr. Marco André Alves de Souza (DEQUIM-UFRRJ)

DEDICATÓRIA

A Deus, Ser Supremo, no comando de minha vida, que nunca me desamparou e que sempre está comigo, permitindo a realização de mais um sonho. A Ele ofereço todos os momentos de minha vida e a quem agradeço por me permitir viver, ter saúde, ter minha família, meus amigos e por me guiar nessa incrível jornada que é viver.

Dedico este trabalho ao meu pai Aparecido e minha mãe Izolina, responsáveis pelo meu crescimento moral, que tudo fizeram por mim ao longo da minha vida, pelas dificuldades passadas para fazerem de mim a pessoa que sou hoje, pelos ensinamentos de vida, por todo amor e dedicação, me incentivando e me ensinando a acreditar em meus sonhos. Espero poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Amo muito vocês!

A toda minha família que torcem e se orgulham de mim, em especial a minha irmã Elide, meu cunhado Marcos e meus sobrinhos Carol, Vinícius, Guga, Fábio e Alice, e ao meu Tio Carlos, por todas as orações que intencionam a mim e por toda torcida. Sei que todos me amam e querem o melhor para mim. Quero que saibam que vocês são e sempre serão pessoas importantes em minha vida. Obrigada Família! Amo muito todos vocês!

DEDICATÓRIA

À razão de minha vida, Pedro Henrique.

Meu filho, companheiro, amigo e uma prenda preciosa que Deus colocou aos meus cuidados para que eu conhecesse o real significado de amor verdadeiro e incondicional.

Filho de minha vida

Filho de minha vida,
meu doce rebento.
Tantas noites de sono
sagrado, perdidas
a embalar-te.
No meu peito grudado,
Outras tantas.
Valeu a pena, filho querido;
Cada noite perdida.
E quase a vida, que se ia
no momento primeiro.
Tudo de novo faria.
Filho meu querido.
Tão lindo, tão preguiçoso.
Estudioso, namorador.
Fiel, apaixonado,
tão paquerado.
Meu tão exagerado,
bem dotado, honesto.
Um pouco revoltado,
meu doce ciumento filho
querido.
Eu tudo de novo faria.
Agradeço a Deus, todos os dias.
Meu nenê da mamãe,
homem forte, formado,
sarado, amado, abençoado.
Doce filho da minha vida.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Rosane Nora Castro, companheira de trabalho, professora e amiga querida, agradeço pela dedicação que conduziu todos os momentos de orientação, sempre atenciosa, muito paciente, criteriosa e amiga. Pela troca de experiências, histórias, momentos de descontração, por me acalmar nos meus momentos de ansiedade e pela companhia e palavra amiga nos momentos difíceis. Obrigada por ser essa grande orientadora e pela grande amiga que ganhei de presente da vida, pela oportunidade, orientação e carinho. Grande profissional e um exemplo de dedicação. Muito obrigada.

Ao Prof. Raimundo Braz-Filho, que é um grande exemplo de profissionalismo, dedicação, disponibilidade, o que justifica ser tão admirado por todos os amigos e alunos. Obrigada pelos ensinamentos, orientação, incentivo e por confiar na minha capacidade.

À Dra. Sabrina R.F.Rezende, Prof.^a Débora D.R. de Lima, Prof. Cristiano J. Riger e Prof. Marco André A. de Souza, por possibilitarem a realização das atividades biológicas. Um agradecimento especial aos Profs. Cristiano e Marco André, pela disponibilidade, colaboração, paciência, dedicação e pelas valiosas sugestões e questionamentos nas discussões dos resultados das atividades biológicas.

À Prof.^a Denise Monte Braz e demais membros da equipe do Jardim Botânico da UFRRJ, pela identificação das espécies de Myrtaceae aqui estudadas, e pela disponibilidade e colaboração no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Para desenvolver este trabalho de forma satisfatória, não há dúvida de que muitas outras pessoas contribuíram de uma maneira valiosa para que eu atingisse o resultado almejado. A todos, de forma abrangente, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ainda aos meus amigos, que não nominarei sob pena de cometer alguma injustiça, pela torcida, apoio, incentivo, carinho e pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais. Obrigada, a todos, sinceramente.

À CAPES, CNPq e Faperj pelos auxílios concedidos.

Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente e basta só uma frase para eles renascem outra vez.

Chico Xavier

RESUMO

SANTOS, Frances Regiane. **Estudo comparativo dos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae através do perfil cromatográfico, análise multivariada e atividades biológicas.** 2016. 115p. Tese (Doutorado em Ciências – Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A família Myrtaceae compreende mais de 3.500 espécies, que estão amplamente distribuídas por todos os continentes (exceto Antártida). Este trabalho descreve a diversidade química e o potencial biológico dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas de espécies de Myrtaceae cultivadas no Jardim Botânico da UFRRJ. Seis espécies diferentes foram estudadas: *Eugenia uniflora* L.(pitangueira), *Eugenia brasiliensis* Lam (grumixameira), *Psidium cattleianum* Sabine (araçazeiro), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* (jameleiro) e *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (jambelero vermelho). Os seus óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e avaliados com o auxílio de análises cromatográficas (CG-DIC e CG-EM), quimiometria (utilizando Análise de Componentes Principais - ACP e Análise de Agrupamentos Hierárquicos – AAH) e através de atividades biológicas (larvicida, tripanocida, fungicida e antioxidante). O óleo essencial das espécies *E. uniflora* L, *E. brasiliensis* *P.cattleianum* e *P. guajava* apresentou, principalmente, sesquiterpenos em sua composição, enquanto o óleo de *S. cumini* foi rico em monoterpenos e o de *S. malaccense* apresentou constituintes químicos não oriundos de metabólitos do isopreno. Os resultados obtidos através da quantificação e identificação química dos óleos essenciais por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) aplicadas às análises quimiométricas permitiu discriminar três agrupamentos de óleos essenciais, de acordo com a similaridade na composição de constituintes voláteis para cada espécie. Especificamente para *P. cattleianum* e *P. guajava* os constituintes β -cariofileno e α -humuleno foram considerados os marcadores do gênero *Psidium*. Para os ensaios biológicos realizados, os resultados obtidos com os óleos essenciais das espécies estudadas mostraram-se eficazes quanto à atividade larvicida e fungicida. O óleo essencial de *E. uniflora* e o furanodieno isolado apresentaram atividade antioxidante pelo método TBARS, e também apresentaram potencial atividade tripanocida, sugerindo que ambos sejam uma alternativa interessante para combater doenças parasitárias como a doença de Chagas.

Palavras-chave: Óleos essenciais, CG-EM, Quimiometria, atividade tripanocida.

ABSTRACT

SANTOS, Frances Regiane. **Estudo comparativo dos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae através do perfil cromatográfico, análise multivariada e atividades biológicas.** 2016.115p. Tese (Doutorado em Ciências- Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The Myrtaceae family comprises more than 3,500 species, which are widely distributed on all continents (except Antarctica). The chemical diversity and the biological potential of essential oils extracted from fresh leaves of Myrtaceae species cultivated in the Botanical Garden of UFRRJ were described. Six different species were studied: *Eugenia uniflora* L. (“pitanga”), *Eugenia brasiliensis* L. (“grumixama”), *Psidium cattleianum* Sabine (“araçá”), *Psidium guajava* L. (“goiaba”), *Syzygium cumini* (“jamelão”) and *Syzygium malaccense* (L.) (“jambo”). Chemical, statistical and biological methods were used, with the aid of chromatographic analysis (GC-FID and GC-MS), chemometrics (PCA and HCA statistical analysis) and biological activities (larvicide, trypanocidal, fungicidal and antioxidant) to determine these essential oils. The essential oil of species *E. uniflora* L, *E. brasiliensis*, *P.cattleianum* and *P. guajava* showed mainly sesquiterpenes in its compositions, while the oil from *S. cumini* was rich in monoterpenes and *S. malaccense* presented, mostly, chemical constituents not derived isoprene metabolites.. The chemometric analysis of GC-MS data of the oils extracted from leaves of six species, discriminated three groups of essential oils, according to the similarity of the composition of volatile components for each species. Specifically, for the *P.cattleianum* and *P. guajava* data, the β -caryophyllene and α -humuleno constituents could be considered markers of *Psidium* genus. The biological results suggested that the essential oils of the species studied were effective as they showed larvicide and fungicidal activity . The essential oil of *E. uniflora* and its isolated furanodiene showed antioxidant activity, with the TBARS method, and also showed potential anti-*Trypanosoma cruzi* activity, which suggests that both are an interesting alternative to combat infectious diseases such as Chagas disease.

Key words: Essencial oils, GC-MS, Chemometrics, trypanocidal activity

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplar e folhas da espécie <i>E. uniflora</i> localizada em Seropédica	4
Figura 2. Folhas do exemplar <i>Eugenia brasiliensis</i> L. (Jd. Botânico da UFRRJ)	6
Figura 3. Exemplar e folhas de <i>Psidium cattleianum</i> Sabine (Jd. Botânico da UFRRJ).....	7
Figura 4. Exemplar e folhas de <i>Psidium guajava</i> L. (Jd. Botânico da UFRRJ)	8
Figura 5. Exemplar e folhas da espécie <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels (Jd. Botânico da UFRRJ)	9
Figura 6. Exemplar e folhas de <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L. M. Perry – Jambo vermelho (Jd.Botânico da UFRRJ) (Foto: Ricardo Alves-Silva).	10
Figura 7. Principais fatores que podem influenciar as características dos metabólitos secundários em plantas (adaptado de GOBBO-NETO & LOPES, 2007).....	12
Figura 8. Exemplos de algumas das substâncias presentes em óleos essenciais	13
Figura 9. Estruturas do isopreno e do isopentano (unidade básica de cinco átomos de carbono encontrada nos terpenoides) (adaptado de DEWICK, 2002).	14
Figura 10. Exemplos de estruturas de terpenoides com visualização do arranjo das unidades de isopreno (adaptado de DEWICK, 2002).....	14
Figura 11. Esquema simplificado da rota biossintética das unidades isoprenoides precursoras dos terpenoides (adaptado BARTRAM <i>et al</i> , 2006).	15
Figura 12. Conversão do IPP no DMAPP, em presença da IPP-isomerase (adaptado de CAREY & GIULIANO, 2014).....	16
Figura 13. Esquema simplificado da biossíntese dos mono e sesquiterpenos (adaptado de CROTEAU <i>et al</i> , 2000).	16
Figura 14. Rota biossintética para formação de derivados fenilpropanoides (adaptado de SIMÕES & SPTIZER, 2003).	17
Figura 15. Via de formação do malondialdeído a partir do radical peroxila de ácido graxo tri-insaturado C18 (a), e a formação do cromóforo TBA a partir de TBA e malondialdeído (b) (adaptado de LAGUERRE <i>et al</i> , 2007).....	24
Figura 16. Estrutura molecular do benzonidazol	28
Figura 17. Esquema ilustrativo de gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> (adaptado de BOFFO, 2009)	34
Figura 18. Esquema ilustrativo de classificação por Análise de Agrupamentos Hierárquicos.	35

Figura 19. Coloração das folhas frescas de <i>E.uniflora</i> : (a) folhas maduras e (b) folhas jovens	36
Figura 20. Perfil cromatográfico dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae	46
Figura 21. Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas maduras (a) e jovens (b) de <i>E. uniflora</i>	47
Figura 22. Estruturas das principais substâncias presentes no óleo essencial de <i>E.uniflora</i> .	49
Figura 23. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de <i>E. brasiliensis</i>	52
Figura 24. Estruturas das substâncias majoritárias do óleo essencial de <i>P.cattleianum</i>	54
Figura 25. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de <i>P.guajava</i>	56
Figura 26. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de <i>S.cumini</i>	58
Figura 27. Constituintes majoritários do óleo essencial de <i>S.malaccense</i> do Jd.Botânico da UFRRJ.....	60
Figura 28. Gráfico de scores de CP1 x CP2 obtido a partir dos dados de CG-EM das cinco amostras de óleos essenciais de folhas jovens (FJ) e cinco de folhas maduras (FM) de <i>Eugenia Uniflora</i> L.	62
Figura 29. Gráfico de “loadings” dos CP1 x CP2 aplicados à ACP para os dados CG-EM dos óleos essenciais de folhas jovens (FJ) e maduras (FM) de <i>Eugenia uniflora</i> L. Numeração utilizada no gráfico está descrita na tabela 2.	62
Figura 30. Gráfico de <i>scores</i> -3D (CP1xCP2xCP3) das 6 espécies de Myrtaceae	63
Figura 31. Dendograma obtido a partir dos dados de CG-EM dos óleos extraídos das folhas das 6 espécies em estudo.....	64
Figura 32. Gráfico de “loadings” dos CP1 x CP2 aplicados à ACP para os dados CG-EM dos óleos essenciais de folhas das espécies em estudo.	64
Figura 33. Bi-plot de ACP para <i>scores</i> (●) e <i>loadings</i> (●)	65
Figura 34. Rearranjo térmico do furanodieno (a) e da germacrona (b).....	66
Figura 35. Análise por CLAE-DAD em fase reversa: Cromatogramas da (a) germacrona, (b) curzereno e (c) furanodieno (condições descritas no item 5.5).	67
Figura 36. Cromatograma de íons totais e espectro de massa do furanodieno (3, A-b) e seu produto de rearranjo curzereno (2, A-a) (condições descritas no item 5.3)	68
Figura 37. Cromatograma de íons totais e espectro de massa da germacrona (1, B-b) e seu produto de rearranjo β-elemenona (4, B-a) (condições descritas no item 5.3).....	69
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, acetona-d ₆) da germacrona 1	73

Figura 39. Espectro de RMN ^1H , ^1H COSY (500 x 500 MHz acetona- d_6) da germacrona 1.	74
Figura 40. Espectro de DEPTQ (125 MHz, acetona- d_6) da germacrona 1.....	75
Figura 41. Espectro de HMBC (interações ^3J) - RMN ^1H x ^{13}C (500 x 125 MHz acetona- d_6) da germacrona 1.	76
Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do curzereno 2.....	78
Figura 43. Espectro de DEPTQ (125 MHz,, CDCl_3) do curzereno 2	79
Figura 44. Espectro de COSY- RMN ^1H x ^1H (500 x 500 MHz, CDCl_3) do curzereno 2 ...	80
Figura 45. Espectro de HSQC-RMN ^1H x ^{13}C (500 x 125 MHz, CDCl_3) do curzereno 2 ...	81
Figura 46. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) do furanodieno 3.....	83
Figura 47. Espectro de COSY-RMN ^1H x ^1H (500 x 500 MHz acetona- d_6) do furanodieno 3	84
Figura 48. Espectro de HMBC (acoplamentos ^3J) - RMN ^1H x ^{13}C (500 x 125 MHz, CDCl_3) do furanodieno 3	85
Figura 49. Espectro de DEPTQ (125 MHz, acetona- d_6) do furanodieno 3.....	86
Figura 50. Gráficos da atividade larvicida do óleo essencial das espécies de Myrtaceae frente às larvas do <i>Aedes aegypti</i>	87
Figura 51. Tolerância celular da cepa de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 após a exposição aos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae, nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (a) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (b). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) do número de colônias transformado e porcentagem de sobrevivência em 1,2 e 24 h, de no mínimo 3 experimentos independentes. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle.	89
Figura 52. Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais frente o estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 . (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle.....	90
Figura 53. Desempenho dos óleos essenciais de Myrtaceae nos níveis de disfunção mitocondrial de células de <i>S. cerevisiae</i> calculados a partir dos resultados de viabilidade celular obtidos nos meios YPD e YPGly.	91
Figura 54. Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (pmolMDA/mg de células) em células de <i>S. cerevisiae</i> expostas ao H_2O_2 , e células expostas ao H_2O_2 após pré-incubação com óleo essencial de <i>E. uniflora</i> (O.E.Pitanga) e seu isolado furanodieno.	92
Figura 55. Avaliação da citotoxicidade de óleos essenciais de <i>P.cattleianum</i> (araçá), <i>E. uniflora</i> (pitanga) e <i>E. brasiliensis</i> (grumixama) em células totais de sangue periférico humano. Resultado representado em densidade óptica (A) e em porcentagem de células	

vivas (B). Resultado representativo de 6 experimentos independentes realizados em triplicata.....	93
Figura 56. Avaliação da atividade tripanocida dos óleos essenciais comparada ao potencial do benzonidazol (BZND).....	94
Figura 57. Formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> ($2,5 \times 10^5/\text{mL}$) de culturas tratadas com furanodieno em 6 concentrações.	95
Figura 58. Área e inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> submetido a tratamento com óleo essencial de 5 espécies de Myrtaceae. Letras iguais entre as linhas, resultado não significativo (Tukey 5%* e 0,1%***).	97

Lista de Tabelas

Tabela 1: Rendimento médios e classes de substâncias dos óleos essenciais em estudo	45
Tabela 2: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitangueira)	48
Tabela 3: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i> L. (Grumixameira).....	51
Tabela 4: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Psidium cattleianum</i> (Araçazeiro).	53
Tabela 5: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Psidium guajava</i> L. (goiabeira).....	55
Tabela 6: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Syzygium cumini</i> (jamelão).57	
Tabela 7: Comparação da composição química dos principais constituintes (%) do óleo essencial de <i>Syzygium cumini</i> (jamelão)	58
Tabela 8: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L. (jambeiro vermelho).....	59
Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da germacrona 1 (acetona- d_6) comparados com os relatados da literatura (TAKAHASHI et al, 1983)	72
Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do curzereno 2 (CDCl_3) comparados com os dados da literatura (YANG et al, 2011).....	77
Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do furanodieno 3 (acetona- d_6) comparados com dados da literatura (DEKEBO et al, 2001).....	82
Tabela 12: Valores das concentrações letais dos óleos essenciais em 24 h.....	88
Tabela 13: Formas epimastigotas presentes no meio após 7 dias de incubação com furanodieno em 6 concentrações.	95
Tabela 14: Área e inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> submetido a tratamento com óleo essencial de 5 espécies de Myrtaceae.....	96

Lista de esquemas

Esquema 1: Proposta de fragmentação para as substâncias 1 e 4 e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses. Estruturas ionizadas de 1 e 4 indicadas como 1A e 4A, respectivamente. Estruturas tautoméricas ionizadas de 1A descritas como 1B e 1C.....70

Esquema 2: Proposta de fragmentação para as substâncias 2 e 3 e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses. Estruturas ionizadas de 2 e 3 indicadas como 2A e 3A, respectivamente.....71

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAH: Análise de Agrupamento Hierárquico

ACP: Análise de Componentes Principais

BDA: Batata, Dextrose, Agar

BOD: Biological Oxygen Demand

CC: Cromatografia de Adsorção em gel de sílica, em coluna *flash*

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CG-DIC: Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Ionização de Chamas

CG-EM: Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodo

CL₅₀: Concentração Letal Média

CoASH: Coenzima A reduzida

COSY: Homonuclear Correlation SpectroscopY

DEPTQ: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMAPP: dimetilalil-pirofosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

Enz: Enzima

FJ: Folhas Jovens

FM: Folhas Maduras

HMBC: Heteronuclear MultipleBond Coherence

HSQC: Heteronuclear SingleQuantum Coherence

CI₅₀: Concentração de Inibição Média

IPP: Isopentenil-pirofosfato

ISO: International Organization for Standardization

MDA: Malondialdeído

CIM: Concentração Inibitória Mínima

m/z: Razão massa/carga

NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

RBE: Código Herbário Jardim Botânico

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

TBARS: Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

TMS: Tetrametilsilano

UFC: Unidade Formadora de Colônia

XTT: 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazólio-5-carboxanilida)

YPD: Yeast extract-Peptone-Dextrose medium

YPGly: Yeast extract-Peptone-Glycerol medium

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Família Myrtaceae	3
2.1.1. <i>Eugenia uniflora</i> L. – Pitangueira	4
2.1.2. <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam – Grumixameira	5
2.1.3. <i>Psidium cattleianum</i> Sabine - araçazeiro	6
2.1.4. <i>Psidium guajava</i> L. – goiabeira	7
2.1.5. <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels - Jamelão	8
2.1.6. <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L. M. Perry – Jambo vermelho	9
2.2. Óleos Essenciais	10
2.2.1 Biossíntese de voláteis e composição dos óleos essenciais	12
2.2.2 Métodos de extração de óleos essenciais	18
2.3. Potencial biológico dos óleos essenciais.....	19
2.3.1 Atividade larvicida frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i>	19
2.3.2. Capacidade Antioxidante	22
2.3.3. Atividade antiparasitária	27
2.3.4. Atividade antimicrobiana.....	29
2.4. Análise Multivariada	33
2.4.1. Métodos de Análise de Componentes Principais (ACP) e de Agrupamento Hierárquico (AAH)	33
3. OBJETIVO GERAL.....	35
3.1. Objetivos Específicos	35
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
4.1. Obtenção do material vegetal	35
4.2. Obtenção dos óleos essenciais	36
4.3. Análises da composição química dos óleos essenciais	37
4.4. Isolamento dos constituintes do óleo essencial das folhas de <i>Eugenia uniflora</i>.....	38

4.5. Análise por CLAE-DAD das substâncias isoladas do óleo de <i>E. uniflora</i>	39
4.6. Análise por Ressonância Magnética Nuclear.....	39
4.7. Tratamento estatístico dos dados de CG-EM.....	39
4.8. Atividade larvicida.....	40
4.9. Atividade antioxidante utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.10. Atividade antiparasitária.....	43
4.11. Atividade antifúngica.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. Extração dos óleos essenciais.....	45
5.2. Análise da composição química dos óleos essenciais.....	47
5.3. Tratamento estatístico dos resultados obtidos por CG-EM.....	61
5.3.1. Análise quimiométrica para os óleos essenciais das folhas de pitangueira.....	61
5.3.2. Análise quimiométrica para os óleos essenciais das Myrtaceae em estudo.....	63
5.4. Isolamento e caracterização dos constituintes do óleo essencial das folhas de <i>E. uniflora</i>	65
5.5. Atividade larvicida.....	87
5.6. Atividade Antioxidante dos óleos essenciais.....	89
5.7. Atividade tripanocida.....	92
5.8. Atividade antifúngica.....	96
6. CONCLUSÕES.....	99
7. BIBLIOGRAFIA.....	101

1. INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais está intimamente relacionada à biodiversidade, principalmente a vegetal. Neste contexto, o Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), produtoras de madeiras, celulose, fibras, alimentos, óleos vegetais e óleos essenciais, entre outros produtos naturais, sendo um valioso arsenal químico a ser estudado (CARNEIRO *et al*, 2014).

Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente, onde cerca de quatro mil espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.100 foram avaliadas em suas propriedades medicinais (CARNEIRO *et al*, 2014).

O interesse pelo estudo dos constituintes voláteis de plantas está baseado não somente na possibilidade de obtenção de compostos aromáticos, a partir dos óleos essenciais, na aplicação de produtos como perfume, fragrâncias e cosméticos, mas também daqueles possuidores de propriedades terapêuticas, ou como inseticidas, fungicidas, bactericidas, ou ainda, de compostos precursores de moléculas de alto valor agregado (OOTANI *et al*, 2013).

O Jardim Botânico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foi criado há três décadas, especialmente, para promover oportunidades nos setores de educação e pesquisa, onde existe uma coleção de famílias botânicas já identificadas e catalogadas (CYSNEIROS *et al*, 2011), das quais a família Myrtaceae foi escolhida para o presente estudo.

A família Myrtaceae (do grego *Myrtus* = perfume) é uma família botânica com cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, que se distribuem por todos os continentes (exceto Antártida). São plantas arbustivas ou arbóreas representadas nas Américas, principalmente, pelas plantas frutíferas. O gênero *Eugenia* constitui um dos maiores gêneros desta família, apresentando cerca de 1.115 espécies, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais das Américas. Grande parte destas espécies é usada na medicina popular e muitas já foram submetidas a estudos químicos, além de avaliações farmacológicas (SIANI *et al*, 2000).

Este trabalho descreve a diversidade química e o potencial biológico dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas de seis espécies de Myrtaceae cultivadas no Jardim Botânico da UFRRJ: *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), *Eugenia brasiliensis* Lam

(grumixameira), *Psidium cattleianum* Sabine (araçazeiro), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* (jameleiro) e *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (jambelão vermelho).

Devido à complexidade química na composição dos óleos essenciais, os métodos quimiométricos têm sido aplicados com sucesso aos dados analíticos para reduzir esta complexidade e evidenciar as informações mais relevantes, auxiliando tanto na identificação de variedades que apresentam diferenças na sua composição química quanto nos estudos de quimiotaxonomia. Neste contexto, as técnicas de estatística multivariada, análise de componentes principais – ACP (ou PCA - *Principal Component Analysis*) e de agrupamento hierárquico – AAH (ou HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*) são ferramentas importantes e complementares para identificar semelhanças ou diferenças entre amostras complexas (COSTA *et al.*, 2009; REZENDE *et al.*, 2013).

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo da composição química e do teor dos óleos essenciais obtidos das folhas de seis espécies da família Myrtaceae, existentes no Jardim Botânico da UFRRJ. Para isso utilizou-se a aplicação conjunta de técnicas cromatográficas (CG-DIC e CG-EM) associadas aos métodos quimiométricos com o intuito de discriminar o perfil destes óleos essenciais, e assim, contribuir para o conhecimento da composição química das diferentes espécies.

Além disto, apesar da ampla utilização de óleos essenciais para diferentes propriedades farmacológicas, sempre é importante compreender outras ações biológicas que possam ser aplicadas à saúde humana, agricultura e ao meio ambiente. Neste sentido, no presente trabalho foi realizado um estudo com uma abordagem biológica, através de ensaios de atividades larvicida, tripanocida, fungicida e antioxidante, objetivando a busca de novos quimioterápicos eficazes e que se apresentem com uma alternativa promissora no sentido de proporcionar uma substituição desejada e esperada para algumas substâncias de risco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e mais de 3.500 espécies de árvores e arbustos que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América. No Brasil são registrados 23 gêneros e cerca de 997 espécies, distribuídas principalmente na Mata Atlântica, onde são encontradas 636 espécies (MORAIS *et al*, 2014). De acordo com Sobral e colaboradores (2009), esta família corresponde a 1,32% do total de angiospermas conhecidas, sendo assim, bastante representativa, considerando um total de 400 famílias. Entre os gêneros mais representativos destacam-se *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Syzygium*, *Eucalyptus* e *Melaleuca* (LAGO *et al*, 2011).

As espécies brasileiras de Myrtaceae geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local (GRESSLER *et al*, 2006). Por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente, como por exemplo, a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Essas espécies representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais. Algumas espécies estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia (LANDRUM & KAWASAKI, 1997), como pode ser visto pelas listas de espécies de Myrtaceae ameaçadas no Brasil divulgadas pela Fundação Biodiversitas (2005).

Esta família representa uma importante fonte de óleos essenciais com atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, entre outras (LAGO *et al*, 2011). Além disso, muitos membros desta família são utilizados na medicina tradicional a partir da decocção de folhas com finalidade antirreumática, anti-inflamatória, antipirética, hipoglicemiante, diurética e reguladora do aparelho digestivo (CRUZ & KAPLAN, 2004; LAGO *et al.*, 2011). Espécies de Myrtaceae também se destacam por seu potencial econômico, sendo muitas utilizadas como alimento, como por exemplo, as espécies de *P. guajava* L. e *E. uniflora* L., consumidas em forma de suco, doces, geleias e sorvetes (MORAIS *et al*, 2014). Apresentam também importância ecológica, pois seus frutos carnosos e suculentos são fontes de alimento à fauna silvestre, o que acaba veiculando a dispersão das sementes e favorecendo a sobrevivência e permanência das espécies (GRESSLER *et al*, 2006).

2.1.1. *Eugenia uniflora* L. – Pitangueira

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma planta tropical frutífera nativa do Brasil que pertence à família Myrtaceae, tem seu cultivo bem difundido em outros países da América do Sul (BICAS *et al*, 2011) e tem sido largamente explorada pelas indústrias alimentícias, de cosméticos e de fármacos (ALMEIDA *et al*, 2012). É um arbusto ou árvoreta medindo de 4-10 m de altura, de tronco tortuoso e liso, de cor pardo-clara, ramificado, copa estreita (Figura 1). Popularmente é conhecida como pitangueira-vermelha, pitanga, pitanga-vermelha, ibipitanga, pitangatuba, pitangueira-de-jardim, pitangueira-do-campo (LIRA JÚNIOR *et al*, 2007).



Figura 1. Exemplar e folhas da espécie *E. uniflora* localizada em Seropédica
(Fonte: arquivo pessoal)

As folhas de *E. uniflora* são largamente utilizadas na medicina popular, na forma de infusão ou decocção, por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antidiarreica (SCHAPOVAL *et al*, 1994), anti-hipertensiva e antimicrobiana (OLIVEIRA *et al*, 2008). Outros relatos da literatura têm destacado atividades hepatoprotetora (VICTORIA *et al*, 2013), antinociceptiva, hipotérmica (AMORIM *et al*, 2009), antitumoral (OGUNWANDE *et al*, 2005), inseticida (JUNG *et al*, 2013) e indutor de fitoalexinas (MAZARO *et al*, 2008).

A *E. uniflora* apresenta, tanto nas folhas como nos frutos, óleo essencial rico em sesquiterpenos, além de taninos, pigmentos flavonoídicos e antociânicos, saponinas, sais minerais e uma pequena concentração de ácido ascórbico (LORENZI & MATOS, 2002).

Suas folhas, quando jovens, apresentam uma coloração bronze passando a um verde escuro à medida que envelhecem (MELO *et al*, 2007).

Tem sido descrito na literatura que o óleo essencial de *E. uniflora* extraído por hidrodestilação da parte aérea da planta apresenta rendimento de 0,74 a 1,8%. O óleo apresenta propriedades adstringentes e odor agradável, sendo utilizado atualmente na fabricação de sabonetes, desodorantes e óleos corporais por promover sensação de frescor (MAY *et al*, 2007).

Vários estudos examinaram a composição do óleo das folhas de *E. uniflora* de diferentes regiões no Brasil e em outros países (WEYERSTAHL *et al*, 1988; HENRIQUES *et al*, 1993; MELO *et al*, 2007; COSTA *et al.*, 2009; PEIXOTO *et al*, 2010), e tais estudos demonstraram que a composição e a concentração dos componentes são muito complexas.

2.1.2. *Eugenia brasiliensis* Lam – Grumixameira

A grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam), pertencente à família Myrtaceae, é uma planta nativa do Brasil, com ocorrência do sul da Bahia até Santa Catarina. É uma árvore de porte médio com excepcional valor paisagístico, dotada de copa densa e estreita com folhas simples, geralmente opostas e de coloração sempre verde (Figura 2). Quando adulta, pode alcançar até 15 metros de altura (DONATO & MORRETES, 2007). Tradicionalmente, suas folhas, frutos, madeira e cascas são utilizados para reumatismo, distúrbios gastrointestinais, como diurético e como anti-inflamatório (PIETROVSKI *et al*, 2008; MAGINA *et al*, 2009).

O óleo essencial extraído de suas folhas e cascas é aromático, diurético, tendo seu uso difundido na medicina popular no tratamento de reumatismo (LIMA *et al*, 2008). Poucos são os relatos na literatura descrevendo o estudo e atividade biológica do óleo essencial extraído de suas folhas.



Figura 2. Folhas do exemplar *Eugenia brasiliensis* L. (Jd. Botânico da UFRRJ)
(Foto: Ricardo Alves-Silva).

2.1.3. *Psidium cattleianum* Sabine - araçazeiro

O araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), vulgarmente conhecido com os nomes de araçá, araçá-do-mato, araçá-do-campo e araçá-amarelo, é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, encontrado em estado nativo no Brasil desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (FETTER *et al*, 2010). Trata-se de uma espécie arbórea cuja altura varia entre 3,0 e 6,0 m, com tronco liso e casca descamante (Figura 3). Os frutos são amarelos ou vermelhos, sugerindo que a espécie possa ser dividida em dois morfotipos (LORENZI, 1992). É uma espécie nativa, endêmica do Brasil, utilizada como planta ornamental, que fornece frutos comestíveis e muito apreciados (ALVARENGA *et al*, 2013).



Figura 3. Exemplar e folhas de *Psidium cattleianum* Sabine (Jd. Botânico da UFRRJ)
(Foto: Ricardo Alves-Silva)

Na medicina popular, o araçazeiro (*P. cattleianum*) é usado como adstringente, hepatoprotetor, antidiarreico e analgésico. As folhas são usadas como chá ou pela mastigação direta para alívio de dores abdominais ou de garganta (ALVARENGA *et al*, 2013).

2.1.4. *Psidium guajava* L. – goiabeira

A goiabeira (*Psidium guajava* L.; Myrtaceae) é uma árvore perene, rústica, que atinge porte arbustivo ou arbóreo com menos de 10 m, é considerada nativa da América tropical, em especial do Brasil e das Antilhas. O tronco é tortuoso, liso e descamante e as folhas são simples e de textura coriácea (LORENZI, 1992) (Figura 4). É uma excelente fonte de vitaminas essenciais para o crescimento e bom funcionamento do corpo humano (especialmente vitaminas C e A) (OGUNWANDE *et al*, 2003).



Figura 4. Exemplar e folhas de *Psidium guajava* L. (Jd. Botânico da UFRRJ)
(Foto: Ricardo Alves-Silva).

Diferentes partes da planta são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças humanas. A casca tem sido utilizada para o tratamento de diarreia, seu fruto é tônico, laxante e anti-helmíntico, enquanto as folhas são usadas para o alívio da tosse, distúrbios pulmonares, feridas e úlceras (SHEN *et al*, 2008). Aos óleos essenciais presentes na planta são também atribuídas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (BAKKALI *et al*, 2008).

2.1.5. *Syzygium cumini* (L.) Skeels - Jamelão

O gênero *Syzygium* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de 400 distribuem-se no Brasil e assumem destaque especial por fornecerem extratos utilizados na medicina tradicional como antimicrobianos, anti-inflamatórios, hipoglicemiante e cardiotônicos (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

Syzygium cumini, conhecido popularmente como jamelão ou jambolão, é originário da região Indo-Malásia, China e Antilhas e cultivado em vários países, inclusive o Brasil. É uma árvore frondosa, de porte médio, podendo alcançar 10 metros de altura. Sua copa é cheia, ampla e bastante ramificada, com folhas simples, lisas, escuras e com textura coriácea (SIQUEIRA-NUNES & MARTINS, 2010) (Figura 5).



Figura 5. Exemplar e folhas da espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Jd. Botânico da UFRRJ)
(Foto: Ricardo Alves-Silva)

De acordo com Volpato e colaboradores (2002), informações etnofarmacológicas incluem o uso desta espécie como medicação hipoglicemiante para controle de *Diabetes mellitus*. Outros estudos também comprovam a potencialidade da utilização da espécie no controle da glicemia (GROVER *et al*, 2000, SHARMA *et al*, 2006).

2.1.6. *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry – Jambo vermelho

Syzygium malaccense (L.) Merr. & L. M. Perry pertence à família Myrtaceae, nativa da Índia e da Malásia, é uma planta de frutos comestíveis, que pode atingir de 12 a 15m de altura, com tronco reto e copa densa, com forma piramidal e ramificação abundante que se inicia a 1,5-2,0 m do solo. De agosto a fevereiro, época da florada, ela se recobre de flores vermelhas, caracterizando seu aspecto ornamental (MELO *et al*, 2009) (Figura 6). Suas folhas são utilizadas comumente na medicina popular como diurético, agente antimicrobiano, no tratamento da diabetes, de infecções dérmicas, do trato gastrintestinal e respiratório bem como nas inflamações (OYINLADE, 2014).

Investigação na Nigéria mostrou que as folhas desta planta forneceram um óleo essencial rico em monoterpenos (KARIOTI *et al*, 2007), semelhante ao padrão químico encontrado mais recentemente por Lawal e colaboradores (2014).



Figura 6. Exemplar e folhas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry – Jambo vermelho (Jd.Botânico da UFRRJ) (Foto: Ricardo Alves-Silva).

2.2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são reconhecidos por seu valor medicinal desde os tempos antigos e continuam a ser de primordial importância até os dias atuais. Têm sido usados há muitos anos como perfumes, aromas para alimentos e bebidas, ou para curar o corpo e a mente. Registros achados na Mesopotâmia, China, Índia, Pérsia e Egito antigo mostram o uso dos óleos essenciais, extraídos de diferentes maneiras, em diversos tratamentos. Por exemplo, no antigo Egito, a população extraía os óleos por infusão. Mais tarde, os gregos e romanos usaram a destilação, conferindo às plantas aromáticas um valor adicional. Com o advento da civilização islâmica, as técnicas de extração tornaram-se ainda mais refinadas. Na era do Renascimento, os europeus assumiram a tarefa e com o desenvolvimento da ciência, a composição e a natureza dos óleos essenciais foram bem estabelecidas e estudadas (FRANZ, 2010; DJILANI & DICKO, 2012).

Os óleos essenciais são comumente utilizados como agentes aromatizantes em produtos alimentares, bebidas, perfumaria, produtos farmacêuticos e cosméticos. Atualmente cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são importantes do ponto de vista comercial (BAKKALI *et al*, 2008; DJILANI & DICKO, 2012). Cerca de 40.000 a 60.000 toneladas por ano de produção com valor de mercado estimado em 700 milhões de dólares, indicam que a produção e consumo de óleos essenciais está aumentando em todo o

mundo (RAUT & KARUPPAYIL, 2014). Esses óleos são largamente empregados pelas suas propriedades antifúngica, antibacteriana e inseticida. Além disso, possuem várias outras propriedades biológicas, tais como antitumoral (OGUNWANDE *et al*, 2005), indutor de fitoalexinas (MAZARO *et al*, 2008), antinociceptiva (AMORIM *et al*, 2009), antioxidante (VICTORIA *et al*, 2012), anti-inflamatória (SIANI *et al*, 2013), antimicrobiana (BADAWY & ABDELGALEIL, 2014).

As plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em Angiospermas dicotiledôneas, principalmente nas famílias: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae entre outras. Dependendo do grupo taxonômico, os óleos podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como: pelos e tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (SIMÕES & SPITZER, 2003).

A ISO 9235 de 2013 define óleo essencial como o produto obtido a partir de uma matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor ou por meio de processos mecânicos do epicarpo de citrinos (prensagem). São metabólitos secundários produzidos e armazenados em estruturas secretoras especiais, como cavidades, canais, pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas (ASCENSÃO, 2007) e, de uma maneira geral, constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas, incluindo brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca e podem variar a sua composição de acordo com a localização em uma única espécie (SOUZA *et al*, 2010). Os óleos essenciais são assim denominados devido à composição lipofílica que apresentam, quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras. Os princípios odoríferos dos óleos voláteis são encontrados em várias partes do vegetal, e apresentam uma função ecológica. Além disto, estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (SIANI, 2000; BAKKALI *et al.*, 2008; SELL, 2010).

Embora seja determinada geneticamente, sendo em geral específica para determinado órgão e estágio de desenvolvimento, a composição química dos óleos essenciais pode variar em função de fatores extrínsecos e intrínsecos (Figura 7).

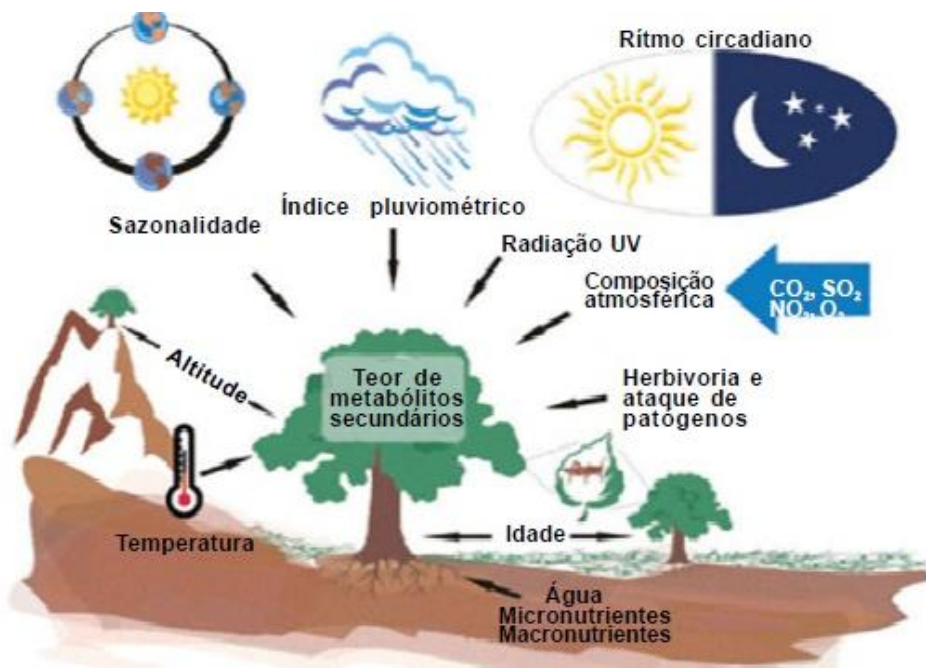


Figura 7. Principais fatores que podem influenciar as características dos metabólitos secundários em plantas (adaptado de GOBBO-NETO & LOPES, 2007)

Os fatores extrínsecos estão relacionados às condições ambientais e de colheita, como localização geográfica e tipo de solo, meses e horário de colheita, precipitação e quantidade de água disponibilizada à planta, interações bióticas, irradiação luminosa, temperatura, tratamento pós-colheita e técnica de extração utilizada (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; MORAIS, 2009); enquanto os fatores intrínsecos dependem da genética e fisiologia da planta, como a variabilidade genética (quimiotipos), fase ontogênica (origem e desenvolvimento), órgão da planta e idade da planta (SIMÕES & SPITZER, 2003; SALGUEIRO *et al.*, 2010; VERMA *et al.*, 2014).

É evidente que a literatura especializada reúna uma série de estudos envolvendo a composição química dos óleos essenciais produzidos por espécies de Myrtaceae, entretanto, dada a ampla diversidade biológica desta família botânica, ainda há muito por ser descoberto e avaliado.

2.2.1 Biossíntese de voláteis e composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de substâncias presentes em concentrações variáveis, geralmente caracterizados por um, dois ou três componentes majoritários, encontrados em altas concentrações quando comparados com a quantidade dos outros componentes presentes. A complexidade química dos óleos essenciais dificulta a

análise dos seus componentes bioativos. Em muitos casos registrados na literatura, o constituinte majoritário é responsável pela atividade biológica. No entanto, esta propriedade pode ser atribuída à ação sinérgica ou antagonica de vários componentes (BAKKALI et al, 2008).

Os componentes incluem dois grandes grupos de origem biossintética distinta, constituídos de derivados fenilpropanoides, que são compostos aromáticos caracterizados por apresentarem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, e dos terpenoides, considerados o grupo predominante. Os componentes terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpênicos, formados de 10 átomos de carbono, e os sesquiterpenos, terpenoides que apresentam 15 átomos de carbono em sua estrutura (Figura 8) (BAKKALI et al., 2008; KUTCHAN *et al*, 2015).

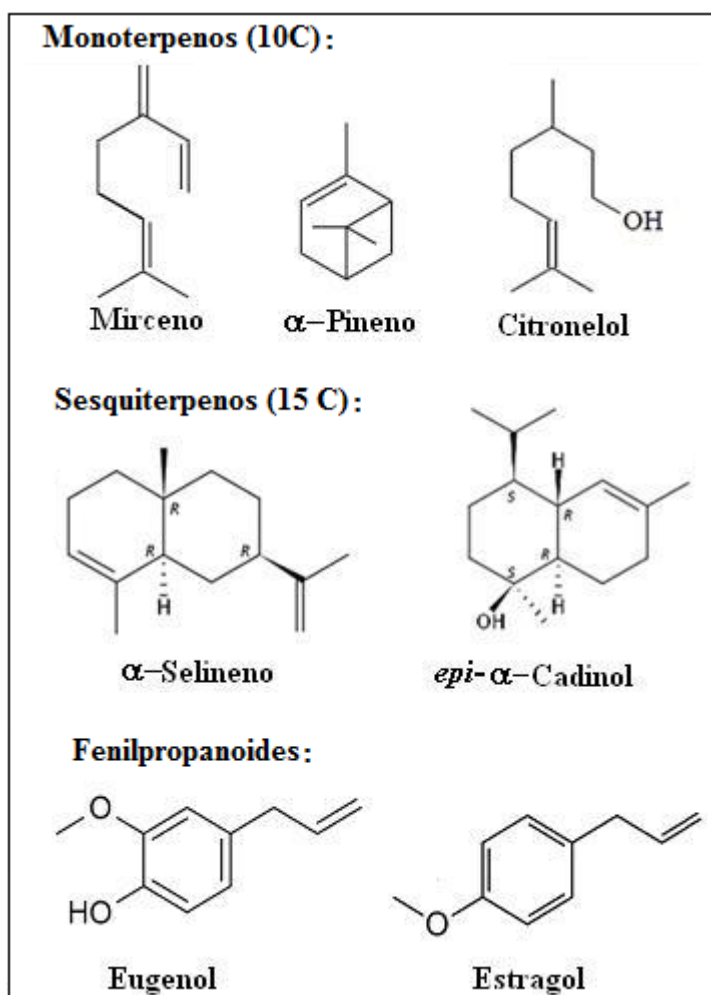


Figura 8. Exemplos de algumas das substâncias presentes em óleos essenciais

Atualmente são descritos cerca de 30.000 membros dos terpenoides, sendo considerados um dos grupos de produtos naturais mais importante (KUTCHAN *et al*, 2015).

Os terpenoides são definidos como substâncias compostas de unidades do isopreno (Figura 9).

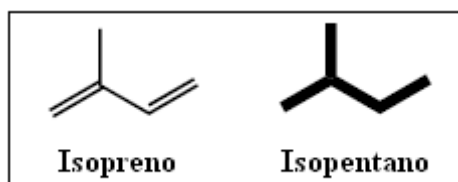


Figura 9. Estruturas do isopreno e do isopentano (unidade básica de cinco átomos de carbono encontrada nos terpenoides) (adaptado de DEWICK, 2002).

O isopreno não é encontrado nos óleos essenciais, e nem é um intermediário na biossíntese destes metabólitos especiais, mas o esqueleto isopentano pode, geralmente, ser discernido na maioria dos terpenoides (Figura 10). No entanto, o arranjo linear de unidades de isopreno pode ser mais difícil de ser observado em estruturas onde, por exemplo, possa ter ocorrido reações de rearranjo, além de perdas ou ganhos de carbono (DEWICK, 2002).

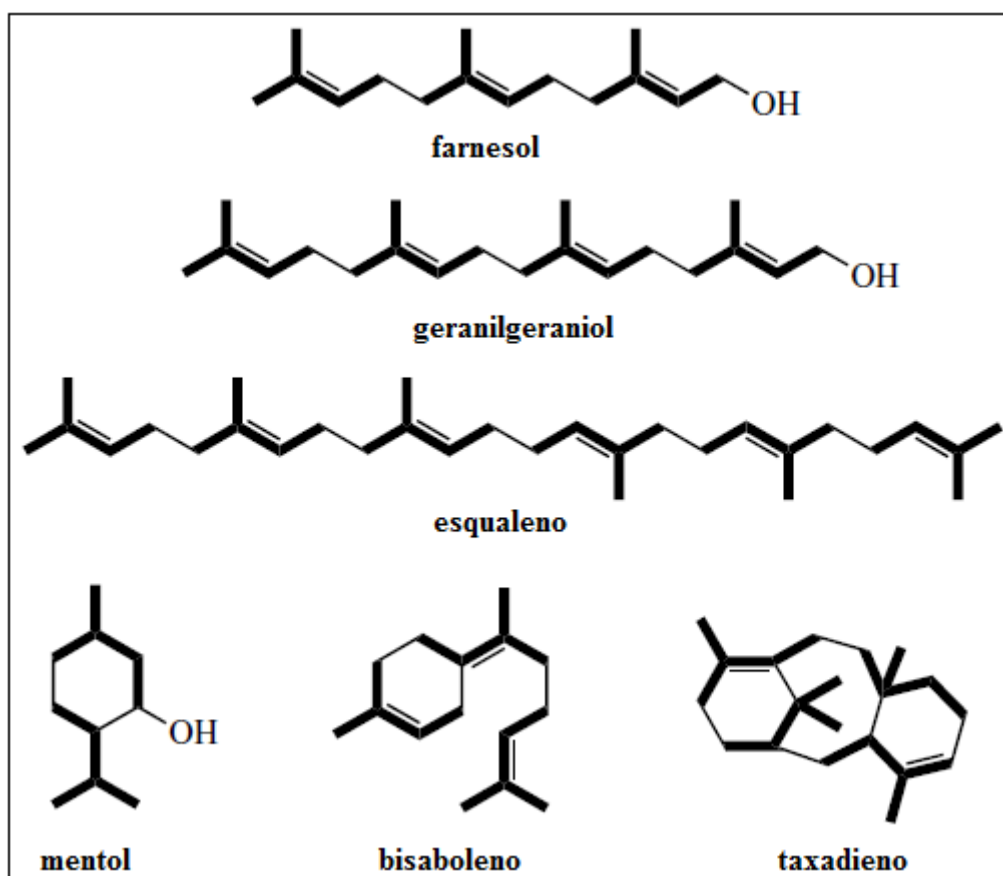


Figura 10. Exemplos de estruturas de terpenoides com visualização do arranjo das unidades de isopreno (adaptado de DEWICK, 2002)

Na biossíntese dos terpenoides, as unidades básicas de cinco átomos de carbono bioquimicamente ativas são representadas pelo isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). Estes intermediários são sintetizados em plantas por duas rotas diferentes: a via do mevalonato, que ocorre no citosol, e a via metil-eritritol-4-fosfato (citada também como via deoxixilulose fosfato), que tem sua ocorrência nos plastídeos (DEWICK, 2002; KUTCHAN *et al*, 2015).

Na via do mevalonato, no primeiro estágio, inicialmente três moléculas de acetil-CoA são condensadas e a partir de uma série de etapas, o ácido mevalônico é formado, sendo posteriormente fosforilado, descarboxilado e desidratado, produzindo assim o IPP. A rota do metil-eritritol-4-fosfato se inicia com a condensação do gliceraldeído-3-fosfato com o piruvato e, após um conjunto de reações, se dá a formação do intermediário, a deoxixilulose fosfato, que após rearranjo e redução dá origem ao metil-eritritol fosfato, que é então reduzido dando origem ao IPP e seu isômero DMAPP, na proporção de 5:1 (BARTRAM *et al*, 2006; KUTCHAN *et al*, 2015) (Figura 11).

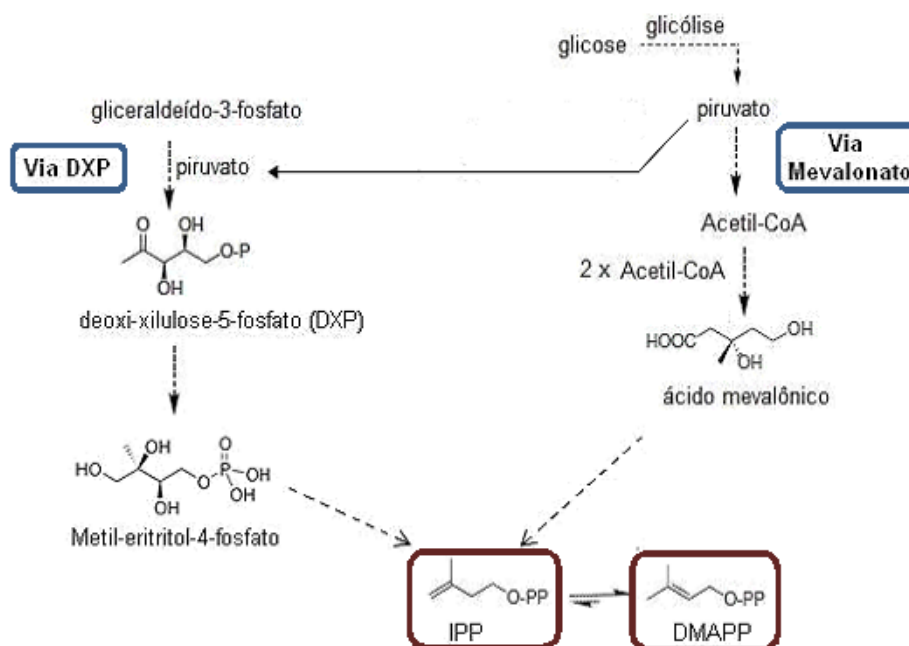


Figura 11. Esquema simplificado da rota biossintética das unidades isoprenoides precursoras dos terpenoides (adaptado BARTRAM *et al*, 2006).

O IPP, na presença da enzima IPP-isomerase (aqui representada por Enz-H), é convertido no DMAPP (Figura 12). Apesar de serem estruturalmente similares, o IPP e DMAPP apresentam reatividades diferentes, uma vez que somente no isômero DMAPP, o pirofosfato (PP), um bom grupo de saída em reações de substituição nucleofílica, está ligado

a um carbono alílico, o que possibilita a formação de um carbocátion estabilizado por ressonância, enquanto o menos reativo, IPP, apresenta como sítio principal de reação a ligação dupla (CAREY & GIULIANO, 2014).

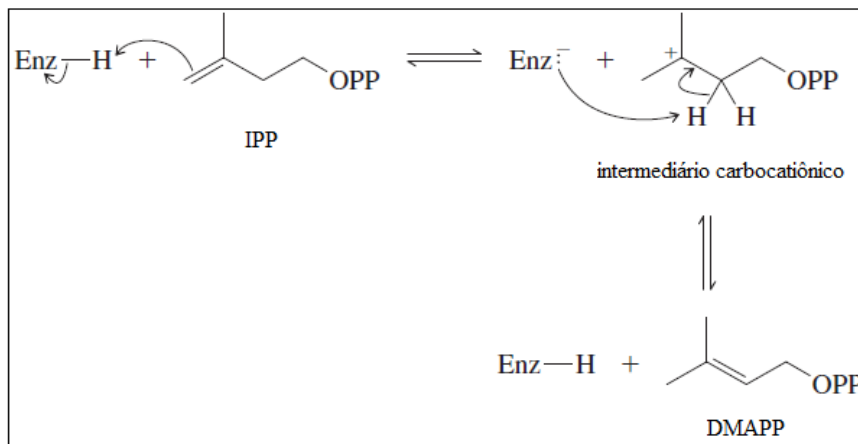


Figura 12. Conversão do IPP no DMAPP, em presença da IPP-isomerase (adaptado de CAREY & GIULIANO, 2014).

Na segunda etapa da biossíntese dos terpenoides mais comuns presentes nos óleos essenciais, o IPP e DMAPP, em presença de preniltransferases, reagem entre si para formar uma ligação carbono-carbono, unindo duas unidades de isopreno e dando origem ao geranyl difosfato, o precursor dos monoterpenos. O geranyl difosfato, um difosfato alílico como o DMAPP, reage com o IPP dando origem ao precursor dos sesquiterpenos, o farnesil difosfato (CAREY & GIULIANO, 2014; KUTCHAN *et al*, 2015) (Figura 13).

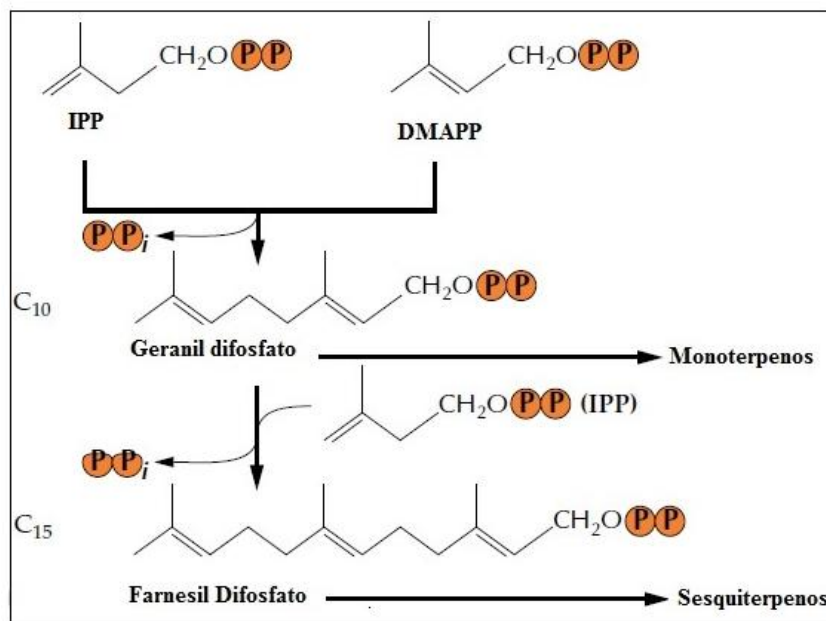


Figura 13. Esquema simplificado da biossíntese dos mono e sesquiterpenos (adaptado de CROTEAU *et al*, 2000).

A via biossintética de formação dos fenilpropanoides se dá através de um processo que se inicia com a condensação aldólica do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, e após várias etapas dão origem ao ácido chiquímico, precursor dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Estes aminoácidos, ao perderem uma molécula de amônia, dão origem aos ácidos cinâmico e *para*-cumárico, precursores da maioria das substâncias classificadas de fenilpropanoides (SIMÕES & SPITZER, 2003) (Figura 14).

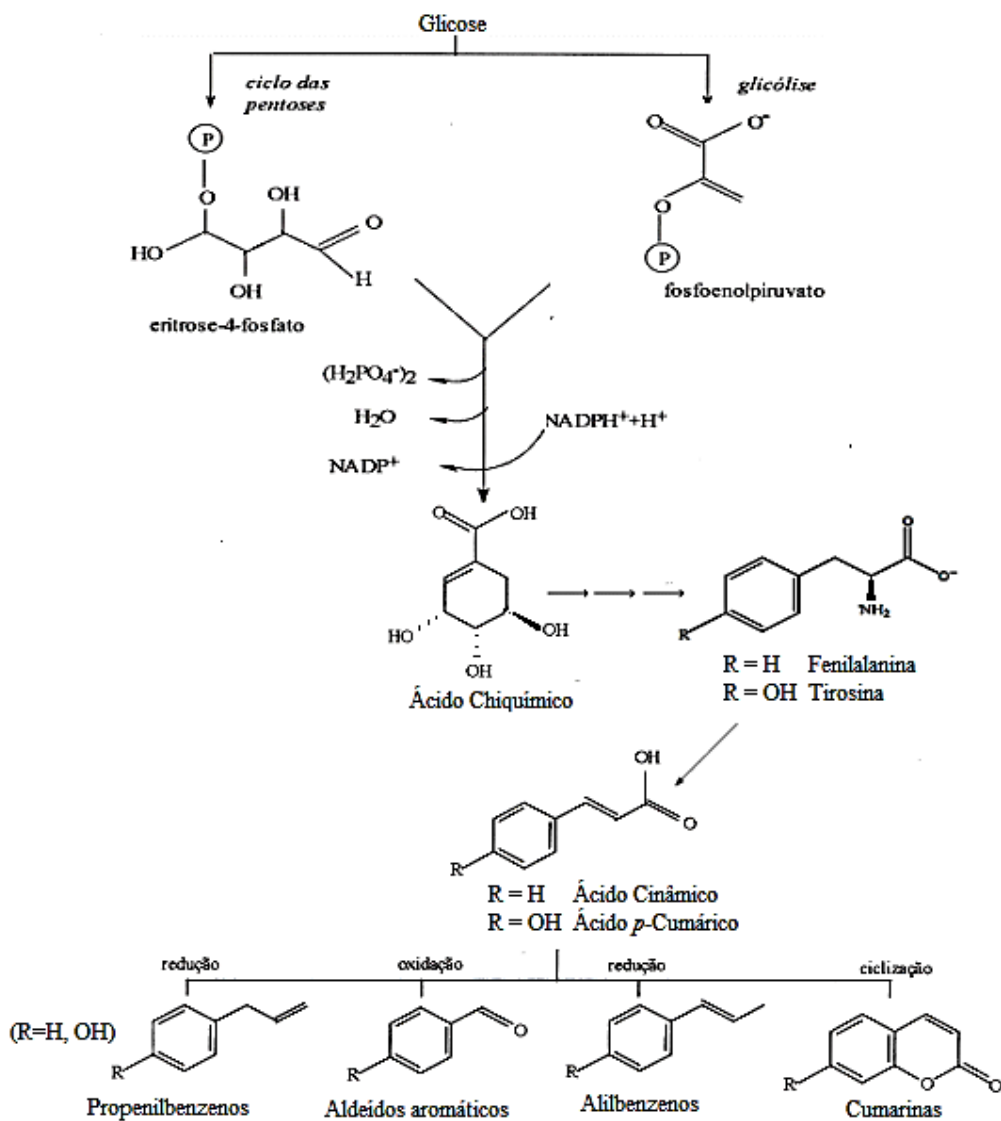


Figura 14. Rota biossintética para formação de derivados fenilpropanoides (adaptado de SIMÕES & SPITZER, 2003).

2.2.2 Métodos de extração de óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos através de inúmeras técnicas, sendo as mais comuns a prensagem, hidrodestilação, extração por arraste a vapor, enfloração e extração por fluído supercrítico. No entanto, as propriedades dos óleos essenciais extraídos através destes métodos, podem variar, dependendo do método utilizado (OKOH *et al.*, 2010; MACHADO & FERNANDES JR., 2011). Além disto, podem não ser considerados verdadeiros óleos essenciais, uma vez que não obedecem à sua definição segundo a ISO 9235 de 2013. No entanto, eles possuem, na maioria das vezes, perfis de aroma que são quase idênticos aos da matéria-prima a partir da qual eles foram extraídos. Eles são, portanto, muitas vezes utilizados na indústria de sabor e fragrância e em adição na indústria alimentar, se os solventes escolhidos são aceitáveis para alimentos e não deixam qualquer resíduo prejudicial em produtos alimentares (KUBECZKA, 2010).

O método da prensagem (ou expressão) é ainda bastante utilizado em indústrias devido ao seu alto rendimento, embora esta técnica seja pouco seletiva, podendo produzir óleos com altos teores de substâncias não voláteis, impurezas e lipídios. É aplicado exclusivamente para a extração dos óleos essenciais de pericarpos de frutos cítricos, onde, após a prensagem, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação ou centrifugação (SIMÕES & SPITZER, 2003; PAVARINI *et al.*, 2012).

Os processos de destilação, como hidrodestilação e arraste a vapor, têm em comum a utilização da água ou do seu vapor para facilitar a libertação dos óleos essenciais das células secretoras ou de armazenamento. Os óleos essenciais possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em seguida ocorre a condensação que, devido à natureza dos compostos, permite a separação do óleo da água (SIMÕES & SPITZER, 2003). Embora sejam técnicas simples e menos dispendiosas quando comparadas com as outras técnicas de extração, o fato de haver aquecimento direto pode levar à ocorrência de degradações e oxidações do material vegetal e consequente perda de alguns constituintes do óleo essencial (SIMÕES & SPITZER, 2003; PAVARINI *et al.*, 2012).

A enfloração ou *enfleurage* é um processo milenar empregado para extrair óleos essenciais de pétalas de flores, que são termicamente instáveis e altamente voláteis, utilizando gordura animal ou vegetal. As pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um determinado período de tempo. Após seu esgotamento, estas pétalas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura

é tratada com álcool. Posteriormente, o álcool é destilado a baixa temperatura e é obtido o óleo essencial, considerado de alta qualidade e de aroma peculiar (PAVARINI *et al*, 2012).

A extração por fluído supercrítico emprega um gás como solvente, geralmente o gás carbônico (CO₂), que é mantido acima de sua temperatura e pressão críticas, tornando-o um fluído supercrítico com características peculiares, como baixa viscosidade, alta densidade e difusão, intermediária entre gases e líquidos. Além disso, esta técnica é muito atrativa porque é realizada a temperaturas reduzidas comparadas com as das outras técnicas, diminuindo assim a possibilidade de degradação térmica dos compostos a extrair e encurtando o tempo de extração. No entanto, esta técnica exige equipamentos sofisticados, grandes otimizações e manutenções devido às elevadas pressões que se atingem durante o processo, sendo bastante dispendiosa e resultando, conseqüentemente, em produtos mais caros (HERRERO *et al*, 2010, PAVARINI *et al*, 2012).

2.3. Potencial biológico dos óleos essenciais

Do ponto de vista econômico, diferentes aplicações podem ser dadas aos óleos essenciais: na medicina, na culinária, na cosmética, e mais recentemente, na agricultura. O conhecimento de que o óleo essencial ou alguns dos constituintes que fazem parte desses óleos podem atuar como antimicrobianos ou apresentar outras propriedades biológicas, tem estimulado pesquisas com o objetivo de fazer uso desses produtos naturais para proteger culturas e produtos agrícolas armazenados, bem como aplicados na saúde humana. Em uma breve análise de relatos publicados recentemente, somente uma pequena quantidade de artigos trata da análise da atividade biológica atrelada ao estudo fitoquímico das suas espécies. E mais especificamente, sobre alguns óleos essenciais obtidos de espécies de Myrtaceae nota-se profunda escassez de informações. Assim, a seguir serão destacadas algumas atividades biológicas descritas para óleo essencial de diferentes espécies de Myrtaceae que foram alvo deste trabalho.

2.3.1 Atividade larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti*

Algumas espécies de mosquitos atuam como vetores para uma grande variedade de patógenos e parasitas, humanos e veterinários, e causam grande morbidade e mortalidade, sendo assim um grande encargo econômico nos países afetados por doenças endêmicas. Nas últimas décadas tem crescido a busca pelo controle químico alternativo contra o *Aedes aegypti* L. e neste sentido vários estudos estão sendo desenvolvidos e incentivados, focados

em novas substâncias de origem vegetal com propriedades inseticidas (PAVELA, 2015, ISMAN & GRIENEISEN, 2014). O principal controle deste vetor é baseado na destruição dos locais de reprodução usando inseticidas sintéticos. No entanto, o uso continuado destes inseticidas pode resultar em resistência dos mosquitos (MELO-SANTOS *et al.*, 2010) além de serem tóxicos e afetarem o meio ambiente através da contaminação do solo, da água e do ar. Esses efeitos negativos dos inseticidas sintéticos tornaram-se o principal impulso à pesquisa de inseticidas naturais mais eficazes, por serem biodegradáveis, eco-amigáveis e seguros para o meio ambiente. Neste contexto os óleos essenciais têm se mostrado muito promissores no sentido de proporcionar uma substituição esperada e desejada para algumas substâncias sintéticas de risco (LIMA *et al.*, 2011; PAVELA, 2015).

Dados da literatura revelam que cerca de 361 dos óleos essenciais de 269 espécies de plantas (sendo cerca de 27% recolhidas no Brasil) foram testados quanto à sua atividade larvicida. Mais de 60% destes óleos essenciais foram considerados ativos ($CL_{50} < 100$ mg/L), e a maioria era derivado de espécies pertencentes às famílias Myrtaceae, Lamiaceae e Rutaceae. Os óleos essenciais mais ativos foram aqueles ricos em fenilpropanoides, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenos e que exibiram concentrações eficazes comparáveis à dose recomendada para a utilização de temefós (1 mg/L) nos criadouros do mosquito (DIAS & MORAES, 2014), um inseticida organofosforado amplamente utilizado como a principal estratégia para o controle das larvas do mosquito *A. aegypti* (CRIVELENTI *et al.*, 2011).

A concentração necessária para atingir mortalidade depende de muitos fatores, tais como o estágio larval, temperatura ambiente, a capacidade de penetrar a cutícula larval, bem como o mecanismo de ação (PAVELA *et al.*, 2009; RATTAN, 2010).

Embora muitos trabalhos foquem a atenção sobre a eficácia larvicida de óleos essenciais, existe pouca informação disponível sobre o seu mecanismo de ação contra insetos. Existe uma dificuldade de se determinar a relação entre o efeito larvicida e a composição química do óleo essencial porque as interações entre as substâncias podem influenciar a atividade da mistura. Vários mecanismos de ação das substâncias individuais, muitos dos quais ainda permaneçam desconhecidos, podem em suas combinações, não só proporcionar um aumento significativo na eficácia, mas também impedirem o desenvolvimento da resistência às pragas (SANTOS *et al.*, 2010).

Dados da literatura revelam que a lipofilicidade desempenha um papel chave na modulação da atividade larvicida (RATTAN, 2010). A associação entre compostos

lipofílicos e inibição enzimática/desativação da proteína pode ser uma explicação razoável para este fato (PAVELA, 2015). Esta hipótese foi confirmada através de um estudo quimiométrico aplicado aos compostos ativos, tais como terpenos e fenilpropanoides (SCOTTI *et al.*, 2013).

Santos e colaboradores (2011) também apresentaram uma discussão sobre a relação estrutura/atividade, mostrando que a presença de heteroátomos na estrutura básica de hidrocarbonetos diminui a potência larvicida. A substituição de ligações duplas por epóxidos mais reativos diminui a potência larvicida ou ligações duplas exo e conjugadas parecem aumentar a potência larvicida. Por exemplo, Lucia e colaboradores (2007) e Perumalsamy e colaboradores (2009) verificaram que β -pineno, que possui uma ligação dupla exocíclica, é mais tóxico para as larvas de *A. aegypti* que o α -pineno que apresenta uma ligação dupla endocíclica. Santos e colaboradores (2011) ainda relataram que a presença de grupos hidroxilas em estruturas cíclicas resultou na diminuição da potência larvicida, provavelmente devido ao aumento da polaridade, indicando que a diminuição do caráter lipofílico destes compostos restringe a sua passagem através da cutícula larval (LOMONACO *et al.*, 2009; RATTAN, 2010).

Nas pesquisas realizadas em bancos de dados especializados (SciFinder, PubMed, SciELO, Portal de Periódicos CAPES e Web of Science) foram encontrados apenas dois artigos relatando bioensaios de óleos essenciais de duas das espécies de Myrtaceae estudadas no presente trabalho frente a larvas de *Aedes aegypti*. Um dos trabalhos foi o de Leite e colaboradores (2009) onde foi relatado que o óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia uniflora* L. mostrou uma inibição de 100% da viabilidade larval em todas as concentrações ensaiadas. Nos ensaios realizados, a mortalidade ocorreu num curto período de tempo (2 h) tornando-se impossível a observação do desenvolvimento das larvas de *A. aegypti* nos últimos experimentos. Os autores concluíram que a rápida e alta taxa de mortalidade provavelmente foi estabelecida devido à interferência do óleo essencial ensaiado sobre a síntese e/ou reabsorção de quitina nas larvas. No segundo trabalho, Lima e colaboradores (2011) relataram pela primeira vez, o potencial larvicida do óleo de *P. guajava* e do seu componente majoritário, o 1,8-cineol, que correspondia 48,8% da composição do óleo. Nas condições testadas, o óleo essencial apresentou uma CL_{50} igual a 24,7 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o 1,8-cineol mostrou um valor de CL_{50} de 47,9 $\mu\text{g/mL}$, indicando que, provavelmente, este constituinte seja um dos componentes responsáveis pelo efeito larvicida apresentado pelo óleo essencial de *P. guajava*.

Satyal e colaboradores (2015) também relataram uma potencial atividade larvicida em experimentos utilizando como modelo larvas de *Chaoborus plumicornis* (glassworm ou larva do mosquito fantasma ou “verme do vidro”). Neste experimento o óleo essencial de *P. guajava* apresentou CL₅₀ de 63,3 µg/mL, e os componentes majoritários avaliados foram *E*-nerolidol e β-cariofileno, que corresponderam, respectivamente, a 35,6 e 15,8% da composição do óleo investigado.

2.3.2. Capacidade Antioxidante

O termo antioxidante é utilizado para definir o conjunto enzimático ou não de sistemas que protegem as macromoléculas ou estruturas celulares, retardando, impedindo ou removendo o dano oxidativo a estes alvos (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010). Há ainda compostos de origem vegetal, como as frutas, verduras, óleos essenciais, entre outros (DE OLIVEIRA *et al*, 2009; VICTORIA *et al*, 2012) ou sintéticos, como exemplo os utilizados para preservar alimentos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) que possuem atividade antioxidante (RAMALHO & JORGE, 2006).

O papel e os efeitos benéficos dos antioxidantes contra vários transtornos e doenças induzidas pelo estresse oxidativo têm recebido muita atenção. Muitos tipos de antioxidantes com diferentes funções desempenham seu papel na rede de defesa *in vivo*. Os antioxidantes de eliminação de radicais livres são uma das classes mais importantes e a avaliação da sua capacidade tem sido objeto de estudos extensivos (NIKI, 2010).

Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos, contendo número ímpar de elétrons (elétron desemparelhado) em sua última camada eletrônica, e que podem interferir em reações normais do organismo, causando alterações. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados EROs (espécies reativas de oxigênio) e nos átomos de nitrogênio são ERNs (espécies reativas de nitrogênio) (COTINGUIBA *et al*, 2013). Consideram-se radicais livres, por exemplo, o ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (•OH) e o radical lipoperoxila (LOO•). Capazes também de reagir com moléculas celulares e teciduais, as principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio compreendem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o óxido nítrico (NO•) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻) (SILVA & FERRARI, 2011).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria, por meio da cadeia

transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (BARBOSA *et al*, 2010). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, etc.) (COTINGUIBA *et al*, 2013).

Os radicais livres atuam no sistema imunológico, pois apresentam ação bactericida, fungicida, virótica, agindo como uma espetacular barreira de defesa do organismo frente à presença de microrganismos. Além disso, são encontrados envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, quando o acúmulo destas moléculas ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre o que se chama de estresse oxidativo, o que irá acarretar efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação de membranas e a oxidação de proteínas e DNA (BARREIROS *et al*, 2006; COTINGUIBA *et al*, 2013).

A peroxidação lipídica é provavelmente o tipo de dano mais explorado em pesquisas quando se trata de EROs. O processo é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado que, por ter múltiplas ligações duplas, é um excelente alvo para o ataque de radicais livres, e propagado por radicais peroxilas, podendo ser definido como uma cascata de eventos bioquímicos. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, entre eles, o malondialdeído (ou propanodial), uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) comumente dosado para avaliar o estresse oxidativo (Figura 15), e considerado um biomarcador importante na detecção do estresse oxidativo em amostras biológicas (LAGUERRE *et al*, 2007; BORGES *et al*, 2011; MENDONÇA *et al*, 2014). Uma resposta ao estresse oxidativo é acionado quando as células ‘sentem’ um aumento de radicais livres - um mecanismo elaborado de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante.

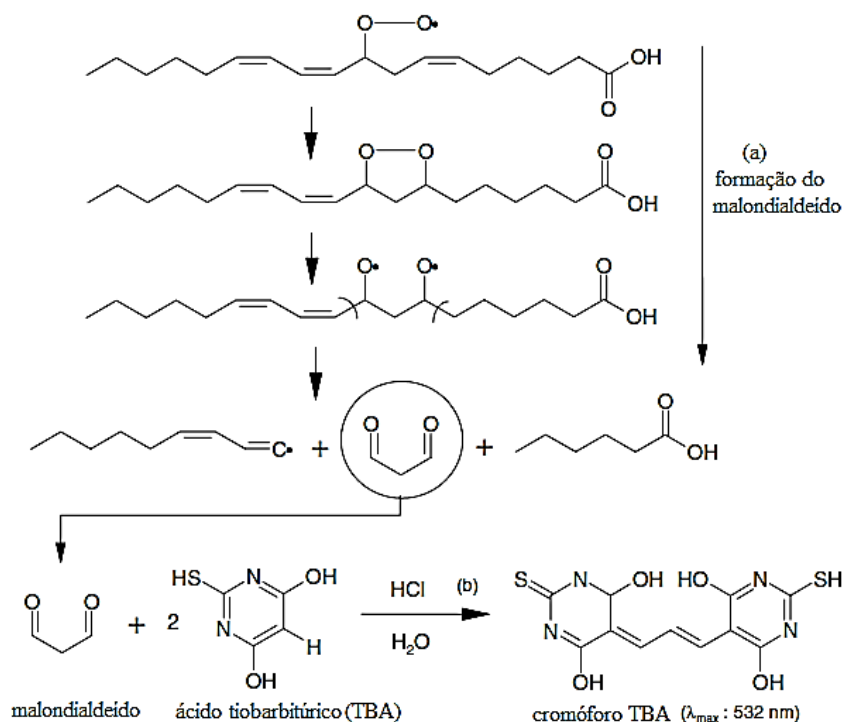


Figura 15. Via de formação do malondialdeído a partir do radical peroxila de ácido graxo tri-insaturado C18 **(a)**, e a formação do cromóforo TBA a partir de TBA e malondialdeído **(b)** (adaptado de LAGUERRE et al, 2007).

Existem vários métodos *in vitro*, relativamente simples, utilizados para avaliar o potencial antioxidante de diferentes substâncias, onde a reação é estudada na ausência e na presença dos componentes, cuja atividade antioxidante está sendo investigada. Entre estes métodos destacam-se os colorimétricos relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)], o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)–Poder Antioxidante de Redução do Ferro, e o ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (SACCHETTI *et al*, 2005; BORGES *et al*, 2011).

Considerando as diferenças entre o grande número de ensaios disponíveis, os resultados de um único ensaio podem dar apenas uma sugestão das propriedades antioxidantes dos óleos essenciais e devem ser interpretados com cautela. Além disso, a complexidade química dos óleos essenciais, muitas vezes uma mistura de dezenas de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico, pode levar a resultados distintos, dependendo do ensaio utilizado. Portanto, a possibilidade de

uma abordagem com múltiplos ensaios no trabalho de triagem é altamente recomendável (SACCHETTI *et al*, 2005).

No entanto, tais ensaios não são representativos das condições celulares do homem e, tendo em vista que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva é necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos (BORGES *et al*, 2011). O método utilizando células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para estudo da oxidação *in vivo* têm se mostrado muito adequados para o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem a tolerância ao estresse oxidativo, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados aos observados no homem, devido à sua semelhança com as células de mamíferos superiores, como principais organelas, vias metabólicas, proteínas, mecanismo redox intracelular e fatores de transcrição (SOARES *et al*, 2005; TORRE-RUIZ *et al*, 2012).

Estudos têm revelado a capacidade antioxidante de óleos essenciais, sugerindo o potencial destes produtos naturais para uso em indústrias farmacêuticas, no entanto, as suas utilizações podem ser dificultadas devido à variabilidade química dos óleos. Vários fatores, incluindo o tempo de colheita da planta aromática, condições climáticas e agrônômicas, o desenvolvimento vegetativo e a parte da planta utilizada, o tipo de extração utilizado, entre outros, podem ser considerados como responsáveis por flutuações em suas composições químicas e em suas propriedades biológicas (MIGUEL, 2010).

Em um estudo sobre a atividade antioxidante do óleo essencial obtido de folhas de *E. uniflora*, Victoria e colaboradores (2012) propuseram que o mecanismo desta atividade fosse baseado, principalmente, na transferência de elétrons, uma vez que o óleo essencial apresentou potencial capacidade redutora de ferro com seu poder redutor melhorado com o aumento da concentração do óleo essencial testado, e também por ter se mostrado mais potente no ensaio de eliminação de radicais de ABTS, com um valor de CI_{50} de $8,11 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ do que no ensaio com radicais de DPPH (CI_{50} de $833,3 \pm 20,7$ $\mu\text{g/mL}$). No ensaio, o óleo essencial avaliado reduziu a peroxidação lipídica em rins de camundongo e, a administração deste por via oral não causou letalidade ou efeitos toxicológicos nos animais.

Em um estudo sazonal do óleo essencial extraído de folhas frescas de *Eugenia brasiliensis*, nas quatro estações do ano, Siebert e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antioxidante através do ensaio de sequestro de radicais livres de DPPH, da inibição da peroxidação lipídica do sistema β -caroteno/ácido linoleico, e através da determinação do poder redutor de ferro (FRAP). Neste trabalho todas as amostras foram incapazes de reduzir

os radicais de DPPH a níveis inferiores a 50% de uma concentração máxima de 500 µg/mL. As amostras dos óleos essenciais também apresentaram resultados pobres no teste de inibição da peroxidação lipídica, com a melhor percentagem de inibição obtida com o óleo essencial extraído na primavera (14,05%). O potencial de redução mostrou resultados semelhantes em todas as amostras, e o melhor resultado registrado foi do outono (94,32 mg / ácido ascórbico/g de amostra), mostrando assim uma fraca resposta das amostras testadas.

Castro e colaboradores (2015) relataram que o óleo essencial de *P. cattleianum* exibiu capacidade antioxidante no ensaio de redução do ferro (FRAP) em concentrações iguais e superiores a 100 µg/mL, mas não demonstrou efeito nos testes com radicais de DPPH e ABTS. Nos testes *in vivo*, avaliaram a capacidade deste óleo essencial para reduzir a oxidação do ácido linoleico, a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio em regiões do cérebro de camundongos (córtex, hipocampo e cerebelo) e a peroxidação lipídica basal no fígado, rim e cérebro de camundongos. O óleo essencial de *P. cattleianum* diminuiu a peroxidação lipídica, por si só em concentrações que variaram de 100 a 500 µg/mL no fígado, com um valor de CL₅₀ de 48,00 ± 3,00 µg/ml e Inibição máxima (I_{max}) de 65,10 ± 11,71%. No rim, houve diminuição da peroxidação lipídica em concentrações de 100 e 500 µg/mL com um valor de I_{max} de 32,90 ± 2,62% e no cérebro apresentou um I_{max} de 45,40 ± 14,40%. Além disso, a administração deste óleo por via oral não causou efeitos tóxicos nestes animais.

Nos estudos realizados por Lee e colaboradores (2012), o óleo essencial de folhas de *P. guajava* (goiabeira) teve seu potencial antioxidante avaliado usando ensaio de eliminação de radicais livres (DPPH), poder redutor do ferro (FRAP) e também o ensaio da oxidação (descoloração) do β-caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. O óleo essencial das folhas de goiabeira mostrou uma atividade de eliminação de radicais livres dependente da concentração através da inibição dos radicais DPPH, mas agiu como um antioxidante moderado com valor CI₅₀ de 460,37 ± 1,33 µg/mL. Apresentou também inibição moderada na oxidação do β-caroteno com uma percentagem de inibição de 81,67 ± 1,48%, e no teste do FRAP, apresentou um fraco poder redutor com um a CE₅₀ igual a 5511,94 ± 9,66 µg/mL.

Uma potencial atividade antirradicalar do óleo essencial extraído de folhas frescas de *S. cumini* foi relatada por Elansary e colaboradores (2012), que avaliaram esta propriedade frente a capacidade sequestrante de radicais livres (DPPH). Num estudo comparativo com o óleo essencial de outras espécies vegetais, o óleo essencial de *S. cumini*, apresentou a mais

alta atividade antioxidante total (11,13%). Neste trabalho, os autores sugerem que esta alta atividade poderia ser atribuída à quantidade elevada de α -terpineol e α -pineno presentes na composição do óleo desta espécie.

Os resultados obtidos por Reddy & Jose (2013) também demonstraram que o óleo essencial de folhas de *S. cumini* pode ser considerado uma boa fonte de antioxidantes naturais. Verificaram que a capacidade antioxidante deste óleo (CI₅₀ de 76,4 μ g/mL) foi comparável à encontrada para o padrão, ácido ascórbico (CI₅₀ de 70,4 μ g/mL), indicando que este óleo possui um potencial poder sequestrante de radicais livres frente ao DPPH.

Para o óleo essencial obtido de folhas de *S. malaccense*, Lawal e colaboradores (2014) testaram o poder antioxidante frente ao sequestro de radicais livres (DPPH) e mostraram que este óleo apresentou uma eficaz atividade antioxidante (CI₅₀ de 58,4 mg/L), comparável ao valor obtido com o ácido ascórbico (56,4 mg/L), porém pouco efetivo quando comparado ao antioxidante fenólico BHA (butil-hidroxianisol), que apresentou uma CI₅₀ de 36,1 mg/L.

2.3.3. Atividade antiparasitária

A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, é bastante difundida no mundo e afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas. A tripanossomíase é uma das mais graves endemias do Brasil. O parasita pode ser transmitido aos seres humanos por insetos triatomíneos, alimento contaminado, fezes, via oral, transfusão de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados e o percurso transplacentário de uma mãe contaminada para seu recém-nascido (WHO, 1997). O tratamento desta doença é difícil, pois esses protozoários por serem também eucariotos compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Hoje, o fármaco disponível no mercado brasileiro para o tratamento da doença de Chagas é o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 16).

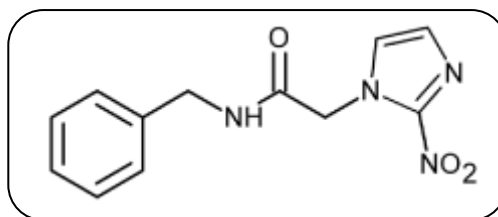


Figura 16: Estrutura molecular do benzonidazol

No entanto, devido à baixa especificidade de ação deste fármacos em vias bioquímicas definidas do parasita, o mesmo apresenta efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes (DIAS *et al.*, 2009). Frente a estas dificuldades, torna-se importante a busca por novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes e apresentem baixa toxicidade. Neste contexto, uma alternativa bastante promissora é o uso de espécies vegetais, com as quais várias pesquisas vêm sendo realizadas para avaliar o efeito de seu uso ou dos seus vários metabólitos para a prevenção e tratamento desta doença (CALIXTO, 2000; SANTOS *et al.*, 2012a).

Muito poucos são os relatos na literatura sobre o potencial tripanocida de extratos, óleos essenciais e seus componentes isolados das espécies de Myrtaceae estudadas neste trabalho.

O primeiro registro da atividade tripanocida de *E. uniflora* foi relatado por Santos e colaboradores (2012a). Estes autores avaliaram a atividade antiepipimastigota e citotóxica, *in vitro*, do extrato etanólico de *E. uniflora* que apresentou CI_{50} de 62,76 $\mu\text{g/mL}$ e uma concentração inibitória mínima (CIM) com valor ≤ 1024 $\mu\text{g/mL}$. O trabalho realizado por Azeredo e colaboradores (2014) demonstrou que o óleo essencial de *E. uniflora* foi efetivo contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando $CI_{50}/24\text{h}$ de 70 $\mu\text{g/mL}$, sendo o primeiro relato na literatura sobre o potencial tripanocida do óleo essencial desta espécie.

Um outro trabalho relatado na literatura apresentou o potencial tripanocida de extrato etanólico de *Syzygium cumini* (jamelão) com CI_{50} de 56,42 $\mu\text{g/mL}$ e uma concentração inibitória mínima (CIM) com valor ≤ 1024 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS *et al.* 2012b). Em todos os relatos, os autores indicaram que estas espécies de Myrtaceae podem ser consideradas fontes de produtos naturais derivados de plantas com atividade antiepipimastigota com baixa toxicidade.

Para três espécies de Myrtaceae estudadas no presente trabalho, *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini*, dados relatados na literatura destacam propriedades antiparasitárias testadas em outros modelos biológicos. Os estudos realizados por Rodrigues e colaboradores (2013) mostraram que o óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, rico em

sesquiterpenos, possuiu significativa atividade leishmanicida em duas fases para *Leishmania amazonenses*, apresentando CI_{50} de 3,04 $\mu\text{g/mL}$ para a forma promastigota e CI_{50} de 1,92 $\mu\text{g/mL}$ para a forma amastigota.

Lee e colaboradores (2013) relataram que o óleo extraído de folhas frescas de *P. guajava* apresentou potencial atividade contra o parasito *Toxoplasma gondii*, sendo considerado superior (CE_{50} de 3,94 $\mu\text{g/mL}$) ao apresentado pelo fármaco Clindamicina ($CE_{50} = 6,24 \mu\text{g/mL}$), usado como controle positivo.

A atividade antiparasitária do óleo essencial das folhas de *S. cumini* foi testada frente a forma promastigotas de *Leishmania amazonenses*. Dias e colaboradores (2013) observaram a maior eficácia da atividade deste óleo após 24 horas de exposição dos parasitos, com um valor de CI_{50} de 36 mg/L , superior ao encontrado com o controle positivo *Glucantime* (7000 mg/L) (atividade confirmada por RODRIGUES *et al*, 2015).

2.3.4. Atividade antimicrobiana

Produtos químicos utilizados na agricultura para controlar pragas e doenças de plantas, os agrotóxicos são conseqüentemente os responsáveis pelo aumento da produção agrícola e pelo crescimento da população. No entanto, o uso indiscriminado destes produtos químicos tem trazido uma gama de efeitos indesejáveis para os seres humanos e ao meio ambiente (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012) e colocou, em 2009, o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos (RANGEL *et al*, 2011). Neste contexto, a busca de novas substâncias é necessária para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de pragas e baixo impacto ambiental (MARANGONI *et al*, 2012).

As propriedades antifúngicas dos óleos essenciais os tornam uma alternativa interessante no controle de agentes fitopatogênicos, pragas agrícolas e plantas infestantes, considerando a importância da fitossanidade na agricultura (OATANI *et al*, 2013). Trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais de plantas medicinais têm demonstrado forte potencial no controle de fitopatógenos devido ao seu modo de ação fungitóxica direta, atuando na inibição do crescimento micelial e retardando ou interferindo na germinação de esporos e na indução de fitoalexinas (KNAAK & FIUZA, 2010).

Os óleos essenciais, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, são também de grande interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, desde que surgiu a possibilidade de sua utilização como substitutos naturais dos conservantes sintéticos (BAKKALI *et al*, 2008). Alguns autores discutem que tais propriedades se devem a sua característica lipofílica. A hidrofobicidade do óleo essencial permite uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (KALEMBA & KUNICKA, 2003; BAKKALI *et al*, 2008 ; MAIA *et al*, 2015).

Recentemente, o uso de extratos de plantas como agentes com atividade antioxidante e antimicrobiana tem sido de extrema importância para os alimentos, pois podem ser utilizados como aditivos alimentares, fornecendo proteção contra reações oxidativas, além de proteger contra microrganismos deteriorantes e patogênicos. Microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos, são reconhecidos por serem causadores de diversas infecções em humanos (MAIA *et al*, 2015).

Vários relatos na literatura indicam que os óleos essenciais de espécies de Myrtaceae aqui estudadas possuem algum grau de atividade antimicrobiana frente aos mais variados microrganismos patogênicos.

No trabalho de Costa e colaboradores (2010) demonstrou-se a influência da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *E. uniflora*, com diferentes cores de frutos, na atividade fungicida frente ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis* pela técnica de macro diluição em caldo. O resultado mais significativo foi obtido com o óleo do grupo II (pitangueira de frutos vermelhos claro), que apresentou como majoritários os sesquiterpenos curzereno e os germacrenos D e A, sendo inibido completamente na concentração de 62,5 µg/ mL.

Para um óleo essencial de *E. uniflora* rico em selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, atractilona, furanodiona e curzereno, BRUN e MOSSI (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana, pelo método da difusão em disco, contra 20 microrganismos, sendo eles bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* e Gram-negativas *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas campestris* e *Yersinia enterocolitica*, demonstrando que somente as bactérias que apresentaram

sensibilidade frente ao óleo foram as Gram-positivas: *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis* e a Gram-negativa *Xanthomonas campestris*.

Para testar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*, Lago e colaboradores (2011) testaram estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus equi* e *Staphylococcus epidermidis*, e leveduras do gênero *Candida*: *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e do gênero *Cryptococcus*: *C. grubii*, *C. gattii*, *C. neoformans* e uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, que foram submetidas a um ensaio de difusão em disco. O óleo analisado, rico em curzereno e germacreno B, exibiu atividades antimicrobianas interessantes contra várias bactérias Gram-positivas, principalmente *S. equi* e *S. epidermidis*, além de apresentar atividade contra todas as cepas de leveduras testadas. Segundo os autores, estes resultados sugerem que a atividade observada pode estar relacionada com a composição específica de sesquiterpenos no óleo e indicaram claramente que o mesmo pode ser explorado como agente antibacteriano e fungicida.

Das folhas de um exemplar da espécie *E. brasiliensis* foi extraído o óleo essencial rico nos sesquiterpenos espatulenol, τ -cadinol e viridiflorol, que apresentou potencial atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, com um valor da concentração inibitória mínima (CIM) de 156 $\mu\text{g/mL}$ (MAGINA *et al*, 2009). Para a mesma espécie, Siebert e colaboradores (2015) demonstraram que nenhum dos óleos essenciais testados, que também apresentavam como majoritários o espatulenol e τ -cadinol, foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, tendo uma CIM superior a 1.000 mg/mL , indicando que é possível que a atividade dos componentes principais é modulada por outras moléculas presentes em pequenas proporções (BAKKALI *et al*, 2008).

De acordo com estudos realizados na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *P. cattleianum*, Castro e colaboradores (2015) demonstraram que o óleo apresentou atividade antifúngica significativa frente a cepas de *Candida albicans*, confirmando os dados relatados anteriormente por Apel e colaboradores (2006).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *P. guajava* tem sido seletivamente avaliada por diferentes pesquisadores. Sacchetti e colaboradores (2005) relatam que o óleo essencial extraído das folhas de *P. guajava* mostrou forte resistência contra a levedura *Yarrowia lipolytica*. Uma forte ação inibitória também foi observada frente aos microrganismos *S. aureus* e *Salmonella* sps e *Bacillus cereus* (GONÇALVES *et*

al, 2008; JOSEPH & PRIYA, 2010, VAZQUEZ-CAHUICH *et al*, 2013). Nos resultados publicados por Joseph e colaboradores (2010) é destacado o significativo efeito inibitório do óleo essencial desta espécie contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas fluorescens*. Os resultados dos testes antimicrobianos realizados por Nisha e colaboradores (2011) mostraram que o óleo tinha uma potencial atividade antimicrobiana contra estirpes bacterianas, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp, *Enterococcus aerogenes*, *Acinetobacter* spp (Gram-positivas) e *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativas).

Para as espécies do gênero *Syzygium*, Reddy & Jose (2013), corroborando estudos anteriores (SHAFI *et al*, 2002; ELANSARY *et al*, 2012), avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *S. cumini* L. contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Enterobacter faecalis*, *Salmonella paratyphi*, e Gram-negativas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, pelo método de difusão em disco. O óleo essencial exibiu pronunciada atividade contra todas as bactérias testadas tendo sua atividade completamente comparável com os antibióticos convencionais, tais como a Tobramicina, Sulfato de Gentamicina, Ofloxacina e Ciprofloxacina, avaliados sob condições semelhantes.

Em testes de inibição do crescimento micelial realizados com fungos fitopatógenos, o óleo essencial extraído de folhas de *S. cumini* foi mais efetivo contra o fungo *Alternaria alternata* (CE₅₀ de 115 mg/L), enquanto que contra os fungos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* se mostrou menos efetivo com CE₅₀ de 402, 724 e 970 mg/L, respectivamente (BADAWY & ABDELGALEIL, 2014). Nos resultados apresentados por Siddique e colaboradores (2016) o óleo essencial das folhas frescas de *S. cumini* apresentou boa atividade antifúngica nos ensaios realizados pelo método da difusão em disco contra cinco espécies de *Aspergillus*, três espécies de *Fusarium*, e também contra o *Penicillium digitatum*.

Quando comparado ao antibiótico gentamicina, o óleo essencial de folhas de *Syzygium malaccensis* apresentou moderada atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em disco, frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Citrobacter youagae*, *E. coli*, *Kiebsiella* spp, *Micrococcus* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp, *Mucor mucedo* e *Rhizopus stolonifer* (LAWAL, 2014).

2.4. Análise Multivariada

O tratamento de dados matemáticos e estatísticos para relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados tem sido facilitado pelos recursos dos métodos computacionais que incorporam as técnicas instrumentais modernas. Neste campo, muita ênfase tem sido dada aos sistemas de análise multivariada, que permitem processar e correlacionar muitas variáveis simultaneamente, levando a interpretação dos dados e aquisição do máximo de informações sobre o sistema analítico.

Assim, a quimiometria é uma ferramenta que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas experimentais, extrair o máximo de informações relevantes a partir da análise de dados químicos, e obter o conhecimento sobre os sistemas químicos estudados (MASSART, 1998).

De uma maneira geral, o conjunto de dados químicos (dados cromatográficos neste trabalho) consiste de n objetos, descrito por p variáveis. Os objetos químicos são as amostras analisadas (óleos essenciais), e as variáveis são as medidas efetuadas sobre os constituintes químicos dos objetos (por exemplo, áreas dos picos cromatográficos, concentrações dos componentes).

2.4.1. Métodos de Análise de Componentes Principais (ACP) e de Agrupamento Hierárquico (AAH)

A análise de componentes principais (ACP) consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. A finalidade do ACP é gerar novas variáveis (chamada de componentes principais) a partir das variáveis originais; então as novas variáveis são usadas para analisar os dados por meio de algum tipo de projeção geométrica ou representação. Em ACP as novas variáveis são calculadas levando em conta as correlações presentes nos dados, mas elas mesmas não são correlacionadas entre si. Em outras palavras, as n -variáveis originais geram através de suas combinações lineares, n -componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que sejam obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e, assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras pois, embora a informação estatística presente nas n -variáveis originais seja a mesma dos n -componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras

componentes principais mais que 90% desta informação. O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço n-dimensional. A redução da dimensionalidade do conjunto de dados leva a uma diminuição na complexidade das informações analisadas, tornando-as de mais fácil compreensão. A análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico (TEÓFILO, 2013). Dois tipos de gráfico são gerados na análise por ACP, o gráfico de *scores* e o gráfico de *loadings* (Figura 17). Em geral quase todas as matrizes de dados podem ser simplificadas por ACP, desde que estejam devidamente escalonadas.

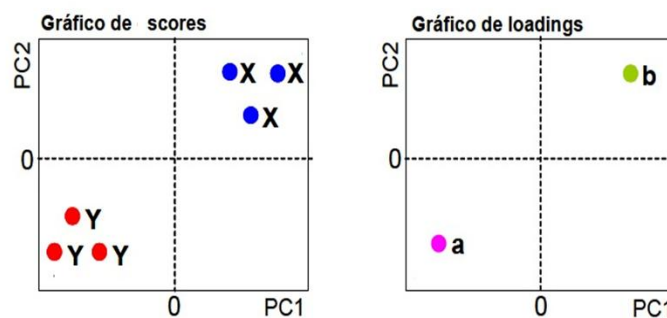


Figura 17. Esquema ilustrativo de gráfico de *scores* e *loadings* (adaptado de BOFFO, 2009)

A técnica de análise de agrupamentos hierárquicos (AAH) tem como objetivo formar grupos homogêneos de unidades amostrais, com base em similaridades dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de uma classe diferente. A AAH interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (Figura 18). A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (MOITA & MOITA, 1998).

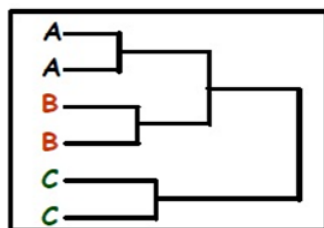


Figura 18. Esquema ilustrativo de classificação por Análise de Agrupamentos Hierárquicos.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de seis espécies de Myrtaceae cultivadas no Jardim Botânico da UFRRJ.

3.1. Objetivos Específicos

- Extrair através da técnica de hidrodestilação o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), *Eugenia brasiliensis* Lam (grumixameira), *Psidium cattleianum* Sabine (araçazeiro), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* (jamelão) e *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (jambeiro vermelho);
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais obtidos das seis espécies de Myrtaceae por CG-FID e CG-EM;
- Verificar a influência da idade das folhas (jovem e madura) de *E. uniflora* na composição química do óleo essencial;
- Avaliar a composição química dos óleos essenciais através da análise multivariada (Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos Hierárquicos);
- Isolar e caracterizar através de métodos espectroscópicos os principais constituintes do óleo essencial de *E. uniflora*;
- Submeter os óleos essenciais aos ensaios de atividade antioxidante, antifúngica, larvicida e tripanocida.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção do material vegetal

As espécies *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), *Eugenia brasiliensis* Lam (grumixameira), *Psidium cattleianum* Sabine (araçazeiro), *Psidium guajava* L. (goiabeira),

Syzygium cumini (jamelão) e *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (jambeiro vermelho) da família Myrtaceae foram coletadas, em diferentes meses dos anos de 2013, 2014 e 2105, no Jardim Botânico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A coleta e classificação contaram com o apoio da Prof^a Dr^a Denise Monte Braz e demais colaboradores do Departamento de Botânica – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFRRJ, sendo que as espécies utilizadas foram identificadas e uma exsicata de cada planta se encontra armazenada em herbário da própria instituição sob nº RBE 2364 (*E. uniflora*), RBE 2366 (*E. brasiliensis*), RBE 2361 (*P. cattleianum*), RBE 2365 (*P. guajava*), RBE 2367 (*S. cumini*) e RBE 2363 (*S. malaccense*).

As folhas frescas foram coletadas da parte aérea de um mesmo exemplar de cada planta, sempre no período entre 8 e 9 horas da manhã, foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais para a realização do processo de hidrodestilação.

Para avaliar a possível variabilidade na composição química do óleo essencial de *E. uniflora*, em função da idade das folhas, foram coletadas folhas maduras (de coloração verde escuro) e folhas jovens (de coloração bronze), coletadas 20 dias após as folhas maduras (Figura 19).



Figura 19. Coloração das folhas frescas de *E.uniflora*: (a) folhas maduras e (b) folhas jovens

4.2. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos das folhas frescas de cada espécie de planta. Após a coleta, as folhas de cada espécie (100 g) foram trituradas separadamente com pequena

quantidade de água destilada em um liquidificador semi-industrial. Após triturado, o material vegetal foi transferido para um balão de destilação (capacidade de 1,0 L), juntamente com 500 mL de água destilada, e foi submetido à hidrodestilação utilizando aparelhagem tipo Clevenger, por um período de 4 h, contadas a partir do início do refluxo da água condensada, do tubo separador para o balão de destilação. O hidrolato obtido (mistura do óleo essencial + água) foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, utilizando diclorometano (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas sob sulfato de sódio anidro e em seguida, filtradas e evaporadas com fluxo de nitrogênio. Os óleos essenciais foram recolhidos e armazenados em frasco de vidro âmbar a 4 °C e ao abrigo da luz. O rendimento de cada óleo essencial foi calculado e expresso em porcentagem com base de massa de óleo obtida por massa de folhas frescas (% m/m). As extrações para cada espécie de planta foram realizadas em triplicatas usando 100g de material vegetal.

4.3. Análises da composição química dos óleos essenciais

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada pela combinação de duas técnicas: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em chama (CG-DIC) e Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada em Cromatógrafo a gás (modelo GC-17A - Shimadzu) acoplado ao Espectrômetro de Massa (QP2010 Plus - Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida *Factor Four-VF-5ms* (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano, Varian) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme; temperatura do injetor de 220 °C, gás de arraste hélio na vazão de 1 mL min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 1,0 µL (óleo essencial solubilizado em diclorometano) com a razão de *split* 1:30.

Foi utilizada programação de temperatura de 60 °C a 260 °C (3 °C min⁻¹), depois um aumento de 10 °C/min até 290 °C, finalizando com 290 °C/5 minutos. Totalizando uma análise de 77 min.

O espectrômetro de massa operou nas seguintes condições: detector operando por impacto de elétrons com energia de 70 eV, temperatura da interface de 310 °C, temperatura da fonte de ionização 220 °C e fragmentos detectados na faixa de varredura de 40 a 500 Da no modo *scan*.

As análises quantitativas dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas por CG-DIC (equipamento Agilent HP-5890-Série II) com mesma coluna e condições experimentais, porém a temperatura do detector foi fixada a 250 °C, e os gases utilizados foram hidrogênio (40mL/min) e ar sintético (400mL/min). A quantificação relativa (%) de cada componente no óleo foi estimada com base na normalização das áreas dos picos pelo DIC (percentagem da área do pico em relação à área total dos picos no extrato).

O software utilizado para tratamento dos dados é o CG-EM Solution (Shimadzu) versão 2.53 SU3.

A identificação das substâncias do óleo essencial foi realizada por meio de seus índices de retenção (IR), calculados para cada constituinte a partir da injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos lineares (C₈-C₂₀) nas mesmas condições da amostra. Cada pico do cromatograma foi também identificado pela comparação dos seus espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas do sistema CGEM (NIST08) e pela consulta da literatura especializada (ADAMS, 2007).

4.4. Isolamento dos constituintes do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*

As substâncias de interesse foram isoladas do óleo essencial, obtido das folhas jovens ou maduras de *E. uniflora*, através de Cromatografia Líquida de Adsorção em gel de sílica, em coluna *flash* (CC). Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em colunas de vidro, utilizando como fase estacionária gel de sílica com partículas entre 63-200 µm (230-400 mesh, Vetec, RJ). Cerca de 100 mg do óleo, na forma de pastilha, foi aplicado no topo da coluna recheada com 70 g de gel de sílica, adicionada como uma suspensão em éter de petróleo. Para a separação dos constituintes da folha madura a fração menos polar contendo hidrocarbonetos foi eluída com éter de petróleo, enquanto para a folha jovem uma eluição sucessiva com uma mistura de éter de petróleo: AcOEt (90:10, v/v) forneceu a fração mais polar. As frações foram analisadas por CCDA (gel de sílica 60 com indicador de fluorescência F₂₅₄, com suporte de alumínio, e eluente éter de petróleo e acetato de etila) e reunidas conforme a semelhança, e os solventes foram removidos usando uma corrente de N₂. A visualização das substâncias na CCDA foi feita sob a luz ultravioleta 254 nm, e a revelação foi feita utilizando solução de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento. Após o fracionamento cromatográfico, três substâncias foram isoladas: germacrona, curzereno e o furanodieno que foram, posteriormente, analisadas por CG-DIC, CG-EM (item 4.3) e CLAE-DAD (item 4.5).

4.5. Análise por CLAE-DAD das substâncias isoladas do óleo de *E. uniflora*

As substâncias isoladas do óleo essencial de *E. uniflora* foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Para estas análises foi utilizado um cromatógrafo Prominence (Shimadzu) equipado com duas bombas (modelo LC-20AT), com detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), sistema de injeção automático (Sil-10A), forno de coluna (CTO) e sistema de aquisição e tratamento de dados *LCSolutions* (Shimadzu). As substâncias, solubilizadas em acetonitrila, foram analisadas em uma coluna de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm D.I × 5µm, Betasil, Thermo) com sistema isocrático de eluição, tendo como fase móvel acetonitrila: água (78:22, v/v). As análises foram realizadas com fluxo de 1,2 ml min⁻¹, comprimento de onda de 214 nm e temperatura do forno de 28,7 ° C. A pureza das substâncias foi determinada através da área de pico da amostra de interesse dividida pela área total de todos os picos no cromatograma.

4.6. Análise por Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C, uni- e bidimensional foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance III, operando a 500 MHz para RMN de ¹H e 125 MHz para RMN de ¹³C. Os espectros das substâncias isoladas foram registrados em acetona-d₆ ou CDCl₃, tendo como referência interna o sinal do TMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete). As constantes de acoplamentos (*J*) foram registradas em Hertz (Hz).

4.7. Tratamento estatístico dos dados de CG-EM

Para examinar a variabilidade da composição química do óleo extraído das folhas das espécies estudadas foram realizados a Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH), utilizando o software The Unscramble® 10.3. Um tratamento envolveu a análise estatística entre os dados obtidos por CG-EM das folhas jovens (FJ) e maduras (FM) de *E. uniflora* onde os valores de porcentagem em área (% área) foram convertidos em uma matriz de dados (10 amostras X 33 variáveis) para a construção dos gráficos de ACP e AAH utilizando dez amostras dos óleos (cinco da extração por hidrodestilação das folhas jovens-FJ e cinco das folhas maduras-FM) e 33 variáveis (substâncias identificadas nos óleos, numeradas de **1 a 33** – Tabela 2). Para o segundo

tratamento foi construída uma matriz de dados com a média dos valores das porcentagens em área (% área) das substâncias identificadas (115 variáveis, numeradas de **1 a 115**, Tabelas **2-7**) nos óleos extraídos das folhas das 6 espécies em estudo (6 amostras). A AAH foi realizada para estudar as semelhanças entre as amostras com base na distribuição de componentes químicos do óleo essencial. Para a obtenção do dendograma da AAH foram utilizadas a distância Euclidiana quadrática e o método de variância mínima de Ward.

4.8. Atividade larvicida

O objetivo deste ensaio foi avaliar a atividade larvicida e eficácia comparativa dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae: *Eugenia uniflora* L., *Eugenia brasiliensis* Lam, *Psidium cattleianum*, *Psidium guajava* L. e *Syzygium cumini*, frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* L.

Os ensaios foram realizados pela Dra. Sabrina Rita F. Rezende, pós-doutoranda do Departamento de Química (DEQUIM) da UFRRJ, e desenvolvidos usando metodologia recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

A população de *A. aegypti* cepa *Rockfeller* foi mantida em laboratório a 27 ± 1 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %. Os ovos foram colocados para eclodir em potes plásticos com 1 L de água desclorada. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas diariamente com ração para peixe (Nutriflakes, Nutriconpet). A atividade larvicida foi realizada em quadruplicata em copos plásticos de 50 mL, onde foram adicionadas 10 larvas de 3º instar em 10 ml de água desclorada. O óleo essencial foi diluído em solução aquosa de DMSO 2% e distribuídos nos copos. As concentrações dos óleos variaram de 0,01 a, 0,30 µg/µL. A mortalidade das larvas foi verificada após 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h de exposição ao óleo. Paralelamente, foram feitos controles com água e DMSO 2%. Para o cálculo da porcentagem de mortalidade utilizou-se o programa *Prisma 5.0* e a CL_{50} (definida como a concentração do óleo necessária para matar 50% das larvas em 24 h) foi calculada pela Análise de *Probit* através do programa *Biostat*.

4.9. Atividade antioxidante utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

A atividade antioxidante frente a um modelo biológico foi realizada pela equipe coordenada pelo Prof.Dr. Cristiano J. Riger, do setor de Bioquímica do DEQUIM-UFRRJ, utilizando células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para a realização dos

testes foi utilizada a cepa BY4741 com genótipo *MATa; his3; leu2; met15; ura3* adquirida da empresa Euroscarf (Frankfurt, Alemanha).

A cepa estocada foi mantida em meio YPD sólido 2%, contendo 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) de glicose, 2% (m/v) de peptona e 2% (m/v) de ágar. Para os experimentos, as células foram crescidas em meio YPD 2% líquido, em um agitador orbital a 28°C e 160 rpm com uma razão de 5:1 volume do frasco:meio de cultura. Como agente de indução de oxidação foi utilizado 0,5 mM de peróxido de hidrogênio (E. Merck). A concentração celular foi determinada pela medida da absorbância da suspensão de células a 570 nm. O fator de conversão da absorbância em concentração celular foi calculado pela filtração de 10 mL da suspensão celular através de um filtro Millipore (0,45 µm) e desidratação a 80 °C até peso constante.

- **Tolerância Celular**

As células cresceram até o meio da 1ª fase do crescimento celular (em torno de 1,0 mg peso seco de células/mL) e foram incubadas nas concentrações de 10 e 100 µg/mL dos óleos essenciais das espécies em estudo, por 60 min a 28 °C e 160 rpm. A solução dos óleos essenciais foi preparada previamente em dimetilsulfóxido (DMSO); portanto, durante os experimentos envolvendo incubação das células, manteve-se uma suspensão celular incubada pelo mesmo período apenas com o solvente DMSO (1%). Além disso, uma segunda suspensão celular livre de DMSO e óleos essenciais foi utilizada como controle para os experimentos. Após esse período foi retirada uma alíquota das diferentes suspensões celulares e após diluições seriadas foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio YPD 2%. As placas foram mantidas em estufa BOD a 30 °C e, após 72 horas, foi avaliada a capacidade das células de formar colônias (UFC).

- **Estresse Oxidativo e Viabilidade Celular**

As células cresceram até o meio da 1ª fase do crescimento celular (em torno de 1,0 mg peso seco de células/mL) e foram incubadas na concentração de 100 µg/mL dos extratos brutos das plantas por 60 min a 28 °C e 160 rpm. Após esse período as células foram recolhidas por centrifugação a 4 °C, lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em meio de cultura velho livre de células, contendo solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,5 mM. Manteve-se um ensaio apenas com a suspensão celular (controle) e outro com a suspensão celular e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com células que não

tiveram o pré-tratamento com as soluções dos óleos essenciais das plantas. Todas as suspensões permaneceram por 60 min a 28 °C e 160 rpm em um agitador orbital e após esse período foi retirada uma alíquota das diferentes suspensões e aplicada em placas de Petri contendo meio sólido YPD 2% e YPGly 4% (4% glicerol, 2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% ágar), após as devidas diluições seriadas. O meio YPGly foi usado para testar a formação de células petite (ADAMIS *et al*, 2004). As placas foram mantidas em estufa BOD a 30 °C e as colônias (UFC) foram contadas após 72 horas.

- **Disfunção Mitocondrial**

A determinação do efeito mutagênico do peróxido de hidrogênio foi calculada pela taxa de formação de células petite (mutantes que são incapazes de crescer em fontes de carbono não fermentáveis, como glicerol, devido à baixa função mitocondrial). A percentagem de colônias foi obtida com os resultados de viabilidade celular obtidos nos meios YPD e YPGly.

$$\text{n}^\circ \text{ de petites (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de colônias YPD}) - (\text{n}^\circ \text{ de colônias YPGly})}{\text{n}^\circ \text{ de colônias em meio YPD}}$$

Os resultados são apresentados como uma média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o programa *Prisma 5.0*, aplicando o teste de Tukey para comparação entre duas médias e uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparação entre mais de duas médias. A significância estatística foi determinada a $p < 0,05$.

- **Oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método TBARS foram selecionados o óleo essencial de *E. uniflora* e seu isolado furanodieno, uma vez que há muito pouco acerca da bioatividade dos principais constituintes isolados do óleo essencial extraído das folhas desta espécie.

Para a dosagem do nível de peroxidação lipídica foi preparado um extrato celular, utilizando-se ácido tricloroacético 10% e pérolas de vidro. Após o rompimento da membrana por agitação em vórtex, centrifugou-se a suspensão celular retirando-se alíquotas

do sobrenadante para o ensaio de peroxidação, onde foi adicionado EDTA, água e ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram incubadas a 100 °C por 15 min e, após resfriamento, a absorbância do produto formado foi lida a 532 nm. O produto gerado é o resultado da reação do ácido tiobarbitúrico e o produto gerado pela peroxidação dos lipídios de membrana - malondialdeído (MDA). Os valores de absorbância foram transformados em pmol de produto formado (MDA). Os resultados são expressos como uma relação entre o nível de peroxidação lipídica de células expostas ao peróxido de hidrogênio, células não estressadas (controle) e células expostas ao peróxido após pré-incubação com as soluções do óleo essencial de pitanga e do isolado furanodieno (STEELS *et al.*, 1994).

- **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como uma média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o programa *Prisma 5.0*, aplicando o teste de Tukey para comparação entre duas médias e uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparação entre mais de duas médias. A significância estatística foi determinada a $p < 0,05$.

4.10. Atividade antiparasitária

Os ensaios de avaliação da atividade antiparasitária dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae foram realizados pela equipe coordenada pela Profa.Dra. Débora Decote R. de Lima, do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Para este ensaio, foram selecionados os óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L., *Eugenia brasiliensis* Lam, *Psidium cattleianum* (que apresentaram comportamentos distintos entre si nos testes com a levedura *S. cerevisiae*), e o furanodieno (sesquiterpeno oxigenado majoritário isolado do óleo essencial de *Eugenia uniflora*) para avaliação referente ao possível potencial tripanocida frente a formas epimastigotas do parasita (forma encontrada no tubo digestivo do vetor, e que não é infectante para os vertebrados).

- **Ensaio de citotoxicidade**

Um teste preliminar com os óleos essenciais das três espécies selecionadas foi realizado para avaliar possível ação citotóxica frente células humanas. Células mononucleares totais de sangue periférico foram cultivadas na concentração de 2×10^5 células/poço em um volume de 150 μ L. As células foram tratadas com os óleos essenciais

nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL. As amostras foram lidas após a incubação por 24 h em estufa (37°C a 5% CO₂). O DMSO foi usado como diluente dos óleos essenciais na concentração de 1,6%. Foi adicionado 50 µL de XTT em cada amostra antes da leitura. O XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) é um corante de sais de tetrazólio utilizados para distinguir as células vivas das células mortas. Eles são reduzidos à formazana pelo sistema de citocromo das células viáveis e a cor resultante é uma medida direta da viabilidade celular. Seis experimentos independentes foram realizados em triplicata.

- **Ensaio da atividade tripanocida**

Foram utilizadas formas epimastigotas clone Dm28c, cultivadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*), suplementado com Soro Fetal Bovino 10%. Uma solução destas formas epimastigotas, concentrada a $2,5 \times 10^5$ parasitos/mL, foi aplicada em placas para cultura celular de 48 poços. Em seguida, uma solução em DMSO de benzonidazol e dos óleos essenciais, na concentração de 40 µg/mL, e do furanodieno nas concentrações em série de 3, 30, 60, 90, 150 e 200 µg/mL, foram adicionadas aos poços. Empregaram-se dois tipos de controle para este experimento: um controle positivo apenas com os parasitos em meio de cultura e como controle do veículo a solução dos parasitos adicionada de DMSO. A placa foi lacrada, e mantida em condições de estufa BOD (27 °C), por um período de sete dias. Após este período, foi realizada a contagem dos parasitos, diluídos em azul de *trypan*, utilizando câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Para o furanodieno, a média de pelo menos dois experimentos independentes foi usada para calcular o valor CI₅₀, usando o software ED50plus v1.0.

4.11. Atividade antifúngica

Este ensaio foi realizado pelo Prof.Dr. Marco Andre A. Souza, do setor de Bioquímica do DEQUIM-UFRRJ, através do método de difusão em ágar, que é a técnica mais comum de avaliação de atividade antimicrobiana. O método é reconhecido como preciso e confiável, com o qual é possível calcular o grau de inibição do crescimento de microrganismos e as suas alterações morfológicas de uma forma simples (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Discos com 0,6 cm de diâmetro, contendo estruturas reprodutivas do fungo *Fusarium oxysporum*, obtido na coleção do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ (código FUS4514),

foram repicados para o centro das placas contendo meio nutritivo BDA (10% dextrose), previamente vertido e solidificado. Em seguida, as placas foram fechadas, lacradas com filme de PVC e incubadas em câmara com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas. Os tratamentos consistiram na adição das soluções de DMSO + óleos essenciais no meio nutritivo BDA. A concentração dos óleos essenciais no meio nutritivo foram de $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ (0,01 %) e de DMSO foi de $8 \mu\text{L}/\text{mL}$ (0,8%). Foram preparados dois controles negativos, um apenas com o meio nutritivo BDA e outro com 0,8% de DMSO. Um controle positivo foi preparado, com adição direta do fungicida comercial Folicur (tebuconazole 20%) ao meio de cultura, à concentração de $1 \mu\text{L}/\text{mL}$.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação as placas foram digitalizadas e as imagens processadas no programa ImageJ v.1,49 (National Institute of Health, USA) para a aquisição da área de crescimento do halo fúngico (em cm^2). A inibição foi obtida através da equação: $I(\%) = 100 - (A_{\text{OE}} \times 100 / A_{\text{C}})$. Onde: I (inibição), A_{OE} (área dos tratamentos com óleos essenciais), A_{C} (área do controle). A análise de variância, o teste de médias e os gráficos foram realizados no programa GraphPad prism v. 6,01.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração dos óleos essenciais

Na tabela 1 estão apresentados os rendimentos dos óleos essenciais e o percentual das classes de substâncias presentes nos óleos, e calculadas em relação ao conjunto total de tipos de terpenoides (determinado por CG-DIC para os óleos, considerando-se sua abundância relativa nos cromatogramas).

Tabela 1: Rendimento médios e classes de substâncias dos óleos essenciais em estudo

	<i>E. uniflora L.</i>		<i>E. brasiliensis</i>	<i>P. cattleianum</i>	<i>P. guajava</i>	<i>S. cumini</i>	<i>S. malaccense</i>
	FJ	FM					
Rendimento (%)	0,55	0,67	0,39	0,38	0,47	0,09	0,013
Total Monoterpenos (%)	0,73	2,94	8,47	4,16	1,20	62,80	0,55
Total Sesquiterpenos (%)	95,34	93,02	86,06	83,33	95,77	33,65	16,95
Outros grupos	0,17	1,18	0,08	0,93	1,41	1,46	45,63
Total identificado (%)	96,24	97,14	94,61	88,42	98,38	97,91	63,13

Na extração dos óleos essenciais das folhas das diferentes espécies de Myrtaceae utilizando o método de hidrodestilação, observou-se que o rendimento variou de 0,09 a

0,67% em relação a massa de folhas frescas (% m/m). As duas espécies do gênero *Syzygium* apresentaram o menor teor de óleos essenciais, enquanto que os maiores rendimentos foram obtidos para as folhas de *E. uniflora*. Os resultados encontrados, estão em conformidade com os obtidos na literatura que relatam que rendimentos superiores a 1% não são muito comuns em espécies desta família (MAY *et al*, 2007). À exceção, destacam-se os baixos rendimentos em óleo essencial apresentados para as duas espécies do gênero *Syzygium* no presente trabalho, que não são corroborados pelos relatos da literatura consultada. Ismail e colaboradores (2010), submetendo folhas frescas de *S. malaccense* a duas horas de hidrodestilação, obtiveram um rendimento cerca de 30 vezes maior (0,29%) ao obtido no presente estudo, em 4 horas de extração.

Observou-se uma predominância de sesquiterpenos na maioria dos óleos essenciais, exceto para o da espécie *S. cumini* (jamelão) que foi rico em monoterpenos e para o óleo essencial de *S. malaccense* cuja predominância foi de substâncias não pertencentes à classe dos terpenos (Tabela 1 e Figura 20).

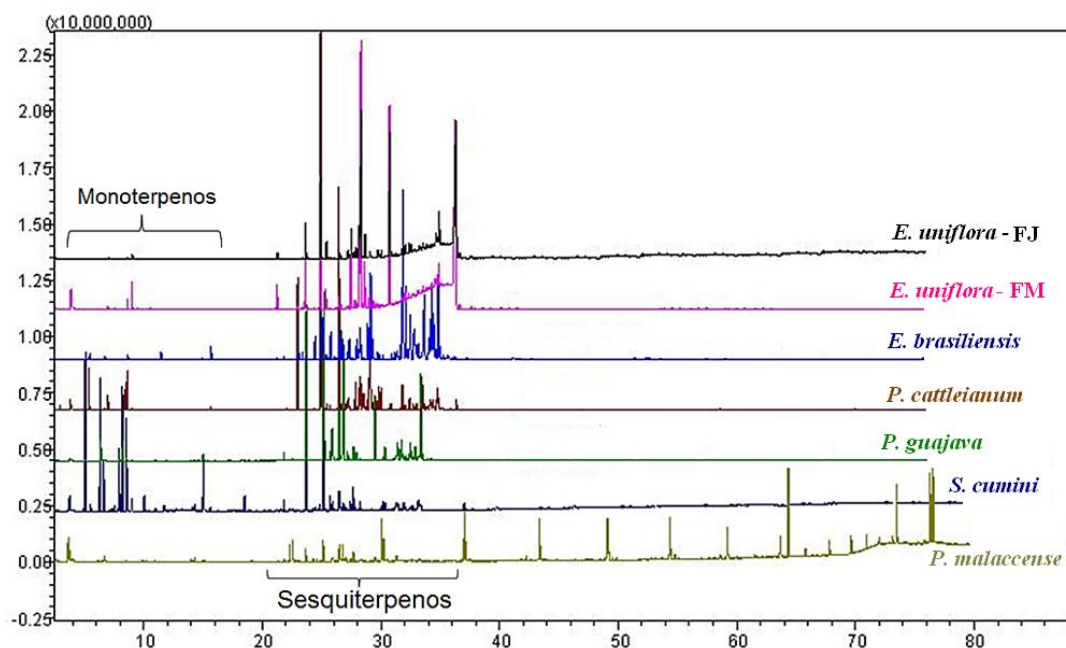


Figura 20. Perfil cromatográfico dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae

É amplamente discutido na literatura que a produção de óleos essenciais pelas plantas pode ser diretamente afetada por fatores ambientais. Quando comparado com dados da literatura, observou-se que existem diferenças entre as espécies estudadas, que podem estar ligadas as condições climáticas e a natureza do solo que influenciam diretamente tanto no teor como nos constituintes químicos de um óleo essencial (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

5.2. Análise da composição química dos óleos essenciais

As análises por Cromatografia em Fase Gasosa para os óleos essenciais das seis espécies de Myrtaceae apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas com relação aos principais constituintes químicos. Ressalta-se que a identificação das substâncias foi feita através de CG-EM e a quantificação por CG-DIC.

- *Eugenia uniflora*

Através da análise de CG-EM e de CG-DIC dos óleos essenciais das folhas maduras (a) e jovens (b) de *E. uniflora* observou-se a presença de 36 substâncias para as folhas maduras e 28 para as folhas jovens, das quais foram identificados 31 e 24 constituintes, respectivamente (Figura 21).

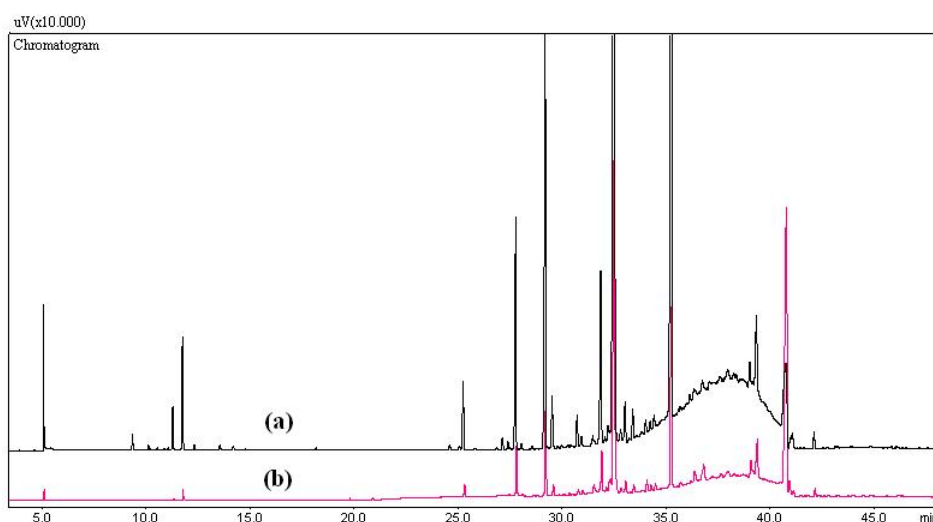


Figura 21. Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas maduras (a) e jovens (b) de *E. uniflora*

Os óleos essenciais das folhas maduras e jovens são formados por uma pequena proporção de monoterpenos, e majoritariamente por sesquiterpenos (Tabela 1, pag. 45). A variação quantitativa e qualitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais nos dois tipos de folhas de *E. uniflora* estão apresentados na Tabela 2, onde estão apresentados os principais constituintes encontrados nas folhas de *E. uniflora*, e pela qual se pode observar que houve variações na composição, bem como nos teores entre as duas amostras.

Cabe destacar que esta foi a primeira vez que foi realizada uma análise da composição química do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* com diferentes fases de maturação (SANTOS et al, 2015).

Tabela 2: Composição química do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	Folhas Maduras		Folhas Jovens	
		IR ^(c)	% Área±dp	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
859	(1) Hexenol (3Z)	848	1,18±0,54	854	0,17±0,13
990	(2) Mirceno	986	0,19±0,06	-	-
1037	(3) β-Ocimeno (Z)	1032	0,45±0,23	1036	0,18±0,09
1050	(4) β-Ocimeno (E)	1043	2,30±0,60	1049	0,55±0,11
1338	(5) δ-Elemeno	1334	1,55±0,25	1338	0,64±0,19
1376	(6) α-Copaeno	1375	0,27±0,06	-	-
1390	(7) β-Elemeno	1388	4,76±0,32	1392	3,26±0,78
1419	(8) β-Cariofileno	1420	9,35±0,71	1424	6,02±1,93
1436	(9) γ-Elemeno	1428	1,55±0,44	1433	1,01±0,36
1454	(10) α-Humuleno	1456	0,95±0,22	1460	0,37±0,26
1466	(11) Cariofileno 9- <i>epi-E</i>	1461	0,30±0,09	1464	0,23±0,07
1477	(12) γ-Gurjeneno	1473	0,33±0,12	1477	0,61±0,18
1485	(13) Germacreno D	1482	4,13±0,29	1491	2,78±0,56
1490	(14) β-Selineno	1487	0,99±0,28	1492	1,02±0,26
1496	(15) Viridifloreno	1490	0,53±0,21	1495	0,87±0,27
	Não identificado	-	-	1496	1,96±0,37
1499	(16) Curzereno	1496	22,37±1,08	1499	16,60±1,49
	Não identificado	1503	0,37±0,06	-	-
1509	(17) Germacreno A	1509	2,80±0,46	1513	1,86±0,32
1523	(18) δ-Cadineno	1518	0,81±0,08	1533	0,54±0,15
	Não identificado	1528	0,37±0,09	-	-
	Não identificado	1533	0,47±0,14	-	-
1538	(19) α-Cadineno	1538	0,29±0,11	1538	0,67±0,17
	Não identificado	-	-	1543	0,43±0,10
1546	(20) Selina-3,7(11)-dieno	1543	0,37±0,10	1547	0,50±0,15
1561	(21) Germacreno B	1562	14,39±0,62	1566	13,54±1,38
1583	(22) Óxido de cariofileno	1585	1,27±0,11	-	-
1590	(23) Glóbulol	1591	0,86±0,15	1593	1,15±0,23
1592	(24) Viridiflorol	1599	0,80±0,14	1602	1,22±0,32
1602	(25) Ledol	1608	0,17±0,01	-	-
1602	(26) β-Elemenona	-	-	1603	1,08±0,29
	Não identificado	1630	0,34±0,07	-	-
1646	(27) Cubenol	1637	0,47±0,04	-	-
1654	(28) α-Cadinol	1657	0,63±0,23	-	-
	Não identificado	1660	0,49±0,06	1661	1,05±0,33
1658	(29) Atractilona	1664	2,49±0,38	1669	3,74±0,51
-	(30) Furanodieno ^(e)	1699	18,99±2,47	-	-
1693	(31) Germacrona	-	-	1705	37,82±1,91
1713	(32) Farnesal (2E, 6Z)	1705	0,40±0,12	-	-
1716	(33) Farnesal (2Z, 6E)	1709	0,83±0,18	-	-
	Não identificado	1737	0,39±0,06	-	-
	Não identificado	-	-	1741	0,20±0,01

(a) Índices de Kovats determinado em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção determinado em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos; (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata; (e) Confirmado por RMN

Do total de 97,14% de constituintes identificados no óleo essencial das folhas maduras de *E. uniflora*, 2,94% corresponderam aos monoterpenos, e 93,02%

corresponderam aos sesquiterpenos, sendo os principais constituintes o curzereno (22,37%), furanodieno (18,99%), germacreno B (14,39%) e β -cariofileno (9,35%). Nas folhas jovens foram identificados 96,24% dos constituintes do óleo, sendo 0,73% de monoterpenos e 95,34% de sesquiterpenos, tendo como componentes majoritários a germacrona (37,86%) (não presente nas folhas maduras), curzereno (16,60%) e germacreno B (13,54%) (Figura 22). No óleo essencial das folhas jovens não foi detectado o furanodieno nas condições das análises por CG-DIC e CG-EM. Foi possível observar que o teor do óleo essencial da *E. uniflora* variou em função da idade das folhas, com a relação principalmente aos sesquiterpenos oxigenados, furanodieno e germacrona. A ausência de germacrona nas folhas maduras pode sugerir que ocorra uma transformação biogenética deste componente em função do envelhecimento das folhas.

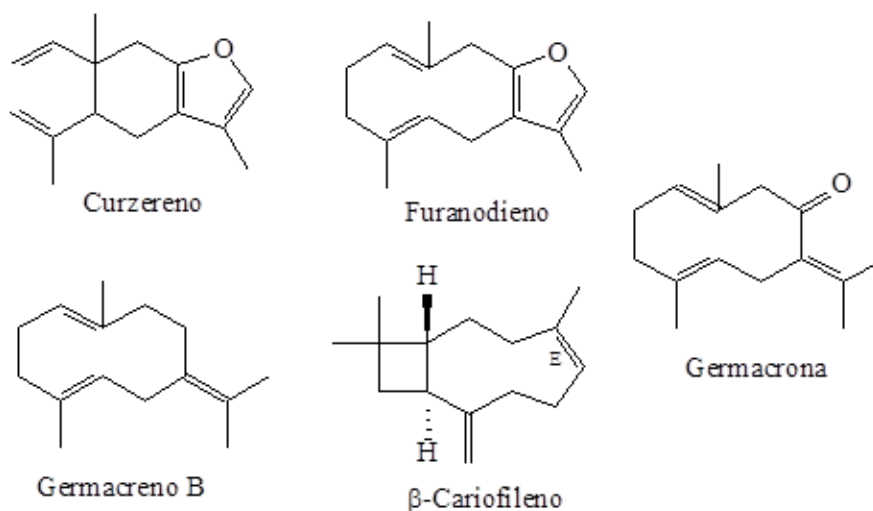


Figura 22. Estruturas das principais substâncias presentes no óleo essencial de *E.uniflora*.

Cabe destacar que o teor de curzereno e germacrona aqui observado está de acordo com relato da literatura, que mostrou uma significativa variação, quantitativa e qualitativa, encontradas na composição do óleo essencial de espécimes de *E. uniflora* de acordo com as regiões onde foram cultivadas. Embora o óleo essencial das folhas de *E. uniflora* coletadas na Nigéria também tenha apresentado o curzereno como majoritário (19,7%), os demais constituintes majoritários relatados foram selina-1,3,7-trien-8-ona, com 17,8%, seguido de 16,9% de atractilona e 9,6% de furanodieno (OGUNWANDE *et al*, 2005). Enquanto que, em exemplares do sul da Bahia, o óleo essencial de folhas de *E. uniflora* apresentou como componentes majoritários o germacreno B (21,2%) e óxido de selina-1,3,7-trien-8-ona (19,3%) (VICTORIA *et al*, 2012), as folhas de uma espécime do estado de São Paulo forneceram um óleo essencial composto principalmente, por atractilona (26,78%), seguido

do curzereno (17,96%) (LAGO *et al*, 2011), e as folhas coletadas na região centro-oeste de Goiás forneceram um óleo essencial que apresentou, como majoritários, a selina-1,3,7-trien-8-ona (43 %) e seu epóxido (29%) (COSTA *et al*, 2010). Já os compostos majoritários na amostra coletada na Índia foram furanodieno (17,19%) e espatulenol (10,72%) (THAMBI *et al*, 2013). Em contraste aos nossos resultados e aos relatados na literatura, uma espécie cultivada na Argentina forneceu um óleo essencial rico em monoterpenos, sendo os majoritários a carvona (14,4%), pulegona (11,4%), nerolidol (10,5%) e limoneno (10,4%), (URBIEGO *et al*, 1987).

- ***Eugenia brasiliensis***

As substâncias identificadas no óleo extraído das folhas de *E. brasiliensis*, estudada no presente trabalho, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Composição química do óleo essencial de folhas de *Eugenia brasiliensis* L. (Grumixameira)

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
859	(1) Hexenol (3Z)	849	0,08±0,02
930	(37) α-Tujeno	924	0,19±0,03
939	(38) α-Pineno	932	2,15±0,92
979	(39) β-Pineno	978	1,60±0,56
1029	(40) Limoneno	1029	0,39±0,16
1031	(41) 1,8-Cinenol	1036	1,58±0,84
1096	(42) Linalol	1100	1,11±0,87
1177	(43) 4-Terpineol	1182	0,60±0,06
1188	(44) α-Terpineol	1198	0,85±0,06
1345	(45) α-Cubebeno	1347	0,43±0,01
1374	(6) α-Copaeno	1377	1,36±0,97
1386	(46) β-Bourboneno	1385	1,06±0,84
1390	(7) β-Elemenol	1390	0,48±0,16
1409	(47) α-Gurjeneno	1409	1,42±0,58
1419	(8) β-Cariofileno	1424	7,70±1,97
1432	(48) β-Copaeno	1432	3,97±1,27
1441	(49) Aromadendreno	1441	1,52±0,99
1451	(50) α-Himachaleno	1451	0,80±0,05
1454	(10) α-Humuleno	1459	1,53±0,11
1466	(11) Cariofileno 9- <i>epi</i> -E	1463	2,13±0,07
1476	(51) <i>Trans</i> -cadna-1(6)4-dieno	1447	1,21±0,87
1477	(12) γ-Gurjeneno	1477	1,20±0,42
1485	(13) Germacreno D	1483	0,59±0,01
1490	(14) β-Selineno	1492	0,89±0,04
1496	(15) Viridifloreno	1494	1,66±0,13
1499	(52) β-Macrocarpeno	1499	3,13±0,40
1500	(53) β-Muroleno	1505	0,54±0,29
1513	(54) γ-Cadineno	1517	1,76±0,17
1523	(18) δ-Cadineno	1522	5,55±1,61
1528	(55) <i>Cis</i> -Calameneno	1526	3,64±1,09
1534	(56) <i>Trans</i> -Cadina-1,4-dieno	1536	1,03±0,11
1538	(19) α-Cadineno	1540	0,51±0,01
1545	(57) α-Calacoreno	1545	0,47±0,05
1563	(58) (<i>E</i>)-Nerolidol	1563	0,37±0,12
1566	(59) Maliol	1567	0,36±0,09
1568	(60) Palustrol	1575	0,76±0,18
1578	(61) Espatuleno	1586	6,42±1,47
1590	(23) Globulol	1589	5,25±1,11
1595	(25) Ledol	1593	3,83±0,22
1602	(62) 11-Cubebanol	1601	3,02±1,04
-	Não identificado	1611	2,09±0,66
1619	(63) 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1621	1,03±0,01
-	Não identificado	1623	0,26±0,09
1628	(64) 1- <i>epi</i> -Cubenol	1634	4,03±1,12
-	Não identificado	1640	2,96±1,44
1640	(65) α- <i>epi</i> -Cadinol	1649	4,48±1,67
1654	(66) α-Cadinol	1652	4,00±0,15
1658	(67) Valerianol	1654	2,96±0,23
1666	(68) Intermedeol	1664	4,92±0,48
1700	(69) Amorfa-4,9-dien-2-ol	1693	0,08±0,01
-	Não identificado	1736	0,08±0,01

(a) Índices de Kovats determinado em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção determinado em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos, (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata.

A composição do óleo de folhas de *E. brasiliensis* já foi relatado anteriormente (FISCHER *et al*, 2005; LIMA *et al*, 2008; MAGINA *et al*, 2009; SIEBERT *et al*, 2015) demonstrando também uma diversidade na sua composição.

No presente estudo, os constituintes majoritários identificados do óleo essencial de *E. brasiliensis* foram β -cariofileno (7,70%), espatulenol (6,42%), e δ -cadineno (5,55%) (Figura 23), enquanto que Lima e colaboradores (2008) relatam o cubenol (17,4%), espatulenol (13%) e α -tujeno (8,3%) como substâncias majoritárias no óleo essencial de uma espécie cultivada na região central de São Paulo.

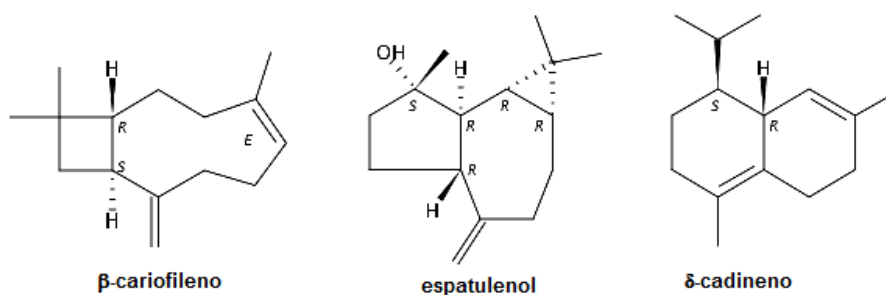


Figura 23. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de *E. brasiliensis*

Já para uma espécie cultivada em Santa Catarina os principais compostos encontrados em *E. brasiliensis* foram espatulenol (12,6%), σ -cadinol (8,7%), viridiflorol (7,1%), α -cadinol (6,6%), e 1-*epi*-cubenol (6,3%), todos os quais sesquiterpenos oxigenados (MAGINA *et al*, 2009). No entanto, um estudo anterior realizado por Fischer e colaboradores (2005) para o óleo essencial das folhas de *E. brasiliensis* do sudeste do Brasil, foi constatado que os principais compostos eram α - e β -selineno (14,8 e 12,6%, respectivamente), e β -cariofileno (12,6%).

De fato, muitas vezes existem grandes diferenças na composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais a partir de plantas da mesma espécie. As razões para esta variabilidade podem ser as diferentes fontes geográficas, as estações de colheita, o genótipo, o clima, bem como a parte da planta a ser utilizada. Estas variáveis influenciam a concentração relativa de cada componente no óleo (MAGINA, 2009). Isto pode ser observado em recente trabalho publicado por Siebert e colaboradores (2015) que descreveu a composição sazonal do óleo essencial das folhas de *Eugenia brasiliensis*, cultivada em Blumenau (SC). A análise por GC permitiu a identificação de 40 componentes, onde observou-se que os monoterpenos variaram mais (42%) do que os sesquiterpenos (14%), sendo os hidrocarbonetos monoterpenos que sofreram a maior variação ao longo do ano

(64%). As principais substâncias: na primavera e no verão foi o espatulenol ($16,02 \pm 0,44\%$ e $18,17 \pm 0,41\%$, respectivamente), no outono, o τ -cadinol ($12,83 \pm 0,03\%$) e no inverno, o α -pineno ($15,94 \pm 0,58\%$).

- *Psidium cattleianum*

As folhas frescas de *P. cattleianum*, submetidas a hidrodestilação, forneceram um óleo essencial rico em sesquiterpenos, cujas análises pelas técnicas de Cromatografia Gasosa, nos permitiram identificar 22 substâncias, correspondentes a 88,42% do total do óleo, e que seguem apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Composição química do óleo essencial de folhas de *Psidium cattleianum* (Araçazeiro).

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
859	(35) Hexenal (2Z)	855	0,93±0,33
930	(37) α -Tujeno	936	2,28±0,86
990	(2) Mirceno	992	0,91±0,29
1029	(40) Limoneno	1033	0,97±0,12
1031	(41) 1,8-Cineol	1037	2,45±1,21
1375	(70) α -Ilangeno	1382	7,79±0,29
1419	(8) β -Cariofileno	1428	45,75±1,98
1434	(71) α -trans-Bergamoteno	1438	0,43±0,06
1441	(49) Aromadendreno	1445	0,32±0,08
1454	(10) α -Humuleno	1463	12,92±0,69
1460	(72) Allo-Aromadendreno	1465	0,36±0,08
1484	(73) α -Amorfeno	1479	0,48±0,14
1485	(13) Germacreno D	1483	0,39±0,06
1490	(14) β -Selineno	1497	1,94±0,22
1498	(74) α -Selineno	1503	0,87±0,06
1507	(76) α -Bisaboleno (Z)	1506	1,31±0,64
1512	(75) δ -Amorfeno	1510	0,33±0,04
	Não identificado	1513	0,88±0,08
1514	(77) γ -Bisaboleno (Z)	1517	0,23±0,06
	Não identificado	1521	0,66±0,03
1523	(18) δ -Cadineno	1525	6,72±0,06
1529	(78) Zonareno	1530	0,17±0,02
1531	(79) γ -Bisaboleno (E)	1533	0,26±0,04
	Não identificado	1540	0,87±0,06
	Não identificado	1545	1,48±0,05
	Não identificado	1550	1,51±0,05
1563	(58) <i>E</i> -Nerolidol	1567	0,61±0,08
	Não identificado	1592	1,75±0,22
	Não identificado	1606	0,93±0,05
	Não identificado	1638	1,16±0,02
	Não identificado	1653	0,37±0,09
	Não identificado	1657	0,41±0,12
	Não identificado	1667	0,58±0,14
	Não identificado	1670	0,19±0,05
	Não identificado	1711	0,79±0,18

(a) Índices de Kovats determinado em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção determinado em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos; (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata.

As folhas frescas do exemplar de araçazeiro utilizada neste estudo forneceram um óleo essencial abundante em β -cariofileno (45,75%), seguido de α -humuleno (12,92%), α -ilangeno (7,79%) e δ -cadineno (6,72%) (Figura 24).

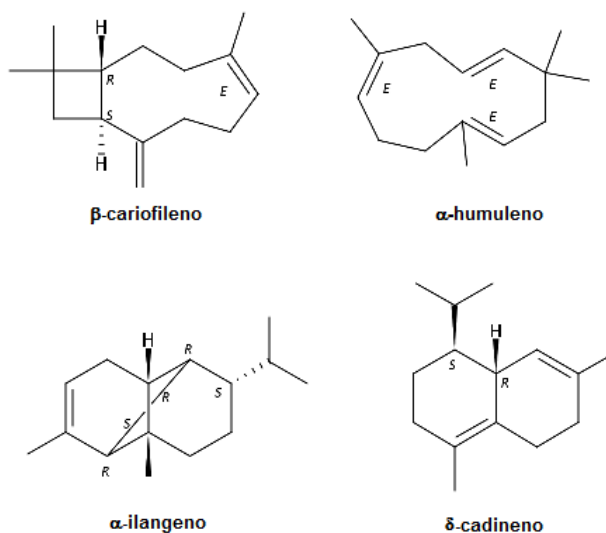


Figura 24. Estruturas das substâncias majoritárias do óleo essencial de *P.cattleianum*

Semelhante aos nossos estudos, o β -cariofileno, com a proporção relativa de 20,2%, também foi o constituinte majoritário encontrado no óleo essencial de uma espécie cultivada no Rio Grande Sul, mas que mostrou o monoterpeneo 1,8-cineol, o segundo constituinte majoritário, com cerca de 11,9% (PAROUL *et al*, 2002). Já a espécie cultivada em Cuba apresentou como majoritários o epi- α -murolol (21,9%), α -cadinol (20%), α -epi-cadinol (16,7%) e óxido de cariofileno (13,6%) (PINO *et al*, 2004). Enquanto as folhas da espécie coletada na Mata Atlântica, no sudeste do Brasil, forneceram como substâncias majoritárias os monoterpenos α -tujeno (25,2%) e 1,8-cineol (16,4%), e o sesquiterpeneo β -cariofileno com 13,6% (MARQUES *et al*, 2008).

- ***Psidium guajava***

Um total de 20 substâncias foram identificadas no óleo essencial de *P. guajava* equivalente a 98,34% do total da composição do óleo (Tabela 5). Para esta espécie também pode se observar variações significativas nas proporções relativas dos constituintes do óleo essencial de suas folhas quando comparadas àquelas relatadas na literatura, mostrando como

os fatores genéticos e ambientais (condições climáticas e do solo) podem induzir a modificações no metabolismo secundário da planta (CHEN *et al*, 2007; PINHO *et al*, 2014).

As substâncias identificadas no óleo extraído das folhas de *Psidium guajava* L. estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Composição química do óleo essencial de folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira).

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
853	(34) Hexenol (3E)	850	0,27±0,07
960	(80) Benzaldeído	964	1,14±0,11
1037	(3) β-Ocimeno (Z)	1033	0,57±0,44
1031	(41) 1,8-Cinenol	1034	0,31±0,41
1188	(44) α-Terpineol	1197	0,30±0,04
1375	(70) α-Ilangeno	1376	0,28±0,02
1419	(8) β-Cariofileno	1425	25,83±0,71
1454	(10) α-Humuleno	1463	33,20±0,67
1473	(82) 4,5-di-epi-Aristolocheno	1473	0,21±0,00
1477	(83) β-Chamigreno	1475	1,16±0,08
1490	(14) β-Selineno	1494	11,71±0,11
1498	(74) α-Selineno	1501	12,08±0,22
1505	(80) β-Bisaboleno	1508	0,25±0,04
1523	δ-Cadineno	1522	0,54±0,05
1531	(79) γ-Bisaboleno (E)	1527	0,26±0,26
1563	(58) (E)-Nerolidol	1563	3,00±0,13
1583	(22) Óxido de cariofileno	1586	0,50±0,02
1608	(86) Epóxido de Humuleno II	1614	0,61±0,04
	Não identificado	1622	0,87±0,10
	Não identificado	1638	0,64±0,04
	Não identificado	1642	0,14±0,03
1646	(87) α-Murolol	1551	0,35±0,01
1659	(88) Selin-11-en-4-α-ol	1666	5,79±0,16

(a) Índices de Kovats determinado em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção determinado em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos; (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na tabela, os majoritários para o óleo desta espécie foram o α-humuleno, com 33,2%, seguido de β-cariofileno (25,83%), α-selineno (12,08%) e β-selineno (11,71%) (Figura 25).

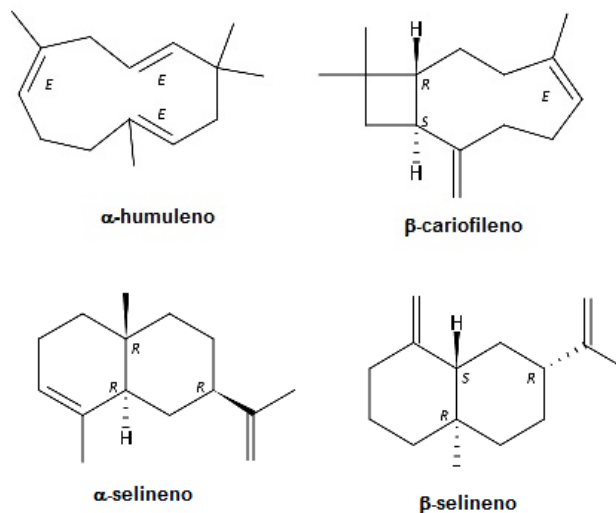


Figura 25. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de *P. guajava*

Enquanto o óleo estudado no presente trabalho apresenta uma composição rica em sesquiterpenos, Xiao-Duo e colaboradores (1991) relatam um óleo extraído das folhas de uma espécie proveniente da China com uma proporção importante dos monoterpenos α -pineno (37,8%) e 1,8-cineol (18,9%). Estes monoterpenos também foram identificados nos óleos essenciais das folhas de *P. guajava* coletadas em Belém (1,8-cineol: 21,4%, α -pineno: 23,9%) (da SILVA *et al*, 2003) e de Taiwan (1,8-cineol: 12,4%, α -pineno: 14,7 %) (CHEN *et al*, 2007). Outros relatos na literatura apresentam composições químicas marcadas pela presença de outros componentes principais. Os majoritários presente no óleo de *P. guajava*, cultivada no México, foram o α -selineno (23,7%), α -humuleno (18,8%) e δ -selineno (18,3%). Na espécie cultivada em Cuba, Pino e colaboradores (2001) identificaram 57 componentes, dos quais β -cariofileno (21,6%), (*E*)-nerolidol (19,2%) e selin-11-en-4 α -ol (13,4%) foram os majoritários. Em uma amostra da Nigéria, Ogunwande e colaboradores (2003) encontraram 42 compostos, o que representou mais de 90% da mistura volátil identificada. Os compostos majoritários foram limoneno (42,1%) e β -cariofileno (21,3%), enquanto para uma espécie coletada no Ceará, os cinco componentes mais abundantes no óleo extraído das folhas foram epiglobulol (19,20%), 1,8-cineol (13,31%), óxido de isoaromadendreno (11,13%), álcool cariofenil (10,21%) e β -cariofileno (9,51%) (PINHO *et al*, 2014).

- *Syzygium cumini*

Folhas frescas de *S. cumini* forneceram um óleo essencial com um rendimento muito baixo (0,09%) (Tabela 1), cujas substâncias identificadas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Composição química do óleo essencial de folhas de *Syzygium cumini* (jamelão).

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
853	(34) Hexenol (3E)	849	1,46±0,44
932	(38) α-Pineno	939	19,31±3,29
979	(39) β-pineno	979	13,29±1,37
990	(2) Mirceno	988	2,23±0,18
1029	(40) Limoneno	1029	3,25±0,34
1037	(3) β-Ocimeno (Z)	1036	12,66±0,90
1044	(4) β-Ocimeno (E)	1046	6,54±0,40
1059	(104) γ-Terpineno	1057	0,44±0,01
1088	(105) Terpinoleno	1473	0,56±0,01
1096	(42) Linalol	1100	0,10±0,03
1132	(106) Allo-Ocimeno	1121	0,12±0,04
1121	(107) β-Fenchol	1127	0,17±0,02
1139	(108) Trans-Pinacarveol	1143	0,10±0,04
1149	(109) Hidrato de Canfeno	1157	0,10±0,03
1169	(110) Borneol	1175	0,12±0,05
1177	(43) 4-Terpineol	1182	0,26±0,08
1188	(44) α-Terpineol	1198	2,87±0,90
1220	(111) Acetato de fenchila	1218	0,13±0,03
1288	(112) Bornil acetato	1285	0,56±0,11
1375	(70) α-Ilangeno	1369	0,08±0,01
1376	(6) α-Copaeno	1375	0,35±0,09
1419	(8) β-Cariofileno	1424	21,53±2,85
1454	(10) α-Humuleno	1459	7,94±0,97
1473	(82) 4,5-di-epi-Aristolocheno	1471	0,48±0,06
1479	(114) γ-Muroloeno	1475	0,25±0,04
1490	(14) β-Selineno	1489	0,90±0,14
1498	(74) α-Selineno	1497	0,28±0,13
1512	(75) δ-Amorfeno	1503	0,09±0,02
1513	(54) γ-Cadineno	1514	0,29±0,05
1523	(18) δ-Cadineno	1519	0,80±0,14
	Não identificado	1538	0,17±0,06
	Não identificado	1579	0,41±0,10
1572	(115) Álcool Cariofenil	1575	0,40±0,08
1583	(22) Óxido de Cariofileno	1589	0,26±0,11
	Não identificado	1608	0,44±0,09
	Não identificado	1623	0,29±0,08
	Não identificado	1659	0,77±0,20

(a) Índices de Kovats determinado em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção determinado em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos; (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata

Alguns dos constituintes majoritários do óleo essencial da espécie *Syzygium cumini* utilizada no presente estudo (Jd Botânico–UFRRJ) estão apresentados na Figura 26.

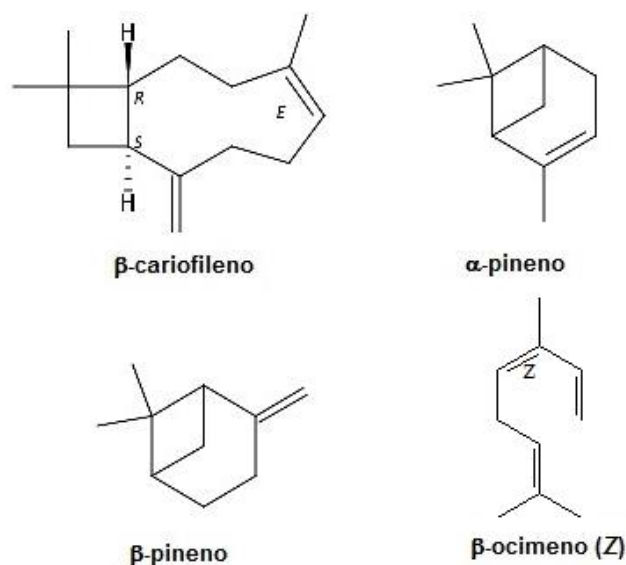


Figura 26. Estruturas das principais substâncias do óleo essencial de *S.cumini*

Foi observada também uma significativa variação na composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Syzygium cumini* (jamelão). Shafi e colaboradores em 2002 relataram que o óleo essencial de folhas do jamelão coletadas no sul da Índia era abundante em pinocarveol (15,1%), α -terpineol (8,9%), mirtenol (8,3%), eucarvona (6,6%) e murolol (6,4%). Já Nishandhini e colaboradores (2015) descrevem para uma amostra de óleo obtida de exemplares de *Syzygium cumini* do mesmo país, uma abundância em α -pineno (21,5%), β -ocimeno (*E*) (6,8%), α -terpineol (9,5%) e δ -cadineno (8,3%).

Alguns dos constituintes majoritários do óleo essencial da espécie *Syzygium cumini* utilizada no presente estudo (Jd Botânico–UFRRJ) foram similares aqueles previamente reportados na literatura para óleos isolados de plantas originárias do Egito, e de outras regiões do Brasil, apresentando, no entanto, diferenças em suas porcentagens (Tabela 7)

Tabela 7: Comparação da composição química dos principais constituintes (%) do óleo essencial de *Syzygium cumini* (jamelão)

Substâncias	Jd.Botânico UFRRJ	Egito Badawy <i>et al.</i> (2014)	Egito Mohamed <i>et al.</i> (2013)	J. Fora - MG Machado <i>et al.</i> (2013)	São Luiz- MA Dias <i>et al.</i> (2013)	FIOCRUZ – RJ Siani <i>et al.</i> (2013)
α -Pineno	19,31	17,26	32,32		31,85	22,2
β -Pineno	13,29	11,28	12,44			
β -Ocimeno (<i>Z</i>)	12,66				28,98	10,2
β -Ocimeno (<i>E</i>)	6,54				11,71	
α -Terpineol		13,88		9,08		
β -Cariofileno	21,53		11,19	16,00		9,45
α -Humuleno	7,94			25,24		

- *Syzygium malaccense*

No presente trabalho, as folhas frescas do *S. malaccense* estudado apresentaram o menor rendimento em óleo comparado às demais espécies. Foram identificadas 25 substâncias (68%) que estão apresentadas na Tabela 6, das quais 45,63% dos majoritários não são originados a partir dos metabólitos do isopreno (15,43% de eicoseno-1, 6,46% de eicosano, 6,26% de 4-hidroxi-4metil-2-pentanona e 4,9% de hexadeceno-1) (Figura 27).

Tabela 8: Composição química do óleo essencial de folhas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. (jambeiro vermelho)

IK ^(a)	SUBSTÂNCIAS ^(b)	IR ^(c)	% Área±dp ^(d)
839	(89) 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	840	6,26±0,24
855	(36) 2-Hexanal (<i>E</i>)	853	1,11±1,40
853	(34) Hexenol (<i>3E</i>)	850	0,96±0,55
870	(90) n-Hexanol	866	0,61±0,13
979	(91) 1-Octen-3-ol	981	1,15±0,65
1195	(92) Diidrocitronelol	1192	0,55±0,08
1200	(93) n-Dodecano	1200	0,59±0,24
1300	(94) n-Tridecano	1298	0,39±0,29
1376	(6) α-Copaeno	1384	1,26±0,15
1389	(95) Tetradeceno-1	1393	2,12±0,68
1400	(96) n-Tetradecano	1400	1,70±0,57
1419	(8) β-cariofileno	1424	2,26±0,51
1439	(97) α-Guaieno	1438	0,32±0,07
1444	(98) 6,9-Guaiadieno	1445	0,37±0,11
1454	(10) α-Humuleno	1460	3,63±0,91
1477	(83) β-Chamigreno	1477	0,78±0,11
1490	(14) β-Selineno	1494	3,85±0,79
1498	(74) α-Selineno	1500	2,84±0,49
1523	(18) δ-Cadineno	1523	1,14±0,14
1563	(58) (<i>E</i>)-Nerolidol	1564	0,50±0,16
1589	(99) Hexadeceno-1	1594	4,90±1,61
1600	(100) n-Hexadecano	1600	2,18±0,71
	Não identificado	1695	6,43±1,98
1700	(101) Heptadecano	1700	1,75±0,53
1988	(102) Eicoseno-1	1975	15,43±3,42
2000	(103) Eicosano	1996	6,46±1,77
	Não identificado	2169	5,50±1,30
	Não identificado	2379	3,71±0,98
	Não identificado	2578	2,38±0,75
	Não identificado	2773	1,08±0,19
	Não identificado	2793	17,77±2,69

(a) Índices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007); (b) Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; (c) Índices de retenção em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms em comparação ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos; (d) média e desvio padrão das amostras em triplicata.

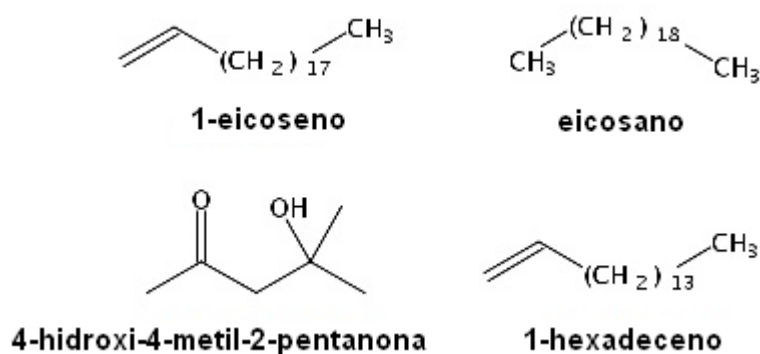


Figura 27. Constituintes majoritários do óleo essencial de *S.malaccense* do Jd.Botânico da UFRRJ

Os sesquiterpenos se apresentaram em 16,95% do óleo extraído, tendo como majoritários o β -selineno (3,85%) e α -humuleno (3,63%), e 0,55% da composição do óleo, foi identificado o único monoterpeneo diidrocitronelol. O padrão químico foi muito semelhante ao de um estudo anterior apresentado por Ismail e colaboradores (2010), apenas prevalecendo os constituintes não oriundos dos metabólitos do isopreno, porém diferindo na identidade dos compostos majoritários. A variabilidade química significativa relatada por estes pesquisadores é observada pela composição dos voláteis das folhas da espécie cultivada na Malásia. O óleo essencial continha 180 substâncias, sendo os majoritários identificados como ácido hexanóico (12,16%), o salicilato de metila (8,27%), 3-hexen-1-ol (7,81%), 1-octen-3-ol (5,89%), ácido *n*-hexadecanóico (5,07%), 2-hexenal (4,89%) e 3-buten-2-ona (3,68%).

Poucos são os relatos na literatura sobre extração e estudo químico dos constituintes voláteis das folhas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. (jambo). Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, Karioti e colaboradores (2007), descreveram que o óleo essencial extraído das folhas frescas de uma espécie cultivada em Ile-Ife (Nigéria) apresentou 38 substâncias, das quais os monoterpeneos foram majoritários (61,1%), representados principalmente por α -pineno (7,3%), β -pineno (8,0%), *para*-cimeno (13,5%) e α -terpineol (7,5%). Os sesquiterpenos compunham 30,8% deste óleo essencial, cujo principal componente foi o β -cariofileno (9,0%). Um padrão químico muito semelhante ao anterior foi relatado por Lawal e colaboradores (2014) que descreveram um óleo essencial de um exemplar da região de Ikotun (Nigéria), também rico em monoterpeneos (79,9%), mas diferindo na identidade dos majoritários, representados principalmente pelo limoneno (48,8%) e α -terpineno (26,2%).

As diferenças qualitativas e quantitativas encontradas nos teores de óleo essencial podem estar relacionadas com diferenças genéticas e fatores físicos do ambiente. Lopes

(2008) demonstrou em seu trabalho que as substâncias, assim como os teores de óleo, variam durante as estações do ano. A composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos (CERQUEIRA *et al.*, 2009), no entanto, fatores ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação, sazonalidade, nutrientes, altitude, entre outros, podem causar variações significativas na composição química dos óleos essenciais.

A composição do óleo essencial também pode ser diferente devido aos quimiotipos, onde diferentes constituições químicas surgem em uma determinada planta devido à necessidade da mesma em se adaptar a algum fator ambiental, como por exemplo, o clima, composição do solo, altitude, escassez de água, luz, época da colheita e o método de extração e fração de destilação do óleo essencial (MORAIS *et al.*, 1996).

5.3. Tratamento estatístico dos resultados obtidos por CG-EM

5.3.1. Análise quimiométrica para os óleos essenciais das folhas de pitangueira

Para auxiliar na verificação da possível diferença da composição química do óleo essencial em função da idade das folhas de *E. uniflora*, foi utilizado o tratamento quimiométrico, aplicando-se ACP e AHH aos resultados (porcentagem em área relativa) obtidos dos cromatogramas (CG-DIC) para os óleos essenciais das folhas jovens (**FJ**) e maduras (**FM**).

Através da análise de componentes principais (ACP) foi verificado que o primeiro componente principal (CP1) descreveu 98% da variância total dos dados e o segundo (CP2) 1%, acumulando 99% da variância total (Figura 28). Em uma análise se os primeiros componentes principais acumularem uma porcentagem relativamente alta da variação total, em geral referida como acima de 80%, eles explicarão satisfatoriamente a variabilidade manifestada entre as amostras avaliadas. Os dados obtidos do gráfico de “scores” demonstram a discriminação de dois grupos, a constituição química dos óleos obtidos das folhas jovens e os obtidos das folhas maduras.

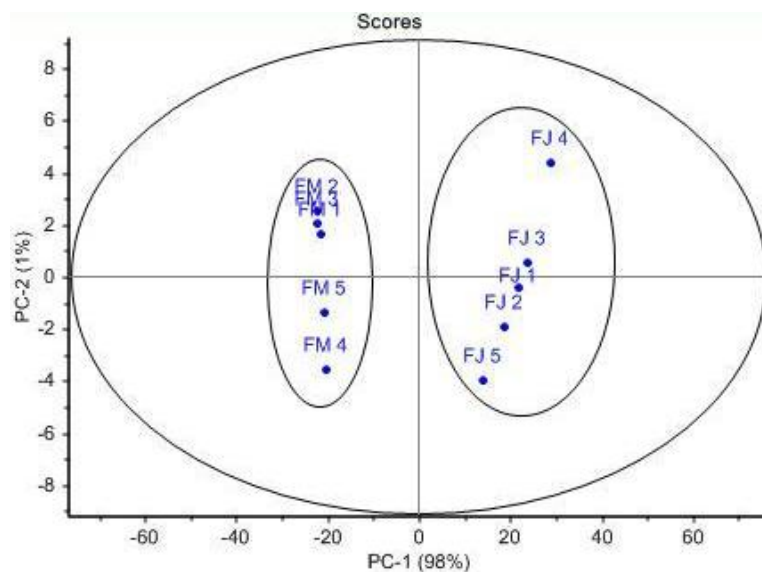


Figura 28. Gráfico de scores de CP1 x CP2 obtido a partir dos dados de CG-EM das cinco amostras de óleos essenciais de folhas jovens (FJ) e cinco de folhas maduras (FM) de *Eugenia Uniflora* L.

Através da análise do gráfico de “loadings” (Figura 29) observou-se que as substâncias **12** (γ -gurjeneno), **15** (viridifloreno), **19** (α -cadineno), **20** (selina-3,7(11)-dieno), **23** (globulol), **24** (viridiflorol), **26** (β -elemenona), **29** (atractilona) e **31** (germacrona) foram as mais importantes para a discriminação das amostras de óleo obtidos das folhas jovens.

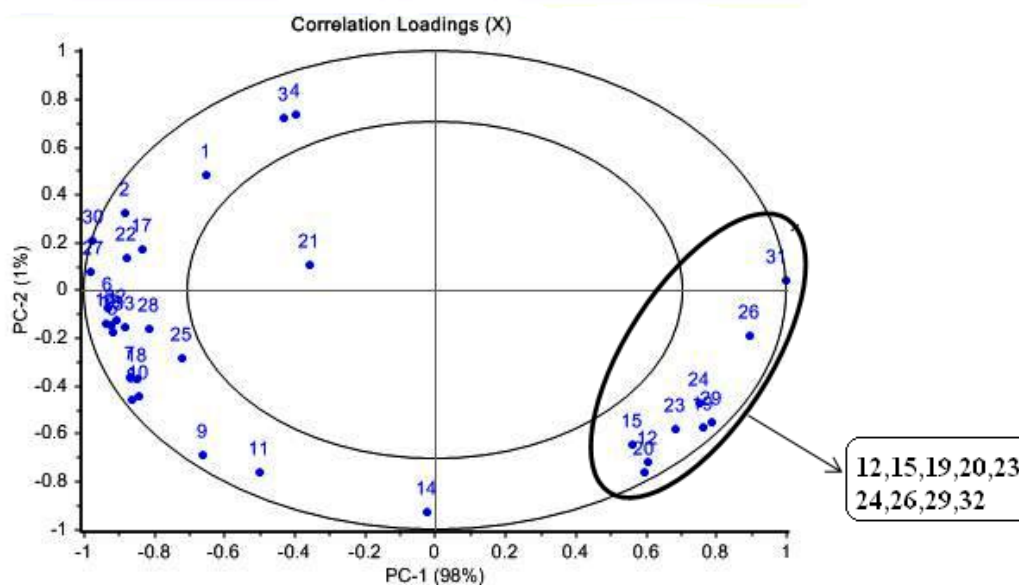


Figura 29. Gráfico de “loadings” dos CP1 x CP2 aplicados à ACP para os dados CG-EM dos óleos essenciais de folhas jovens (FJ) e maduras (FM) de *Eugenia uniflora* L. Numeração utilizada no gráfico está descrita na tabela 2.

Estes resultados demonstram que a análise multivariada aplicada aos resultados de CG-EM foi satisfatória para discriminar as diferenças na composição química destes óleos em função da idade das folhas, ressaltando que, apesar da expressiva diferença observada no óleo essencial das folhas jovens da pitangueira, atribuída à elevada concentração de germacrona, outros componentes, em quantidades minoritárias, comuns às duas espécies, foram também importantes para esta discriminação.

5.3.2. Análise quimiométrica para os óleos essenciais das Myrtaceae em estudo

Os resultados obtidos pelas análises por CG-EM do óleo extraído das folhas frescas de *E. uniflora* (Folhas Maduras- **Pt FM**), *E. brasiliensis* (**GX**), *P. cattleianum* (**AÇ**), *P. guajava* (**GB**), *S. cumini* (**JB**) e *S. malaccense* (**JM**), quando submetidos a análise de componentes principais (ACP), apresentaram o primeiro componente principal (CP1) que descreveu 45% da variância total dos dados, o segundo (CP2) 21% e o terceiro (CP3) descrevendo 17% da variância total, acumulando assim, 83% da variância total. A Figura 30 mostra o gráfico de *scores*, obtido pela análise de ACP selecionando-se as três primeiras CPs. Esta análise indicou a presença de três seções de espécies de Myrtaceae devido às diferenças significativas na composição dos óleos essenciais, revelando apenas uma discriminação para *P. cattleianum* e *P. guajava* com relação ao gênero *Psidium*.

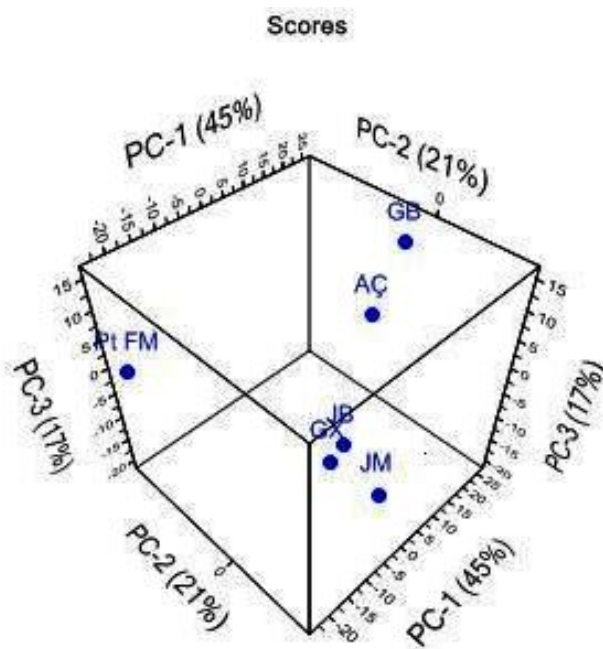


Figura 30. Gráfico de *scores*-3D (CP1xCP2xCP3) das 6 espécies de Myrtaceae

A figura 31 mostra o dendograma indicando a similaridade das espécies segundo as variáveis escolhidas.

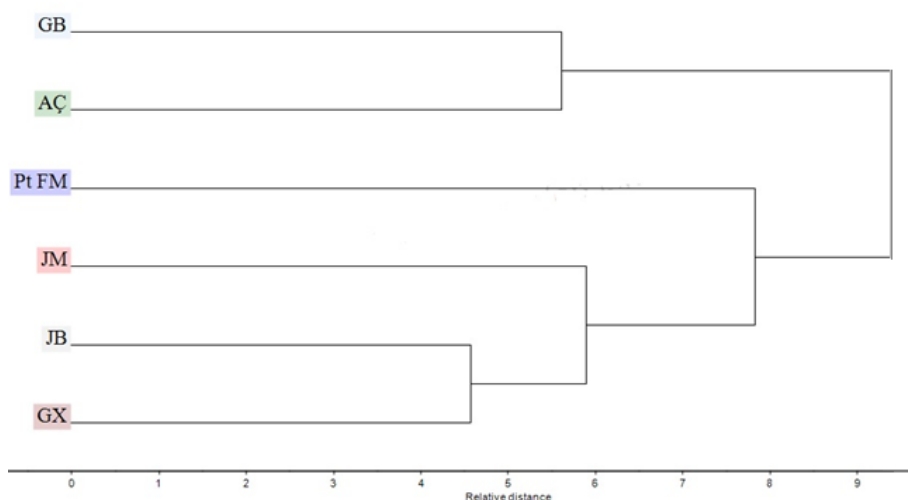


Figura 31. Dendrograma obtido a partir dos dados de CG-EM dos óleos extraídos das folhas das 6 espécies em estudo.

As maiores similaridades foram encontradas entre *P. cattleianum* (AÇ) e *P. guajava* (GB), assim como entre *S. cumini* (JM), *S. malaccense* (JB) e *E. brasiliensis* (GX). A similaridade entre *P. cattleianum* e *P. guajava* era esperada devido à proximidade botânica, uma vez que ambas são do mesmo gênero e ricas em β -cariofileno (8) e α -humuleno (10) (Figura 32). *Eugenia brasiliensis* é mais próxima de *S. cumini* e *S. malaccense* do que da *E. uniflora*, isto deve ter ocorrido devido a uma grande contribuição do α -copaeno (6), conforme observado no gráfico de *loadings* (Figura 32). A terceira CP (17%) foi a responsável pela diferenciação de *E. uniflora* com as demais espécies, devido ao alto teor de curzereno (16), germacreno B (21) e furanodieno (30), mais claramente observado através da análise Bi-plot de *scores* e *loadings* (Figura 33).

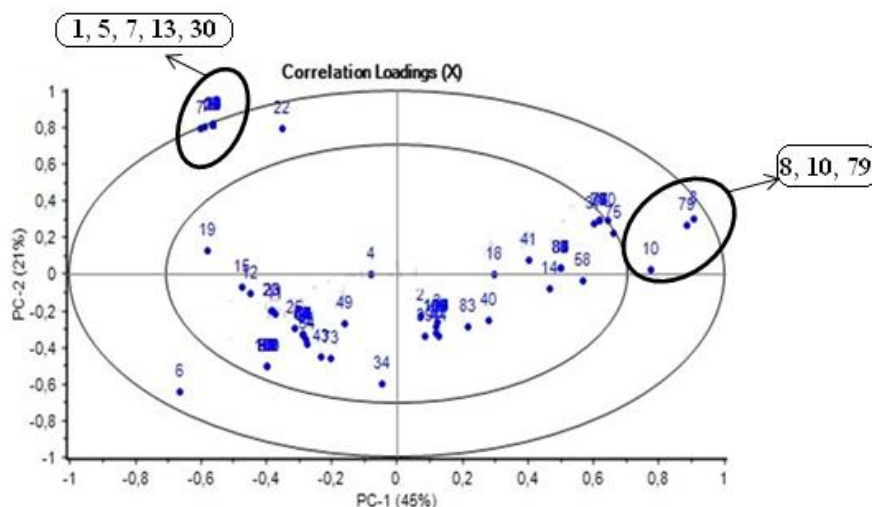


Figura 32. Gráfico de “loadings” dos CP1 x CP2 aplicados à ACP para os dados CG-EM dos óleos essenciais de folhas das espécies em estudo.

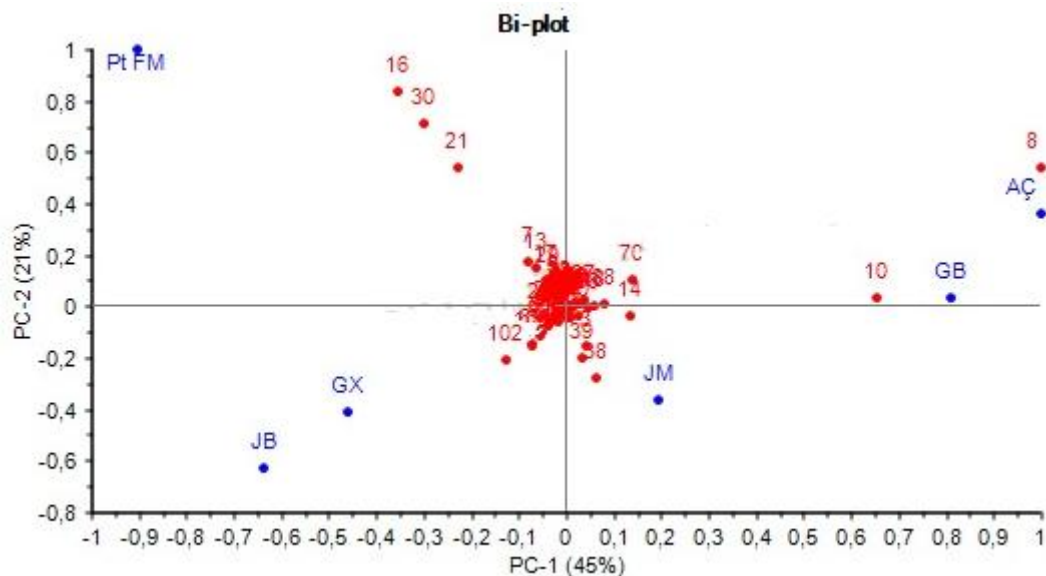


Figura 33. Bi-plot de ACP para scores (●) e loadings (●)

5.4. Isolamento e caracterização dos constituintes do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*

A fim de avaliar a composição química do óleo essencial obtido de folhas jovens e maduras de *E. uniflora* e verificar a possível ocorrência do rearranjo térmico que ocorre com dois dos sesquiterpenos identificados (furanodieno e germacrona), durante a análise por Cromatografia Gasosa com rampa de aquecimento (BALDOVANI et al, 2001; ADIO et al, 2009; CHANG et al, 2011), o óleo essencial extraído das folhas de *E. uniflora* foi submetido ao fracionamento através de Cromatografia De Adsorção em gel de sílica, em coluna *flash* (CC).

Foi previamente descrito que o furanodieno sofre rearranjo térmico para dar curzereno e germacrona para β -elemenona, através de uma reação sigmatrópica [3,3], também conhecido como o rearranjo de Cope (Figura 34), durante a corrida cromatográfica (MÖLLEKEN et al, 1988; WEYERSTAHL et al., 1988; BALDOVINI et al, 2001). Como esses sesquiterpenos oxigenados (curzereno e β -elemenona) podem ser também gerados na coluna cromatográfica a partir do aquecimento, as suas concentrações podem variar continuamente nas análises realizadas.

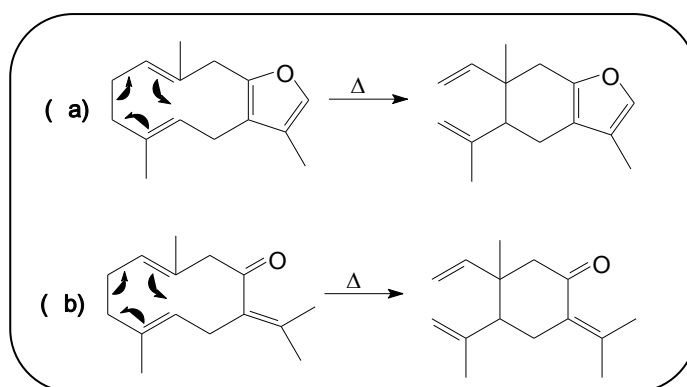
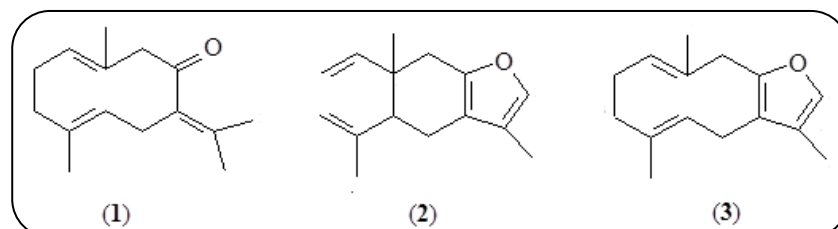


Figura 34. Rearranjo térmico do furanodieno (a) e da germacrona (b)

Para determinar inequivocamente as concentrações dos principais sesquiterpenos presentes em *E. uniflora*, óleo essencial foi submetido ao fracionamento cromatográfico.

O isolamento das substâncias do óleo essencial extraído das folhas maduras por CC forneceu curzereno (2) (3 mg) e furanodieno (3) (29,8 mg), mas não revelou a presença de germacrona (1). No entanto, o fracionamento cromatográfico do óleo obtido das folhas jovens de *E. uniflora* forneceu 34,3 mg de germacrona e 10,8 mg do furanodieno. Cabe destacar que este foi o primeiro relato sobre a variabilidade na composição química do óleo essencial de folhas jovens e maduras de *E.uniflora*, com o isolamento e a caracterização dos principais constituintes (SANTOS et al, 2015).



A pureza da germacrona (99,10%), curzereno (96,17%) e furanodieno (99,02%) foi realizada por CLAE-DAD a 240nm (Figura 35), além de ter confirmado a ausência do rearranjo térmico para o furanodieno e a germacrona. Diferentemente do que ocorreu quando essas substâncias isoladas foram analisadas por CG-EM com rampa de aquecimento, onde os produtos curzereno (15,73%) e β -elemenona (1,77%) foram detectados (Figura 36 e 37), semelhante aos relatos da literatura (BALDOVANI et al, 2001; ADIO et al, 2009; CHANG et al, 2011).

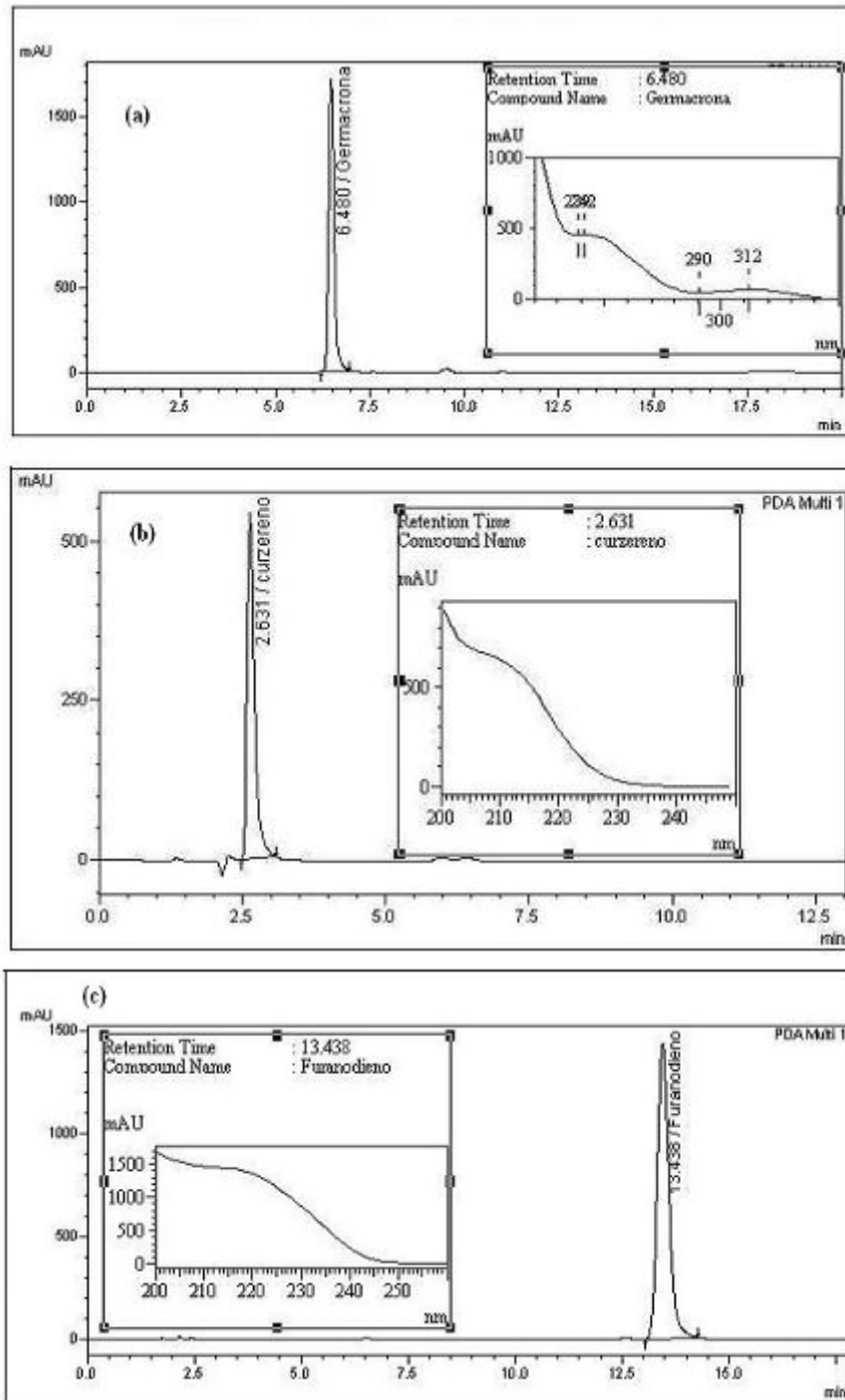


Figura 35. Análise por CLAE-DAD em fase reversa: Cromatogramas da (a) germacrona, (b) curzereno e (c) furanodieno (condições descritas no item 5.5).

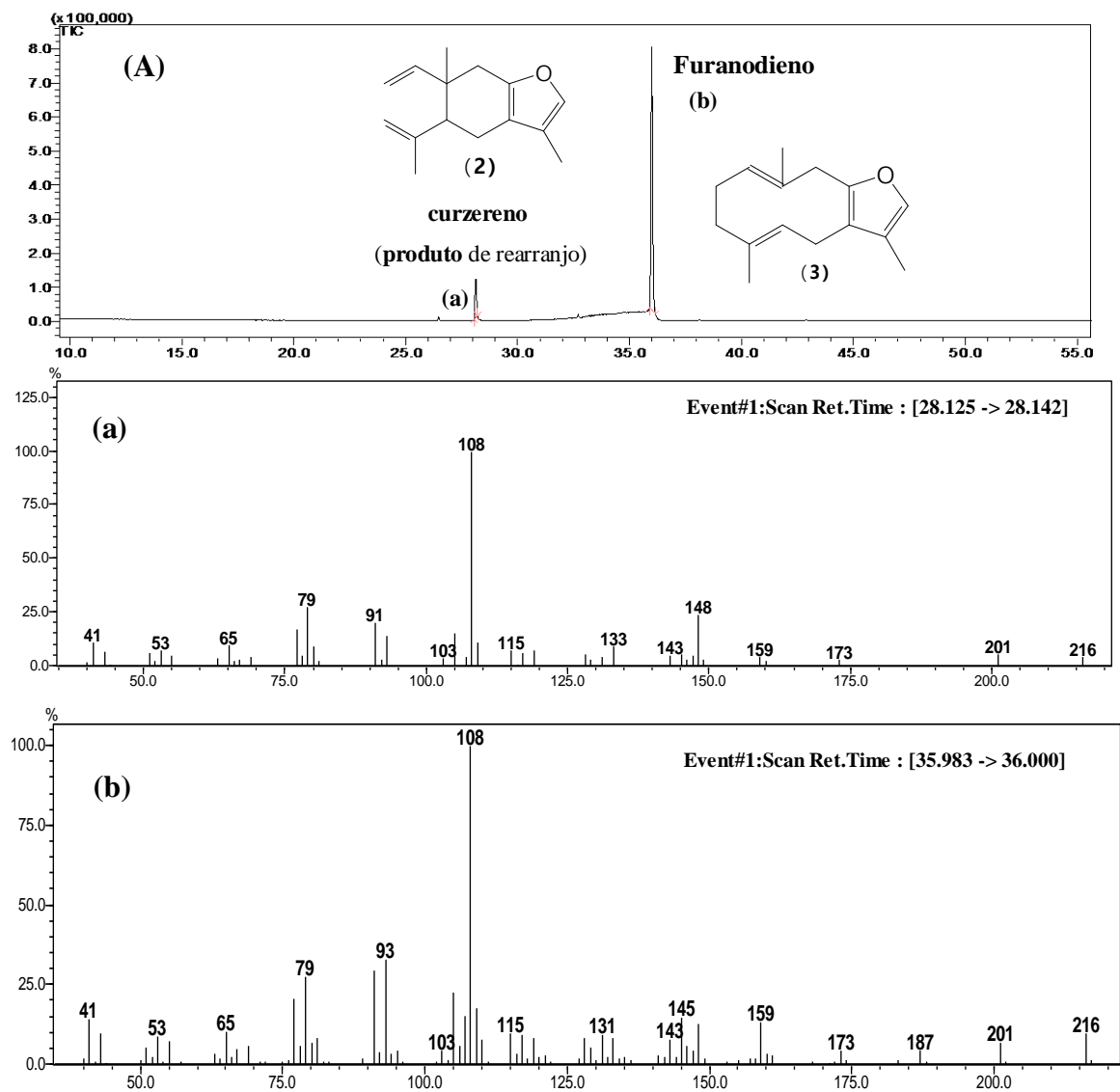


Figura 36. Cromatograma de íons totais e espectro de massa do furanodieno (3, A-b) e seu produto de rearranjo curzereno (2, A-a) (condições descritas no item 5.3)

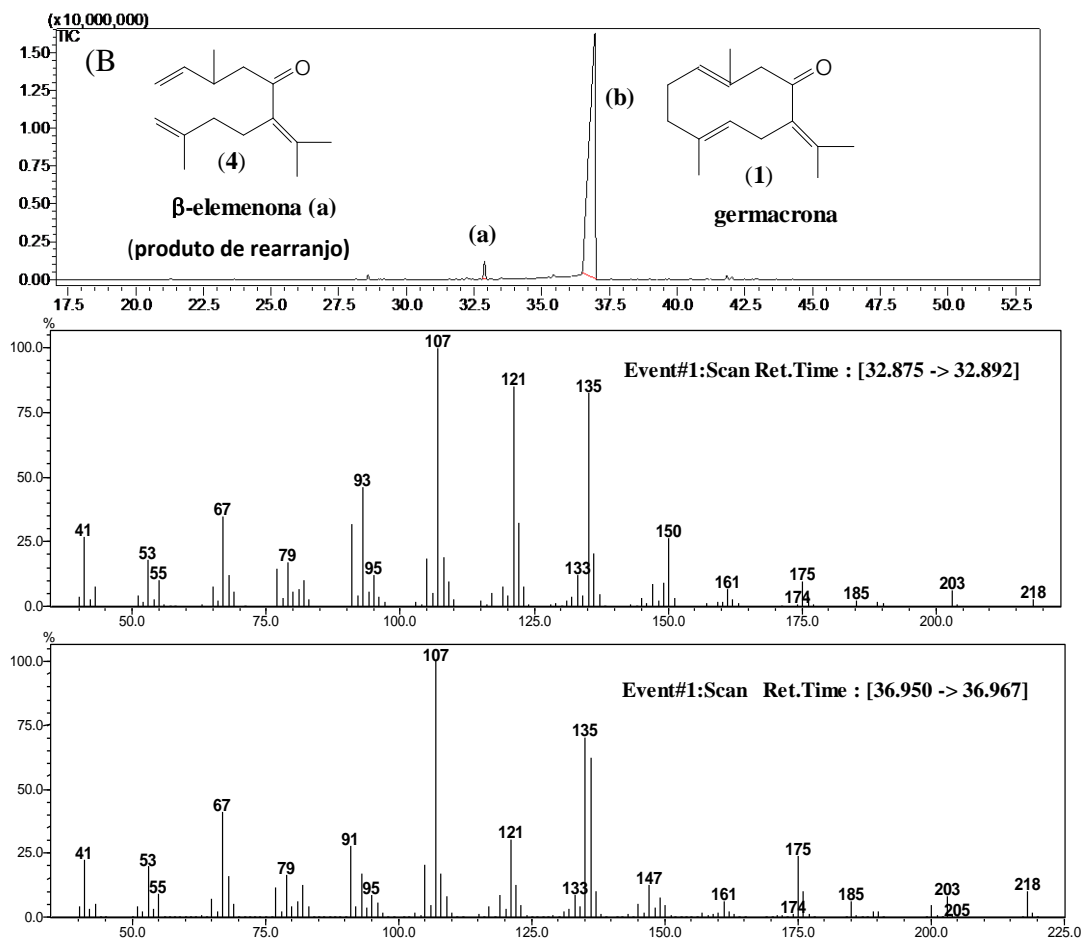
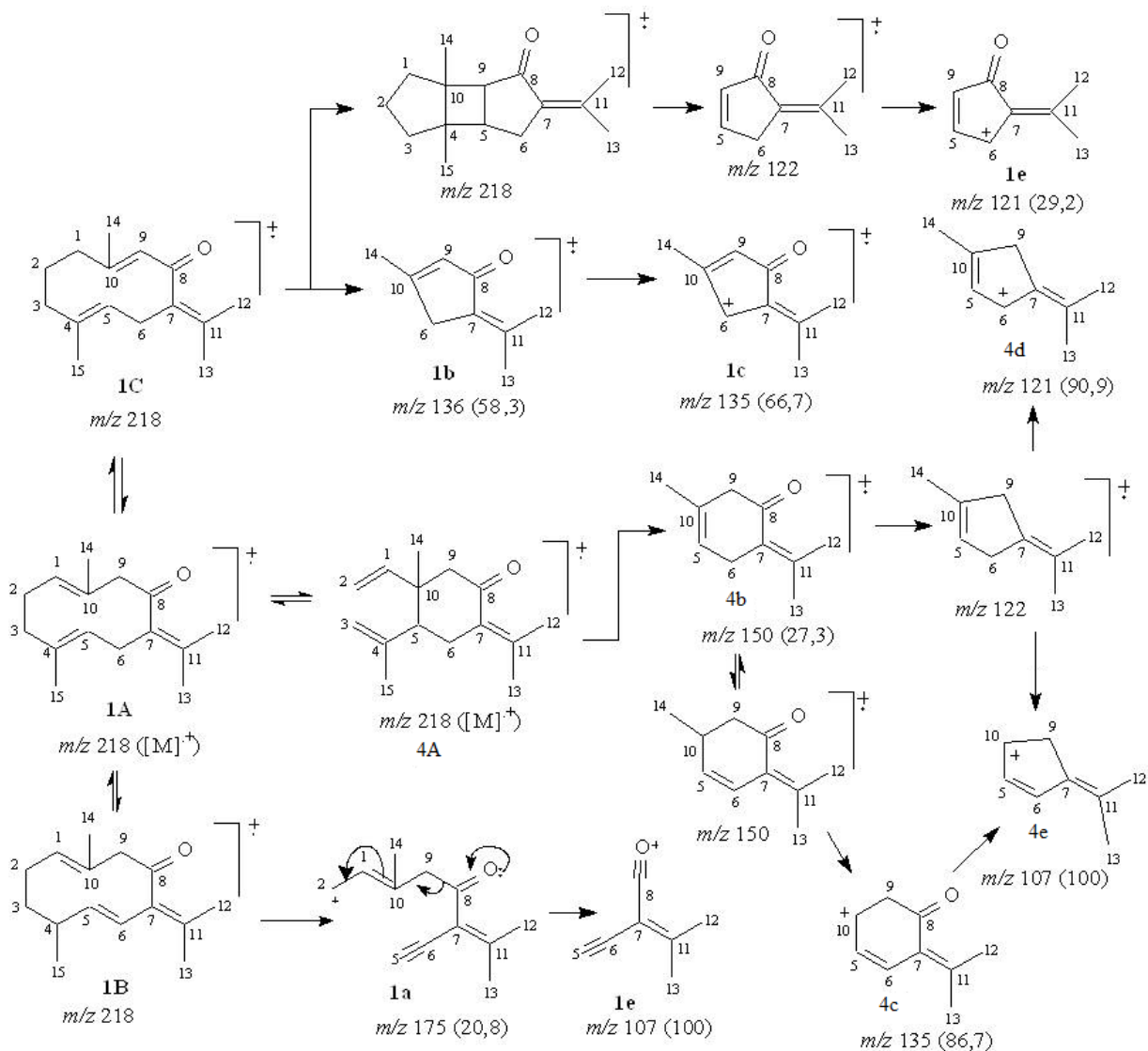


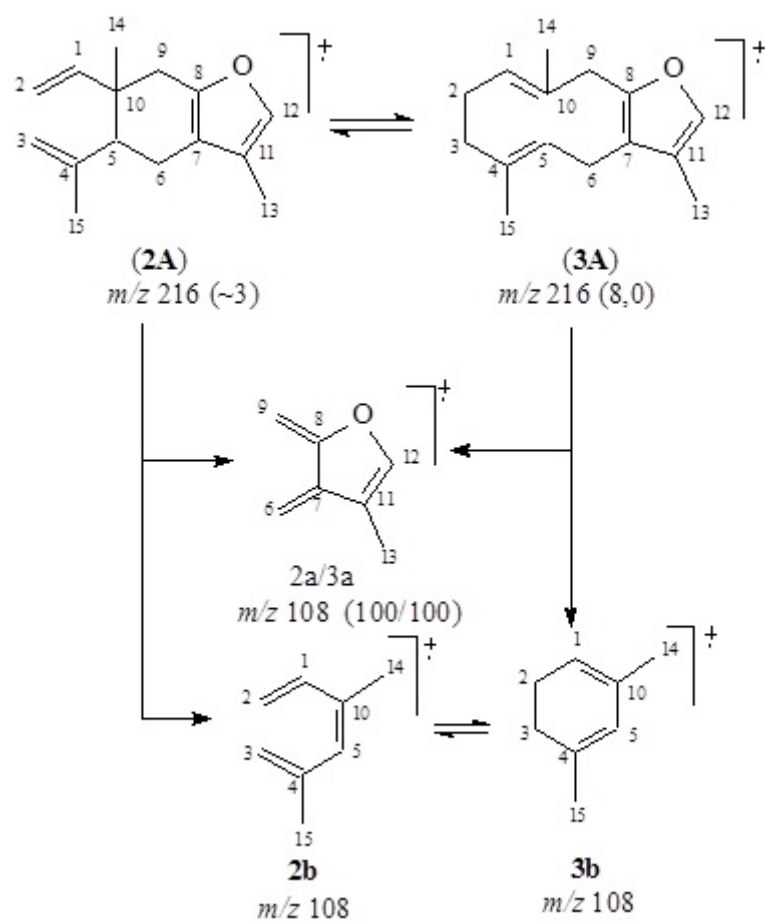
Figura 37. Cromatograma de íons totais e espectro de massa da germacrona (**1**, B-b) e seu produto de rearranjo β -elemenona (**4**, B-a) (condições descritas no item 5.3)

Os espectros de massas da germacrona (**1**) e da β -elemenona (**4**) obtidos pela análise através de CG-EM revelaram os picos dos íons moleculares em m/z 218 ($[M]^+$, **1A/4A**, 8,3/~4 %), confirmando a fórmula molecular $C_{15}H_{22}O$, e outros picos classificados também como principais em m/z 175 (20,8/9,0 %), 150 (0,0/27, 3 %), 136 (58,3/13,6 %), 135 (66,7/86,7 %), 121 (29,2/90,9 %) e 107 (100/100 %, pico base) atribuídos aos fragmentos **1a/4a** a **1e/4e**, respectivamente, permitindo observar diferenças significativas nas abundâncias relativas, principalmente no caso do pico em m/z 136 que apareceu com 58,3 % no EM de **1** e praticamente a percentagem correspondente à abundância natural (13,6 %) no EM de **4** (Esquema 1), situação análoga verificou-se com pico em m/z 150 presente com 27,3 % no espectro de **4** e praticamente zero no de **1** e podem ser usados para distinção de tais componentes. Os espectros de massas do curzereno (**2**) e furanodieno (**3**) revelaram-se praticamente idênticos, apresentando somente pequenas diferenças nas intensidades relativas de alguns picos e compatíveis com a formação de equilíbrio envolvendo as duas substâncias

no espectrômetro de massas nas condições experimentais de registro de tais espectros, com pico do íon molecular em m/z 216 ($[M]^+$, **2A**, ~3 % e **3A**, 8,0 %) e pico base em m/z 108 (**2a**, 100 % e **3a**, 100 %) justificado através de fragmentação do tipo retro Diels-Alder (Esquema 2).



Esquema 1: Proposta de fragmentação para as substâncias **1** e **4** e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses. Estruturas ionizadas de **1** e **4** indicadas como **1A** e **4A**, respectivamente. Estruturas tautoméricas ionizadas de **1A** descritas como **1B** e **1C**.



Esquema 2: Proposta de fragmentação para as substâncias **2** e **3** e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses. Estruturas ionizadas de **2** e **3** indicadas como **2A** e **3A**, respectivamente.

Após isolamento e análise da pureza relativa por CLAE-DAD, os três sesquiterpenos tiveram as suas estruturas confirmadas também por análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Assim, os dados de RMN de ^1H e ^{13}C evidenciaram as correlações entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, e a comparação desses valores com os descritos na literatura permitiu a confirmação das estruturas da germacrona (**1**), curzereno (**2**) e furanodieno (**3**) (TAKAHASHI *et al*, 1983; DEBEKO *et al*, 2002; YANG *et al*, 2011) (Tabelas 9-11).

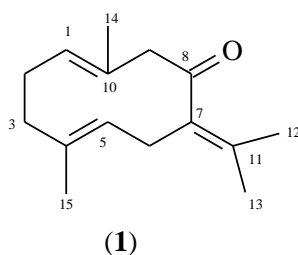


Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da germacrona **1** (acetona- d_6) comparados com os relatados da literatura (TAKAHASHI et al, 1983)

	SUBSTÂNCIA (1)		Germacrona (CCl_4) (TAKAHASHI <i>et al</i> , 1993)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	4,97 (<i>dl</i> , $J=12,3\text{Hz}$)	133,01	4,99	132,8
2	2,15 (<i>m</i>) 2,40 (<i>m</i>)	24,58	2,20 2,50	24,2
3	2,13 (<i>m</i>) 2,11 (<i>m</i>)	38,65	2,20 2,50	38,2
4	-	127,69	-	126,9
5	4,73 (<i>dd</i> , $J=11,4$ e $2,8\text{Hz}$)	126,25	4,71	125,6
6	2,81 (<i>m</i>) 2,90 (<i>m</i>)	26,69	2,86 2,86	29,30
7	-	129,77	-	129,50
8	-	206,63	-	207,90
9	2,88 (<i>m</i>) 3,39 (<i>d</i> , $J=10,4\text{Hz}$)	56,26	2,95 3,41	56,00
10	-	135,37	-	135,10
11	-	138,01	-	137,50
12	1,78 (<i>s</i>)	19,86	1,78	19,90
13	1,72 (<i>s</i>)	22,37	1,73	22,30
14	1,61 (<i>s</i>)	15,68	1,63	16,80
15	1,41 (<i>s</i>)	15,67	1,44	15,60

m= multipletto; *s*= simpleto; *d*= dupletto; *dd*=duplo dupletto; *dl*= dupletto largo;
J- constante de acoplamento

Os assinalamentos dos sinais dos hidrogênios vinílicos H-5 (δ_{H} 4,73 ppm) que acoplam, com um $J= 11,4$ e $2,8$ Hz, com os dois H-6 e do H-1 (δ_{H} 4,97 ppm) acoplando, com um $J= 12,3$ Hz, com o H-2 α e com H-2 β (J não calculado) foram confirmadas pela análise dos espectros de $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY (Figuras 38 e 39)

Adicionalmente, com base no experimento HMBC foram confirmados os sinais para os carbonos quaternários: C-4 (δ_{C} 127,69 ppm) que apresenta interações (3J) com os dois H-6 e H-2 (δ_{H} 2,40 ppm), do C-7 (δ_{C} 129,77 ppm) (3J) e C-11 (δ_{C} 138,01 ppm) (2J) com os hidrogênios das metilas 12 e 13 e que estão em acordo com os dados da literatura (Figura 40 e 41).

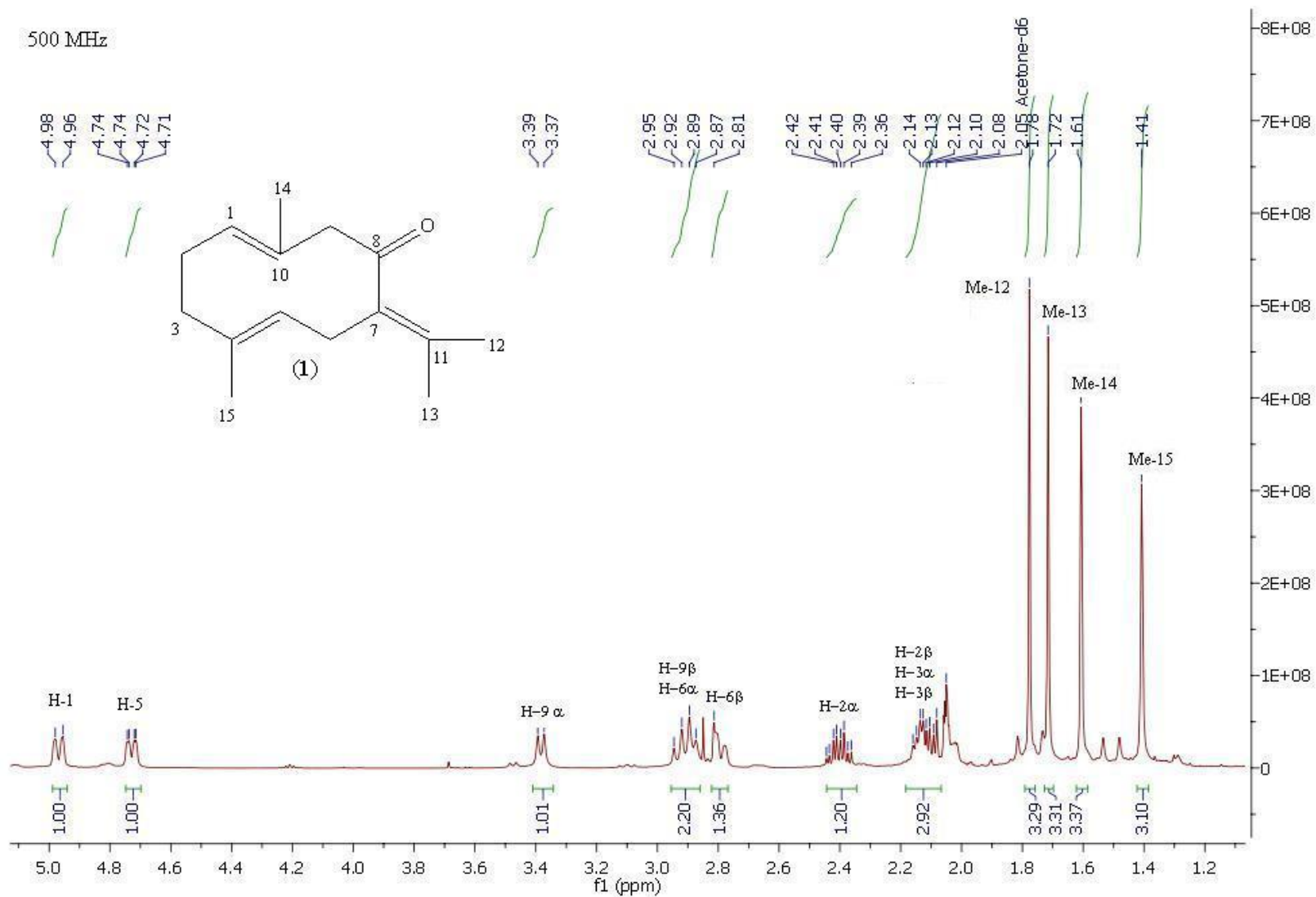


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) da germacrona 1

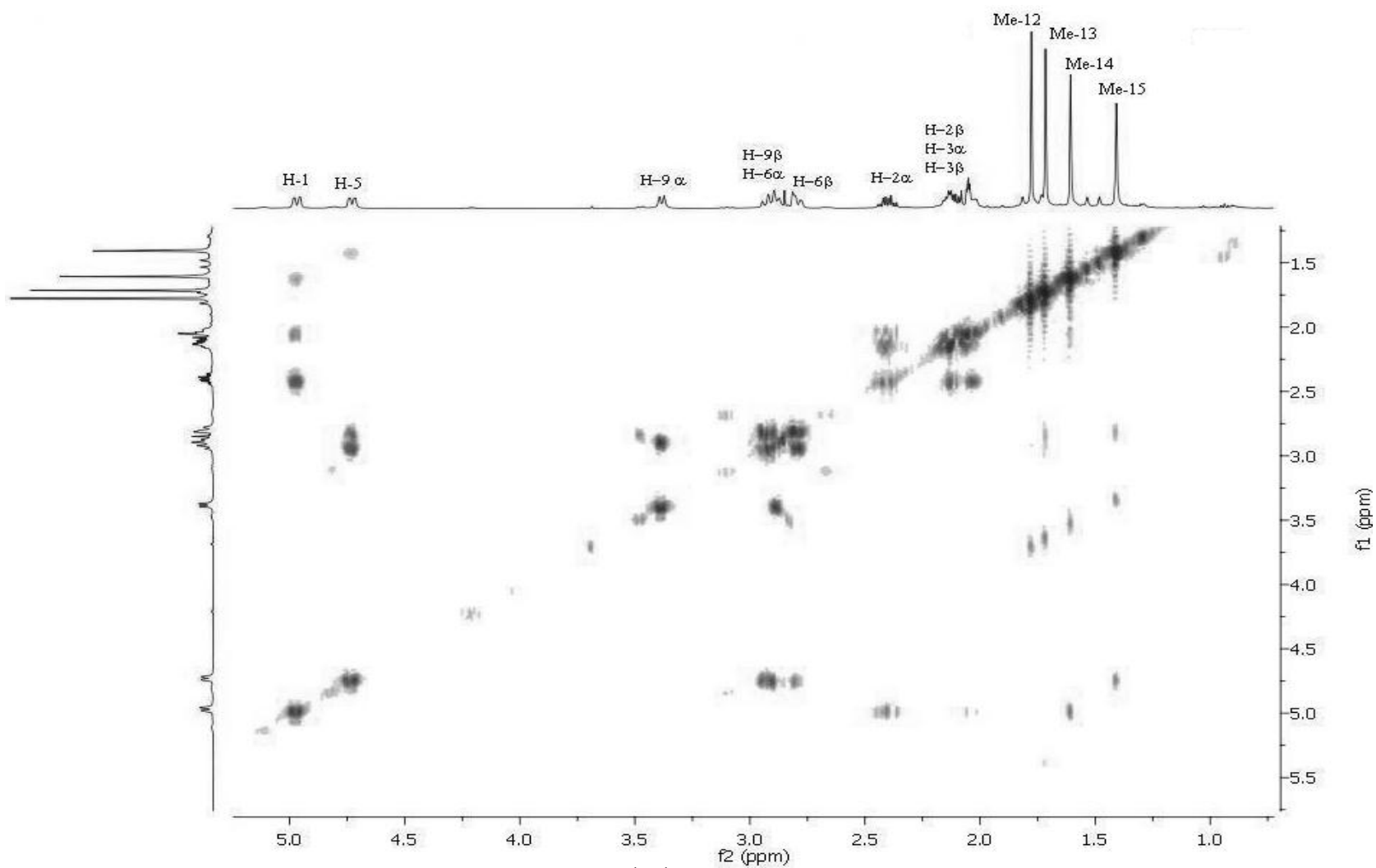


Figura 39. Espectro de RMN ^1H , ^1H COSY (500 x 500 MHz acetona- d_6) da germacrona **1**

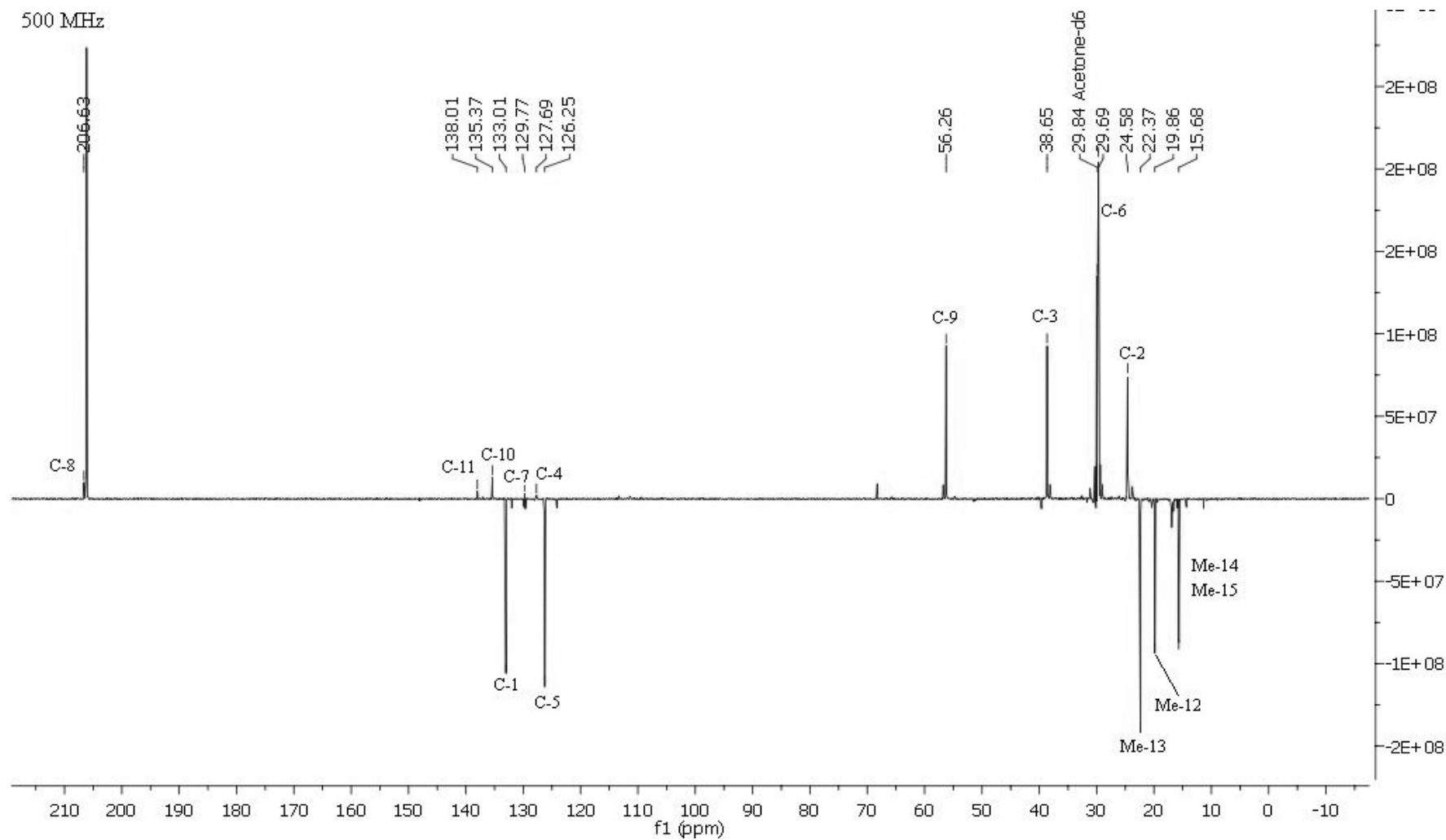


Figura 40. Espectro de DEPTQ (125 MHz, acetona-d₆) da germacrona **1**

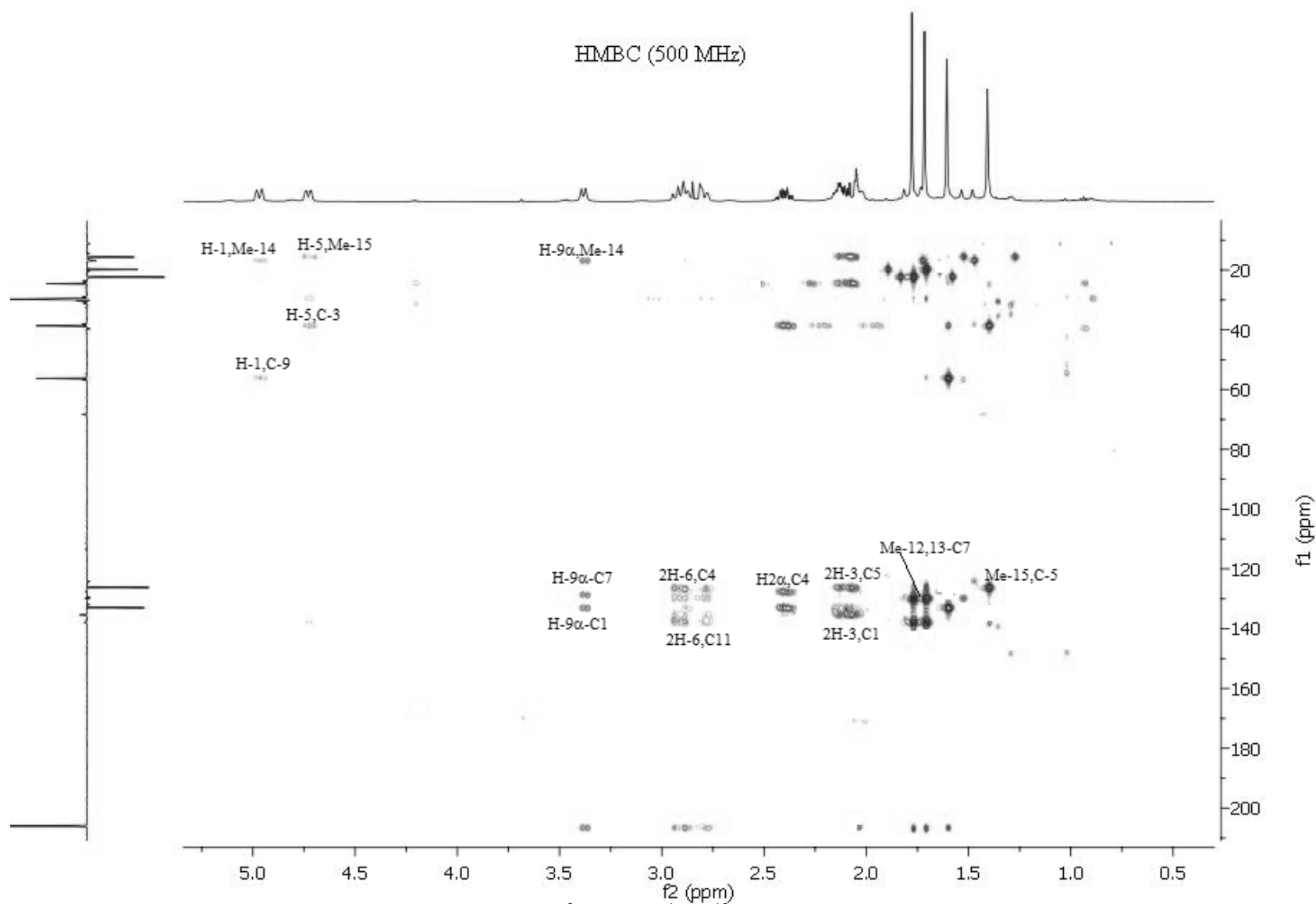


Figura 41. Espectro de HMBC (interações 3J) - RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz acetona- d_6) da germacrona **1**.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do curzereno **2** estão listados na Tabela 10.

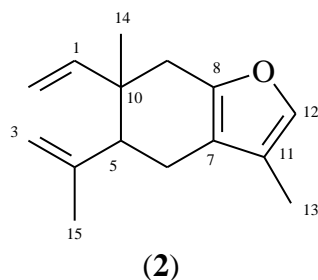


Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do curzereno **2** (CDCl_3) comparados com os dados da literatura (YANG et al, 2011).

	SUBSTÂNCIA (2)		Curzereno (CDCl_3) (YANG et al, 2011)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	5,87 (<i>dd</i> , $J=17,5; 10,8\text{Hz}$)	147,27	5,89	147,10
2	4,99 (<i>dd</i> , $J=17,5; 1,1\text{Hz}$) 4,97 (<i>dd</i> , $J=10,8; 1,1\text{Hz}$)	111,10	5,02 4,98	110,90
3	4,86 (<i>d</i> , $J=1,6\text{ Hz}$) 4,75 (<i>d</i> , $J=1,6\text{ Hz}$)	38,65	4,88 4,77	38,20
4	-	147,51	-	147,20
5	2,29 (<i>t</i> , $J=6,8\text{Hz}$)	50,08	2,31	50,00
6	2,41 (<i>dd</i> , $J=6,8; 1,6\text{ Hz}, 2\text{H}$)	24,35	2,43	24,20
7	-	116,67	-	116,50
8	-	149,00	-	149,50
9	2,67 (<i>d</i> , $J=6,2\text{ Hz}$) 2,36 (<i>d</i> , $J=6,2\text{ Hz}$)	36,24	2,69	36,10
10	-	40,25	-	40,10
11	-	119,14	-	119,30
12	7,05 (<i>s</i>)	137,42	7,07	137,20
13	1,92 (<i>d</i> , $J= 1,2\text{ Hz}$)	8,25	1,94	8,10
14	1,74 (<i>s</i>)	24,62	1,76	24,40
15	1,06 (<i>s</i>)	19,58	1,08	19,50

m= multipletto; *s*=simpleto; *d* = dupletto; *dd* =duplodupletto; *t*= triplete; *J*- constante de acoplamento

As análises dos experimentos de RMN uni- e bidimensionais confirmaram os seguintes elementos estruturais: um grupo vinila, com δ_{H} 5,87 ppm (H-1), 4,99 e 4,97 ppm (2H-2), ligado ao carbono quaternário C-10; um grupo isopropenila, com δ_{H} 1,06, 4,75 e 4,86 ppm, ligado ao C-5. O anel furano trissubstituído em α com o C-8 (δ_{C} 149 ppm), em β pelo C-7 (δ_{C} 111,64 ppm) e em β' pela Me-13, que apresenta uma interação, com $J=1,2\text{ Hz}$ com o H-12 (δ_{H} 7,05 ppm) em α' (Figuras 42-45).

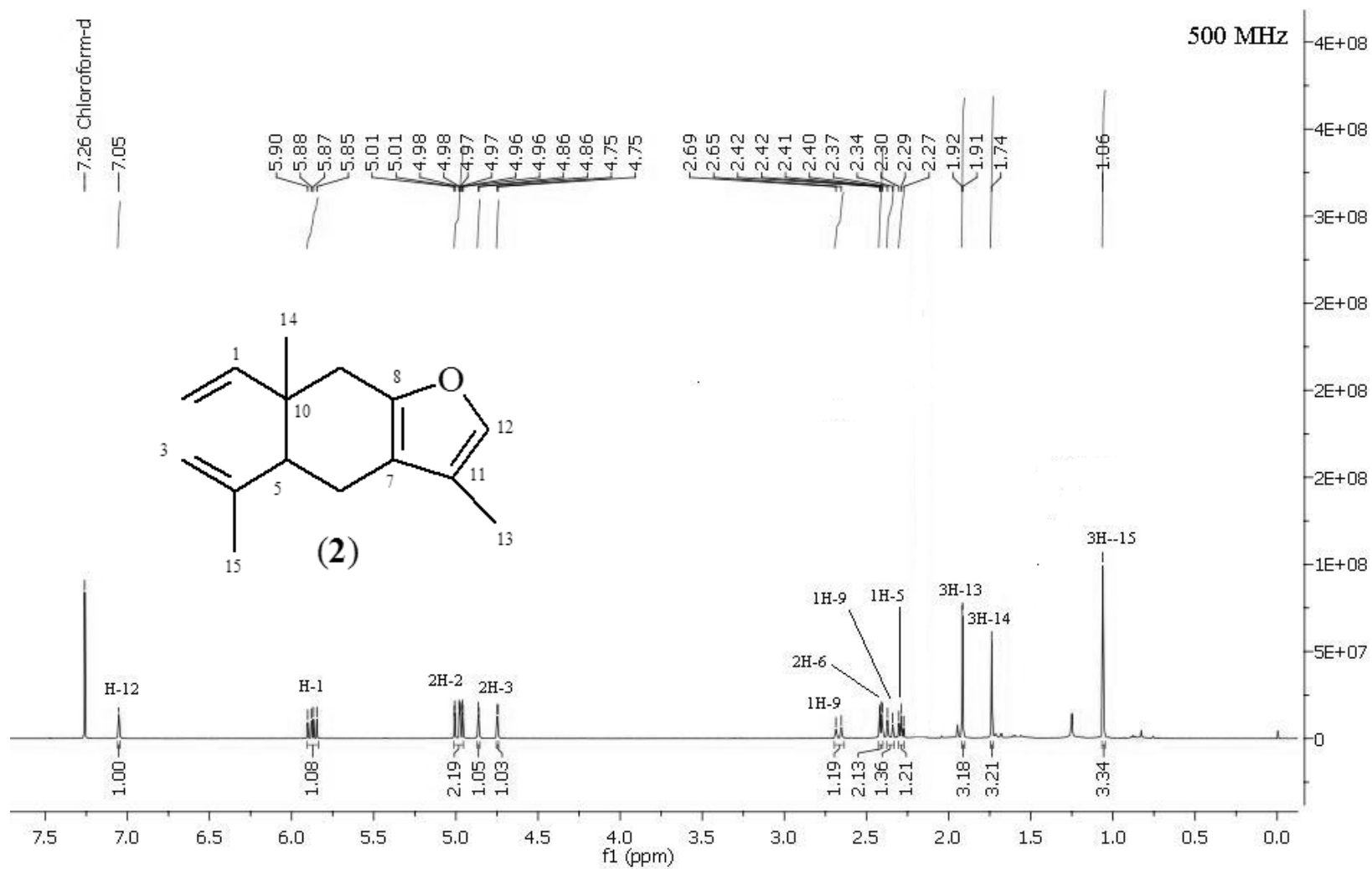


Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do curzereno **2**

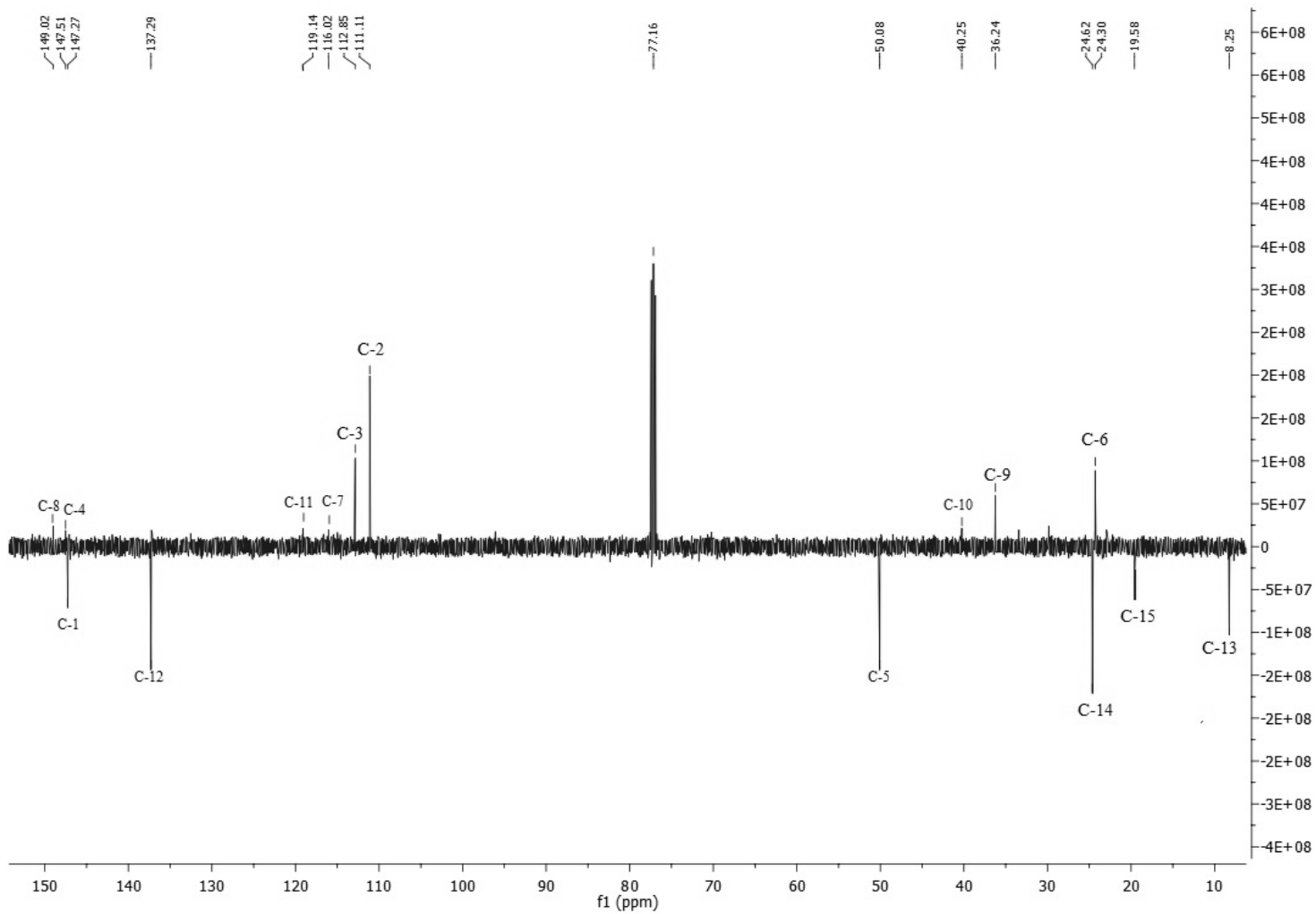


Figura 43. Espectro de DEPTQ (125 MHz,, CDCl₃) do curzereno 2

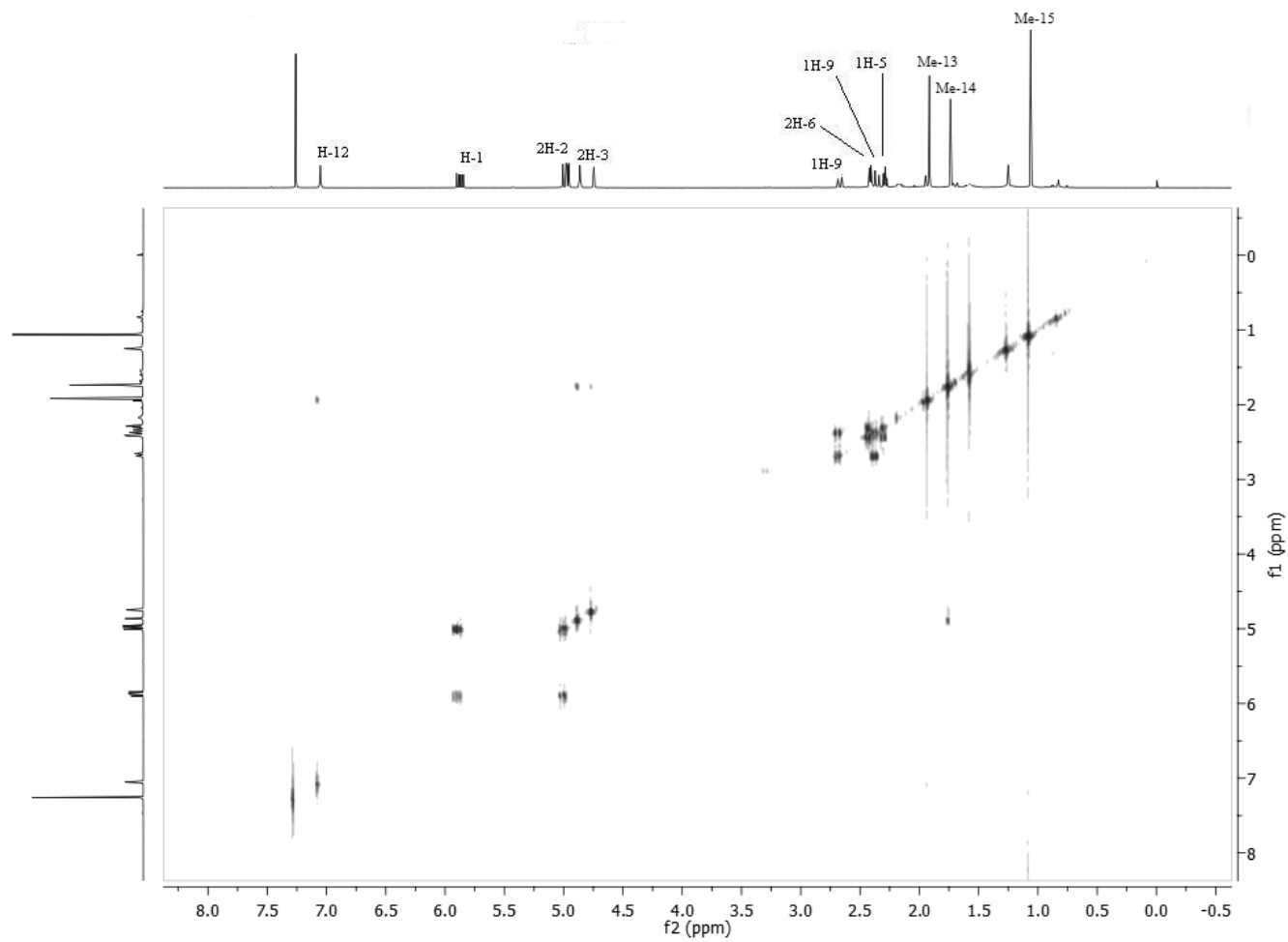


Figura 44. Espectro de COSY- RMN ¹H x ¹H (500 x 500 MHz, CDCl₃) do curzereno **2**

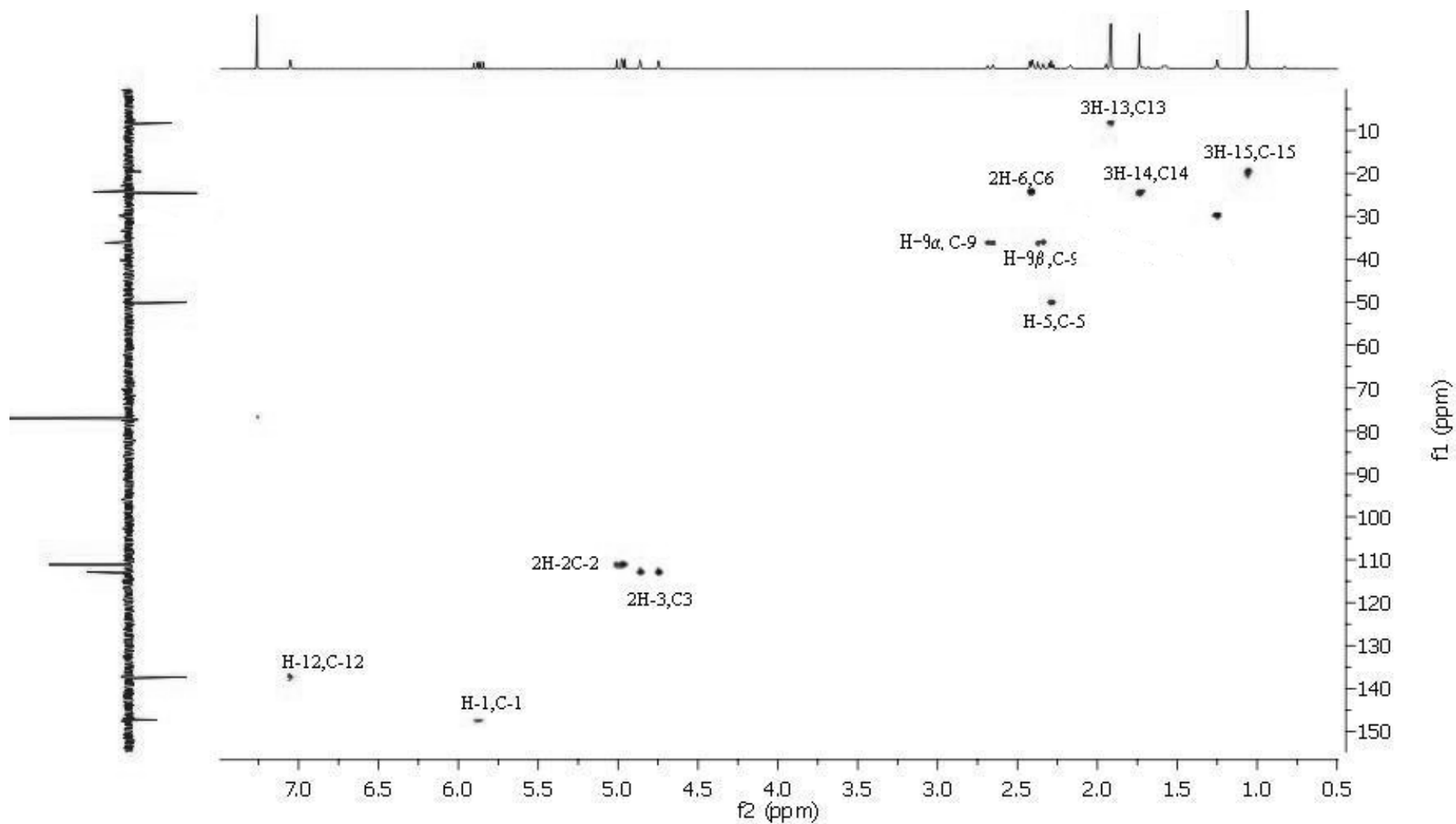


Figura 45. Espectro de HSQC-RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, CDCl_3) do curzereno **2**

Na tabela 11 estão apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do furanodieno **3**.

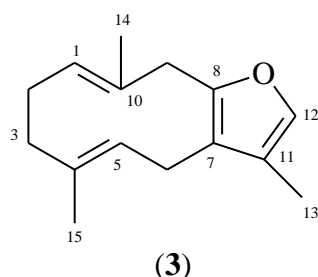


Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do furanodieno **3** (acetona- d_6) comparados com dados da literatura (DEKEBO et al, 2001).

SUBSTÂNCIA (3)			Furanodieno (CDCl_3) (DEKEBO et al, 2001)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	4,98 (<i>dd</i> , $J=10; 6,2\text{Hz}$)	129,85	4,94	129,40
2	2,13 (<i>m</i>)	27,37	2,13	27,20
3	2,22 (<i>m</i>)	40,01	2,24	38,20
	1,78 (<i>m</i>)		1,59	
4	-	134,78	-	134,70
5	4,74 (<i>dd</i> , $J=10,5; 2,8\text{Hz}$)	128,39	4,74	127,90
6	3,07 (<i>m</i>)	24,85	3,08	24,70
7	-	119,61	-	119,30
8	-	150,13	-	150,10
9	3,42 (<i>m</i>)	41,49	3,54	41,30
			3,43	
10	-	129,39	-	129,30
11	-	122,57	-	122,30
12	7,14 (<i>s</i>)	136,95	7,07	136,40
13	1,90 (<i>d</i> , $J= 1,2 \text{ Hz}$)	8,89	1,92	9,30
14	1,57 (<i>s</i>)	16,55	1,60	16,80
15	1,26 (<i>s</i>)	16,38	1,27	16,60

m= multipletto; *s*= simpleto; *d* = dupletto; *dd* =duplo dupletto; *J*- constante de acoplamento

O furanodieno (**3**) exibiu espectro de RMN ^1H (Figura 46) apresentando os sinais das 3 metilas vinílicas (Me-15, Me-14 e Me-13) em 1,26, 1,57 e 1,90 ppm respectivamente. O sinal dos hidrogênios da Me-13, se apresenta como um dupletto de $J=1,2 \text{ Hz}$ referente ao acoplamento com o H-12 (δ_{H} 7,14, *sl*), confirmado na análise do RMN $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (Figura 47). Os acoplamentos exibidos entre os hidrogênios das Me-14 e Me-15 com os hidrogênios vinílicos H-1 (δ_{H} 4,98 ppm) e H-5 (δ_{H} 4,74 ppm), respectivamente, demonstram a presença de duplas trissubstituídas (HMBC, Figura 48), que, como observado no espectro de DEPTQ, apresentam deslocamentos químicos de carbono em 129,85 (C-1) e 129,39 ppm (C-10) e em 134,78 (C-4) e 128,39 ppm (C-5) (Figura 49).

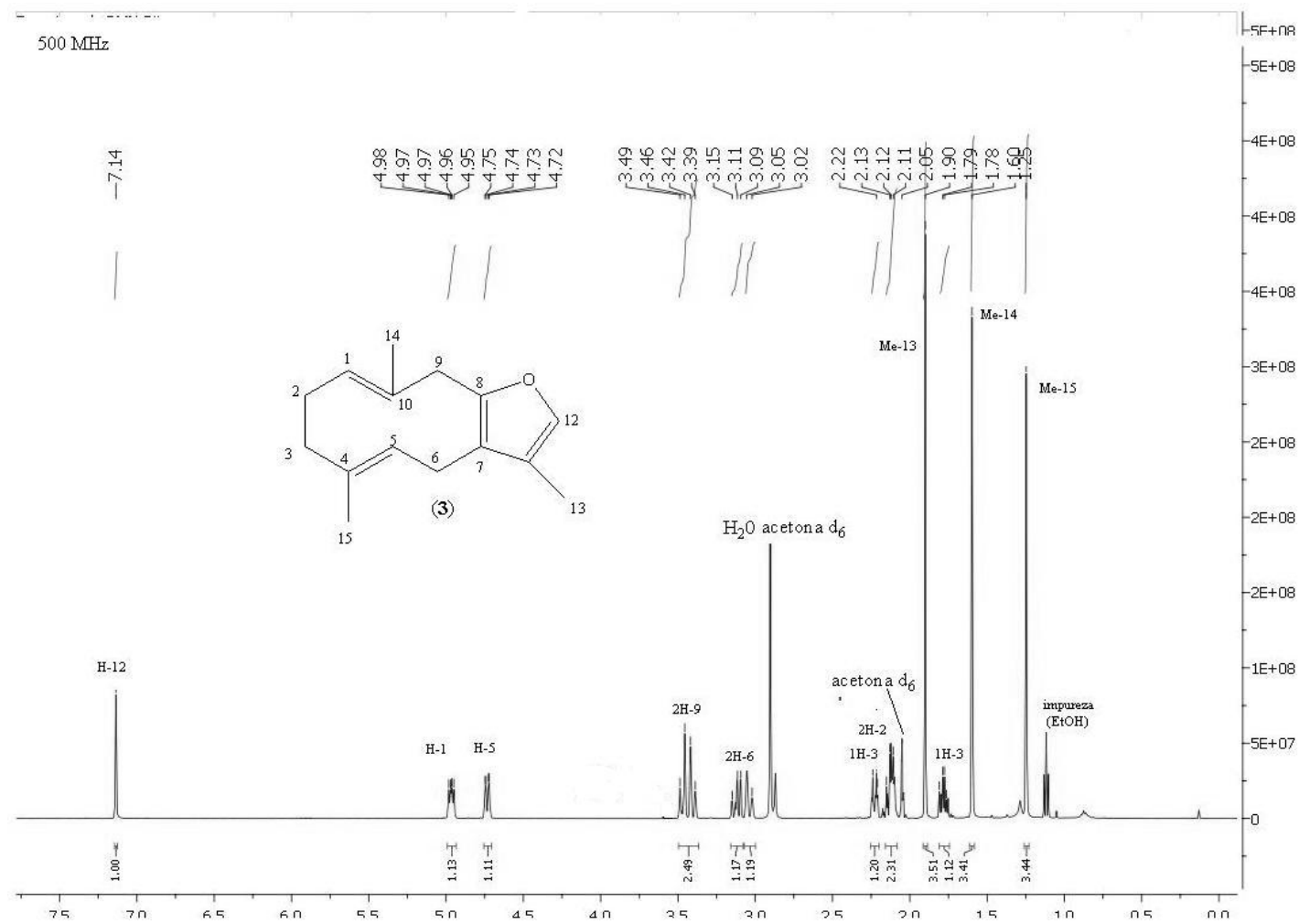


Figura 46. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, acetona-d₆) do furanodieno **3**

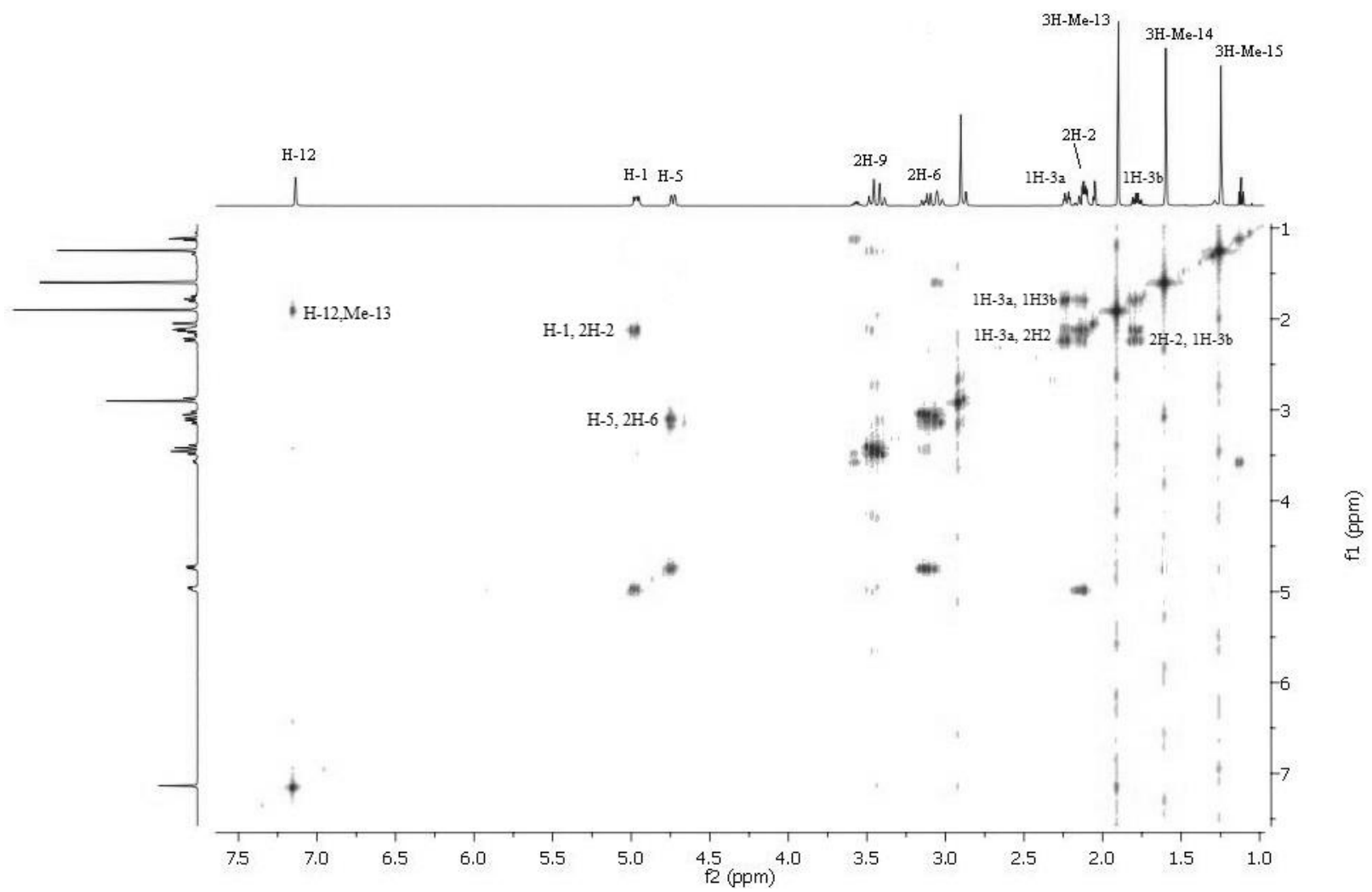


Figura 47. Espectro de COSY-RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (500 x 500 MHz acetona- d_6) do furanodieno **3**

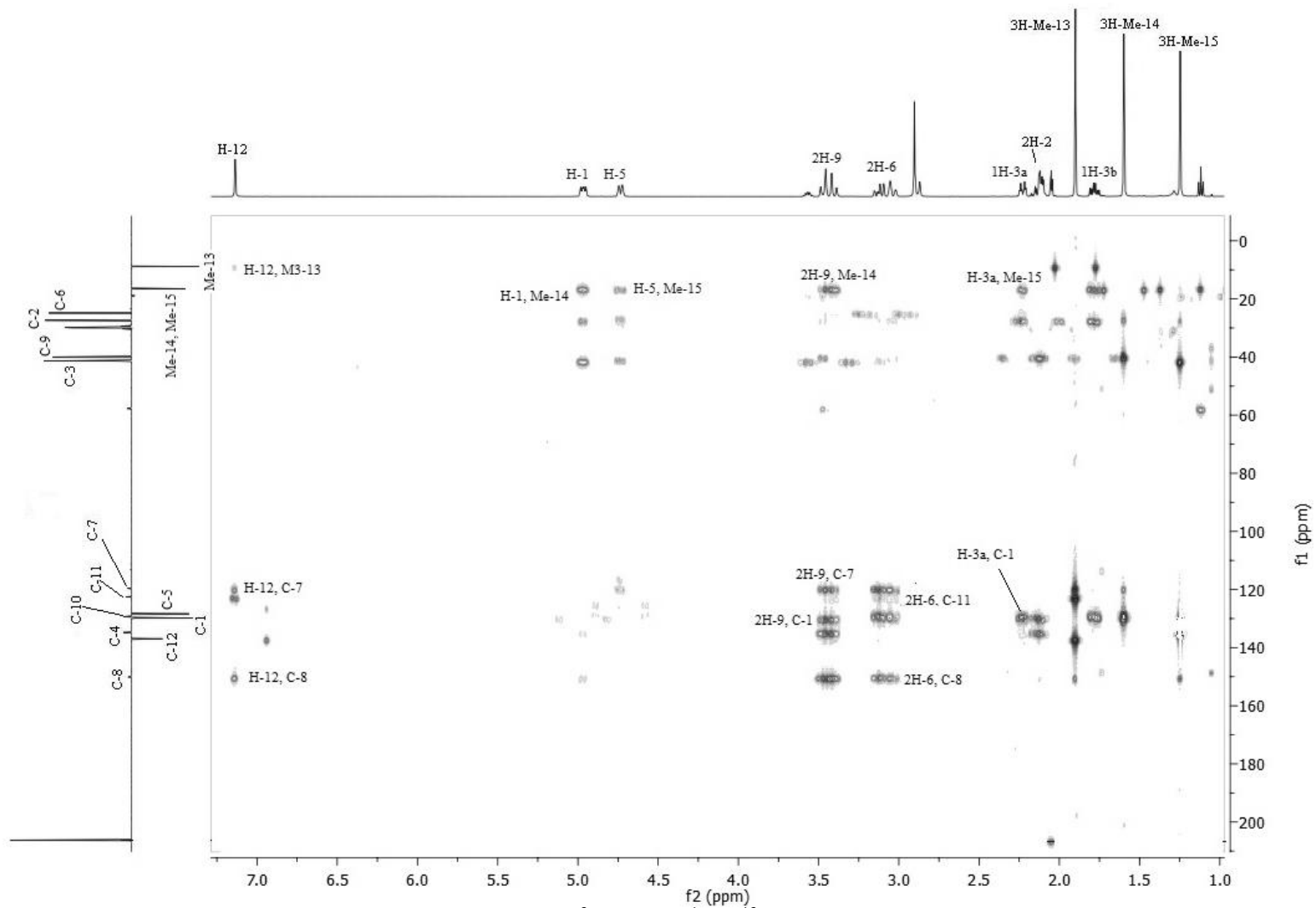


Figura 48: . Espectro de HMBC (acoplamentos 3J) - RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 125 MHz, CDCl_3) do furanodieno **3**

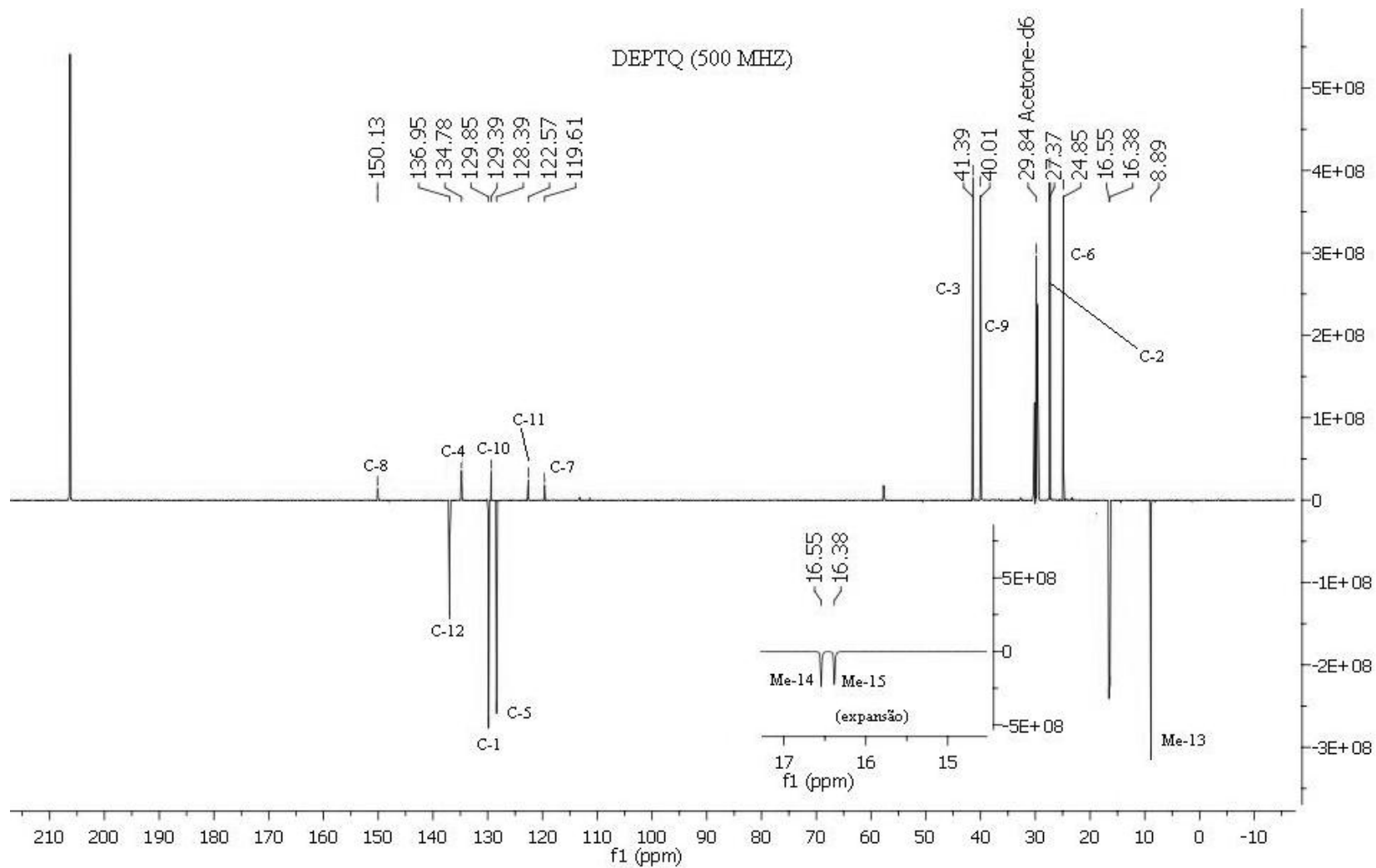


Figura 49. Espectro de DEPTQ (125 MHz, acetona-d₆) do furanodieno **3**.

5.5. Atividade larvívica

Os ensaios biológicos realizados com os óleos essenciais das espécies em estudo demonstram que após 24 horas de exposição em diferentes concentrações dos óleos a mortalidade larval de *Aedes aegypti* L. atingiu a faixa de 100% (Figura 50), sendo que as concentrações mais eficientes foram 0,24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para *E.uniflora* (**Pitanga**), *E.brasiliensis* (**Grumixama**), *P.cattleianum* (**Araçá**), *P.guajava* (**Goiaba**) e *S.cumini* (**Jamelão**), respectivamente, quando comparadas às demais concentrações e controles. A análise dos gráficos também revelou que o aumento da mortalidade larval foi proporcional ao aumento das concentrações dos óleos, com exceção ao óleo de goiaba, onde essa relação se tornou significativamente proporcional com concentrações a partir de 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Nenhuma mortalidade foi observada nos grupos controles (água e DMSO 2%) após o período de 24 horas de teste (dados não mostrados).

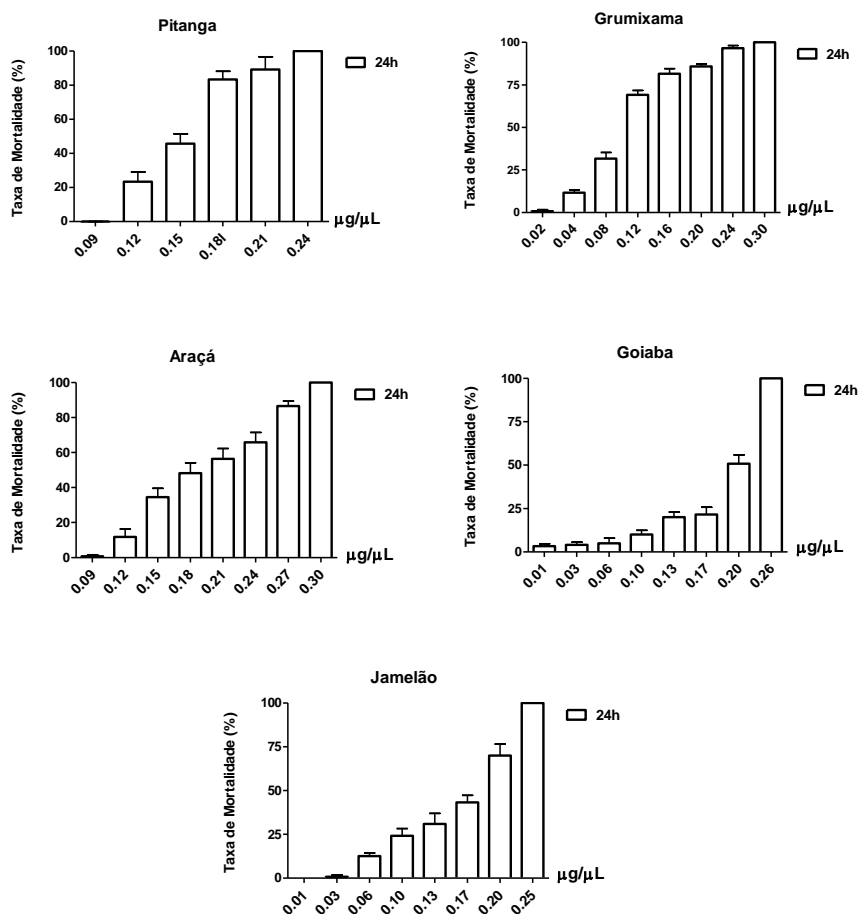


Figura 50. Gráficos da atividade larvívica do óleo essencial das espécies de Myrtaceae frente às larvas do *Aedes aegypti*.

A CL₅₀ de cada óleo essencial foi calculada com base nas taxas de mortalidade obtidas em diferentes concentrações no período de 24 h (Tabela 12).

Tabela 12: Valores das concentrações letais dos óleos essenciais em 24 h.

OE avaliados	CL ₅₀ (mg/L)
<i>Eugenia uniflora</i>	140
<i>Eugenia brasiliensis</i>	100
<i>Psidium cattleianum</i>	200
<i>Psidium guajava</i>	220
<i>Syzygium cumini</i>	150

Nos estudos de Lima e colaboradores (2011), o óleo essencial de folhas de *P. guajava* exibiu uma significativa atividade larvicida, apresentando uma CL₅₀ de 27,7 mg/L, enquanto que no presente estudo, o óleo desta espécie apresentou atividade larvicida inferior (CL₅₀ = 220 mg/L), sendo o óleo essencial de *E. brasiliensis* aquele que apresentou o maior efeito contra as larvas (CL₅₀ = 100 mg/L). O óleo essencial da *P. guajava* apresentou uma composição química rica em sesquiterpenos com 33,2% de α -humuleno, 25,83% de β -cariofileno, 12,08% de α -selineno e 11,71% de β -selineno, enquanto o óleo essencial avaliado por Lima e colaboradores (2011) se apresentou rico no monoterpene oxigenado 1,8-cineol, seguido de 25,6% de β -cariofileno (48,8%), dentre os 82,3% dos compostos identificados. Estes dados divergem dos avaliados por Santos e colaboradores (2011) que relatam que a presença de heteroátomos na estrutura básica de hidrocarbonetos diminui a potência larvicida.

Segundo DIAS & MORAES (2014), como ainda não há um padrão estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para se determinar a atividade larvicida de produtos naturais, diversos autores desenvolvem seus próprios critérios para caracterizar o potencial larvicida de um determinado produto. Neste sentido, os dados aqui apresentados foram correlacionados como os critérios estabelecidos por Komalamisra e colaboradores (2005) que consideraram como produtos ativos, aqueles que apresentaram uma CL₅₀ < 50 mg/L, moderadamente ativos com 50 mg/L < CL₅₀ < 100 mg/L, eficazes para 100 mg/L < CL₅₀ < 750 mg/L, e inativos aqueles com CL₅₀ > 750 mg/L.

Assim, todos os óleos essenciais apresentados no presente estudo se mostraram eficazes quanto a atividade larvicida contra *A. aegypti*. No entanto, são necessárias pesquisas complementares, utilizando inseticidas sintéticos como padrão positivo para se estabelecer critérios para caracterizar o potencial larvicida dos óleos essenciais dentro deste modelo de

bioensaios. Ainda assim, esses dados reforçam a importância do uso de produtos vegetais como fontes de novas substâncias bioativas e, mostram a importância de ensaios preliminares como uma sinalização de potencialidades biológicas.

5.6. Atividade Antioxidante dos óleos essenciais

- Tolerância Celular

Para análise da tolerância celular, foram expostas células de *S. cerevisiae*, crescidas até a 1ª fase do crescimento em YPD 2% nas concentrações de 10 e 100 µg/mL dos óleos essenciais de *E.uniflora* (**Pitanga**), *E.brasiliensis* (**Grumixama**), *P.cattleianum* (**Araçá**), *P. guajava* (**Goiaba**), *S.cumini* (**Jamelão**) e *S. malaccense* (**Jambo**) (Figura 51).

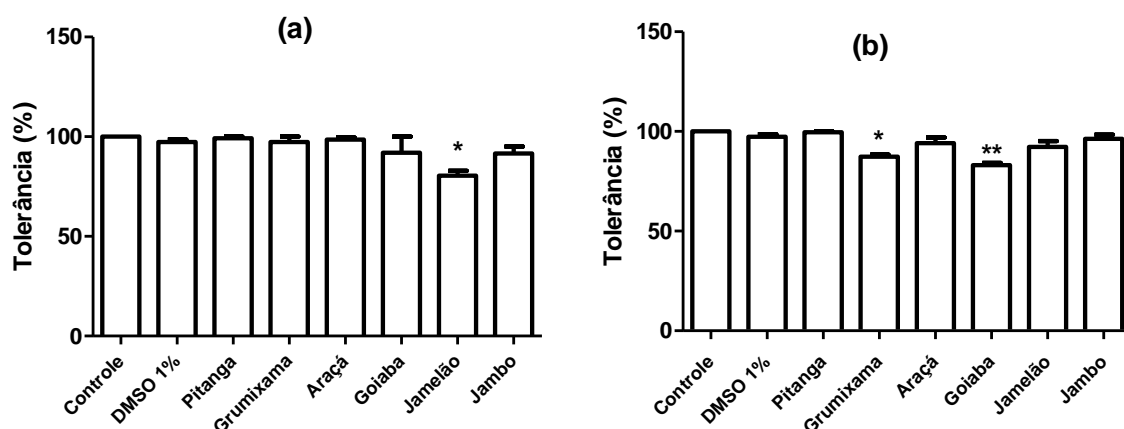


Figura 51. Tolerância celular da cepa de *S. cerevisiae* BY4741 após a exposição aos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae, nas concentrações de 10 µg/mL (a) e 100 µg/mL (b). Os resultados representam a média e desvio padrão (\pm) do número de colônias transformado e porcentagem de sobrevivência em 1,2 e 24 h, de no mínimo 3 experimentos independentes. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle.

Os resultados demonstraram que as concentrações de óleos essenciais e o DMSO não causaram toxidez às células de levedura, não havendo inclusive diferença significativa entre as duas concentrações avaliadas. Apesar das diferenças significativas encontradas entre os óleos de *S. cumini* para 10 µg/mL, e *E. brasiliensis* e *P. guajava* para 100 µg/mL, observou-se pelos resultados que, nestes casos, a tolerância foi moderada, e que no geral indicam que a inibição provocada pelas concentrações utilizadas destes óleos essenciais foi branda.

- Estresse Oxidativo e Viabilidade Celular

Após verificar que as concentrações de 10 e 100 µg/mL dos óleos não foram tóxicas para as células de levedura, partiu-se para análise dos potenciais antioxidantes dos óleos essenciais, a partir dos ensaios de viabilidade celular e disfunção mitocondrial. Para análise da capacidade antioxidante dos óleos essenciais, células de *Saccharomyces cerevisiae* foram tratadas com o agente oxidante peróxido de hidrogênio (0,5 mM) após a incubação com amostras dos óleos.

Na avaliação da capacidade das células de formarem colônias (viabilidade celular), observou-se que nenhum dos óleos testados apresentou um efetivo potencial de proteção das células contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (Figura 52).

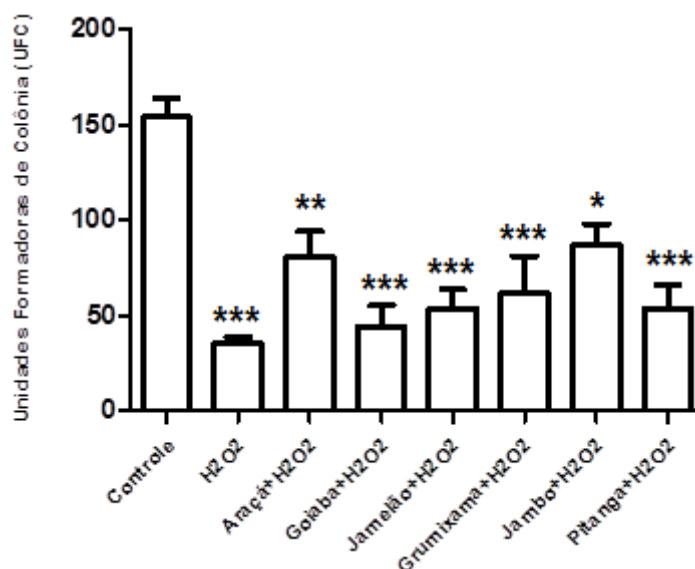


Figura 52. Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais frente o estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. (*) indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle.

Não houve diferença significativa entre os dados de UFC (unidade formadora de colônia) dos óleos essenciais de *P. guajava*, *S. cumini*, *E. brasiliensis* e *E. uniflora* com aqueles obtidos para as células tratadas com o H₂O₂, indicando que estes óleos não mostraram atividade antioxidante frente aos danos oxidativos causados pelo H₂O₂ no método testado. Já os óleos essenciais do *P. catleianum* e *S. malaccence* apresentaram um potencial antioxidante moderado.

- Disfunção Mitocondrial

O uso de levedura tem a vantagem que o dano mitocondrial pode ser facilmente avaliado através da detecção de células *petite* entre as células sobreviventes. A análise de disfunção mitocondrial teve por objetivo determinar a capacidade das células de desenvolverem normalmente as mitocôndrias quando crescidas em meio contendo glicerol como fonte de energia. Neste meio as células que não conseguiram desenvolver suas mitocôndrias, devido a um dano mitocondrial, tornaram-se incapazes de formar colônia.

Os óleos essenciais de *P. guajava*, *S. cumini*, *E. brasiliensis* e *E. uniflora* mostraram-se altamente efetivos na proteção contra danos mitocondriais nas células de *S. cerevisiae* (Figura 53). Embora apresentando uma proteção moderada frente aos danos oxidativos provocados pelo H₂O₂, os óleos do *P. catleianum* e *S. malaccence* apresentaram níveis consideráveis de disfunção mitocondrial, cerca de 18% e 12%, respectivamente, quando comparados ao nível do H₂O₂ (24%)

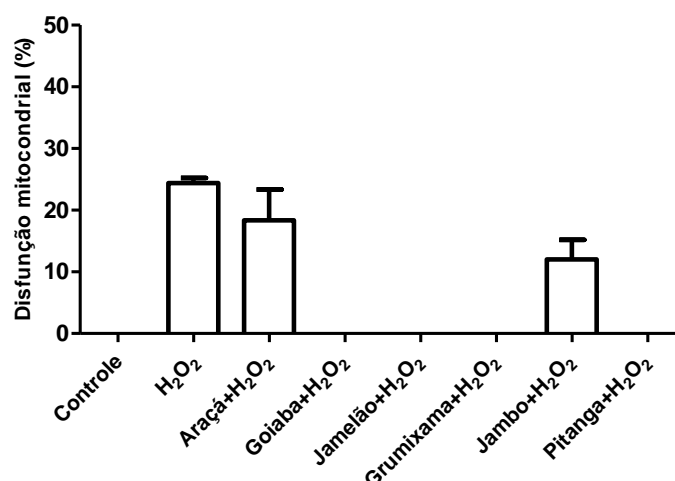


Figura 53. Desempenho dos óleos essenciais de Myrtaceae nos níveis de disfunção mitocondrial de células de *S. cerevisiae* calculados a partir dos resultados de viabilidade celular obtidos nos meios YPD e YPGly.

- Oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressos *pmol* de malonaldeído (MDA) por *mg* de células, para o óleo essencial de *E. uniflora* (**O.E.Pitanga**) e do furanodieno estão apresentados na Figura 54.

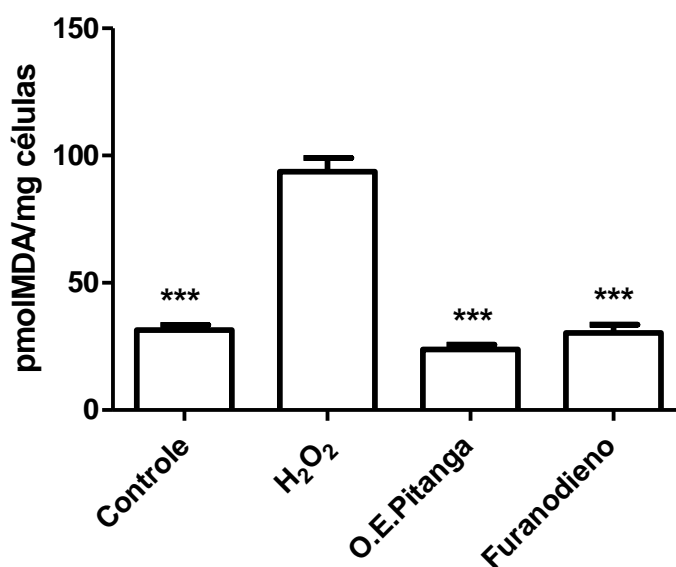


Figura 54. Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (pmolMDA/mg de células) em células de *S. cerevisiae* expostas ao H₂O₂, e células expostas ao H₂O₂ após pré-incubação com óleo essencial de *E. uniflora* (O.E.Pitanga) e seu isolado furanodieno.

Nas condições experimentais aplicadas, avaliando-se os dados obtidos com as células adicionadas de H₂O₂, verificou-se um aumento nos níveis de peroxidação lipídica em comparação ao controle. Entretanto, o óleo essencial de *E. uniflora* e o furanodieno, revelaram-se potenciais agentes antioxidantes, promovendo uma proteção significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao controle.

Na literatura existe um número limitado de publicações relacionada a bioatividade de constituintes isolados de óleos essenciais, bem como estudos sobre compostos bioativos do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* não estão disponíveis. Pesquisa realizada na literatura revelou que o furanodieno, isolado da fração hexânica de folhas de *Curcuma longa* apresentou fraca atividade antioxidante frente ao ensaio de inibição da peroxidação lipídica (LIU & NAIR, 2012). No entanto, é sabido que a bioatividade dos óleos essenciais não pode ser atribuída somente aos seus principais constituintes, uma vez que os componentes minoritários são capazes também de desempenhar um papel significativo na atividade observada, além dos efeitos sinérgicos que podem estar atuando (VICTORIA *et al*, 2012).

5.7. Atividade tripanocida

- Avaliação da citotoxicidade:

Os resultados da viabilidade das células mononucleares totais de sangue periférico estão representados na Figura 55. Os resultados sugerem que, nas condições testadas, os óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. brasiliensis* L. e *P. cattleianum* mantêm a viabilidade das

células ao longo do tempo e que em concentrações adequadas podem ser utilizadas nos estudos desejados.

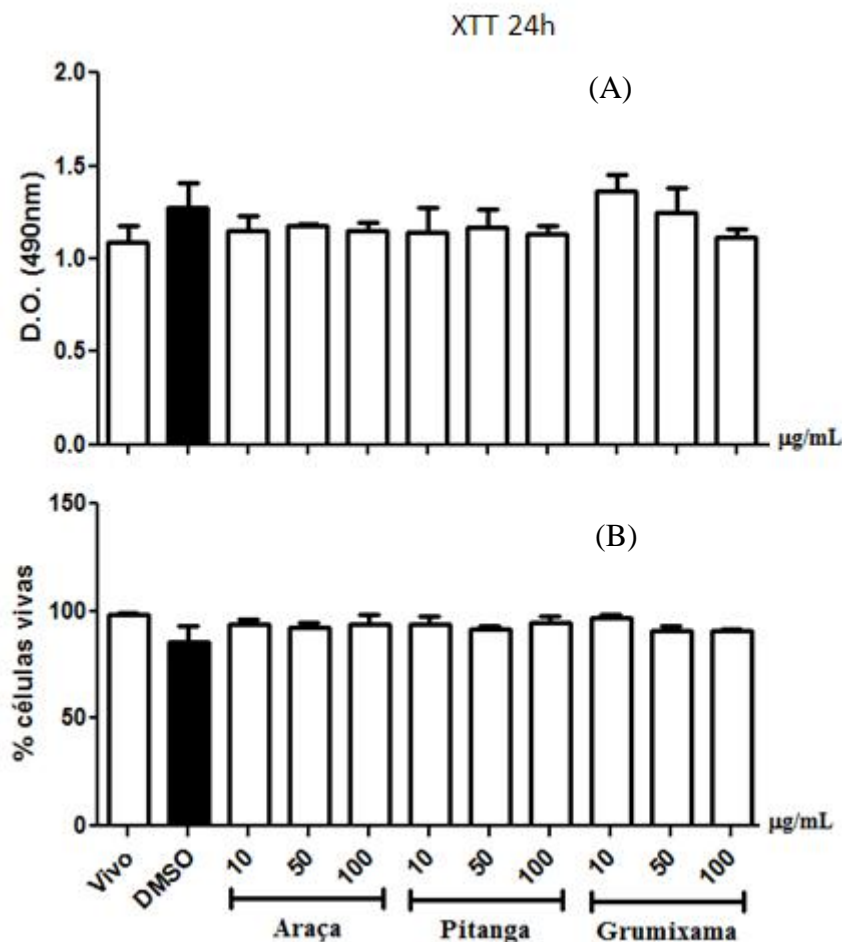


Figura 55. Avaliação da citotoxicidade de óleos essenciais de *P.cattleianum* (araçá), *E. uniflora* (pitanga) e *E. brasiliensis* (grumixama) em células totais de sangue periférico humano. Resultado representado em densidade óptica (A) e em porcentagem de células vivas (B). Resultado representativo de 6 experimentos independentes realizados em triplicata.

- Ação tripanocida

Com o objetivo de avaliar a potencial atividade dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae selecionadas e do furanodieno frente ao parasito do *T. cruzi*, formas epimastigotas foram incubadas na presença de concentrações estabelecida para estes compostos. A mortalidade dos parasitos em cultura foi determinada através da contagem após sete dias de incubação.

Os resultados do desempenho dos três óleos essenciais testados em comparação à ação do fármaco benzonidazol, estão apresentados na Figura 56.

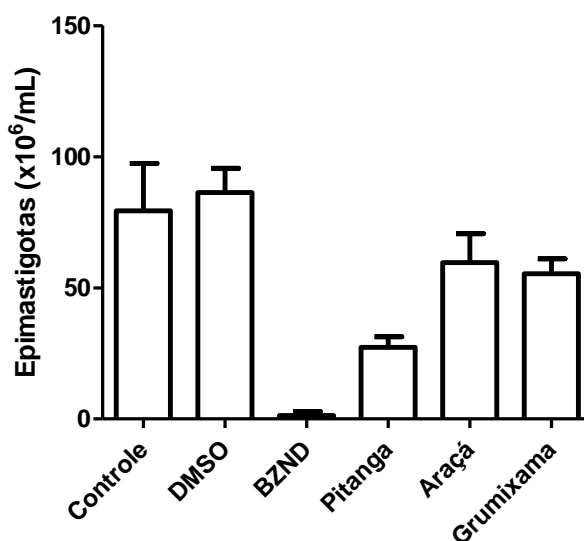


Figura 56. Avaliação da atividade tripanocida dos óleos essenciais comparada ao potencial do benzonidazol (BZND)

Os resultados demonstraram que óleo essencial de *E. uniflora* foi mais ativo quando comparado aos óleos das outras duas espécies. No entanto, nenhum dos três óleos apresentaram desempenho comparável ao fármaco benzonidazol.

Como o resultado obtido com óleo de *E. uniflora* foi o mais satisfatório, e o furanodieno havia sido isolado em quantidade satisfatória, esta substância foi então avaliada. Os resultados, apresentados na Tabela 13, mostram que as concentrações variando de 30 a 200 µg/mL apresentaram atividade significativa em relação ao controle, evidenciado pelo caráter descendente do gráfico (Figura 57). A concentração de 200 µg/mL foi a que se mostrou mais fortemente ativa, diminuindo em torno de 99% o número de parasitos presentes no meio. Pouca diferença significativa na quantidade de parasitos pode ser observada na menor concentração testada (3 µg/mL), com apenas 7% de atividade. A análise dos dados obtidos com o furanodieno forneceu uma CI_{50} de 39,2 µg/mL.

Tabela 13: Formas epimastigotas presentes no meio após 7 dias de incubação com furanodieno em 6 concentrações.

	Epimastigotas (x 10 ⁶ /mL) ^(*)	Atividade (%)
Controle	21,87±3,37	
DMSO	20,58±2,32	5,9
3 µg/mL	18,67±0,38	7,0
30 µg/mL	10,33±0,52	52,8
60 µg/mL	4,58±0,63	79,0
90 µg/mL	1,33±0,38	93,9
150 µg/mL	0,50	97,7
200 µg/mL	0,25	98,9

(*) resultados expressos como média das repetições

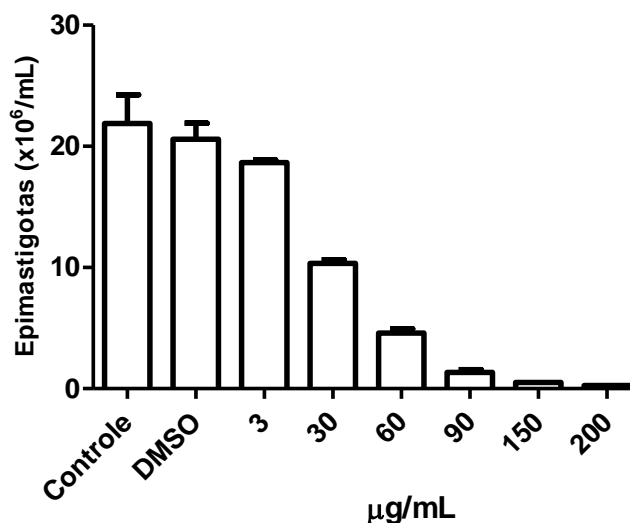


Figura 57. Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* ($2,5 \times 10^5$ /mL) de culturas tratadas com furanodieno em 6 concentrações.

Há vários relatos na literatura que demonstraram que furanodieno possui propriedades diversificadas como analgésico, hepatoprotetor, anti-inflamatória, antitumorais e antiangiogênicas (DOLARA *et al.*, 1996; MATSUDA *et al.*, 1998; MAKABE *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2012), mas não há relatos quanto a atividade tripanocida deste sesquiterpeno. Estes dados podem sugerir que o furanodieno, isolado do óleo de *E. uniflora*, seja um dos elementos responsáveis pela atividade antiepigastigota do óleo essencial desta espécie.

Estes resultados indicam que a *E. uniflora* seria uma fonte de potenciais substâncias, que representam uma alternativa interessante para combater doenças infecciosas como a doença de Chagas. O uso do óleo essencial desta planta pode representar uma fonte promissora para o desenvolvimento de terapias, principalmente em função da baixa

toxicidade *in vitro*, como foi observado nos experimentos realizados e como já descrito na literatura (XIAO *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2012).

Apesar da necessidade de estudos futuros para melhor elucidação do mecanismo de ação do furanodieno, os resultados obtidos neste trabalho sugerem fortemente o furanodieno como potencial agente tripanocida.

5.8. Atividade antifúngica

Com relação ao crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* submetido a tratamento com óleos essenciais e fungicida comercial, não se verificou diferença significativa entre os controles negativos (somente BDA e BDA+DMSO), após 72 horas de incubação (Tabela 14 e Figura 58). Não foi observado crescimento micelial no tratamento com o fungicida comercial Folicur (100% de inibição).

Tabela 14: Área e inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* submetido a tratamento com óleo essencial de 5 espécies de Myrtaceae

Tratamento	Crescimento (cm ²)	Inibição (%)
Controle (BDA)	12,34 a	-
Controle (BDA+DMSO)	11,41 a	-
Controle (Folicur)	0 e	100,0 ***
<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	3,82 d	66,5 ***
<i>P. guajava</i> (Goiaba)	10,00 ab	12,3 ns
<i>E. brasiliensis</i> (Grumixama)	3,19 d	72,0 ***
<i>S. cumini</i> (Jamelão)	3,92 d	65,6 ***
<i>P. cattleianum</i> (Araçá)	7,61 bc	33,4 *

Letras iguais entra as linhas, resultado não significativo (Tukey 5%). Em relação aos respectivos controles: não significativo (ns), significativo a 5% * e 0,1% ***.

Apesar de não ter sido observado inibição significativa no tratamento com o óleo essencial de *P. guajava*, os demais óleos essenciais promoveram inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum*. O tratamento com óleo essencial de *P. cattleianum* promoveu menor ação inibitória sobre o crescimento micelial do fungo (33,4% de inibição). Os valores de inibição verificados nos tratamentos com os óleos essenciais de *E. uniflora*, *E. brasiliensis*, *S. cumini* foram respectivamente de 66,5; 72,0 e 65,6%.

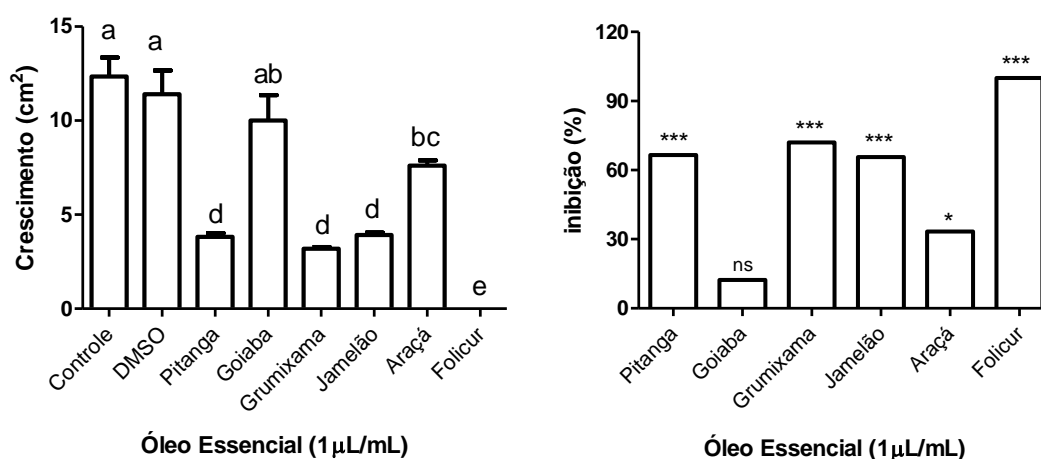


Figura 58. Área e inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* submetido a tratamento com óleo essencial de 5 espécies de Myrtaceae. Letras iguais entre as linhas, resultado não significativo (Tukey 5%* e 0,1%***).

Embora constem vários relatos na literatura indicando que os óleos essenciais de espécies de Myrtaceae possuem algum grau de atividade antimicrobiana frente aos mais variados microrganismos, até o momento, apenas para as espécies *E. uniflora* e *S. cumini* são encontrados relatos sobre a avaliação do potencial antifúngico frente ao fitopatógeno do gênero *Fusarium*, em especial ao *F. oxysporum* (BRUN & MOSSI; 2010; COSTA *et al*, 2010; LAGO *et al*, 2011; VITÓRIA *et al*, 2012). Contrariando o resultado aqui obtido, Souza e colaboradores (2005) relataram que o óleo essencial de *E. uniflora* não apresentou inibição para nenhum dos fungos testados, incluindo *Fusarium spp.*

Para a espécie *E. brasiliensis*, Magina e colaboradores (2009) demonstram que o óleo essencial extraído das suas folhas apresentou potencial atividade microbiana frente a um conjunto de bactérias, enquanto que Siebert e colaboradores (2015) demonstram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial parece variar de acordo com a estação do ano em que foi realizada a extração do óleo. Não foram encontrados relatos da avaliação da atividade antifúngica desta espécie.

Apel e colaboradores (2006) verificaram atividade antifúngica para o óleo essencial de *P. cattleianum*, posteriormente testado em outros trabalhos, onde também foi demonstrado o seu potencial (CASTRO *et al*, 2015; SCUR *et al*, 2016). Soliman e colaboradores (2016) verificaram atividade antimicrobiana para o óleo essencial de *P. cattleianum* e *P. guajava*, porém menos acentuada no controle de fungos. Uma atividade antifúngica dose-dependente foi relatada por Souza Junior e colaboradores (2009), enquanto

Joseph e colaboradores (2010) relataram que o óleo essencial de *P. guajava* apresentou atividade bactericida, porém a atividade antifúngica foi nula.

Os resultados obtidos aqui para o óleo essencial de *S. cumini* estão de acordo com os reportados por Badawy & Abdelgaleil (2014) e Siddique e colaboradores (2015), nos quais constam que o óleo essencial desta espécie apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, inclusive o *Fusarium oxysporum*.

Lawal e colaboradores (2014) também verificaram ampla atividade antimicrobiana do óleo essencial de *S. malaccense* contra fungos e bactérias.

Em relação aos possíveis mecanismos de ação através dos quais o crescimento micelial pode ser reduzido ou totalmente inibido, Lucini e colaboradores (2006) indicaram que a inibição do crescimento micelial é causada por monoterpenos presentes em óleos essenciais. No entanto, no presente trabalho, tanto o óleo essencial *S. cumini* (jamelão), rico em monoterpenos (62,71%), quanto o óleo essencial de *E. brasiliensis* (grumixama) formado principalmente por sesquiterpenos (85,72%), apresentaram percentual de inibição próximos, sugerindo a ação específica de componentes dos óleos essenciais, bem como possível ação sinérgica (CAROVIC-STANKO *et al*, 2010).

A atividade inibitória também tem relação com a característica lipofílica dos óleos essenciais que permite uma interação das substâncias presentes com as membranas celulares, provocando alterações nas funções, aumentando a sua permeabilidade e induzindo ao extravasamento de constituintes intracelulares vitais, bem como afetando a respiração celular e outros sistemas enzimáticos (BAKKALI *et al*, 2008, BADAWY & ABDELGALEIL, 2014; MAIA *et al*, 2015).

No que concerne à pesquisa química de alguns representantes da família Myrtaceae atrelado ou não a testes de atividade biológicas, e mais precisamente, aos estudos dos óleos essenciais produzidos pelas espécies aqui avaliadas, a carência de trabalhos publicados revela que ainda há muito a ser investigado.

6. CONCLUSÕES

Para o óleo essencial extraído de *E. uniflora* a análise multivariada aplicada aos resultados de CG-EM foi satisfatória para discriminar as diferenças na composição química destes óleos em função da idade das folhas.

O furanodieno (3) foi isolado do óleo essencial das folhas jovens, embora não tenha sido observado na análise cromatográfica convencional (CG-DIC), sugerindo assim, que tenha ocorrido a sua conversão completa em curzereno (2) através do rearranjo térmico.

As análises de ACP e AAH aplicadas aos resultados de CG-EM dos óleos essenciais extraídos das folhas das seis espécies de Myrtaceae estudadas no presente trabalho permitiu discriminar três agrupamentos distintos, de acordo com a similaridade da composição de constituintes voláteis para cada espécie. Especificamente, para o OE de *P. guajava* e *P. cattleianum*, os constituintes β -cariofileno e α -humuleno foram considerados os biomarcadores do gênero *Psidium*.

As análises por CLAE-DAD e RMN demonstraram que a Cromatografia de Adsorção em gel de sílica, em coluna *flash* (CC) foi uma metodologia adequada para o isolamento do curzereno, furanodieno e a germacrona do óleo essencial de *E. uniflora*, confirmando que não ocorreu rearranjo térmico para furanodieno e a germacrona.

Nos resultados obtidos dos ensaios biológicos, pode-se concluir que embora todos os óleos essenciais estudados tenham se mostrado eficazes quanto a atividade larvicida contra *A. aegypti*, ainda são necessárias pesquisas complementares, utilizando inseticidas sintéticos como modelos para se estabelecer critérios para caracterizar o potencial larvicida dos óleos essenciais dentro deste bioensaios. Ainda assim, os resultados reforçam a importância de produtos vegetais como fonte de novas substâncias bioativas e mostram a importância de bioensaios preliminares como uma sinalização de potencialidades biológicas.

A avaliação do estresse oxidativo sob *S. cerevisiae* demonstrou que os óleos essenciais, nas condições realizadas, não apresentaram potencial antioxidante. No entanto, no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, pelo método TBARS, o óleo essencial de *E. uniflora* e seu isolado furanodieno indicaram uma significativa atividade antioxidante. Estes resultados demonstram a importância do uso de uma gama de ensaios no processo de triagem antes de se atribuir bioatividade a um material vegetal, minimizando assim resultados duvidosos, além de possibilitar evidências referentes ao mecanismo de ação.

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) pode ser considerada uma fonte de potenciais substâncias que representam uma alternativa interessante no combate as doenças parasitárias, como a doença de Chagas. Esta planta parece ser promissora no desenvolvimento de terapias, principalmente em função da baixa toxicidade *in vitro*, como observado nos experimentos realizados.

Os resultados com furanodieno sugerem fortemente que esta substância possa ser um potencial agente antiparasitário, apesar da necessidade de estudos futuros para melhor compreensão de seu mecanismo de ação.

Os ensaios realizados com o fungo *Fusarium oxysporum* revelaram que os óleos essenciais das espécies estudadas no presente trabalho apresentam discreta atividade fungicida. Estes resultados sugerem o uso de óleo essencial dessas espécies como uma alternativa interessante no controle de fitopatógenos, embora outros ensaios devam ser realizados, testando-se novas concentrações sobre o crescimento micelial do *F. oxysporum*, para se estabelecer a concentração inibitória segura dos óleos estudados.

Nota-se que apesar da significativa representatividade de gêneros e espécies da família Myrtaceae, a quantidade de estudos envolvendo os indivíduos deste grupo, bem como, os óleos essenciais por eles produzidos e a potencial utilização biológica e ecológica, são ainda incipientes nos dias atuais.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMIS, P. D.; GOMES, D. S.; PINTO, M. L.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol.Lett.*, 54, 81-88, 2004.

ADAMS, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., All.Pub.Corp. Illinois, 2007.

ADIO, A. M. Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. *Tetrahedron*, 65, 1533-1552, 2009.

ALMEIDA, D. J. A.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. *Ambiência*, 8, 177-193, 2012.

ALVARENGA, F. Q.; MOTA, B. C. F.; LEITE, M.; FONSECA, J. M. S. OLIVEIRA, D. A.; ROYO, V. A.; SILVA, M. L.A.; C.; ESPERANDIM, V. BORGES, A.; LAURENTIZ, R. S. *In vivo* analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the Hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. *J.Ethnopharmacol.*, 150, 280–284, 2013.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim.Nova*, 10, 2202-2210, 2010.

AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*, 16, 923-928, 2009.

APEL, M.A.; LIMA, M.E.L.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; SOBRAL, M.E.G.; SUFFREDINI, I.B.; MORENO, P.R.H. Screening of the biological activity from essential oil of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo, Brazil). *Pharmacologyonline* 3: 376-383, 2006.

ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica. In: Figueiredo *et al* (Eds). Potencialidade e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Lisboa, Portugal, pp 19-28, 2007.

AZEREDO, C.M.O.; SANTOS, T.G.; MAIA, B.H.L.N.S.; Soares, M.J. In vitro biological evaluation of eight diferente essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complement.Altern.Med.*, 14:309, 2014 (doi:10.1186/1472-6882-14-309).

BADAWY, E.I.; ABDELGALEIL, S.A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Ind.Crop.Prod.*, 52, 776– 782, 2014.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446–47, 2008.

- BALDOVANI, N.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Identification and Quantitative Determination of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oil by ¹³C-NMR. *Phytochem. Anal.* 12, 58-63, 2001.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* Campinas, 23, 629-643, 2010
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.D. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas. *Quim. Nova*, 29, 113-123, 2006.
- BARTRAM, S.; JUX, A.; GLEIXNER, G.; BOLAND, W. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochem.*, 67, 1661-1672, 2006.
- BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Res.Int.* 44, 1843-1855, 2011.
- BOFFO, E. F. *Tese Doutorado*. Utilização de RMN aliada a Métodos Quimiométricos na análise de mel e aguardentes.. São Carlos –UFSCar, 2009.
- BORGES, L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 7, 1-20, 2011.
- BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. *QNEsq*, 34, 10-15, 2012.
- BRUN, G.R.; MOSSI, A.J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). *Perspectiva*, 34, 135-142, 2010.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 33, 179-189, 2000.
- CAREY, F.A.; GIULIANO, R.M. **Organic Chemistry**. 9th Ed., New York, MacGraw Hill. 2014, p. 1005-1013.
- CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Rev.Sapiência*, 3, 44-75, 2014.
- CAROVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEOM, O.; STRIKIC, F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chem.*, 119, 196-201, 2010.
- CASTRO, M.R.; VICTORIA, F.V.; OLIVEIRA, D.H.; JACOB, R.G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: antioxidant and antifungal activity.. *Pharm.Biol.*, 53, 242-250, 2015.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; CRUZ, N. F. R. F. G. VARIÇÃO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Quím.Nova*, 32, 1544-1548, 2009.

CHANG, R.; MORAIS, A. L.; NAPOLITANO, D. R.; DUARTE, K.C.; GUSMAN, V. B.; NASCIMENTO, E. A. A new approach for quantifying furanodieno and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (pitangueira) leaves. *Braz.J.Pharmacogn.*, 21, 392-396, 2011.

CHEN, H.C.; SHEU, M.J.; LIN, L.Y.; WU, C.M. Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *J.Essent.Oil Res.* 19, 345-347, 2007.

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

COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal Variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, 1287-1293, 2009.

COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P. H. J. Influence of Fruit Biotypes on the Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *J.Braz.Chem.Soc.*, 21, 851-858, 2010.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol.Aspects Med.*, 22, 217-246, 2001.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F.N. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. UNOPAR, *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 15, 231-237, 2013.

CRIVELENTI, L. Z., GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; BORIN, S. Toxicidade do Inseticida Organofosforado Abate® em Alevinos de *Poecilia reticulata*., *J.Braz.Soc. Ecotoxicol.*, 6, 65-68, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd. 2000, cap.24, p.1250-1318.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente*, 11, 47-52, 2004.

CYSNEIROS, V. C., PEREIRA-MOURA, M. V. L., PAULA, E. P. E BRAZ, D. M.: Arboreal Eudicotyledons, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Botanical Garden, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Check List*, 7(1), 1-6, 2011.

DA SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; DA SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.D.G.B.; MAIA, J.G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flav.Fragr.*, 18, 240-243, 2003.

DEBEKO, A.; DAGNE, E.; STERNER, O. Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants of true myrrh. *Fitoterapia*, 73, 48-55, 2002.

DE OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim.Nova*, 32, 689-702, 2009.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach.** 2th Ed., England, John Wiley & Sons, Ltd. 2002. p.167-202.

DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol.Res.* 113, 565-592, 2014.

DIAS, C.N.; RODRIGUES, K.A.F.; CARVALHO, F.A.A.; CARNEIRO, S.M.P.; MAIAC, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; MORAES, D.F.C. Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chem.Biodivers.* 10, 1133-1141, 2013.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nova*, 32, 2444-57, 2009.

DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J., Bohn, T. (Eds.), *Nutrition, Well-being and Health*. In Tech, Croatia, pp. 155-178, 2012.

DOLARA, P.; LUCERI, C.; GHELARDINI, C.; MONSERRAT, C.; AIOLLI, S. LUCERI, F.; LODOVICI, M.; MENICHETTI, S.; ROMANELLI, M.N. Analgesic effects of myrrh. *Nature*, 379, 29, 1996.

DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Rev.Bras.Farmacog.* 17, 426-443, 2007.

ELANSARY, H.O.; SALEM, M.Z.M.; ASHMAWY, N.A.; YACOUT, M.M. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Leaves Essential Oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. *J.Agric.Sci.*; 4, 144-152, 2012.

FETTER, M.R.; VIZZOTTO, M.; CORBELINI, D.D.; GONZALEZ, T.N. . Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. *Braz.J.Food Technol.*, III, 92-95, 2010.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.*, 23, 213-226, 2008.

FIGUEIREDO, F.G.; TINTINO, S.R.; BRITO, D.I.V.; BRAGA, M.F.B.M.; LEITE, N.F.; LUCENA; B.F.F.; SOBRAL-SOUZA; C.E.; GOMEZ; M.C.V.; COUTINHO, H.D.M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. *Rev.Ciênc.Farm.Básica Apl.*, 35, 149-154, 2014.

FISCHER, D. C.; LIMBERG, R.P.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R.H. Essential oil from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. *J.Essent.Oil Res.*, 17, 499-500, 2005.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour.Frag.J.*, 25, 112-13, 2010.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS: Lista da flora brasileira ameaçada de extinção segundo avaliação no workshop da Fundação Biodiversitas em 2005. Disponível em: http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf. Acesso em 15/03/2016).

GOBBO-NETO, L. E.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, 30, 374-381, 2007.

GONÇALVES, F.A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.N.S.; MACRAE, A.; SOUSA, O.V.; FONTELES-FILHO, A.A.; VIEIRA, R.H.S.F. - Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp. *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Rev.Inst.Med.trop.S. Paulo*, 50, 11-15, 2008.

GRESSLER, E.; PIZO, M.A.; MORELLATO, L.P.C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Rev.Brasil.Bot.*, 29, 509-530, 2006.

GROVER, J. K.; VATS, V; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *J.Ethnopharmacol.*, 73, 461-470, 2000.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 393 561–564, 2010.

HENRIQUES, A.T.; SOBRAL, M.E.; CAUDURRO, A.D.; SCHAPOVAL, E.E.S, BASSANI, V.L.; LAMATY, G.; MENUT, G.; BESSIÈRE, J.M. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. *J Essent Oil Res.* 5: 501-505, 1993.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A. CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.. Review: Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *J.Chromatogr.A*, 1217, 2495–2511, 2010.

ISMAIL, I.S.; ISMAIL, N.; LAJIS, N. Ichthyotoxic properties and essential oils of *Syzygium malaccense* (Myrtaceae). *Pertanika J.Sci.Technol.* 18, 1-6, 2010.

ISMAN, M.B., GRIENEISEN, M.L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends Plant.Sci.*, 19, 140–145, 2014.

JOSEPH, B.; PRIYA, R.M. *In vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method. *Int.J.Curr.Pharmaceutical Res.*, 2, 28-32, 2010.

JOSEPH, B.; PRIYA, R.M.; HELEN, P.A.M.; SUJATHA, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial cytotoxic activity from the *Psidium guajava* (L) leaf. *J.Adv.Biotechnol.*, 9, 10-14, 2010.

JUNG, P.H.; SILVEIRA, A. C.; NIERI, E. M.; POTRICH, M.; LOZANO, E. R.; REFATTI, M. Atividade Inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. *Floresta e Ambiente*, 20, 191-196, 2013.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Curr.Med.Chem.*, , 10, 813-829, 2003.

KARIOTI, A.; SKAL TSA, H.; GBOLADE, A. A. Analysis of the leaf Oil of *Syzygium malaccense* Merr. Et Perry from Nigeria. *J. Essent.Oil Res.*, 19, 313-315, 2007.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotrop.Biol.Conserv.*, 5, 120-132, 2010.

KOMALAMISRA, N.; TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; APIWATHNASORN, C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health*, 36, 1412-1422, 2005.

KUBECZKA, K. H. History and sources os essential oil reseach. In: BASER, K.H.C.; BUCHABAUER, G. (eds). **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. CRC Press, Florida,USA. 2010, cap. 2, p.3-38.

KUTCHAN, T.M.; GERSHENZON, J.; MØLLER, B.L.; GANG, D.R. Natural Products. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, 2th Ed., New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd. 2015, cap.24, p.1132-1206.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM. M. A.; MARTINS, R.C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G., SANTOS, R. T.; SARTORELLI, P.: Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. And *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*, 16, 9827-9837, 2011.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog.Lipid Res.*, 46, 244–282, 2007.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrate synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, New York, 49, 508-536, 1997.

LAWAL, O.A.; OGUNWANDE, I.A.; BULLEM, C.A.; TAIWO, O.T.; OPOKU, A.R. Essential oil compositions and *in vitro* biological activities of three *Syzygium* species from Nigeria. In: New developments in terpenes research. Hu, J. ed.; Nova Science Publ., Inc, Nova York, 2014, cap. 5, p.93-112.

- LEE, W.C.; MAHMUD, R.; PILLAI, S.P.; PERUMAL,S.; ISMAIL, S. Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium guajava* L. leaves. *APCBEE Procedia* 2, 86 – 91, 2012.
- LEE, W.C.; MAHMUD, R.; NOORDIN, R.; PILLAI,S.P.; PERUMAL,S.; ISMAIL, S. Free Radicals Scavenging Activity, Cytotoxicity and Anti-parasitic Activity of Essential Oil of *Psidium guajava* L. Leaves against *Toxoplasma gondii*. *J.Res.Oil Bear.Pl.*, 16, 32 – 38, 2013.
- LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; LEITE, S.P.; XAVIER, A.L.; MEDEIROS, I.A. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. *Rev.Bras.Farmacog. Braz.J.Pharmacog.*, 19, 842-846, 2009.
- LIMA, M.A.A.; OLIVEIRA, F.F.M.; GOMES, G.A.; LAVOR, P.L.; SANTIAGO, G.M.P.; NAGAO-DIAS, A.T.; ARRIAGA, A.M.C.; LEMOS, T.L.G.; CARVALHO, M.G. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Afr.J.Biotechn.*, 10, 11716-11720, 2011.
- LIMA, N. P.; CERQUEIRA, S. H. F.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H.G. Composition and chemical variation of the essential oil from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. And *Eugenia* sp. (Myrtaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 20, 223-225, 2008.
- LIRA JÚNIOR, J.S.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F.. **Pitangueira**. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Recife, 2007. 87p.
- LIU, Y.; NAIR, M.G. *Curcuma longa* and *Curcuma mangga* leaves exhibit functional food property. *Food Chem.*, 135, 634–640, 2012.
- LOMONACO, D.; SANTIAGO, G.M.P.; FERREIRA, Y.S.; ARRIAGA, A.M.C.; MAZZETTO, S.E.; MELEC, G.; VASAPOLLO, G. 2009. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chem.*, 2009, 11, 31–33, 2009.
- LOPES, M. M. Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (Kiaersk) G. M. Barroso e Sobral (myrtaceae). 2008. 48p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Setor de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa Minas Gerais, Viçosa, MG.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa: *Instituto Plantarum*, 1992. 368 p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum*, p.350-351, 2002.
- LUCIA, A.; AUDINO, P.G.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J.Am.Mosq.Control.Assoc.*, 23, 299–303, 2007.
- LUCINI, E.I.; ZUNINO, M.P.; LOPEZ, M.L.; ZYGADLO, J.A. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J.Phytopathol.*, 154, 441–446, 2006.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cad. acad.*, Tubarao, 3, 105-127, 2011.

MACHADO R.R.P.; JARDIM, D.F.; SOUZA, A.R.; SCIO E.; FABRI, R.L.; CARPANEZ, ARTHUR G.; GRAZUL, R.M.; MENDONÇA, J.P.R.F.; LESCHE, B.; AARESTRUP, F.M. The effect of essential oil of *Syzygium cumini* on the development of granulomatous inflammation in mice. *Braz.J. Pharmacog.*, 23, 488-496, 2013

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI Jr., A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PISSOLATI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Eugenia* species. *J.Nat.Med.*, 63, 345-350, 2009.

MAIA, T.F.; DE DONATO, A.; FRAGA, M.E. Review: Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. *Rev.Brasil.Prod.Agroind.*, 17, 105-116, 2015.

MAKABE, H.; MARU, N.; KUWABARA, A.; KAMO, T.; HIROTA, M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. *Nat.Prod.Res.* 20,680–685, 2006.

MARANGONI, C.; MOURA,N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. *Rev.Ciên.Amb.*, Canoas, 6. 95-112, 2012.

MARQUES, F. A.; WENDLER, E. P.; MAIA, B. H. L. N. S. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. *J.Essent. Oil Res.*, 20, 519-520, 2008.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M. ; BUYDENS, L. M. C.; DE JONG, S.; LEWI, P. J. ; SMEYERS-VERBEKE, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A, Elsevier, Amsterdam, vol. 20, 1998.

MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from *Zedoariae* rhizoma on galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8, 339–344, 1998.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; DE GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. *Cienc. Rural*, 38, 1824-1829, 2008.

MAY, A.; MORAES, A.R.A.; PINHEIRO, M. Q. Teor de óleo essencial de pitanga em função de tratamentos pós-colheita. *Rev. Caatinga* (Mossoró, Brasil), .20, 186-190, 2007.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L.; REZENDE, C. M. Identification of Impact Aroma Compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) Leaf Essential Oil. *J.Braz.Chem.Soc.*, 18, 179-183, 2007.

MELO, R.R.; ARAÚJO; E.R.S.A.; SILVA, A.A.L.; RANDAU, K.P.; XIMENES, E.C.P.A. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. *Rev.Bras.Farm.*, 90, 298-302, 2009.

MELO-SANTOS, M.A.V.; VARJAL-MELO, J.J.M.; ARAÚJO, A.P.; GOMES, T.C.S.; PAIVA, M.H.S.; REGIS, L.N.; FURTADO, A.F.; MAGALHÃES, T.; MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; AYRES, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop.*, 113: 180-189, 2010.

MENDONÇA, P.S.; CARIOCA, A.A.F.; MAIA, F.M.M. Interações entre Estresse Oxidativo, Terapia Utilizada e Estadiamento em Pacientes com Câncer Colorretal. *Rev.Bras.Cancer.*, 60, 129-134, 2014.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15, 9252-9287, 2010.

MOHAMED, A.A.; ALI, S.I.; EL-BAZ, F.K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. PLOS ONE, 8, 1-7, 2013.

MOITA, J.M.N.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim.Nova*, 21, 467-469, 1998.

MORAIS, L.A.S.. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic.Bras.* 27: S4050-S4063, 2009.

MORAIS, L.M.F.; CONCEIÇÃO, G.M.; NASCIMENTO, J.M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. *Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 1, 317-346, 2014.

MORAIS, S. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W.; MATOS, J. A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. *J.Essent.Oil Res.*, 8, 449- 451, 1996.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic.Biol.Med.*, 49, 503–515, 2010.

NISHA, K.; DARSHANA, M.; MADHU, G.; BHUPENDRA, M.K. GC-MS analysis and antimicrobial activity of *Psidium guajava* (leaves) grown in Malva region of India. *Int.J.Drug Dev.Res.* 3, 237-245, 2011.

NISHANDHINI, S.; SUDHA, V.; MALLAVARAPU, G.R.; MURUGAN, R. Chemical compositions, α -amylase inhibitory and antioxidant activities of the essential oils from unripe fruit pulp and leaves of *Syzygium cumini*. *Int.J.Pharm.Pharm.Sci.*, 7, 511-514, 2015.

OATANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Utilização de óleos essenciais na agricultura. *J.Biotec.Biodivers.* 4, 162-175, 2013.

OGUNWANDE, I. A., OLAWORE, N. O., ADELEKE, K. A., EKUNDAYO, O., KOENIG, W. A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flav.Fragr.J.*, 18: 136–138, 2003.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Int. J. Aromather.*, 15, 147-152, 2005.

OLIVEIRA, C. B.; SOARES, D. G. S.; PAULO, M. Q.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antimicrobiana *in vitro* da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre Bactérias Cariogênicas. *Rev.Bras. Ciênc. Saúde*, 12, 239-250, 2008.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem.* 120, 308–312, 2010.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Utilização de óleos essenciais na agricultura. *J.Biotec.Biodivers.* 4, 162-175, 2013.

OYINLADE, O.C. Phytochemical and Physicochemical Analysis of Three Different Types of Apples. *Inter.J.Scient.Res.Rev.*, 3, 67-78, 2014.

PAROUL, N.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; EMMERICH, D.; FAGGION, A.; SCOLOSKI, E.; LIOTTO, F. R.; ROVANI, A. S.; FILLA, J.; MUNIK, R. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Psidium cattleianum* (araçá-do-campo). 25ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Calda (MG), 2002.

PAVARINI, D. P.; SILVA, D. B.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Substâncias voláteis: técnicas de extrações das clássicas às avançadas. In: Souza, B.H.B. *et al.* (org.): **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ed. UFOP, Ouro Preto, 2012, p. 19-54.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind.Crops Prod.*, 76, 174–187, 2015.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; TRÍSKA, J. Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol.Res.*, 105, 1365–1370, 2009.

PEIXOTO, C.A., OLIVEIRA, A.L., CABRAL, F.A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) leaves. *J Food Process Eng* 33: 848-860, 2010.

PERUMALSAMY, H.; KIM, N.J.; AHN, A.J. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *J.Med.Entomol.* 46, 1420–1423, 2009.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.A.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *J.Pharm.Pharmacol.* 60, 479-487, 2008.

PINHO, A.I.; WALLAU, G.L.; NUNES, M.E.M.; LEITE, N.F.; TINTINO, S.R.; CRUZ, L.C.; CUNHA, F.A.B.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; POSSER, T.; FRANCO, J.L. Fumigant activity of the *Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxid.Med.Cell Longev.* 2014, 1-8, 2014.

PINO, J. A.; AGÜERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf Oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. *J.Essent.Oil Res.*, 13, 61-62, 2001.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; MARBOT, R.; MARTI, M.P. Leaf Oil of *Psidium parvifolium* Griseb and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. *J.Essent.Oil Res.*, 16, 370-371, 2004.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim.Nova*, 29, 755-760, 2006.

RANGEL, C.F.; ROSA, A.C.S.; SARCINELLI, P.N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, 19, 435-442, 2011.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.*, 29, 913–920, 2010.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264, 2014.

REDDY, L.J.; JOSE, B. Evaluation of antibacterial and DPPH radical scavenging activities of the leaf extracts and leaf essential oil of *Syzygium cumini* Linn. from South India *Int.J.Pharm.Pharm.Sci.*, 5, 358-361, 2013.

REZENDE, W.P.; BORGES, L.L.; ALVES, N.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos*. *Rev.Bras. Farmacogn.* 23, 433-440, 2013.

RODRIGUES, K.A.F.; AMORIM, L.V.; OLIVEIRA, J.M.G.; DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: Effects on *Leishmania amazonenses* and possible mechanisms of action. 2013 (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/279726>).

RODRIGUES, K.A.F.; AMORIM, L.V.; DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C.; CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. *J.Ethnopharmacol.*, 160, 32–40, 2015.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632, 2005.

SAGRERO-NIEVES, L.; BARTLEY, J.P; PROVIS-SCHWEDE, A. Supercritical fluid extraction of the volatile components from the leaves of *Psidium guajava* L. (guava). *Flav. Fragr. J.*, 9, 135-137, 1994.

SALGUEIRO, L.; MARTINS, A.P.; CORREIRA, H. Raw materials: the importance of quality and safety. A review. *Flav.Fragr.J.*, 25, 253–271, 2010.

SANTOS, F.R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R.N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial. *Quim. Nova*, 38, 762-768, 2015.

SANTOS, K.K.; MATIAS E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp.Parasitol.* 131, 130–132, 2012a.

SANTOS, K.K.; MATIAS E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia jambolana* L. *J.Med.Food*, 15, 66–70, 2012b.

SANTOS, S.R.L.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; BARBOSA, J.D.F.; SANTOS, R.L.C.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* Larvae. *Vector-Borne Zoonotic.dis.*, 10, 1049-1054, 2010.

SANTOS, S.R.L.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere* 84, 150–153, 2011.

SATYAL, P.; PAUDEL, P.; LAMICHHANE, B.; SETZER, W.N.. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. *Am.J.Essent.Oils Nat.Prod.*, 3, 11-14, 2015.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. J. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia unijlora* L. *Ethnopharmacol.*, 44, 137-142, 1994.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; SILVA, V.B.; SANTOS, S.R.L.; CAVALCANTI, S.C.H.; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. *Med.Chem.* 9, 1–10, 2013.

SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; PANDINI, J.A.; COSTA, W.F.; LEITE, C.W.; TEMPONI, L.G. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Braz.J.Biol.*, 76, 101-108, 2016.

SELL,C. Chemistry of Essential oils. In: BASER, K.H.C.; BUCHABAUER, G. (eds). **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. CRC Press, Florida,USA. 2010, cap. 5, p.121-150.

SHAFI, P.M.; ROSAMMA, M.K.; JAMIL, K.; REDDY, P.S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. *Fitoterapia*, 73, 414-416, 2002.

SHARMA, B. S.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J.Ethnopharmacol.*, 104, 367-373, 2006.

SHEN SC, CHEN FC, WU NJ. Effect of guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf soluble solids on glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *Phytother.Res.* 22: 1458-1464, 2008.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. *Biotecnol.Ciênc.Desenvol.* 16, 38-43, 2000.

SIANI, A.C.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharm. Biol. Early Online*: 1–7, 2013.

SIDDIQUE, S.; PERVEEN, Z.; NAWAZ, S.; SHAHZAD, K.; ALI, Z.. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Six Species from Family Myrtaceae. *J.Essent.Oil Bear.Pl.*, 18, 950-956, 2015.

SIEBERT, D.A.; TENFEN, A.; YAMANAKA, C.N.; DE CORDOVA, C.M.M.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; ALBERTON, M.D. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. *Nat.Prod.Res.*, 29, 289-292, 2015.

SILVA, W.J.M.; FERRARI, C.K.B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Rev.Bras.Geriatr.Gerontol.*, 14, 441-451, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia*. Porto Alegre: UFRGS, 2003, p. 467-495.

SIQUEIRA-NUNES, A.; MARTINS, M.B.G. Estudo anatômico de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). *Rev. Biociências*. 16, 116-122, 2010.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev.Bras.Ciênc.Farm.*, 41, 95-100, 2005.

SOBRAL, M.; LUCAS, E.; LANDRUM, L.; SOARES-SILVA, L. Myrtaceae in: STHEMAN, J.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L.H.Y. *Plantas da Floresta Atlântica*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ, 2009. Disponível em: http://www.jbrj.gov.br/publica/livros/pdf/plantas_floresta_atlantica.pdf .(Acesso em 14/03/2016).

SOLIMAN, F.M.; FATHY, M.M.; SALAMA, M.M.; SABER, F.R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, Cairo University, Available

online 1 July 2016, ISSN 1110-0931, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093116300242>).

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; von POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELIZABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, 90, 135-143, 2004.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.; SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48, 245-250, 2005.

SOUZA, S.A.M.; MEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. *Rev. Enciclop. Biosfera*, 6, 1-11, 2010.

SOUZA JUNIOR, I.T.; SALES, N.L.P.; MARTINS, E.R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. *Biotemas*, 22, 77-83, 2009.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P. e WATSON K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, 140, 569-576, 1994.

TAKAHASHI, T.; KITAMURA, K.; NEMOTO, H.; TSUJI, J. A first total synthesis of germacrona by intramolecular alkylation of protected cyanohydrin. *Tetrahedron Lett.* 24, 3489-3492, 1983.

TEÓFILO, R.F., Métodos Quimiométricos: Uma Visão Geral – Conceitos básicos de Quimiometria, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Vol. 1, 2013.

THAMBI, M.; TAVA, A.; MOHANAKRISHNA, M.; SUBBURAJ, M.; PRADEEPKUMAR, K. M.; SHAFI, P. M. Composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Eugenia uniflora* L. leaves growing in India. *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.*, 4, 46-49, 2013.

TORRE-RUIZ, M.A.; SERRANO, L.; PETKOVA, M.I.; PUJOL-CARRION, N Signalling oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-51-0554-1, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects/signalling-the-oxidative-stress-in-saccharomyces-cerevisiae>.

URBIEGO, G.; TAHER, H. A.; TALENTI, E.C. Chemical composition of essential oil of *Eugenia uniflora*. *An. Asoc. Quim. Argentina*, 75, 377-379, 1987.

VAZQUEZ-CAHUICH, D.A.; MORENO, J.E.; HIDALGO, D.C.; MARTINEZ, J.R.V.; BORGES-ARGAEZ, R.; FARFAN, M.C. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *Psidium guajava* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16, 505-513, 2016.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev.Bras.Farmacogn.*, 15, 361-372, 2005.

VERMA, R.S.; Padalia, R.C.; Chauhan, A. Essential oil composition of *Aegle marmelos* (L.). Correa: chemotypic and seasonal variations. *J.Sci.Food Agric.*, 94, 1904–1913, 2014.

VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. *Food Bioscience*, 4, 50-57, 2013.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem.Toxicol.*, 50, 2668-2674, 2012.

VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Rev.Bras.Pl.Med.*, Botucatu, v.4, n.2, p.35-45, 2002.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, M.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTIMM, B.O.; ADEOYE, O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Med.* 54: 546-549, 1988.

WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO, Geneva.

WHO World Health Organization. Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR, Geneva;23-112, 1997.

WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). In: WHO-World Health Organ fact sheet. Updated March 2016. [consultado em 03 de abril, 2016]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

XIAO-DUO J.; QUAN-LONG, P.; GARRAFFO, H.M.; PANNELL, L.K. The Essential Oil of the Leaves of *Psidium guajava* L. *J.Essent.Oil Res.* 3, 187-189, 1991.

XIAO, Y.; YANG, F.Q.; LI, S.P.; GAO, J.L.; HU, G.; LAO, S.C.; CONCEICAO, E.L.; FUNG, K.P.; WANG, Y.T.; LEE, S.M.Y. Furanodiene induces G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK signaling and mitochondria-caspase pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Biol.Ther.* 6:1044–1050, 2007.

YANG, F. Q.; WANG, H. K.; CHEN, H.; CHEN, J. D.; XIA, Z. N. Fractionation of Volatile Constituents from *Curcuma* Rhizome by Preparative Gas Chromatography *J.Autom. Methods Manag. Chem.*(2011), doi:10.1155/2011/942467.

ZHONG; Z.F.; HOI, P.M.; WU, G.S.; XU, Z.T.; TAN, W.; CHEN, X.P.; CUI, L.; WU, T.; WANG, Y.T. Anti-angiogenic effect of furanodiene on HUVECs in vitro and on zebrafish in vivo. *J Ethnopharmacol.* 141, 721-727, 2012.