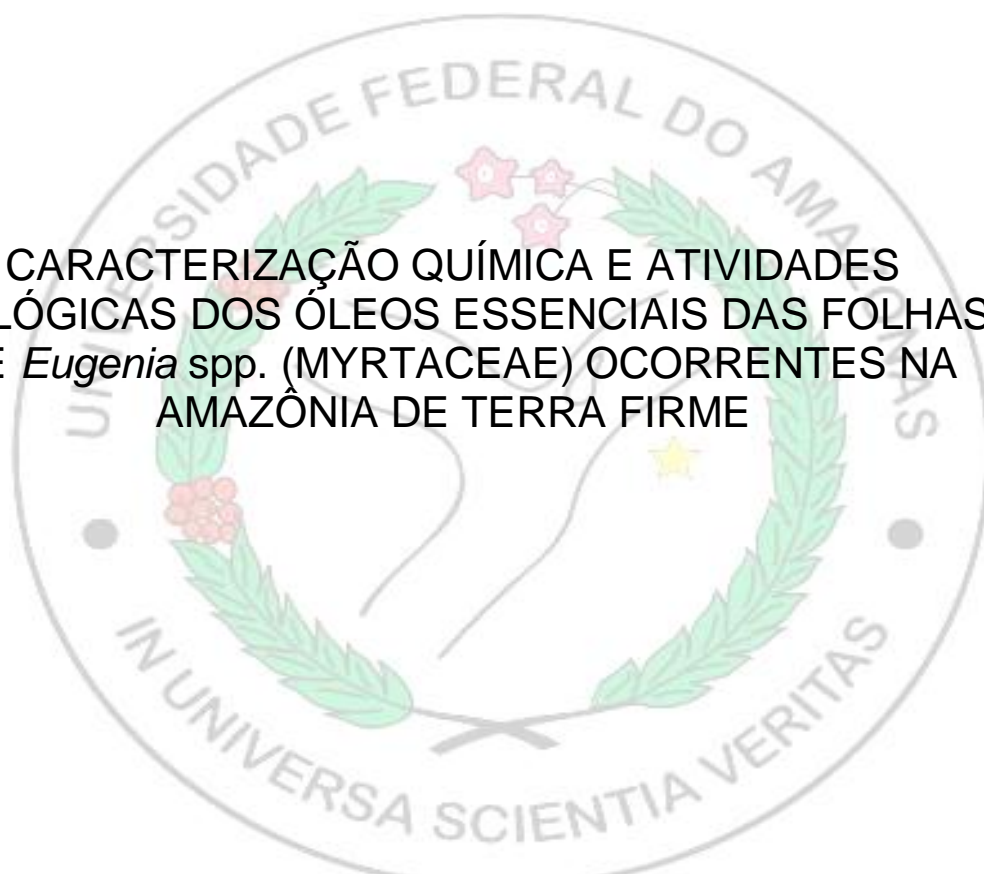


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS
DE *Eugenia* spp. (MYRTACEAE) OCORRENTES NA
AMAZÔNIA DE TERRA FIRME



SIDNEY GOMES AZEVEDO

Manaus

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS
FOLHAS DE *Eugenia* spp. (MYRTACEAE)
OCORRENTES NA AMAZÔNIA DE TERRA FIRME

SIDNEY GOMES AZEVEDO

SIDNEY GOMES AZEVEDO

MANAUS

2014

II

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE
Eugenia spp. (MYRTACEAE) OCORRENTES NA AMAZÔNIA DE TERRA FIRME

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SIDNEY GOMES AZEVEDO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia* spp.
(MYRTACEAE) OCORRENTES NA
AMAZONIA DE TERRA FIRME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

MANAUS

2014

III

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A994c Azevedo, Sidney Gomes
Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia* spp. (myrtaceae) ocorrentes na Amazônia de terra firme / Sidney Gomes Azevedo. 2014
121 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcos Batista Machado
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleos essenciais. 2. Cromatografia Gasosa. 3. Quimiometria.
4. Citotoxicidade. I. Machado, Marcos Batista II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


SIDNEY GOMES AZEVEDO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia* spp.
(MYRTACEAE) OCORRENTES
NA AMAZONIA DE TERRA FIRME

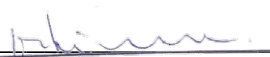
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Aprovado em: 10 / 09 /2014


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcos Batista Machado, Presidente
Universidade Federal Do Amazonas



Profª Drª Maria da Paz Lima, Membro
Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia



Profª Drª Maria das Graças Bichara Zoghbi, Membro
Museu Paraense Emílio Goeldi

Ao meu Pai, meus irmãos,
minha avó, meus amigos pelos
incentivos para a realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao ser maior (Deus) pela força nos momentos de desânimo;

Ao orientador Dr. Marcos Batista Machado pelo acompanhamento constante, pelo incentivo à busca de novos conhecimentos, pela paciência e pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Mesmo em momentos de dificuldade, sempre esteve disposto a estimular e apoiar no desenvolvimento deste.

A querida Dra. Milade Cordeiro Carneiro dos Santos que desde a graduação incentivou a continuar minha formação especificamente na área de Produtos Naturais.

Aos meus familiares pelo carinho e apoio.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa NEQUIMA: Adriana Cavalcante, Andrezza Ramos, Elizanne Porto, Ricardo Oliveira, Mara Ramos, Anália Duarte e Raimundo Junior, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu querido amigo Wilson Nogueira e família (Rosário Nogueira, Dassuem Nogueira, Enã Nogueira e Iolane Moraes), pela acolhida, pelo apoio, pelas conversas, pelos momentos de descontração, muito obrigado. Foi difícil estar em Manaus, teria sido muito mais se não fosse à ajuda a mim disponibilizada.

Ao Mauro Reis e Josiara Reis, pela amizade e pelas conversas de incentivo.

Aos meus amigos de Parintins, por todo apoio e confiança.

A Ellen Suzany pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da instituição que auxiliaram nas discussões referentes ao trabalho e contribuíram para minha formação: Jaqueline, Fátima, Elzalina Soares, Bruna Ribeiro, Samirimi Januario, Alcilene Dias, Luana Monteiro.

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEAM pelo auxílio financeiro.

Ao grupo dos amigos da pós-graduação em química por todos os momentos de estudos e pelos momentos de descontração: Renan Feitosa, Fabiana Almeida, Edizon, Orlando Amazonas, Jésika Maria.

RESUMO

O gênero *Eugenia* (Myrtaceae) compreende mais de 500 espécies distribuídas na região neotropical, ocorrendo nos principais biomas brasileiros, destacando-se o Amazônia, no qual se encontra a Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), em Manaus (AM) uma amostra representativa da floresta amazônica de terra firme, onde foram identificadas 28 espécies de *Eugenia*. A química desse gênero revela uma composição rica em flavonoides/glicosídeos, taninos hidrolisáveis, cumarinas, antocianinas, monoterpenos/sesquiterpenos e triterpenos/esteroides. Contudo, os estudos químicos e biológicos de *Eugenia* spp. ocorrentes no bioma Amazônia ainda são escassos. Neste contexto, esse trabalho visou a caracterização química e avaliação das atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de sete espécies de *Eugenia* (*Eugenia magna*., *E. ramosii*, *E. feijoi*, *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marleneae* e *E. adenocalyx*, obtidos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa com detectores de ionização por chama (DIC) e massas (EM). As sete espécies foram comparadas para determinar a similaridade através da Análise das Componentes Principais e Análise Hierárquica de Cluster. Os óleos essenciais foram submetidos a ensaios bactericidas pelo método de difusão em disco Agar contendo os microrganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina. Os resultados para os óleos essenciais desses ensaios revelaram atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas. Além disso, avaliou-se a susceptibilidade de linhagens de células tumorais de mama humano (MCF-7), cólon humano (HCT-116), melanoma humano (SKMEL-19), ovário humano (ES-2), adenocarcinoma gástrico (ACP02) e uma linhagem normal MRC-5 (fibroblasto humano) frente aos óleos essenciais empregando o teste Alamar-blue. Todas as amostras apresentaram atividade citotóxica em células normais (MRC-5, CI_{50} entre 33,21-38,38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e linhagens tumorais (MCF-7 e HCT-116, ES-2, ACP02, $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$). A composição química desses óleos essenciais apresentou predominância de compostos sesquiterpênicos, sendo oxido de cariofileno para *Eugenia magna*, *E. ramosii*, β -elemeno para um espécie de *E. feijoi*, E- cariofileno para *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marleneae* e *E. adenocalyx*. Os constituintes químicos comuns em todos óleos essenciais foram α -copaeno, β -elemeno, E- cariofileno, α -humuleno, allo aromadendreno, β -bisaboleno, óxido de cariofileno e óxido de humuleno II.

Palavras chave: Myrtaceae, *Eugenia*, óleos essenciais, Cromatografia Gasosa, Quimiometria, citotoxicidade.

Abstract

The genus *Eugenia* (Myrtaceae) has more than 500 species distributed in the Neotropics, occurring in the main Brazilian biomes, especially in the Amazon, in which the Forest Reserve Adolpho Ducke (RFAD) in Manaus a representative sample of Amazonian terra firme forest where has identified 28 species of *Eugenia*. The chemistry of the genus reveals a composition rich in flavonoids / glycosides, hydrolyzable tannins, coumarins, anthocyanins, monoterpenes / sesquiterpenes and triterpenes / steroids. However, chemical and biological studies of *Eugenia* spp. occurring in the Amazon biome are still scarce. In this context, this work aimed to chemical characterization and biological activity of essential oils from leaves of seven species of *Eugenia magna*, *E. ramosii*, *E. feijoi*, *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marleneae* e *E. adenocalyx*, obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography with ionization detectors in flames (GC-FID) and mass spectrometer (GC-MS). The seven species were compared to determine the similarity and difference between their volatile chemical compositions by PCA and HCA. Essential oils have been tested bactericides by Agar disk diffusion method containing microorganisms: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. The results for the essential oils of these tests showed antimicrobial activity for both Gram-positive bacteria as Gram-negative. In addition, we evaluated the susceptibility of strains of human breast tumor cells (MCF-7), human colon (HCT116), human melanoma (SKMEL-19), human ovarian (ES-2), adenocarcinoma (ACP02) and Normal MRC-5 (human fibroblast) compared to essential oils employing Alamar-blue test. All samples exhibit cytotoxic activity in normal cells (MRC-5, IC50 between 33.21 to 38.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and tumor cell lines (MCF-7 and HCT-116, ES-2, ACP02, IC50 $\leq 30\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration value set by the National Cancer Institute. The chemical composition of the essential oils showed predominance of sesquiterpene compounds, the components with higher levels were caryophyllene oxide for *Eugenia magna*, *E. ramosii*, β -elemene to *E. feijoi*, E-caryophyllene for *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marleneae* and *E. adenocalyx*. Common chemical constituents of essential oils were all α -copaene, β -elemene, E-caryophyllene, α -humulene, allo aromadendrene, β -bisabolene, caryophyllene oxide and humulene II oxide.

Keywords: Myrtaceae, *Eugenia*, essential oils, gas chromatography, Chemometrics.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ocorrência de Myrtaceae	21
Figura 2. Perfil químico da família Myrtaceae.	22
Figura 3. Gêneros representantes da família Myrtaceae.....	23
Figura 4. Fatores que podem influenciar o rendimento e o teor dos metabólitos secundários.....	39
Figura 5. Imagem espacial da região metropolitana Manaus (AM)	42
Figura 6. <i>Eugenia magna</i> Hoslt.	43
Figura 7. <i>Eugenia ramisii</i> n. sp.....	43
Figura 8. <i>Eugenia feijoi</i> O. Berg.	44
Figura 9. <i>Eugenia lisbonii</i> n.sp.	44
Figura 10. <i>Eugenia pseudopsidium</i>	45
Figura 11. <i>Eugenia marleneae</i> n. sp.	45
Figura 12. <i>Eugenia adenocalyx</i> DC.....	46
Figura 13. Sistema de hidrodestilação utilizado na obtenção dos óleos essenciais.	47
Figura 14. Avaliação do potencial hemolítico dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.	50
Figura 15. Cromatograma de íons totais obtidos para os óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia magna</i> (Amostra 1A).....	66
Figura 16. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia ramosii</i> (Amostra 2B-1) coletada em período seco.	72
Figura 17. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia ramosii</i> (Amostra 2B-2) coletada em período chuvoso.	73
Figura 18. Condições em que foi encontrado o espécime de <i>Eugenia feijoi</i> (3B)	77
Figura 19. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostra 3A).....	78
Figura 20. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostra 3B)	79
Figura 21. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostra 3C).....	80

Figura 22. Espectro de massas referente ao pico 1 do cromatograma do espécime de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostra 3A)	81
Figura 23. Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma do espécime de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostra 3C)	81
Figura 24. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia lisbonii</i> (Amostra 4A).....	85
Figura 25. Espectro de massas do <i>E</i> -cariofileno (A), em comparação ao espectro da biblioteca	86
Figura 26. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia pseudopsidium</i> (Amostra 5A).....	90
Figura 27. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>Eugenia pseudopsidium</i> (Amostra 5B).....	91
Figura 28. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia marleneae</i> n. sp. (Amostra 6 A)	95
Figura 29. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de <i>E. marleneae</i> n. sp. (Amostra 6B).	96
Figura 30. Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de <i>E. adenocalyx</i> (Amostra 7A).....	100
Figura 31. Análise das componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp. (Myrtaceae)	106
Figura 32. Análise Hierárquica de Custer (HCA) dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp Myrtaceae.....	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Eugenia</i> spp. coletadas na RFAD.	46
Tabela 2. Classificação da atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais.	56
Tabela 3. Resultado de ensaio hemolítico dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.	59
Tabela 4. Valores da viabilidade celular em porcentagem obtida em concentração única (50 µg/ mL).....	60

Tabela 5. Efeito na viabilidade celular de linhagens tumorais (MCF7, HCT116, SKMELL19, ACP02, ES2) e não tumoral (MRC-5) utilizando Alamar blue em 72h de tratamento.	62
Tabela 6. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia magna</i> (Amostra 1A).....	65
Tabela 7. Composição química dos óleos essenciais das folhas das Amostras 2A, 2B-1 e 2B-2 (<i>Eugenia ramosii</i>).....	68
Tabela 8. Constituintes químicos (%) identificado nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostras 3A, 3B e 3C).	74
Tabela 9. Constituintes químicos (%) identificados no óleo essencial das folhas de <i>Eugenia lisbonii</i> (Amostra 4A).	84
Tabela 10. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia. Pseudopsidium</i> (Amostras 5A e 5B).....	88
Tabela 11. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais de das folhas de <i>Eugenia maleneae</i> n. sp. (Amostras 6A e 6B).	92
Tabela 12. Constituintes químicos (%) identificado no óleo essencial de <i>Eugenia adenocalyx</i>	98
Tabela 13. Coeficiente de correlação de Pearson entre os espécimes e espécies estudados.....	105

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formação de compostos fenilpropanóides.....	36
Esquema 2. Formações do GPP e FPP.	37
Esquema 3. Estruturas de núcleos monoterpênicos baseado no trabalho de MAHMOUD; CROTEAU, 2002.	38
Esquema 4. Ciclizações de grupos FPP formando núcleos sesquiterpênicos.	39
Esquema 5. Ensaio microbiológico com óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	49
Esquema 6. Ensaio de citotoxicidade dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp. ...	52
Esquema 7. Proposta de fragmentação do pico base m/z do α - e β -pineno. ...	81
Esquema 8. Proposta biossintética dos monoterpênicos presentes nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia feijoi</i>	82
Esquema 9. Proposta de fragmentação do <i>E</i> -cariofileno associada ao espectro de massas.	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Rendimento dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	55
Gráfico 2. Porcentagens de mono- e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia ramosii</i>	70
Gráfico 3. Porcentagem de mono- e sesquiterpenos dos óleos essenciais de <i>Eugenia feijoi</i> (Amostras 3A, 3B e 3C).....	76
Gráfico 4. Porcentagem de mono e sesquiterpenos encontrados no óleo essencial de <i>Eugenia lisbonii</i>	84
Gráfico 5. Porcentagem dos sesquiterpenos nos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia pseudopsidium</i>	89
Gráfico 6. Porcentagem de mono e sesquiterpenos nos óleos essenciais de <i>Eugenia marleneae n.sp.</i>	94
Gráfico 7. Porcentagem de mono- e sesquiterpenos no óleo essencial das folhas de <i>Eugenia adenocalyx</i> (Amostra 7A).	99
Gráfico 8. Teor de mono- e sesquiterpenos das espécies de <i>Eugenia</i> spp. Coletadas na RFAD.	102

ÍNDICE DE QUADRO

Quadro 1. Componentes químicos abundantes nos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.	29
--	----

ANEXO

Anexo 1. Constituintes dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	116
--	-----

LISTA DE SIGLAS

RFAD – Reserva Florestal Adolpho Ducke

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

CG – Cromatografia Gasosa

CG-DIC – Cromatografia Gasosa hifenado com Detector de Chamas

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

GBIF – Global Biodiversity Information Facility

PRFAD – Projeto Reserva Florestal Adolpho Ducke

PCA – “Principal Components Analysis” /Análise de Componentes Principais/

HCA – “Hierarchical Cluster Analysis” /Análise Hierárquica de Cluster/

NEQUIMA- Núcleo de Estudos Químicos em Micromoléculas da Amazônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Geral	19
2.2. Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	20
3.1. Considerações gerais sobre Myrtaceae	20
3.2. Gênero <i>Eugenia</i>	23
3.2.2. A química dos voláteis de <i>Eugenia</i> spp.....	25
3.3. Óleos Essenciais: biossíntese de monoterpenos e sesquiterpenos.....	32
3.4. Atividades farmacológicas dos óleos essenciais.....	40
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.1. Coleta, identificação e descrição das espécies de <i>Eugenia</i> spp.....	42
4.2. Processamento dos materiais vegetais de <i>Eugenia</i> spp.....	47
4.3. Obtenção dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	47
4.4. Análise biológica dos óleos essenciais	48
4.4.1. Ensaio antimicrobiano.....	48
4.4.2. Ensaio hemolítico.....	49
4.4.3. Ensaio de citotoxicidade dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.	51
4.5. Análises cromatográficas e espectrométricas dos óleos e de <i>Eugenia</i> spp....	52
4.6. Análises estatísticas/quimiométricas.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Rendimento dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.	55
5.2. Avaliação microbiológica dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	55
5.3. Avaliação do potencial hemolítico dos óleos essenciais	58
5.4. Avaliação citotóxica dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> spp.....	60
5.5. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de folhas <i>Eugenia</i> spp.....	64
5.5.1. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de <i>Eugenia magna</i>	64
5.5.2. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de dois indivíduos de <i>Eugenia ramosii</i>	67

5.5.3. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de três indivíduos de <i>Eugenia feijoi</i>	73
5.5.4. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de <i>Eugenia lisbonii</i>	83
5.5.5. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de <i>Eugenia pseudopsidium</i>	87
5.5.6. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de <i>Eugenia marleneae</i> n. sp.....	92
5.5.7. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de um espécime de <i>Eugenia adenocalyx</i>	97
5.6. Comparação química entre as sete espécies de <i>Eugenia</i> spp. ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	101
5.7 Análise de similaridade química de <i>Eugenia</i> spp.	106
6. Conclusão	108
7. Referências Bibliográficas	109

1. INTRODUÇÃO

Brasil existe aproximadamente 55.000 espécies de plantas (22% no total mundial) produtoras de madeiras, celulose, fibras, alimentos, óleos vegetais e óleos essenciais, entre outros produtos naturais. Os principais biomas ocorrentes no Brasil como Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal possuem espécies vegetais características que se adaptam as condições ambientais onde são ocorrentes. Toda essa diversidade representa um dos maiores tesouros brasileiros, do qual o ser humano faz uso como fonte de alimentação, vestuário, habitação, medicinal e etc. (MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Dentre os biomas brasileiros, destaca se a Amazônia, com uma área de aproximadamente 7,5 milhões de km². Seu relevo é um dos fatores principais que determinam o tipo de vegetação ocorrente neste, dividida em dois grupos principais: a vegetação de terra firme e a vegetação que sofre inundação (Várzea, Restinga e Igapó) (RIBEIRO et al, 1999). A Amazônia legal, uma área que engloba os estados brasileiros do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e parte dos Estados do Maranhão e Mato Grosso, apresenta aproximadamente cinco milhões de km² e estima-se a ocorrência de 30.000 espécies de plantas, sendo um terço medicinal e/ou aromática. Desta parte, cerca de 70% das espécies são usadas como medicamentos pela população local, entre outras formas de utilização (STASI; HIRAUMA-LIMA, 2002).

A característica peculiar da floresta amazônica é sua elevada diversidade biológica (uma das regiões de maior biodiversidade do mundo). No entanto muitas espécies nativas da flora ainda são pouco conhecidas. Há relatos de que aproximadamente vinte espécies são utilizadas mundialmente em forma de madeira

e algumas são apreciadas como alimento e/ou medicamento (RIBEIRO et al., 1999). Acredita-se que 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.100 espécies vegetais tiveram suas propriedades medicinais avaliadas (LUPE, 2007).

No perímetro urbano da cidade de Manaus, capital do Amazonas, está localizada uma parcela representativa da floresta de terra firme amazônica, a denominada Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD). Esta é uma das áreas com a flora mais bem estudada da Amazônia (BRAGA-NETO; MAGNUSSON, 2008) pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) declarada como Reserva Biológica possuindo uma área de 10.000 hectares (RIBEIRO et al., 1999).

Estudos de identificação de plantas realizados no âmbito do projeto Flora da Reserva Ducke (1999), em parceria com o Jardim Botânico de Nova York (NYBG) e o Museu Emílio Goeldi de Belém (PA), onde um conjunto de pesquisadores e mateiros liderados por Ribeiro identificaram e ficharam várias espécies pertencentes a diversas famílias (Rubiaceae, Piperaceae, Lecythidaceae, Marantaceae, Commelinaceae e Myrtaceae entre outras) (RIBEIRO et al., 1999). Dentre as angiospermas identificadas na Reserva Ducke, encontra-se a família Myrtaceae, representada por 56 espécies pertencentes a sete gêneros: *Blepharocalyx*, *Myrciaria*, *Calycolpus*, *Calyptranthes*, *Myrcia*, *Marlierea* e *Eugenia* formado por 28 espécies (RIBEIRO et al., 1999).

As espécies do gênero *Eugenia* apresentam um grande potencial terapêutico em seus óleos essenciais, bem como diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antibacteriana, antitumoral, antioxidante, inseticida entre outras (BRUN; MOSSI, 2010; OGUNWAND et al., 2005; CHAIEB et al., 2007). *Eugenia* é um dos

maiores gêneros da família Myrtaceae, e a sua química revela uma composição rica em flavonóides, glicosídeos, taninos hidrolizáveis, coumarinas, antocianinas e terpenoides (STASI; HIRAUMA-LIMA, 2002).

Nos óleos essenciais de espécies de *Eugenia* são encontrados principalmente compostos mono- e sesquiterpênicos como α - e β -pineno, α - e β -selineno e E-cariofileno, comuns ao metabolismo secundário das espécies pertencentes a esse gênero (FISCHER et al., 2005; BRUN; MOSSI, 2010).

Os estudos químicos e biológicos de *Eugenia* spp. ocorrentes na amazônia ainda são escassos. Nesse contexto, este trabalho visou a caracterização dos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais de folhas de *Eugenia* spp. ocorrentes na RFAD, bem como avaliação das suas atividades antimicrobianas e citotóxicas dos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar a composição química e avaliar as atividades antimicrobiana e citotóxica dos óleos essenciais obtidos a partir de folhas de sete espécies de *Eugenia* ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus-AM.

2.2. Específicos

- Analisar os perfis cromatográficos e espectrométricos dos óleos essenciais das folhas de sete espécies de *Eugenia* spp. (*E. magna*, *E. ramosii*, *E. feijoi*, *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marlenae* e *E. adenocalyx*).
- Identificar os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp.;
- Comparar a similaridade cromatográfica e química dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.;
- Determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Eugenia* spp. frente aos microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos óleos essenciais de *Eugenia* spp. frente linhagens tumorais (HCT116, SKMELL 19, MCF-7, ES-2 e ACP02) e linhagem normal de fibroblasto humano (MRC-5).

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Myrtaceae compreende cerca de três mil espécies distribuídas na região neotropical, e se encontra bem representada em diversas formações vegetais brasileiras. Muitas espécies são ricas em óleos voláteis, taninos e são frequentemente utilizadas na medicina popular, com destaque para o gênero *Eugenia*, um dos maiores da família. Estudos da composição química e avaliação biológica dos voláteis são realizados a fim de contribuir com o conhecimento científico deste gênero (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

3.1. Considerações gerais sobre Myrtaceae

O Brasil apresenta uma grande potencialidade para obtenção de recursos vegetais naturais em função da enorme biodiversidade. A flora brasileira é rica em famílias produtoras de óleos essenciais, das quais destaca a família Myrtaceae, com cerca de 76,2% de espécies endêmicas (FORZZA et al., 2010) e várias espécies aromáticas (MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Algumas espécies de Myrtaceae fornecem importantes óleos essenciais e temperos como *Eucalyptus saligna* Smit. e *Pimenta racemosa* Bay, respectivamente. Os constituintes químicos das espécies dessa família incluem compostos voláteis (mono- e sesquiterpenos), além de leucoantocianinas, taninos, ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides e algumas saponinas (STASI; HIRAUMA-LIMA, 2002).

Myrtaceae é uma família de Angiosperma que apresenta duas grandes subfamílias Myrtoideae e Leptospermoideae (MCVAUGH, 1958). Essa família é composta por cerca de 140 gêneros, dispersas principalmente nas Américas e na Oceania (Austrália) (Figura 1, p.. 21) (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION

FACILITY, 2014). Nos trópicos predomina a subfamília Myrtoideae, dois terços das espécies (RIBEIRO et al., 1999; STASI; HIRAUMA-LIMA, 2002).

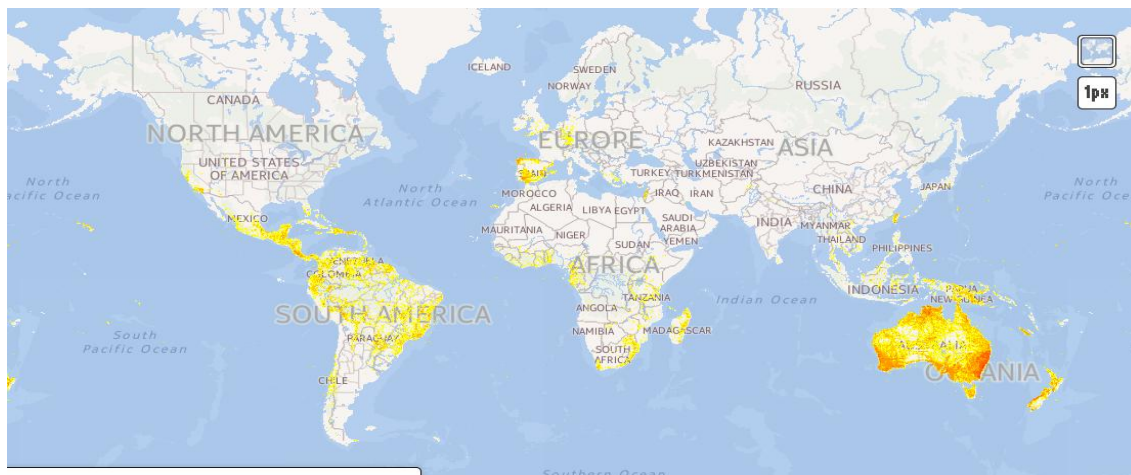


Figura 1. **Ocorrência de Myrtaceae**

Fonte: GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2014

As espécies de Myrtaceae são em geral árvores ou arbustos, raramente subarbustos, e preferencialmente distribuídas entre os trópicos. No Brasil há acerca de 1.000 espécies e todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, a qual é constituída de apenas uma tribo, Myrteae, subdividida em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (ARAGÃO; CONCEIÇÃO, 2008).

Cruz e Kaplan realizaram estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae, ambas pertencentes à ordem Myrtales, entre os anos de 1907 a 2004. A Figura 2 (p. 22) mostra o perfil químico da família Myrtaceae caracterizado pela presença de taninos, flavonóides, mono- e sesquiterpenos, triterpenóides, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbenóides entre outros. No levantamento realizado pelos pesquisadores, cerca de 70% das citações registradas correspondem às espécies da família Myrtaceae. Além disso, entre as famílias de Angiospermas citadas para

fins medicinais no Brasil, Myrtaceae ocupa o terceiro lugar (CRUZ; KAPLAN, 2004b; FORZZA et al., 2010).

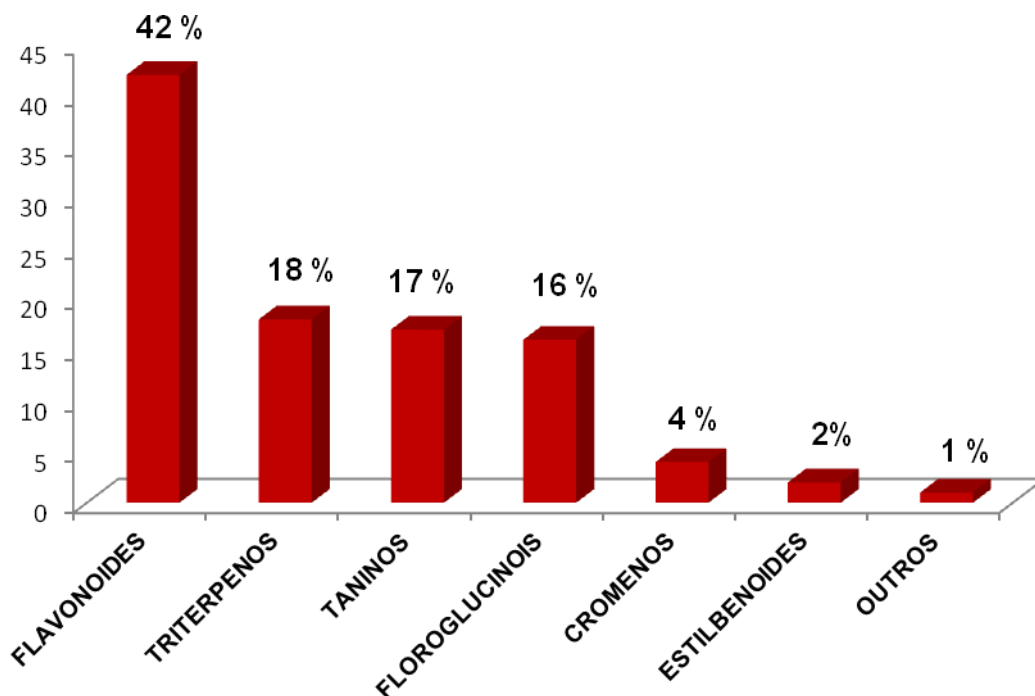


Figura 2. Perfil químico da família Myrtaceae.

Fonte: Cruz e Kaplan (2004).

Myrtaceae corresponde a 1,32% do total das angiospermas conhecidas, e constitui uma das famílias melhor representada nas diferentes formações vegetais do Brasil (SOARES-SILVA, 2000). Os representantes brasileiros apresentam caracteristicamente troncos com cascas lisas tendo o ritidoma renovado a cada estação de crescimento (RIBEIRO et al., 1999). Os gêneros mais importantes são *Psidium*, *Myrtus*, *Campomanesia*, *Syzygium*, *Myrcia* e *Eugenia* (Figura 3, pág. 23).

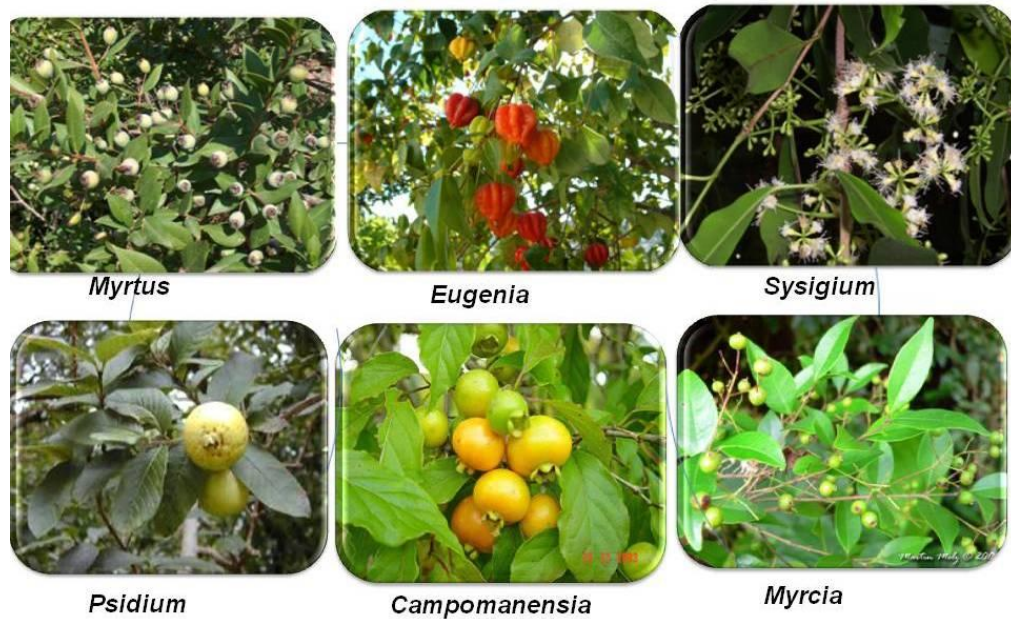


Figura 3. Gêneros representantes da família Myrtaceae.

3.2. Gênero *Eugenia*

Na América do Sul, o gênero *Eugenia* distribui-se desde parte do Norte do Brasil, onde ocorrem mais de 100 espécies até o norte e o nordeste da Argentina, no Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2014). A presença desse gênero é bastante marcante não apenas pela riqueza específica, mas também pela a abundância e frequência relativa de suas espécies (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Das espécies ocorrentes no Brasil 274 são endêmicas (FORZZA et al., 2010). A classificação taxonomica do gênero *Eugenia* baseada no sistema de classificação de (CRONQUIST, 1981) é apresentada a seguir:

- ❖ Reino Plantae
- ❖ Classe Magnoliopsida
- ❖ Subclasse Rosidae
- ❖ Ordem Myrtales
- ❖ Família Myrtaceae

- ❖ Subfamília Myrtoideae
- ❖ Tribo Myrteae
- ❖ Subtribo Eugeniinae
- ❖ Gênero *Eugenia*

Várias espécies de *Eugenia* têm seus frutos usados como alimento, (FISCHER et al., 2005) exemplos: *E. uniflora* L., uma das espécies mais conhecidas do gênero, chamada popularmente de pitanga, *E. edulis* (O Berg) Kiaersk (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999) e *E. stipitata* Mc Vaugh (araçá-boi), uma espécie frutífera originária da Amazônia Ocidental, apresenta um grande potencial econômico, principalmente pela produção de sucos, sorvetes, cremes e compotas (ANJOS; FERRAZ, 1999). Diversas espécies de *Eugenia* são ricas em constituintes tanto fixos quanto voláteis e são frequentemente utilizadas na medicina popular como as *E. brasiliensis* Lam., *E. dysenterica* (Mart.) DC. e *E. cauleflora* O. Berg usadas como antidiarreico, antidiurético, prisão-de-ventre, males dos rins e cicatrizante, as *E. jambos* L., *E. jambolana* Lam., *E. puniceifolia* (H.B.K) DC. e *E. sulcata* Spring são usadas para problemas estomacais, diabetes, males do fígado, anticâncer, colesterol e como adstringente (DI STASI et al., 2002; CRUZ; KAPLAN, 2004a). *E. uniflora* e *E. supra-axillares* Spring são usadas como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e antirreumáticos (RIBEIRO et al., 1999; BOSCOLO; VALLE, 2008; CRUZ; KAPLAN, 2004a). As atividades terapêuticas e biológicas de plantas do gênero *Eugenia* podem ser atribuídas aos compostos fixos, bem como aos compostos voláteis.

3.2.2. A química dos voláteis de *Eugenia* spp.

A caracterização química dos componentes voláteis das espécies de vegetais é realizada principalmente por cromatografia gasosa usando os detectores de ionização por Chamas (CG-DIC) e Espectrômetro de Massas (CG-EM).

A composição química volátil de folhas de *Eugenia* spp. apresenta predominância em sesquiterpenos cíclicos com uma fração menor de monoterpenos. O monoterpeno α -pineno e o sesquiterpeno β -cariofileno são os compostos mais frequentes (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Algumas espécies produzem compostos alifáticos e aromáticos e possuem óleos essenciais completamente incomuns, como é o caso da *E. stigmatica* DC. que possui apenas compostos alifáticos, o ácido fisetérico (90,5%) como componente majoritário e *E. confusa* DC. rica em compostos aromáticos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Estudos da composição volátil de *E. uniflora* mostraram predominância de compostos sesquiterpênicos tanto não oxigenados (24,79 %) quanto oxigenados (48,89%). Os componentes majoritários foram curzereno (17,96%) e atractilona (26,78%), além de uma pequena fração do monoterpenos β -pineno (2,36%) (LAGO et al., 2011).

No óleo das folhas de *E. racemulosa* O. Berg, foram identificados 85,26% do total de compostos presentes no mesmo, sendo a maioria sesquiterpenos: α -cadinol (79,48%), espatulenol (1,70%), *E*-cariofileno (1,19%) e um baixo teor do monoterpeno (limoneno 0,37%) (SENNA et al., 2011).

Espécies de *E. neonitida* Sobral e *E. rotundifolia* Casar. tiveram seus óleos essenciais (folhas frescas e secas) estudados em função da sazonalidade e das

atividades antioxidantes apresentadas pelas mesmas. A *E. neonitida* apresentou maior teor de compostos sesquiterpênicos em todos períodos estudados, variando de 75 a 93% sendo os majoritários biciclogermacreno, germacreno D e β -cariofileno. No óleo de *E. rotundifolia*, a porcentagem maior foi de monoterpenos, variando de 44 a 69% sendo α - e β -pineno os majoritários (DEFAVERI et al., 2011).

Os óleos essenciais de *E. riedeliana* O. Berg. apresentaram predominância de sesquiterpenos (94,6%) sendo o valerianol como componente majoritário, além de uma pequena fração monoterpênic (α -pineno com 3,2%) (SOUZA et al., 2010).

Em 2010, Nakamura e colaboradores estudaram a química volátil das espécies *E. candolleana* DC., *E. acutata* Miq. e *E. copacabanensis* Kiaersk. A predominância foi de compostos sesquiterpênicos com 96,33%, 95,27% e 81,15%, respectivamente. No óleo de *E. acutata* predominou sesquiterpenos não oxigenados com 83,46%, dentre os quais E-cariofileno (27%), seguido de α -selineno (8,4%), γ -muuroleno (8,4%), α -humuleno (4,1%), δ -cadineno (6,0%) e germacreno (5,3%) foram predominantes. Em *E. candolleana* a predominância foi tanto de compostos sesquiterpênicos não oxigenadas quanto oxigenados 45,55% e 49,71% (respectivamente), sendo os oxigenados majoritários, cadinol (29%) e guaiol (15,2%), e os não oxigenados δ -elemeno (13,9%) e viridifloreno (4,8%). *Eugenia. copacabanensis* mostrou predominância em sesquiterpenos oxigenados com 55,15% da constituição química do óleo essencial; os majoritários foram 1,10-di-*epi*-cubenol (14,24%), óxido de cariofileno (6,75%), *epi*- α -cubenol (5,03%) e α -cadinol (3,01%) (NAKAMURA et al., 2010).

Zoghbi e colaboradores (2011) estudaram a composição química das folhas de oito indivíduos de *E. protenta* coletadas em três localidades diferentes do estado

do Pará. A predominância nesse estudo foi de dimetilxantolina, selina-11-en-4- α -ol, β -elemeno, germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno. Os resultados das composições foram processados por Análise das Componentes Principais (PCA), onde foi possível verificar a formação de três grupos de óleos essenciais diferenciados pelo teor de dimetilxantolina (Grupo A), selin-11-en-4- α -ol e β -elemeno (Grupo B), germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno (Grupo C). De acordo com Zoghbi et. al. (2011) a dimetilxantolina foi citada pela primeira vez no gênero *Eugenia* (ZOGHBI et al., 2011).

Com o objetivo de determinar a diferença e similaridade da composição química volátil de espécies de *Eugénias* ocorrentes em Monteverde Costa Rica, Cole e colaboradores (2007) estudaram sete espécies: *E. austin-smithii* Standl., *E. cartagensis* O Berg., *E. haberi* Barrie, *E. monteverdensis* Barrie, *E. zuchowskiae* Barrie, *Eugenia*.sp. A aff. *haberi* e *Eugenia* sp. B aff. *oerstediana*. Os componentes majoritários dos óleos de *E. austin-smithii* e *E. cartagensis* foram o *E*-2-hexenal (37,6%-31,2% respectivamente), para *E. haberi* e *E. zuchowskiae* foi α -pineno (29%-28,3%, respectivamente), de *E. monteverdensis*, o linalol (30,4%), de *Eugenia*.sp. A aff. *haberi* foi o zingibereno (24%) e para *Eugenia*. sp. B aff. *oerstediana* foi 1,8-cineol (26%). Os compostos químicos comuns a todos as espécies estudadas foram α -pineno, *E*-cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, (*E*)-nerolidol e o torreol (COLE; HABER; SETZER, 2007).

Os óleos essenciais de cravos de *E. caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S.G. Harrison revelaram uma composição rica em sesquiterpenos representados principalmente por eugenol (60,5%), *E*-cariofileno (7,55), α -humuleno (1,7%) e acetato de eugenila (7,0%) (MERCHÁN ARENAS et al., 2011).

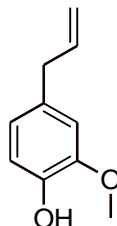

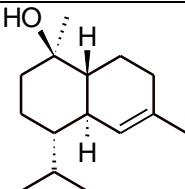
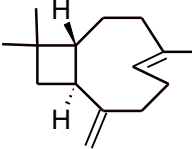
Os voláteis das folhas de *E. dysenterica* foram avaliados e caracterizados em função das atividades antifúngica observada, como compostos químicos destaca-se classe dos sesquiterpenos (60%), sendo 42,4% de sesquiterpenos não oxigenados: E-cariofileno (14,8%), α -humuleno (10,9%), δ -cadineno (5,8 %), α -copaeno (3,8%), α -bulneseno (1,9%), 17,6% oxigenados óxido de cariofileno (5,4%), epóxido de humuleno II (3,2%), 1-epi-cubenol (2,5%), cedr-8(15)en-9 α -ol (2,3%) e cubenol (1,0%). A porcentagem de monoterpenos foi de 28,0%, sendo de não oxigenados corresponderam a 18,2%: limoneno (5,5%), α -tujeno (5,6%) e sabineno (3,9%) e terpenos oxigenados 9,6%: α -terpineol (6,1%) e β -linalol (1,1%) (COSTA et al., 2000).

A composição química e a atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas frescas de *E. zuchowskiae* de Monteverde Costa Rica foram estudadas por Cole e colaboradores (2007). No total 40 compostos foram identificados sendo 53,1% de sesquiterpenos hidrocarbonetos (E-cariofileno (13,2%), α -humuleno (13,11%), α -copaeno (8,1%), δ -cadineno (6,2%), aromadendreno (4,7%), ledeno (1,8%), biciclogermacreno (1,3%), globulol (3,4%), cubebol (1,0%), nerolidol (1,4%) e t-cadinol (1,4%). Os monoterpenos hidrocarbonetos (33,0%) foram correspondentes à: α -pineno (28,3%), limoneno (2,7%) e β -pineno (1,9%) (COLE et al., 2007).

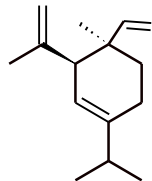
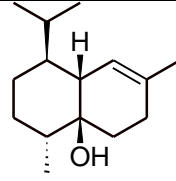
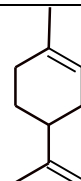
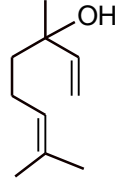
A química dos óleos essenciais das folhas e dos frutos de *E. uniflora* mostrou predominância para compostos sesquiterpênicos, sendo os majoritários curzereno (19,7%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,8%), atractilona (16,9%) e furanodieno (9,6%) nos óleos essenciais das folhas. Germacrona (27,5%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (19,2%), curzereno (11,3%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (11,0%) nos óleos essenciais dos frutos (OGUNWAND et al., 2005).

No Quadro 1 são descritos os componentes majoritários de espécies de *Eugenia* spp. ocorrentes em diversas partes do Brasil, incluindo o trabalho realizado por Oliveira (2012) sobre os voláteis de *Eugenia patrisi* Vahl. cuja amostra foi coletada na RFAD em Manaus (AM), local de coleta das espécies estudadas nesta dissertação.

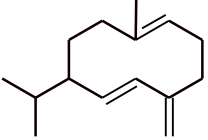
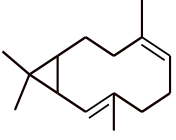
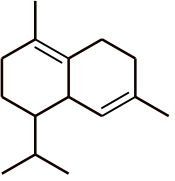
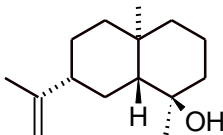
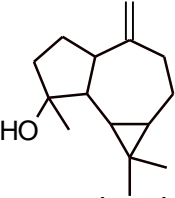

Quadro 1. Componentes químicos abundantes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Espécies	Local	Material vegetal	Constituintes majoritários	Referências
<i>E. caryophyllata</i> Thumb	Vargem Grande Paulista, SP; PB;	Folhas secas	 eugenol (74%)	(TRAJANO et al., 2010; GAYOSO et al., 2005)
<i>E. cerasiflora</i> Miq. <i>E. mosenii</i> (Kausel) Sobral	Paranapia caba (Santo André-SP)	Folhas secas	 α -pineno	(OKIDA et al., 2004)
<i>E. racemulosa</i> O. Berg	Barra Mansa RJ	Folhas secas	 α -cadinol (79,48%)	(SENNA et al., 2011)
<i>E. acutata</i> Miq. <i>E. desynerica</i> (Mart.) DC.	Município de Valinho SP. e em PE. GO	Folhas frescas	 <i>E</i> -cariofileno (27%)	(NAKAMURA et al., 2010); (OLIVEIRA; DIAS; CAMARA, 2005); COSTA et al., 2000)

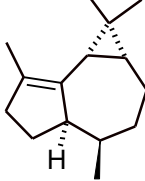
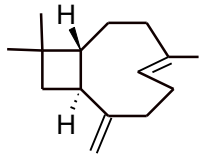
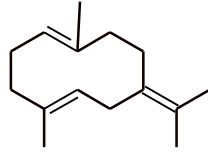
Continuação Quadro 1. Componentes químicos abundantes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

<i>E. candolleana</i> DC.	RJ	Folhas frescas	 <p>δ-elemeno (14%)</p>	(NAKAMURA et al., 2010)
<i>E. copacabanensis</i> Kiaersk..	RJ	Folhas frescas	 <p>1 epi cubenol (14%)</p>	(NAKAMURA et al., 2010)
<i>E. speciosa</i> Camb	RJ RS	Folhas frescas	 <p>limoneno (34%)</p>	(ALVES et al., 2000; APEL et al., 2004)
<i>E. punicifolia</i> (HBK) DC.	PE	Folhas frescas	 <p>linalool (61,2%)</p>	(OLIVEIRA; DIAS; CAMARA, 2005)

Continuação Quadro 1. Componentes químicos abundantes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

<p><i>E. protenta</i> McVaugh</p>	<p>PA</p>	<p>Folhas secas</p>	<div style="text-align: center;">  <p>germacreno D (16%)</p>  <p>biciclogermacreno (12%)</p>  <p>δ-cadineno (15%)</p>  <p>selin-11-en-4-α-ol (18%)</p> </div>	<p>(ZOGHBI et al., 2011)</p>
<p><i>E. cuprea</i> (O. Berg.) Nied.</p>	<p>RS</p>	<p>Folhas secas</p>	<div style="text-align: center;">  <p>espatulenol (12,1%)</p> </div>	<p>(APEL et al., 2004)</p>
<p><i>E. brasiliensis</i> Lam.; <i>E. muticostata</i> Legrand.; <i>E. sulcata</i> Spring. Ex Mart., <i>E. xiriricana</i> Mattos</p>	<p>RS</p>	<p>Folhas secas</p>	<div style="text-align: center;">  <p>α e β-pineno 40, 23, 35, 22% respectivamente</p> </div>	<p>(APEL et al., 2004)</p>

Continuação Quadro 1. Componentes químicos abundantes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

<p><i>E. patrisi</i> Vahl</p>	<p>RFAD Manaus</p>	<p>Folhas secas</p>	<div style="text-align: center;">  <p>α-gurjuneno 12,51%</p>  <p><i>E</i>-cariofileno (8,5%)</p>  <p>germacreno B (10,6%)</p> </div>	<p>(OLIVEIRA, 2012)</p>
-----------------------------------	------------------------	-------------------------	---	-----------------------------

Eugenia spp. apresentam grandes potenciais biológicos tais como antimicrobiano, antifúngico, antitumoral e etc. Estes podem ser atribuídos à composição química volátil presente nos seus óleos essenciais (MAGINA, 2008). Poucas espécies, principalmente as ocorrentes no estado do Amazonas foram amplamente estudadas do ponto de vista químico e biológico. Neste contexto, torna-se interessante conhecer a química de espécies de *Eugenia* spp. ainda não estudadas, a fim de contribuir com o conhecimento científico do gênero.

3.3. Óleos Essenciais: biossíntese de monoterpenos e sesquiterpenos

Os óleos essenciais são produtos naturais obtidos a partir de plantas, são constituintes importantes para várias indústrias visivelmente as de perfumaria, alimentos e farmacêutica (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1992). O uso destes data do

período pré-histórico, quando o homem percebeu que ao queimar certos arbustos ou resinas, estes liberavam certa essência causando-lhes curiosidade em saber a procedência.

Na Idade Média os alquimistas e suas inúmeras experiências, contribuíram significativamente com o desenvolvimento dos processos de extração das essências proveniente de vegetais, onde através de vapor d'água conseguiram extrair o que chamaram de "alma da planta", a partir de então surgiu o termo óleo essencial (JAKIEMIU, 2008). Os óleos essenciais eram usados no Egito para embalsamar faraós, bem como usados como oferendas em cerimônias religiosas e perfume para o corpo entre outras formas de uso.

Os óleos essenciais são caracterizados como produtos naturais obtidos de partes de plantas geralmente aromáticas, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, separáveis comumente por arraste a vapor d'água dentre outras formas de extração (SIMOES et al., 2004). Quando extraídos de diferentes partes da planta podem apresentar diferenças físico-químicas e odoríferas. A principal característica é a volatilidade de seus constituintes, uma propriedade proveniente da forma de extração (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1992).

Diversas funções biológicas são aferidas aos óleos essenciais, tais como proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda d'água, controle da temperatura etc. (SILVA, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2004). A composição química pode ser descrita principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos, ainda fenilpropanoides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1992).

Nos dias atuais conta-se com variadas técnicas de extração de óleos essenciais, tais como:

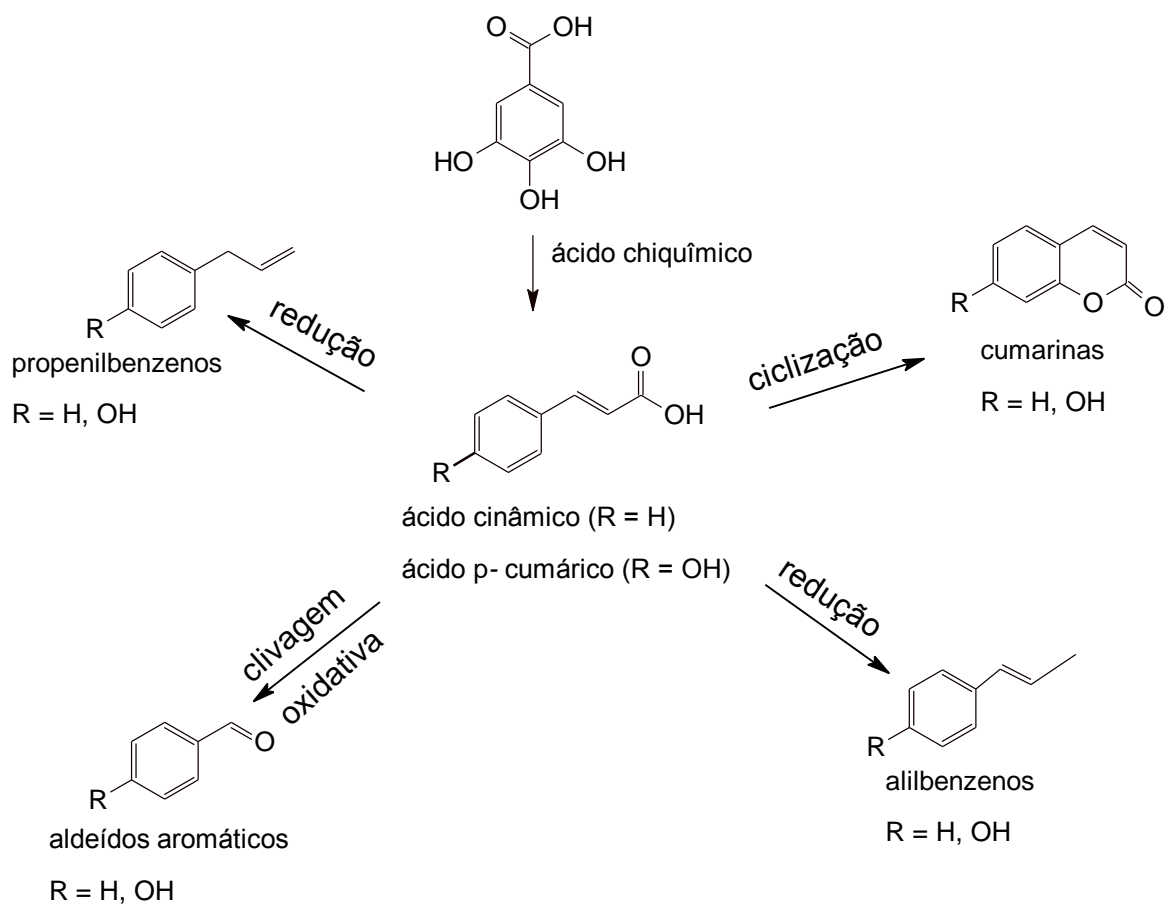
- **Enfloração:** O método consiste na retirada de óleos essenciais de flores frescas utilizando gordura, no qual se espalha uma fina camada (gordura sem odor) sobre placas de vidro, em seguida coloca-se pétalas por um determinado período sobre esta, sendo substituídas a cada intervalo de tempo por novas camadas. Após o processo em que a gordura absorve ao máximo a fragrância, os óleos podem ser retirados por extração com solvente orgânico (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).
- **Prensagem:** Método utilizado para extrair óleos essenciais de frutos cítricos, no qual este é prensado até a liberação das substâncias voláteis encontradas no pericarpo e em cavidades oleaginosas. Por meio da decantação, centrifugação ou destilação fracionada, os óleos são separados da emulsão formada com a água (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).
- **Extração por arraste a vapor d'água:** Método bastante utilizado onde o material vegetal fica em contato com a água dentro de um balão, onde uma fonte de calor faz com que ocorra a ebulição da água que então arrasta os óleos em pequena escala. Geralmente, usa-se um aparato do tipo Clevenger. Depois de separados, os óleos essenciais são secos com Na_2SO_4 anidro (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).
- **Extração por headspace:** É uma técnica muito sensível, usada na análise de compostos em baixas concentrações, onde o analito é mais volátil que a matriz, este volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra. A principal característica

do headspace é a possibilidade de determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta, esta é uma técnica muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra cromatógrafo gasoso para obtenção dos óleos essenciais (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

A composição química dos óleos de uma mesma planta pode variar significativamente e vários fatores podem contribuir, tais como período de coleta, estação do ano, temperatura, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (SIMOES et al., 2004).

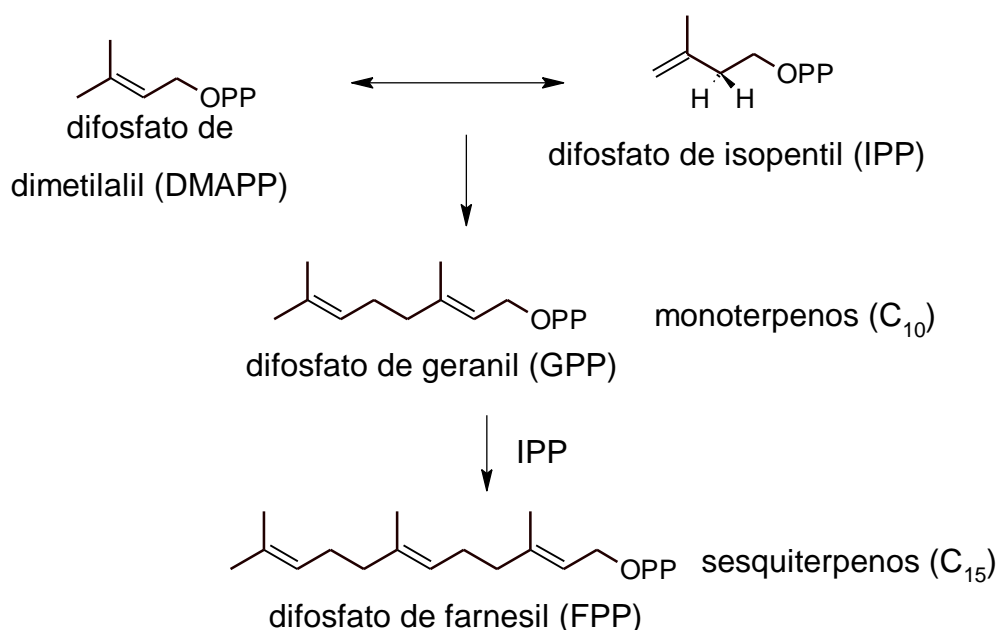
A biossíntese dos principais constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais se dá a partir da rota biossintética precursora dos derivados de terpenóides (via ácido mevalônico/acetato e/ou via fosfato desoxixilulose) e dos fenilpropanóides (via do chiquimato) (DEWICK, 2002).

Os fenilpropanóides são formados via ácido chiquímico que por sua vez é formado a partir da condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico é responsável pela formação das duas unidades básicas dos fenilpropanóides, o ácido cinâmico e o ácido p -cumárico que por meio de redução, oxidação e ciclização formam os alilbenzenos, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos e cumarinas (SIMOES et al., 2004) (Esquema 1. p. 36).



Esquema 1. Formação de compostos fenilpropanóides

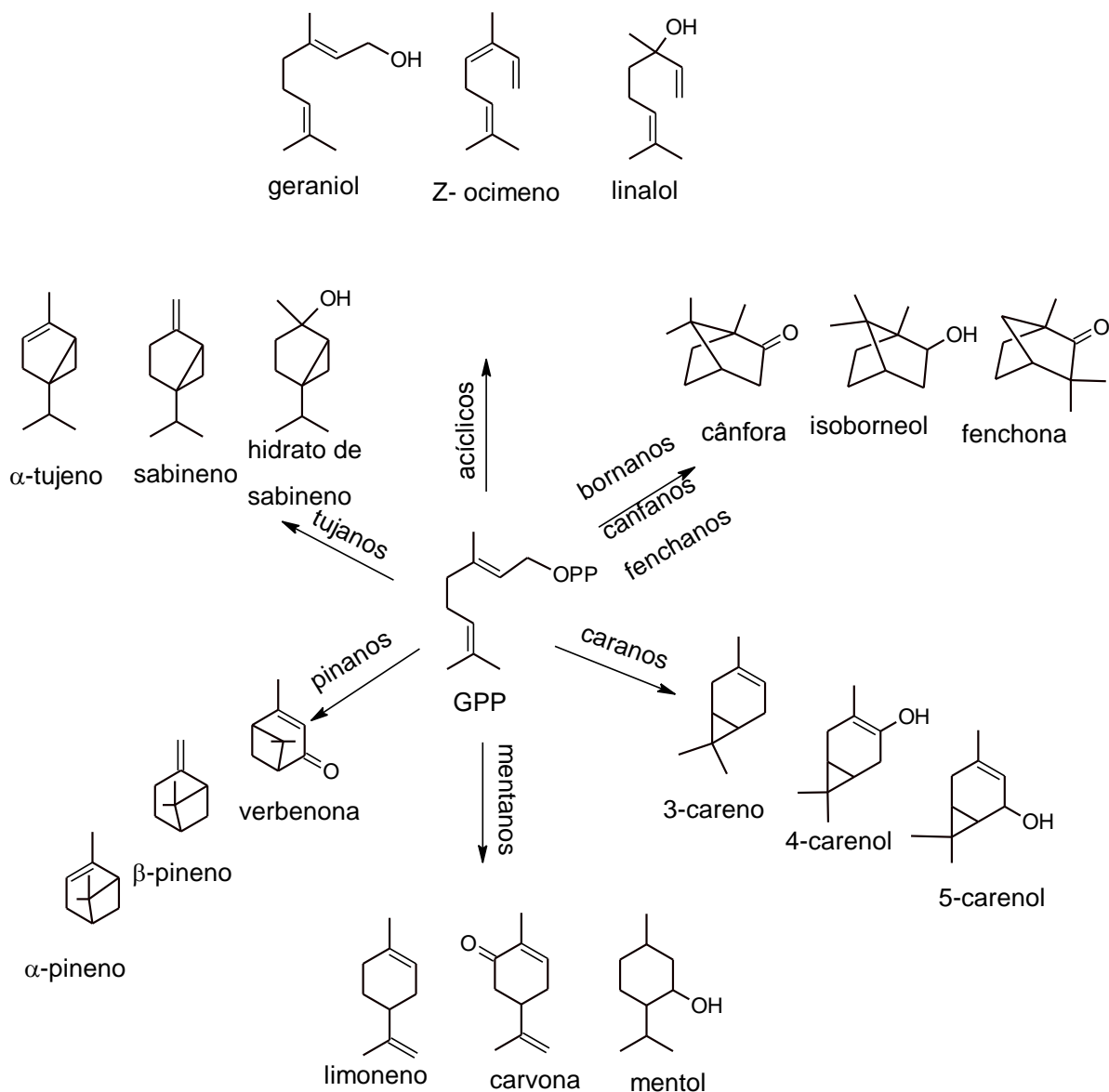
Pela via mevalonato, o difosfato de isopentenil (IPP) e seu isômero, o difosfato de dimetilalil (DMAPP) une-se para formar o difosfato de geranil (GPP), precursor dos monoterpenos (C₁₀). Essa cadeia condensada com outra unidade de IPP, dá origem às cadeias de pirofosfato de farnesil (FPP) (C₁₅) precursora da maioria dos sesquiterpenos, (Esquema 2).



Esquema 2. Formações do GPP e FPP.

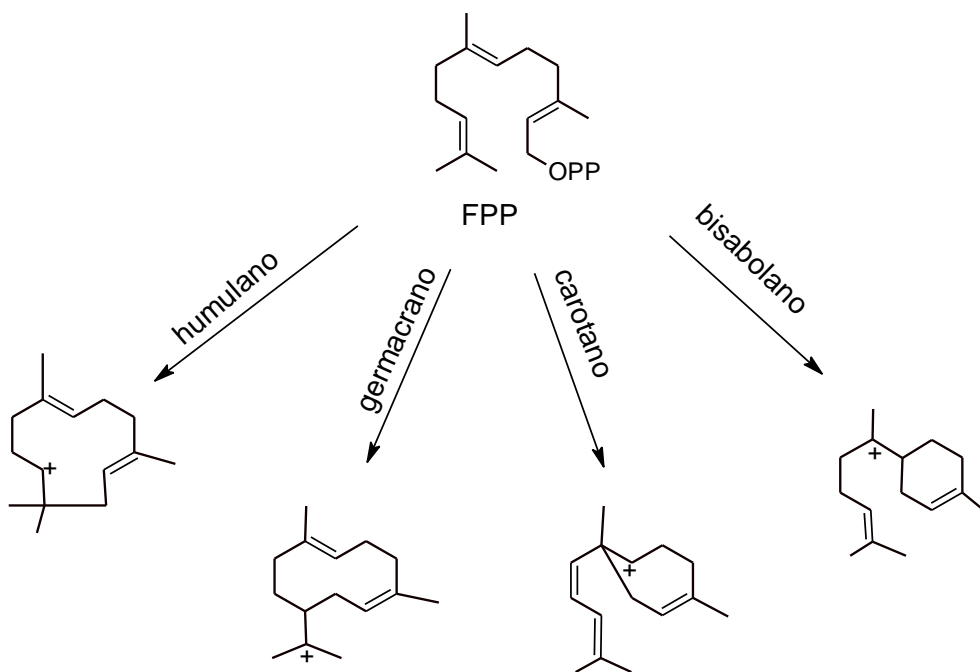
Todo o isômero de GPP, LPP, NPP podem originar monoterpenos acíclicos (geraniol, Z-ocimeno e linalol) por perda de hidrogênio, captura de oxigênio, e formar monoterpenos cíclicos do tipo canfanos, caranos, mentanos, pinanos, tujanos, por migração de hidrogênios ou rearranjos de Wagner-Meerwein (MAHMOUD; CROTEAU, 2002; DEWICK, 2002).

Algumas estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos são apresentadas no Esquema 3 (MAHMOUD; CROTEAU, 2002).



Esquema 3. Estruturas de núcleos monoterpênicos baseado no trabalho de MAHMOUD; CROTEAU, 2002.

O FPP dar origem a cátions de diferentes configurações, dos quais resultam os diversos esqueletos que constituem as estruturas dos sesquiterpenos comuns ao gênero *Eugenia*, dando origem a compostos com núcleos de seis carbonos (bisabolano), sete (carotano), dez (germacrano) ou onze (humulano) (Esquema 4) (CHAPPELL, 1995).



Esquema 4. Ciclizações de grupos FPP formando núcleos sesquiterpênicos.

O rendimento e a porcentagem desses metabolitos secundários podem variar de acordo com alguns fatores, tais como, sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, desenvolvimento e etc. (Figura 4) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

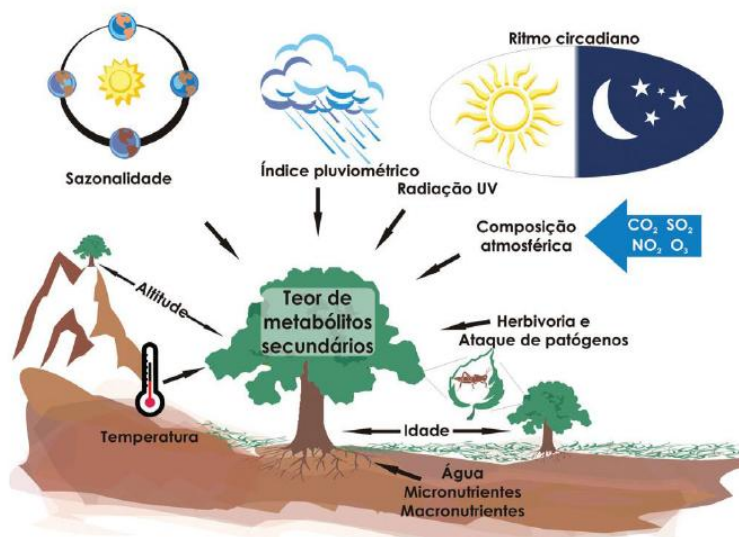


Figura 4. Fatores que podem influenciar o rendimento e o teor dos metabolitos secundários.

Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007)

3.4. Atividades farmacológicas dos óleos essenciais

Diversas propriedades biológicas são atribuídas aos óleos essenciais; devido à complexidade química torna-se difícil correlacionar estas propriedades a uma única substância, pois o sinergismo químico pode atuar determinando as mesmas. Algumas atividades são destacadas como atividades antimicrobianas, atividades antifúngicas, antiinflamatório, antioxidante, antiviral, efeito citotóxico, efeito anestésico e etc. (CHAIEB et al., 2007; MEHTA et al., 2013; OGUNWAND et al., 2005; RINI; OHTANI; ICHIURA, 2012).

As atividades antimicrobianas de óleos essenciais produzidos por plantas tem sido observadas empiricamente durante vários séculos, e confirmadas cientificamente (BASILE et al., 2006). Segundo Duarte (2006), estas propriedades tem sido atribuídas a terpenos como muuroleño, mentol, linalol, geraniol, eugenol, geranial, carvacrol, carvona e timol entre outros (DUARTE, 2006; (SILVA et al., 2012).

Dentre as diversas espécies do gênero *Eugenia*, poucas foram amplamente estudadas (em função do número de espécies identificadas botanicamente) do ponto de vista químico e biológico. Em estudos realizados com os óleos essenciais das folhas de *E. caryophyllata* foram relatadas atividades antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH et al., 2007), atividade antiepiléptica contra convulsões tônicas induzidas por eletrochoque em ratos machos (POURGHOLAMI et al., 1999), e para o eugenol, principal constituinte extraído do seu óleo, foi descrita atividade citotóxica, indutora de radicais livres, apoptose,

antitumoral (YOO et al., 2005), antifúngica (onicomicose) (GAYOSO et al., 2005) e atividade acaricida (FICHI et al., 2007); (MAGINA, 2008).

Os óleos essenciais das folhas e dos frutos *E. uniflora* L apresentam potencial citotóxico frente as linhagens tumorais, células de carcinoma hepatocelular (G2 Hep), carcinoma ductal de mama (Hs 578T) e células de carcinoma da próstata humana (PC-3). Além deste estudo foi realizado a avaliação antimicrobiana frente a microrganismos *gram* positivos (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e *gram* negativos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Os resultados foram promissores considerando o potencial observado, de moderada a alta (OGUNWAND et al., 2005).

Os terpenos α -pineno, α -copaeno, E-cariofileno e α -humuleno exibem uma citotoxicidade comparável ao agente anticarcinogênico doxorubicina em linhagem de celular mama humano (MCF-7). A abundância destes componentes nos óleos essenciais de *E. zuchowskiae* provavelmente contribui para a atividade citotóxica apresentada (COLE et al., 2007). O monoterpeneo α -pineno mostrou citotoxicidade *in vitro* para células de carcinoma hepatocelular humano (Hep G2) e o sesquiterpeneo α -humuleno apresentou atividade citotóxica em algumas linhagens tumorais, incluindo a MCF-7. Também foi testado o β -cariofileno e o óxido de cariofileno, porém estes se mostraram inativos para as linhagens estudadas (LEGAULT et al., 2003).

A avaliação da bioatividade de óleos de plantas, medida pela toxicidade frente a linhagens celulares pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importante atividade biológica.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Coleta, identificação e descrição das espécies de *Eugenia* spp.

As coletas das amostras de folhas de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) foram realizadas no perímetro urbano da cidade de Manaus-AM, especificamente na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Figura 5).

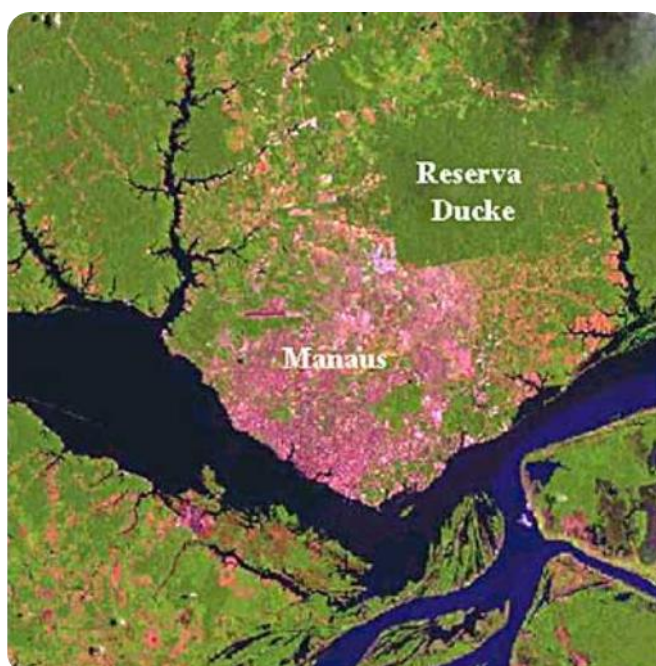


Figura 5. Imagem espacial da região metropolitana Manaus (AM)
Fonte: Braga-Neto et. al.(2008)

As espécies coletadas foram identificadas pela botânica MSc. Maria Anália Duarte de Souza. As exsicatas de todas as espécies identificadas foram comparadas com as exsicatas depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Para as espécies em processo de identificação botânica, suas exsicatas foram preparadas e depositadas no mesmo herbário (INPA). A localização das espécies selecionadas foi realizada empregando os mapas de trilhas proposto pelo projeto Flora da Reserva Ducke (INPA, 2014).

A descrição botânica das espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) estudadas nesta dissertação (Figuras 6 a 12), realizada por (SOUZA, 1999) é apresentada a seguir:

- ✓ ***Eugenia magna* Hostl. (1):** Árvores de pequeno porte. Plaquetas papiráceas, fragmentosas. Folhas glabras e lisas, com nervuras laterais submersas. Nervura central na face adaxial impressa em "v". Pecíolo sulcado-emarginado. Râmulos achatados, glabros, cinza-amarronzados ou castanhos.



Figura 6. ***Eugenia magna* Hostl.**

Fonte: AZEVEDO, S. G. (2012)

- ✓ ***Eugenia ramosii* n. sp. (2):** Árvores de médio a grande porte. Folhas com nervura central na face adaxial côncava. Pecíolo sulco-emarginado. Râmulos glabros e cinza amarronzados.



Figura 7. ***Eugenia ramosii* n. sp.**

Foto: AZEVEDO, S. G. (2012)

- ✓ ***Eugenia feijoi* O. Berg. (3):** Arvoretas. Folhas cartáceas e lanceoladas. Nervuras secundárias proeminentes na face adaxial. Râmulos achatados, glabros e castanhos.



Figura 8. ***Eugenia feijoi* O. Berg.**
Foto: AZEVEDO, S. G. (2012)

- ✓ ***Eugenia lisbonii* n. sp. (4):** Árvore de médio porte. Lâmina papiro-membranácea. Cicatrizes impressas. Folhas brilhantes com pontuações visíveis, idem no pecíolo e nos râmulos. Nervura central na face adaxial convexa. Râmulos achatados.



Figura 9. ***Eugenia lisbonii* n.sp.**
Foto: AZEVEDO S. G. (2012)

- ✓ ***Eugenia pseudopsidium* Jacq (5)**: Árvore de média a grande porte. Placas papiráceas a suberoso-lenhosas. Lâmina glabra. Nervura central na face adaxial côncava. Râmulos achatados e glabros.



Figura 10. ***Eugenia pseudopsidium***
Foto: (SOUZA, 1999)

- ✓ ***Eugenia marleneae* n. sp. (6)**: Árvores de médio a grande porte, base do tronco não ramificada. Cicatrizes de cor laranja. Nervura central na face adaxial impressa em “v” ou côncava. Pecíolo canaliculado. Râmulos glabrescentes.



Figura 11. ***Eugenia marleneae* n. sp.**
Foto:(SOUZA, 1999)

- ✓ ***Eugenia adenocalyx* DC (7)**: Árvore de médio a grande porte. Ritidoma com anéis semicirculares ao longo do tronco. Folhas com nervura central na face adaxial côncava. Ramos jovens achatados.



Figura 12. ***Eugenia adenocalyx* DC.**
Foto: AZEVEDO, S. G. (2012)

Coletou-se amostras de ramos das espécies de *Eugenia* supracitadas totalizando treze amostras (Tabela 1)

Tabela 1. Espécies de *Eugenia* spp. coletadas na RFAD.

N	Código	Espécies	Local na RFAD	Data	Exsicata
1	1A	<i>E. magna</i>	Baixio	09/08/2012	4662
2	2A	<i>E. ramosii</i>	Platô	09/08/2012	3970
3	2B-1	<i>E. ramosii</i>	Platô	09/08/2012	3577
4	2B-2	<i>E. ramosii</i>	Platô	08/01/2013	3577
5	3A	<i>E. feijoi</i>	Campinarana	23/11/2012	4732
6	3B	<i>E. feijoi</i>	Campinarana	23/11/2012	
7	3C	<i>E. feijoi</i>	Campinarana	23/11/2012	4752
8	4A	<i>E. lisbonii</i>	Platô	31/10/2013	3471
9	5A	<i>E. pseudopsidium</i>	Platô	18/09/2013	4577
10	5B	<i>E. pseudopsidium</i>	Platô	18/09/2013	3036
11	6A	<i>E. marleneae</i>	Platô	18/09/2013	3203
12	6B	<i>E. marleneae</i>	Platô	18/09/2013	3821
13	7A	<i>E. adenocalyx</i>	Platô	14/08/2013	4597

4.2. Processamento dos materiais vegetais de *Eugenia* spp.

Os ramos coletados foram armazenados em recipientes devidamente identificados e transportados ao laboratório de Química de Produtos Naturais da UFAM, foram secos a temperatura ambiente por aproximadamente duas semanas. As folhas sadias, desprovidas de qualquer ferimento, ataque de microrganismo ou de coloração desbotada foram selecionadas, picadas manualmente, divididas em alíquotas de 200 gramas e submetidas à hidrodestilação.

4.3. Obtenção dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Os óleos essenciais foram obtidos a partir de 200 gramas de folhas secas pelo método hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado (Figura 13). O material triturado manualmente, foi transferido a um balão de fundo redondo de 5 L, adicionando 2 L de água destilada e hidrodestilado por um período de 4h. Após a obtenção dos óleos, foram mensurados os volumes aproximados no próprio Aparelho Clevenger modificado. Os óleos foram recolhidos, desidratados com Na_2SO_4 anidro e armazenados em frascos de vidro do tipo âmbar e mantidos a -20°C até a realização das análises biológicas, cromatográficas e espectrométricas.



Figura 13. Sistema de hidrodestilação utilizado na obtenção dos óleos essenciais.

Foto: Azevedo (2012)

4.4. Análise biológica dos óleos essenciais

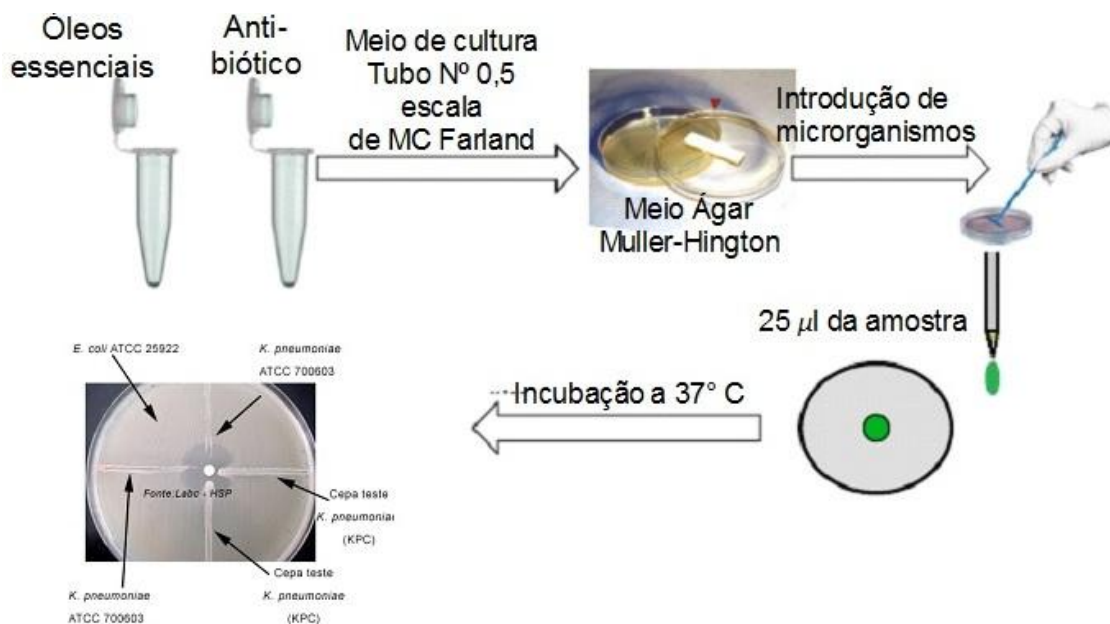
As análises biológicas foram realizadas em parceria com o Centro Biotecnológico da Amazônia (CBA) e Faculdade de Ciências Farmacêutica (FCF) da UFAM, sob supervisão dos professores Dr. Rudi E. L. Procópio (CBA), Dr. Emerson Lima Silva e Dra Marne Vasconcelos (FCF). Os ensaios foram realizados pela MSc. Ellen Suzany (FCF) e Ingrid Reis da Silva (CBA). Os ensaios realizados foram: Ensaio antimicrobiano (CBA), ensaio hemolítico (FCF) e ensaio de citotoxicidade (FCF), os quais são sumarizados a seguir.

4.4.1. Ensaio antimicrobiano

Os óleos essenciais foram submetidos a ensaios de bioatividade pelo método de difusão em ágar-discos utilizando os seguintes microrganismos indicadores: bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (todos resistente ao antibiótico metilicina).

Empregou-se a metodologia normatizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) o qual será relatado a seguir.(WAYNE, 2006)

Os microrganismos indicadores foram padronizados de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas de petri contendo meio Ágar Müller-Hington onde discos de papel de 6 mm de diâmetro foram previamente colocados no meio de cultura neste, 25 µL dos óleos essenciais foram colocados em cada disco e o diâmetro das zonas de inibição foram avaliados após 16 horas de incubação a 37 °C, conforme o Esquema 5 (WIKLER et al., 2006).



Esquema 5. Ensaio microbiológico com óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Fonte: Azevedo, S.G (2012)

4.4.2. Ensaio hemolítico

O teste do potencial hemolítico foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Jimenez e colaboradores (2003) com modificações. Foi coletado sangue de um camundongo Swiss (*Mus musculus*) (ensaio aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas, com protocolo número 116/2012-CEEA) por via do plexo orbital (altamente vascularizado), sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm por 3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Figura 14).

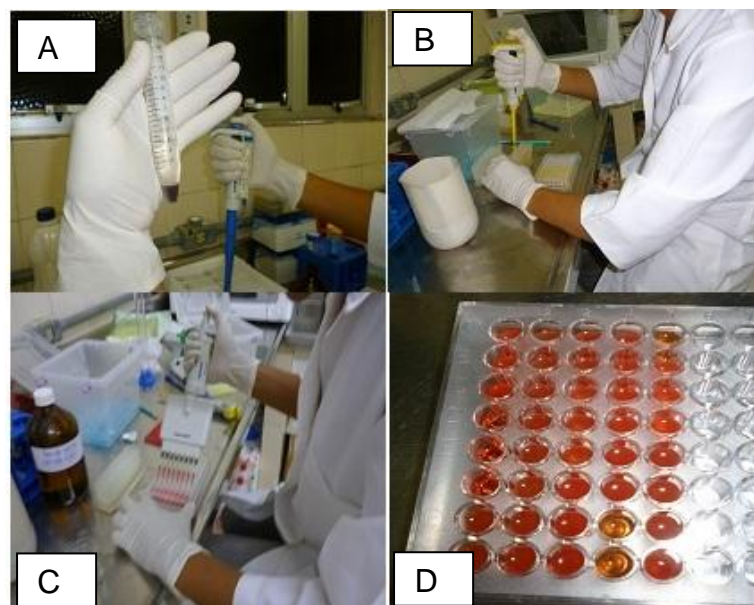


Figura 14. Avaliação do potencial hemolítico dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Fonte: Azevedo, S.G. (2012)

A-preparação dos eritrócitos; **B**-preparação das amostras de óleos essenciais; **C**- preparação do meio; **D**- plaqueamento das amostras

Cada poço da primeira coluna recebeu 100 μ L da solução salina. Na segunda, os poços receberam 50 μ L da solução salina e 50 μ L do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da terceira coluna, foram adicionados 100 μ L de solução salina e 100 μ L das substâncias teste em solução. Da quarta coluna em diante os poços receberam 100 μ L da solução salina, exceto os da última coluna, que receberam 80 μ L de solução salina e 20 μ L de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas dos poços da terceira à décima primeira coluna, retirando-se 100 μ L da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 15,6 a 2000 μ g/mL. Em seguida, 100 μ L da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), e posteriormente centrifugadas (1500

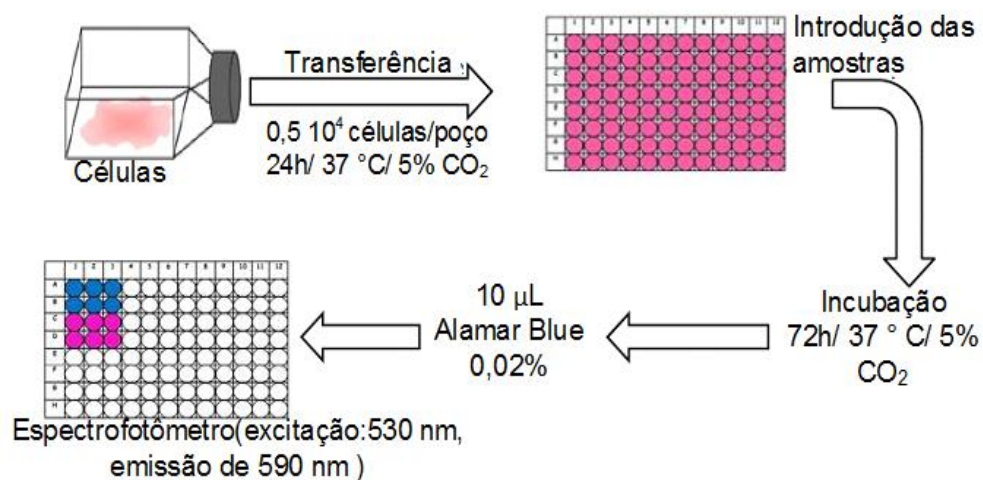
rpm/10 min). O sobrenadante foi transferido para outra microplaca para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm (JIMENEZ et al., 2003).

4.4.3. Ensaio de citotoxicidade dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Avaliação citotóxica dos óleos essenciais foi realizada através do teste do Alamar Blue, este é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Quando as células estão em proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não-fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

As linhagens utilizadas foram cólon humano (HCT116), melanoma humano (SKMELL19), mama humano (MCF-7), ovário humano (ES-2), adenocarcinoma gástrico (ACP02) e fibroblasto humano (MRC-5) cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantida em estufa a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM, estas foram contados em câmara de Neubauer e plaqueados em placas de 96 poços, cada poço contendo 1×10^4 células em 200 µL de meio de cultura. A placa foi então incubada por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram tratadas por setenta e duas horas (Esquema 6).



Esquema 6. Ensaio de citotoxicidade dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Fonte: Ellen Suzany (2014)

A doxorubicina foi usada como controle positivo. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração dos óleos essenciais. Passadas 24 h de tratamento, 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de elisa (marca Beckman e Coulter). Os dados foram analisados em relação ao controle negativo (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

4.5. Análises cromatográficas e espectrométricas dos óleos e de *Eugenia* spp.

Os óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Eugenia* spp. foram analisados em Cromatógrafo Gasoso de Alta Resolução (CGAR) equipado com detector de Ionização por Chama (DIC) e em Cromatógrafo Gasoso acoplado à um Espectrômetro de Massas (EM), ambos da Shimadzu™ (GC2010-FID e GCMS-QP2010, respectivamente).

Na análise por CG-DIC foi empregada uma coluna capilar DB-5 (5% difenil, 95% polidimetilsiloxano) (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura do filme), sendo utilizados como gás de arraste o He em fluxo de 1,0 ml/min. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com o injetor a 250 °C e o detector de ionização por chama a 290 °C. A temperatura programada para o forno foi de 60 a 240 °C a 3 °C min⁻¹. Foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares C7 a C30 para a determinação dos índices de retenção nas mesmas condições cromatográficas.

Na análise por CG-EM, a coluna utilizada foi uma DB5-MS, o gás de arraste usado foi o hélio. As condições das análises cromatográficas foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada com base nos dados de índices de retenção obtidos por CG-DIC, e dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os índices de retenção foram calculados utilizando a Equação de van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares injetados na sequência das amostras. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados da espectroteca Wiley 7.0, NIST, Pherobase e da literatura (ADAMS, 2007).

4.6. Análises estatísticas/quimiométricas

Para análise estatística utilizou-se o software MinitabTM 13.0. Primeiramente, avaliou-se a normalidade da distribuição dos dados (teste de normalidade), para os dados que não apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para os dados cuja distribuição é normal, empregou-

se o teste t (95% confiança) ou realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados cromatográficos e espectrométricos obtidos estes foram tratados em Excel, transpostos, normalizados e levados para análise de similaridade química na ferramenta quimiométrica The Unscrambler™ 10.2 na qual se analisou a PCA (algoritmo de NIPALS para pequenos fatores de dados SVD para grandes fatores de dados, e com validação do tipo “cross validation”) e HCA (método: Wards).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Os rendimentos dos óleos essenciais das treze amostras estudadas estão apresentados no Gráfico 1.

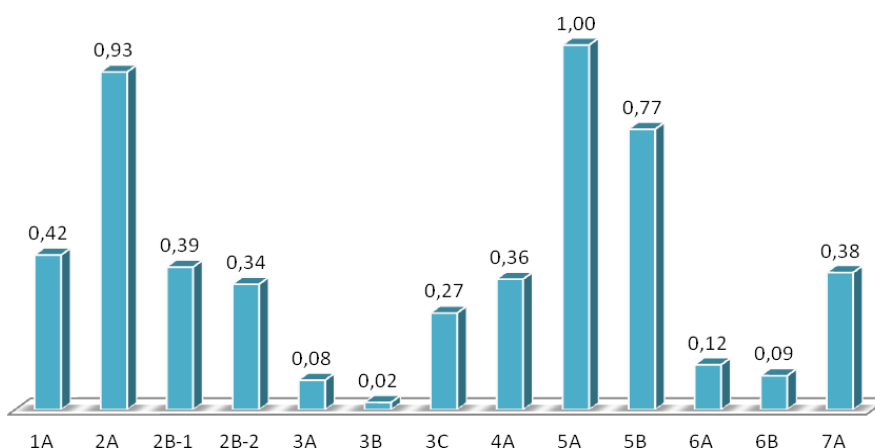


Gráfico 1. Rendimento dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

O rendimento variou de 0,02% para o espécime de *E. feijoi* (3B) a 1% para o espécime de *E. pseudopsidium* (Amostra 5B). Os espécimes coletados em períodos diversificados (seco e chuvoso) apresentaram rendimentos próximos tal como *E. ramosii* (Amostra 2B-1) coletado no período seco e (Amostra 2B-2) coletado no período chuvoso sendo 0,39% e 0,34% respectivamente.

5.2. Avaliação microbiológica dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Microrganismos causadores de doenças estão cada vez mais resistentes a maioria dos antibióticos conhecidos. O que tem incentivado a procura de antibióticos provenientes de produtos naturais (DUARTE, 2006).

Na Tabela 2. pág. 56 estão apresentados os resultados de atividade antibacteriana obtidos para os óleos essenciais das espécies de *Eugenia* spp. testadas frente aos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella*

pneumoniae ATCC 700603, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana de moderada a elevada, tanto para bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* e *E. faecalis*) quanto para Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *B. cepacia*).

Tabela 2. Classificação da atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais.

Amostras	Microrganismos					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. capacia</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
1A	++	++	-	-	-	-
2A	-	-	++	-	-	-
2B-1	+++	+++	++	+++	-	+++
2B-2	+++	++	++	+++	-	+++
3A	++	-	-	-	-	-
3C	-	-	-	-	-	-
5A	-	-	-	-	-	-
5B	-	-	-	-	-	-
6A	-	-	-	-	-	-
7A	++	+	+	+	-	+

Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;

Moderada (++) diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;

Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

Negativo (-): ausência de halo de inibição

As Amostras 2B-1 e 2B-2 (*E. ramosii*) apresentaram atividades antimicrobianas de moderada a alta para os microrganismos *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. capacia* e *E. coli*, exceto para *K. pneumoniae*. A literatura relata que a maioria dos óleos essenciais apresentam atividades antimicrobianas frente microrganismos Gram-positivos, no caso da amostra 2B além de possui atividade nestes indicadores também se mostrou ativo à bactérias Gram-negativas (microrganismos resistentes). Estudos revelam que a resistência das bactérias Gram-negativas pode ser explicada pela presença de uma série de

substâncias hidrofílicas presentes na membrana celular externa das bactérias Gram-negativas que funciona como barreira contra substâncias antibióticas de característica apolar (PALOMBO; SEMPLE, 2001), bem como a presença de enzimas capazes de destruir substâncias estranhas à bactéria (DUFFY; POWER, 2001).

O óleo essencial da amostra 1A (*E. magna*) mostrou atividade moderada para bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. pneumoniae*). As amostras 3A (*E. feijoi*) e 7A (*E. adenocalyx*) também apresentaram atividade moderada, porém apenas para *S. aureus*. Baixa atividade antibacteriana foi registrada para os óleos essenciais de *E. adenocalyx* frente aos microrganismos indicadores *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. capacia* e *E. coli*. As demais amostras não apresentam atividade microbiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas nas condições testadas.

Segundo (DEBA et al., 2008) hidrocarbonetos monoterpênicos não oxigenados e oxigenados são capazes de romper a parede celular, inibir a capacidade respiratória e dificultar o transporte iônico através da membrana celular de bactérias. Compostos sesquiterpênicos, como o β -cariofileno, bastante comum nos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*, são conhecidos por exercerem funções de defesa contra microrganismos invasores na planta (AL-BAYATI, 2008).

Estudos de atividades antimicrobianas com óleos essenciais de folhas de espécies *E. uniflora*, *E. chlorophylla*, *E. supraaxillaris* e *E. stigmatica* testadas em condições similares a este estudo, mostram atividade inibitória de crescimento bacteriano de moderada a elevada para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

(SILVA et al., 2012);(STEFANELLO et al., 2008); (LAGO et al., 2011); ABOUTABL et al., 2011; OKIDA et al., 2004).

Trajano e colaboradores em (2010) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *E. caryophyllata*, cujo efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias encontradas no queijo coalho foi observado (TRAJANO et al., 2010).

As espécies do gênero *Eugenia* têm despertado bastante interesse sobre seu potencial antimicrobiano. Por isso, vários pesquisadores vêm demonstrando os efeitos inibidores do crescimento sobre microrganismos, seja através de extratos ou de seus óleos essenciais.

5.3. Avaliação do potencial hemolítico dos óleos essenciais

O potencial hemolítico dos óleos essenciais analisados em eritrócitos de camundongos *Swiss* mostrou que nem todos os óleos essenciais testados causaram hemólise, quando testadas em concentração única (2 mg/mL).

O ensaio de hemólise tem como objetivo avaliar o potencial das substâncias-testes (óleos essenciais) em causar lesões na membrana plasmática da célula, tanto pela formação de poros quanto por ruptura total.

Os óleos essenciais das espécies *E. lisbonii*, *E. adenocalyx* e *E. pseudopsidium* quando submetidos a este ensaio são hemolíticos aos eritrócitos. Nas concentrações estudadas, na qual não foi observada hemólise, demonstra que os óleos possuem baixa toxicidade, propondo que os compostos presentes nos óleos não apresentam atividade hemolítica e não causam danos às membranas. A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador

de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade (YAMAGUCHI; VEIGA-JUNIOR, 2013).

Os valores de Concentração Efetiva (CE_{50}) são apresentados na Tabela 03, variam de 98,42 a 389,2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3. Resultado de ensaio hemolítico dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Espécies	Código	Hemólise CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. magna</i>	1A	-
<i>E. ramosii</i>	2A	-
<i>E. ramosii</i>	2B-1	-
<i>E. ramosii</i>	2B-2	-
<i>E. feijoi</i>	3A	-
<i>E. feijoi</i>	3C	-
<i>E. lisbonii</i>	4A	160 (132,5-193,1)
<i>E. pseudopsidium</i>	5A	159,8 (138-184,9)
<i>E. pseudopsidium</i>	5B	98,42 9 (84,1-115,2)
<i>E. marleneae</i>	6A	-
<i>E. adenocalyx</i>	7A	138,5 (98,59-194,6)

Nas concentrações estudadas, na qual não foi observada hemólise, demonstra que os óleos testados possuem baixa toxicidade, sugerindo que os compostos presentes nos óleos não apresentam atividade hemolítica e não causam danos às membranas. A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade (YAMAGUCHI; VEIGA-JUNIOR, 2013).

As amostras que causaram hemólise nas culturas de células forneceram uma importante informação para estudo da citotoxicidade de compostos com atividade terapêutica, definindo o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo material constituinte. Assim, resultados positivos no ensaio de citotoxicidade

descaracterizam a condição de inocuidade, sendo possível causar danos ao tecido testado (YAMAGUCHI; VEIGA-JUNIOR, 2013).

5.4. Avaliação citotóxica dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Das onze amostras testadas em concentração única, seis destas apresentaram atividade citotóxica relevante, seus respectivos percentuais de inibição de crescimento das linhagens tumorais estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores da viabilidade celular em porcentagem obtida em concentração única (50 µg/ mL).

Amostras	Viabilidade celular (%)						
	MRC5	MCF7	HCT116	SKMELL19	ACP02	NIHOVCAR	ES2
DMSO	100	100	100	100	100	100	100
Doxorrubicina	10,19	21,42	10,45	16,66	39,50	9,61	12,79
1A	5,01	7,02	4,36	31,13	69,21	51,56	5,67
2A	5,28	6,97	4,71	17,19	46,37	36,63	4,82
2B-1	4,83	6,88	4,21	10,06	48,01	28,52	4,71
2B-2	6,04	6,87	4,21	20,50	71,31	22,95	4,91
3A	73,07	64,19	62,65	84,09	106,46	88,91	30,92
3C	50,27	7,57	11,27	32,39	68,78	49,90	13,91
4A	17,80	23,41	15,85	8,54	10,29	18,01	4,71
5A	74,84	68,74	72,15	71,55	86,60	100	96,71
5B	66,07	42,41	44,42	43,40	67,12	100	95,46
6A	71,01	79,28	69,87	64,54	94,78	100	97,37
7A	48,04	35,60	28,31	27,97	81,35	100	86,99

HCT116: célula tumoral de cólon humano; SKMELL19: melanoma humano; MCF-7: mama humano; ES-2: ovário humano; ACP02: adenocarcinoma gástrico e MRC-5: fibroblasto humano.

De acordo com a metodologia utilizada, as amostras que apresentaram viabilidade celular menor ou igual 10% foram levadas para o ensaio em curva usando ate sete diluições sucessivas a partir de 50 µg/mL.

As Amostras 1A (*E. magna*) 2A, 2B-1 e 2B-2 (*E. ramosii*) apresentaram viabilidade celular entre 4,83 a 6,04% frente a linhagem normal de fibroblasto humano (MRC5). Para as linhagens tumorais testadas de mama humano (MCF-7), cólon humano (HCT116), ovário humano (ES-2), melanoma humano (SKMELL19) e adenocarcinoma gástrico (ACP02) as Amostras 1A, 2A, 2B-1, 2B-2, 3B e 4A apresentaram viabilidade celular com valores entre 4,21 a 10,2%. As amostras que apresentaram CI maior que 50 µg/ mL não inibiram o crescimento celular nas concentrações testadas. Na Tabela 5. p 62 está descrita a Concentração Inibitória obtida após a triagem realizada nas amostras considerando os valores menores que 50 µg/ mL .

Tabela 5. Efeito na viabilidade celular de linhagens tumorais (MCF7, HCT116, SKMELL19, ACP02, ES2) e não tumoral (MRC-5) utilizando Alamar blue em 72h de tratamento.

Espécies	Amostras	Linhagens de células					
		MRC5	MCF7	HCT116	SKMELL19	ACP02	ES2
<i>E. magna</i>	1 A	36,21(29,97-43,75)	19,23 (11,19-33,04)	30,42 (24,69-37,49)	> 50	>50	7,64 (6,15 –9,48)
<i>E. ramosii</i>	2 A	> 50	35,90 (28,13 -45,81)	23,63 (16,30- 34,24)	> 50	> 50	9,58 (7,57-12,13)
<i>E. ramosii</i>	2 B-1	37,03 (29,3-46,68)	20,81 (12,92 -33,50)	28,93 (23,97- 34,93)	> 50	> 50	7,78 (6,31 –9,60)
<i>E. ramosii</i>	2 B-2	38,38 (32,64-45,14)	32,58 (23,99 - 44,25)	32,63 (29,22- 36,43)	34,01 (31,98-36,16)	> 50	10,44 (8,60 – 12,66)
<i>E. feijoi</i>	3 C	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10,79 (8,11 – 14,36)
<i>E. lisbonii</i>	4 A-2013	> 50	> 50	> 50	30,16(27,20- 33,44)	> 50	> 50

Cólon humano (HCT116), melanoma humano (SKMELL19), mama humano (MCF-7), ovário humano (ES-2), adenocarcinoma gástrico (ACP02) e fibroblasto humano (MRC-5). Os valores estão representados com CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

Estudos realizados com óleos essenciais de *Eugenia* spp. têm evidenciado o potencial que estes apresentam frente a linhagens tumorais humana. Os óleos essenciais de *E. zuchowskiae* testados em linhagens de células tumorais humana mostrou pronunciada atividade citotóxica *in vitro* contra MCF-7, MDA-MB-468, e UACC-257 comparáveis com a doxorubicina (LC₅₀ 14-70 µg/ml) (COLE et al., 2007). Os constituintes voláteis dos óleos essenciais, α-pineno, α-copaeno, E-cariofileno e α-humuleno quando testados separadamente em concentração de 100 µg/mL mostraram citotoxicidade *in vitro* comparável ao agente anticâncer doxorubicina (COLE et al., 2007).

Os sesquiterpenos β-elemeno e γ-elemeno presentes nos óleos essenciais de *Eugenia* spp. estudadas nesta dissertação são potentes agentes antitumorais. Estes apresentam efeito inibidor seletivo sobre as células endoteliais vasculares cerebrais e tem apresentado excelentes resultados como agente antitumoral para o tratamento de tumores cerebrais suprimindo o crescimento de metástases cerebrais. Os mesmos induzem apoptoses, limita a diferenciação celular e inibe de metástase neoplásica provando serem bons candidatos a quimioterápicos para o tratamento de neoplasias no pulmão, cólon, estômago, cérebro e etc (BARRERO et al., 2011; SUN et al., 2009).

Estudos realizados com a composição volátil de *Eugenia caryophyllata* mostraram efeitos citotóxicos significativos contra todas as linhagens de células de câncer estudados, a julgar pelo CI₅₀ e seus intervalos de valores 15,75 - 200 µg/mL (KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010).

Comparando os resultados obtidos nesta dissertação com os resultados obtidos dos estudos com *E. caryophyllata* foi possível usar uma quantidade menor de amostra (a partir 50 µg/mL) e os intervalos de confiança de 95%

entre 7,64 a 38,38 revelaram citotoxicidade significativa frente as linhagens celulares estudadas.

5.5. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de folhas *Eugenia* spp.

Nos treze óleos estudados foram caracterizados 133 constituintes químicos, sendo 26 monoterpenos e 107 sesquiterpenos. A predominância foi de compostos oxigenados tanto mono- quanto sesquiterpenos na maioria das amostras. A seguir a química dos voláteis das folhas das espécies em destaque neste estudo será descrita, bem como a proposta de biossíntese dos principais componentes identificados nos óleos essenciais.

5.5.1. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *Eugenia magna*.

A amostra 1A (*E. magna*) apresentou uma composição química rica em compostos sesquiterpênicos; no total foram caracterizados 88,68%. Observa-se a equivalência de compostos sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados, sendo 48,79% e 48,45% respectivamente. Na Tabela 6. p. 65 estão listados os constituintes presentes no óleo essencial de *E. magna* em ordem crescente de seus índices de retenção.

Tabela 6. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia magna* (Amostra 1A)

Constituintes	1A	IR exp	IRe (Adams,2007)
1 α -cubebeno	5,17	1349	1348
2 α -copaeno	8,20	1376	1374
3 β -elemeno	22,43	1389	1389
4 <i>E</i> -cariofileno	1,80	1419	1417
5 α -humuleno	0,76	1453	1452
6 allo-aromadendreno	0,28	1460	1458
7 gemacreno D	0,55	1475	1480
8 β -selineno	1,04	1485	1489
9 <i>E</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1,31	1493	1493
10 α -muurolo	0,44	1499	1500
11 β -bisaboleno	0,42	1507	1505
12 γ -cadineno	1,80	1514	1513
13 <i>E</i> -calameneno	4,59	1521	1521
14 espatulenol	1,08	1576	1577
15 óxido de cariofileno	27,66	1582	1582
16 gleenol	0,24	1586	1586
17 viridiflorol	2,59	1601	1592
18 epóxido de humuleno II	4,18	1607	1608
19 1-epi-cubenol	1,63	1626	1627
20 α -muurolol	1,44	1640	1644
21 <i>E</i> -calamen-10-ol	0,72	1668	1660
22 mustacona	0,35	1669	1677
Total Identificado	88,68		
Total de monoterpenos	0,00		
Total de sesquiterpenos	88,68		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	47,48		
Sesquiterpenos oxigenados	41,20		

IRexp= Índice de retenção experimental, **IRlit** = Índice de Retenção descrito na Literatura (ADAMS, 2007).

Os componentes majoritários do óleo essencial de *E. magna* (Amostra 1A) foram o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno (27,66%) seguido do

sesquiterpeno não oxigenado β -elemeno (22,43%). Considerando um valor de área maior que 1%, registram-se os constituintes β -selineno (1,04%), espatulenol (1,08%), epi-cubebol (1,31%), α -muurolol (1,44%), 1-epi-cubenol (1,63%), γ -cadineno (1,80%), viridiflorol (2,59%), epóxido de humuleno II (4,18%), E-calameneno (4,59%), α -cubebeno (5,17%), α -copaeno (8,20%). Na Figura 15 pode ser visualizado o cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial da Amostra A1.

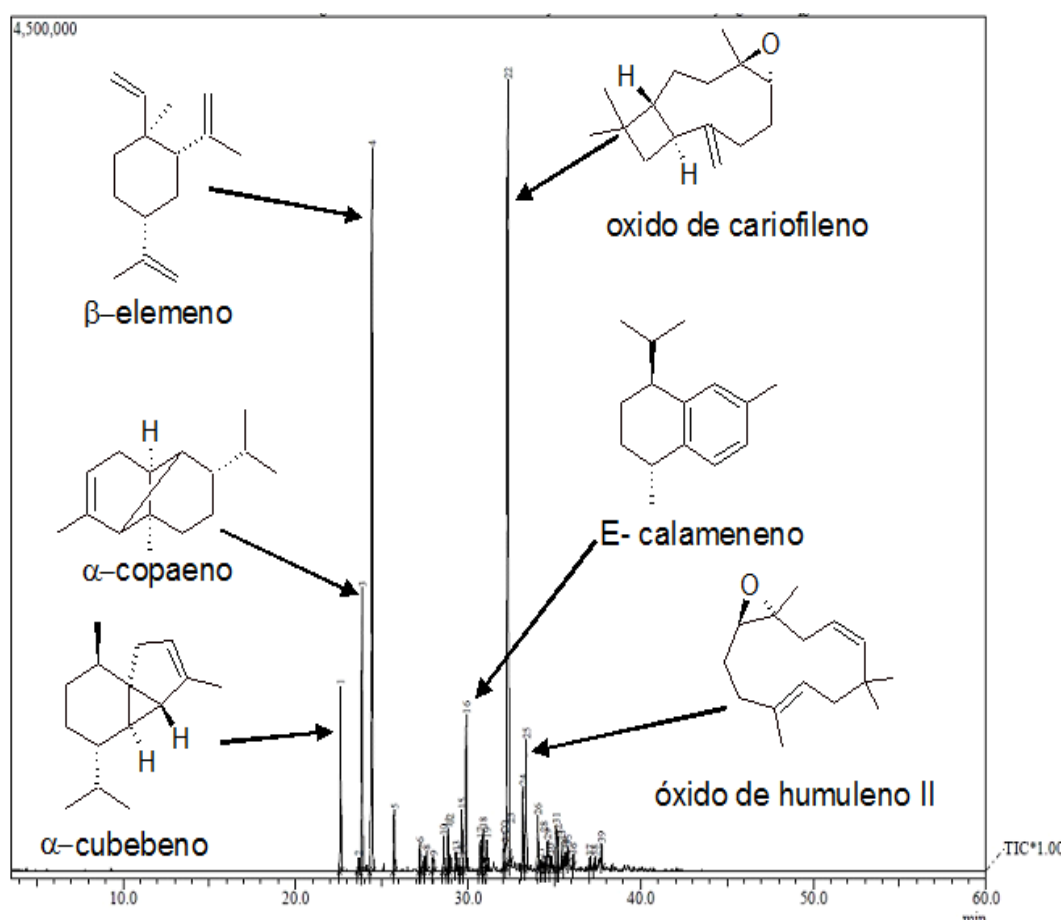


Figura 15. Cromatograma de íons totais obtidos para os óleos essenciais das folhas de *Eugenia magna* (Amostra 1A).

Foi proposta uma rota biossintética para os sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais de *E. magna*.

O difosfato de nerolidil (NPP), um intermediário do precursor dos sesquiterpenos (FPP), dá origem ao cátion bisabolil por meio da clivagem

eletrofílica entre C₆-C₁; o β-bisaboleno é formado a partir da desprotonação desse cátion em C₁₄. A formação do γ-cadineno ocorre a partir da ciclização C₁-C₁₀, seguido do fechamento do anel em C₁-C₆ (DEWICK, 2002).

A formação do espatulenol (1,08%) pode ser sugerida a partir da ciclização em C₁-C₁₀, C₁-C₁₁ e C₆-C₂, precedido de hidratação em C₁₄. A oxidação do *E*-cariofileno origina o óxido de cariofileno, componente majoritário dos óleo essencial desta espécie (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009); STEELE; CROCK; CROTEAU, 1998; DEWICK, 2002; BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009).

A partir do cátion cadinílico, por meio de uma ligação entre C₂-C₇, forma-se um intermediário tricíclico que, desprotonado, leva a formação do constituinte α-copaeno (STEELE et al., 1998). Através da migração de hidreto 1,2 do carbocátion cadinílico e ciclização entre C₂-C₆ origina-se outro intermediário tricíclico capaz de formar, por desprotonação do C₁₅, o α-cubebeno (LITTLE; CROTEAU, 2010). O sesquiterpeno aromático *E*-calameneno também é formado a partir do esqueleto cadinano (NAKASHIMA et al., 2002; (LIMNA MOL et al., 2011).

5.5.2. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de dois indivíduos de *Eugenia ramosii*.

A partir dos óleos essenciais de espécimes *E. ramosii* (Amostras 2A, 2B1e 2B2) identificou-se 42 constituintes voláteis (Tabela 7, p. 68) sendo a maioria sesquiterpenos totalizando 84,66%, 88,86% e 91,62%, respectivamente

Tabela 7. Composição química dos óleos essenciais das folhas das Amostras 2A, 2B-1 e 2B-2 (*Eugenia ramosii*).

	Constituintes	2A	2B-1	2B-2	IRexp.	IRlit.
1	butan-2-ona	0,09	-	-	-	-
2	α -pineno	0,35	0,07	-	934	932
3	δ -elemeno	0,22	-	-	1338	1335
4	α -cubebeno	3,47	9,76	9,46	1371	1348
5	α -copaeno	9,86	12,38	12,62	1377	1374
6	β -bouborneno	0,3	-	-	1386	1387
7	β -cubebeno	-	2,63	2,69	1391	1387
8	β -elemeno	4,66	-	-	1393	1389
9	<i>E</i> -cariofileno	10,33	12,64	9,76	1421	1417
10	β -copaeno	1,81	0,43	0,38	1430	1430
11	aromadrendeno	0,84	0,31	0,18	1440	1439
12	α -humuleno	1,93	2,57	2,12	1455	1452
13	allo-aromadrendeno	0,69	0,8	0,85	1462	1458
14	γ -muuroleno	1,82	0,98	-	1477	1478
15	germacreno D	-	0,08	0,83	1482	1484
16	α -amorfenos	0,39	-	-	1481	1483
17	β -selineno	0,34	-	-	1487	1489
18	epi-cubebol	-	0,89	0,91	1495	1493
19	γ -amorfenos	-	-	1,03	1501	1495
20	Valenceno	0,42	-	-	1496	1496
21	α -muuroleno	1,67	1,1	-	1501	1500
22	Cubebol	-	0,98	-	1516	1514
23	γ -cadineno	1,3	-	-	1515	1513

Continuação Tabela 7. Composição química dos óleos essenciais das folhas das Amostras 2A, 2B-1 e 2B-2 *Eugenia ramosii*.

	constituintes	2A	2B-1	2B-2	IRexp.	IRlit.
24	E-calameneno	1,42	6,07	6,4	1524	1528
25	α -cadineno	0,7	0,08	-	1536	1537
26	germacreno B	1,25	-	-	1553	1559
27	β -calacoreno	0,47	0,35	-	1558	1564
28	Palustrol	0,39	-	-	1563	1567
29	Espatuleno	6,62	3,29	2,9	1579	1577
30	óxido cariofileno	25,64	22,82	28,27	1584	1582
31	Globulol	1,53	-	-	1588	1590
32	Viridiflorol	0,47	1,16	0,8	1594	1593
33	Kusimona	0,05	-	-	1600	1604
34	Ledol	-	1,85	2,1	1604	1602
35	óxido de humuleno II	-	2,31	2,75	1610	1608
36	1-epi-cubenol	-	1,7	1,86	1629	1627
37	epi- α muurolol	1,94	-	-	1641	1640
38	α -cadinol	2,56	0,94	2,3	1655	1652
39	Cubenol	-	1,32	2,25	1643	1645
40	<i>E</i> -calamen-10-ol	0,46	0,75	0,67	1668	1660
41	Mustacona	1,11	0,54	0,49	1678	1676
42	10-nor -calamenen-10-ona	-	0,13	-	1701	1702
	Total Identificados	85,1	88,86	91,62		
	Total de monoterpenos	0,44	0,07	-		
	Monoterpenos Hidrocarbonetos	0,35	0,07	-		
	Monoterpenos oxigenados	0,09	-	-		
	Total de sesquiterpenos	84,3	89,44	91,62		
	Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	43,89	51,18	46,32		
	Sesquiterpenos oxigenados	40,41	37,68	45,3		

IRexp.= Índice de Retenção experimental, **IRlit.**= Índice de Retenção da Literatura (Adams, 2007).

O componente majoritário comum a todas as amostras de *E. ramosii* (Amostras 2A, 2B-1e 2B-2) foi o sesquiterpeno óxido de cariofileno (25,64%, 22,82% e 28,27% respectivamente). No óleo da Amostra 2A, a predominância foi de compostos terpênicos tanto oxigenados (40,77%) quanto não oxigenados (43,89 %). Os componentes que diferem a Amostra 2A da Amostra 2B são os terpenos δ -elemeno (0,22%), β -bouborneno (0,30%), β -elemeno (4,66%), α -amorfenno (0,39%), β -selineno (0,34%), valenceno (0,42%), γ -cadineno (0,70%), germacreno B (1,25%), globulol (1,53 %) e epi- α -muurolol (1,94%).

A porcentagem de mono- e sesquiterpenos das amostras analisadas está plotada no Gráfico 2.

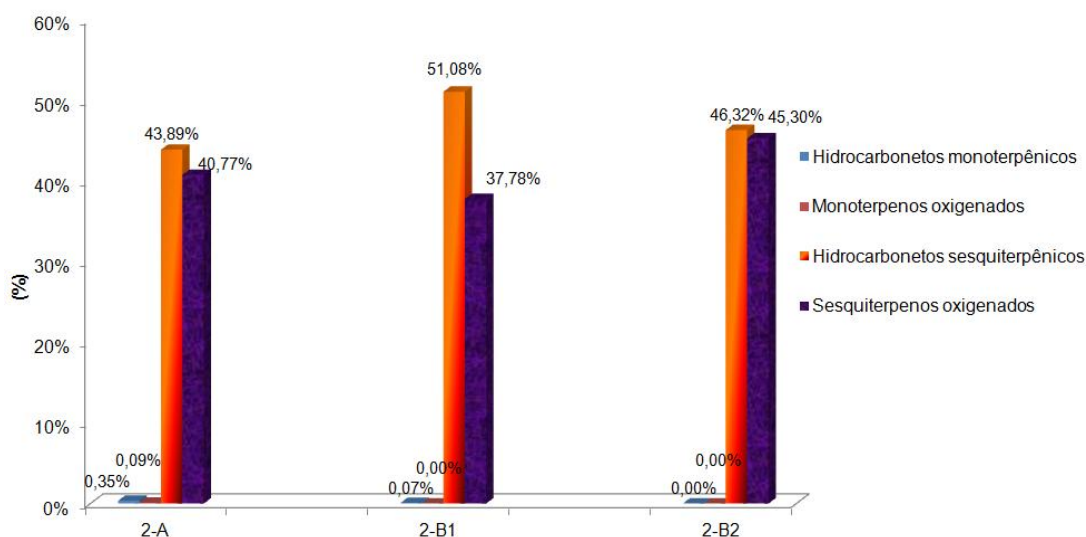


Gráfico 2. Porcentagens de mono- e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia ramosii*.

Baseado em dados da literatura propõem-se uma rota biossintética para os constituintes do óleo essencial de *E. ramosii*.

A partir da ionização do FPP forma um cátion intermediário, no qual em cicliza C₁-C₁₁ formando anel de 11 membros (esqueleto humulano) do qual através de migrações, ciclizações e oxidação forma-se os sesquiterpenos α -

humuleno, *E*-cariofileno e óxido de cariofileno respectivamente. A partir do cátion germacredienílico através de rearranjos forma-se o β -elemeno, do mesmo cátion através de isomerização forma-se o cátion cadinílico o qual é precursor dos sesquiterpenos α - β -copaeno e α -cadinol.

A amostra 2B coletada em período seco (2B-1) e chuvoso (2B-2) apresentaram composição química bastante similar. Os componentes majoritários permaneceram os mesmos nas duas épocas coletadas, variando apenas o teor. O óleo essencial da Amostra 2B-1 coletado no período de seco apresentou predominância de sesquiterpenos não oxigenados (51,18%) enquanto que a Amostra 2B-2 coletado em período chuvoso apresentou predominância de sesquiterpenos oxigenados (46,32%). Alguns componentes químicos não foram observados nas duas épocas, como o monoterpeneo α pineno e os sesquiterpenos α -muuroleno, cubebol, α -cadineno e β -calacoreno observados apenas no período seco.

O perfil cromatográfico de ambas as amostras nas épocas estudadas foram similares, como mostrado nas Figura 16 e 17.

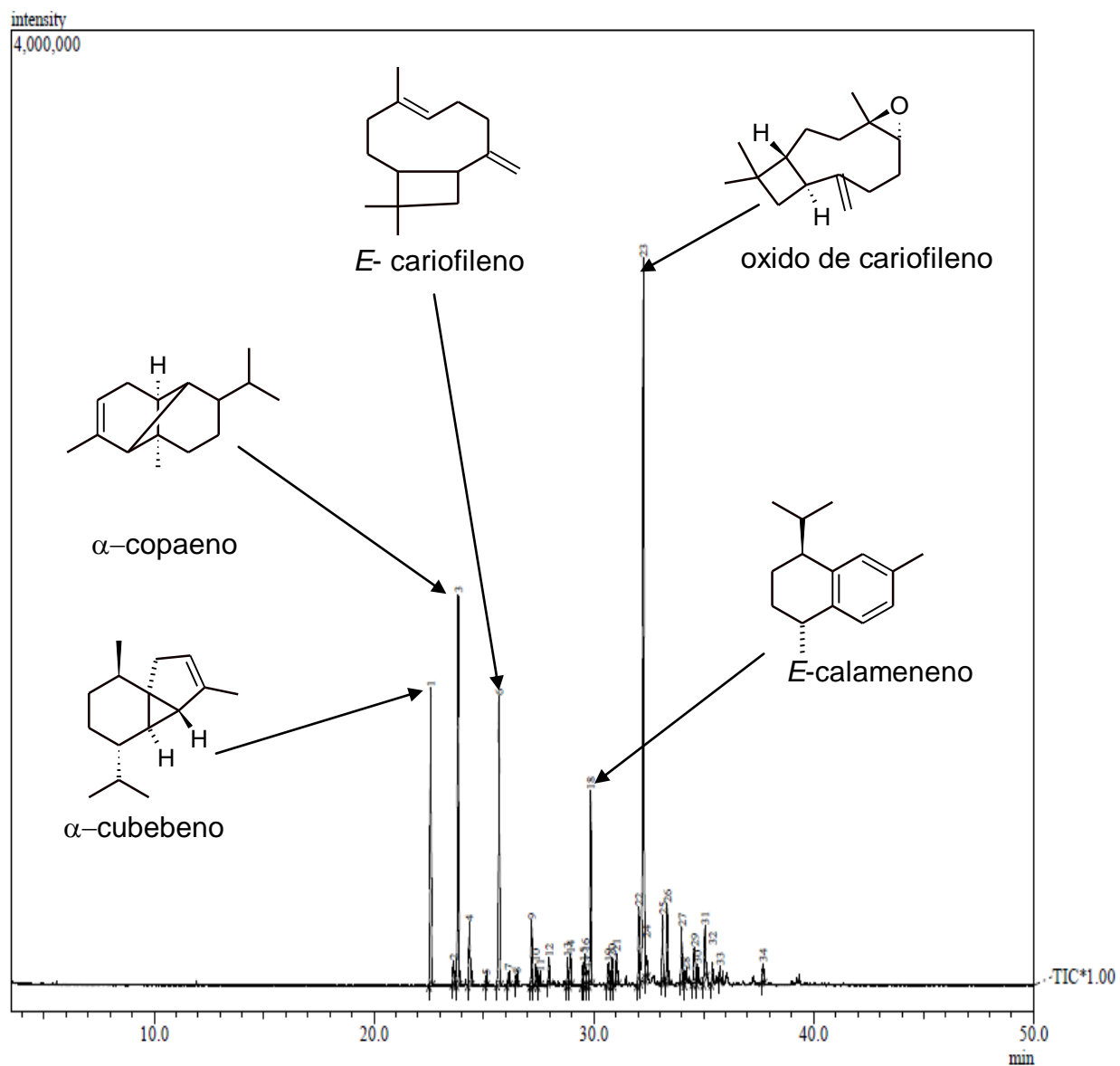


Figura 16. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia ramosii* (Amostra 2B-1) coletada em período seco.

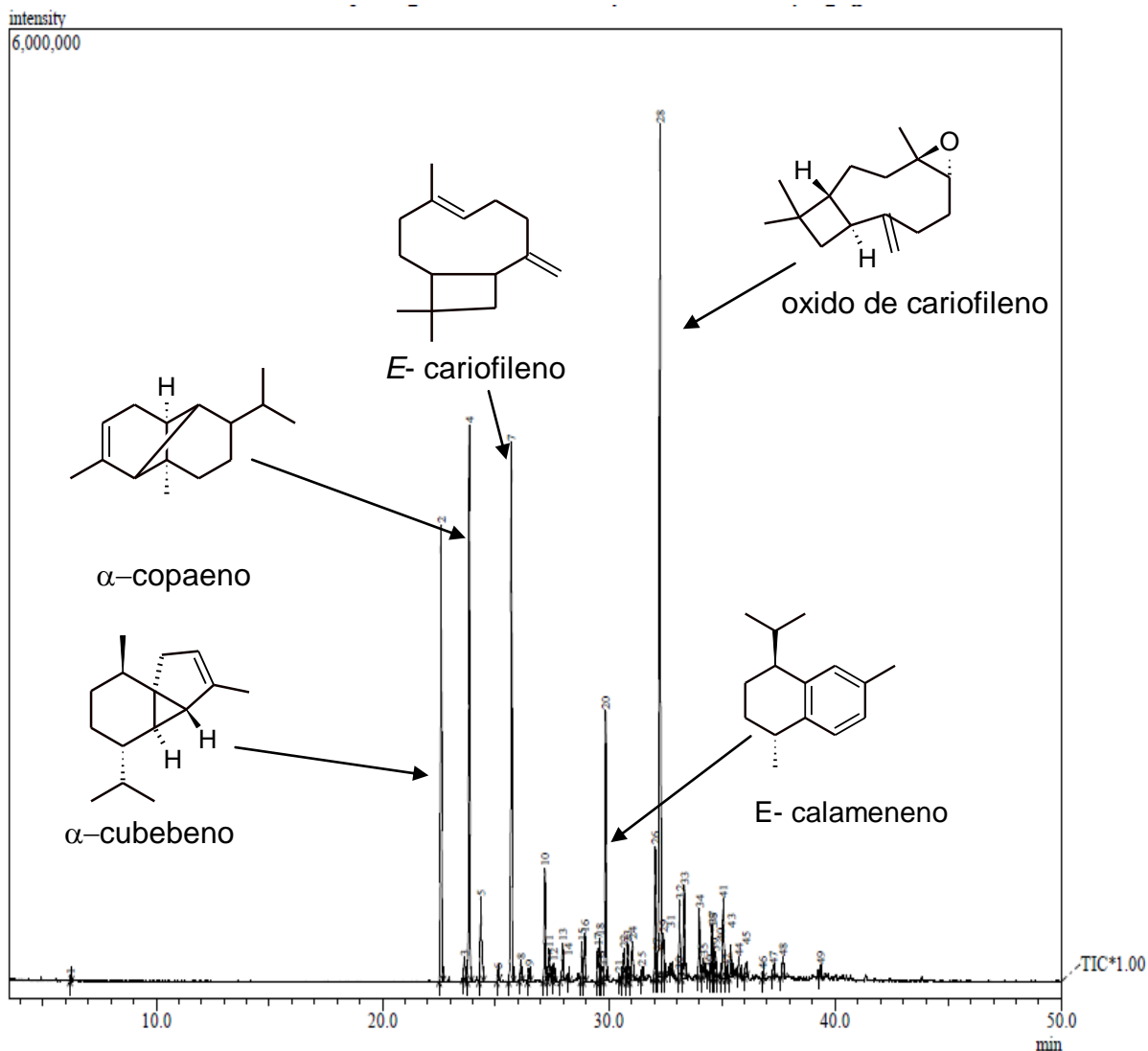


Figura 17. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia ramosii* (Amostra 2B-2) coletada em período chuvoso.

5.5.3. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de três indivíduos de *Eugenia feijoi*.

A porcentagem de identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *E. feijoi* foi 92,67%;82,58% e 93,67% para as amostras codificadas como 3A, 3B e 3C, respectivamente, (Tabela 8).

Tabela 8. Constituintes químicos (%) identificado nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia feijoi* (Amostras 3A, 3B e 3C).

	Constituintes	3A	3B	3C	IRexp.	IR lit.
1	α -pineno	1,12	-	7,00	933	932
2	β -pineno	1,96	-	7,33	977	974
3	limoneno	0,30	-	0,97	1027	1024
4	linalol	0,43	1,32	-	1098	1095
5	<i>E</i> -pinocarveol	0,70	-	0,69	1137	1135
6	pinocarvona	0,34	-	-	1660	1160
7	salicilato de metila	0,23	0,23	-	1186	1190
8	mirtenal	0,74	-	-	1193	1195
9	δ -elemeno	-	0,86	-	1337	1335
10	α -copaeno	-	-	1,17	1375	1374
11	β -elemeno	54,09	0,58	50,12	1391	1389
12	aromadrendreno	-	2,04	-	1438	1439
13	allo-aromadrendreno	-	0,43	-	1460	1458
14	<i>E</i> -cariofileno	-	0,41	-	1418	1417
15	β -chamigreno	0,36	-	-	1474	1476
16	germacreno D	-	0,27	-	1482	1484
17	β -selineno	4,78	-	5,37	1485	1489
18	δ -selineno	-	-	1,35	1494	1492
19	α -muuroleno	-	0,30	-	1499	1500
20	γ -cadineno	-	0,31	-	1513	1513
21	β -bisaboleno	0,96	-	1,08	1507	1505
22	<i>E</i> -dauca-4(11),7-dieno	-	0,31	-	1547	1556
23	<i>E</i> -nerolidol	0,93	-	-	1563	1561
24	palustrol	-	2,77	-	1566	1567

Continuação Tabela 8: Constituintes químicos (%) identificado nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia feijoi* (Amostras 3A, 3B e 3C).

	Constituintes	3A	3B	3C	IRexp.	IR lit.
25	espatulenol	2,69	12,95	0,88	1575	1577
26	óxido de cariofileno	7,53	25,40	6,72	1581	1582
27	viridiflorol	1,74	16,17	-	1592	1592
28	cubeban-11-ol	-	2,93	-	1661	1595
29	ledol	-	8,26	-	1592	1602
30	epóxido de humuleno II	3,16	1,76	2,75	1607	1608
31	10-epi- γ -eudesmol	1,66	-	-	1626	1622
32	epi- α -cadinol	0,59	1,07	-	1635	1638
33	epi- α -muurulol	-	-	0,36	1640	1640
34	pogostol	7,97	-	7,88	1652	1651
35	α -cadinol	-	4,03	-	1644	1652
36	14-hidroxi- α -humuleno	0,39	-	-	1714	1713
37	β -costol	-	0,18	-	1762	1766
	Total Identificados	92,67	82,58	93,67		
	Total de monoterpenos	5,82	1,55	15,99		
	Monoterpenos hidrocarbonetos	3,38	0	15,3		
	Monoterpenos oxigenados	2,44	1,55	0,69		
	Total de sesquiterpenos	86,85	81,03	77,68		
	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	60,19	5,51	59,09		
	Sesquiterpenos oxigenados	26,66	75,52	18,59		

IRexp.= Índice de Retenção experimental, **IRlit.**= Índice de Retenção da Literatura (ADAMS, 2007)

Os óleos essenciais das Amostras 3A e 3C mostraram-se similares, tendo como componente majoritário o β -elemeno (54,09% e 50,12% respectivamente). A predominância de compostos sesquiterpênicos hidrocarbonetos foi comum para ambas as amostras, sendo 60,19% na Amostra 3A e 59,09% na Amostra 3C.

A porcentagem dos compostos mono-e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais das folhas de *E. feijoi* esta representada no Gráfico 03.

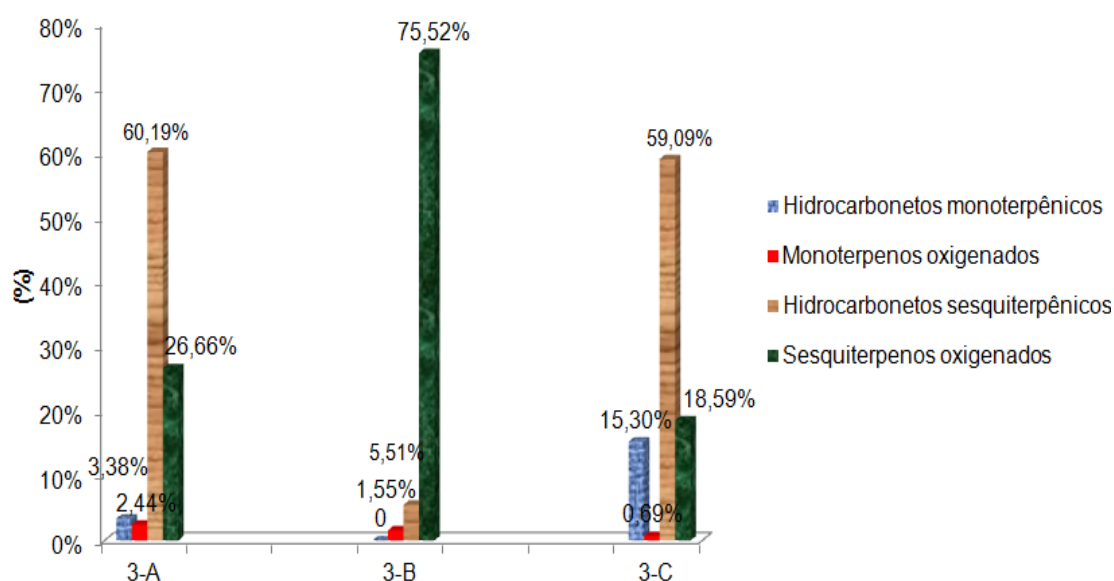


Gráfico 3. Porcentagem de mono- e sesquiterpenos dos óleos essenciais de *Eugenia feijoi* (Amostras 3A, 3B e 3C)

A Amostra 3B apresentou predominância de compostos sesquiterpenos oxigenados (75,72%) sendo o componente majoritário o óxido de cariofileno (25,4%), seguido de viridiflorol (16,17%) e espatulenol (12,95%). Essa diferença no teor dos componentes majoritários nos espécimes estudados pode esta relacionada a fatores que alteraram o conteúdo dos metabólitos secundários, tais como desenvolvimento, radiação ultravioleta, nutrientes, indução por estímulos mecânicos ou ataques de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Embora a Amostra 3B tenha sido coletada no mesmo local de coleta das Amostras 3A e 3C esta se encontrava em condições extremas, folhas se renovando,

protegido da luz solar e paralelo ao chão (Figura 18). Supõem-se que este seja um dos motivos para a variação da química do mesmo (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



Figura 18. Condições em que foi encontrado o espécime de *Eugenia feijoi* (3B)

Fonte: Azevedo, S.G. (2012)

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais das Amostras estudadas estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

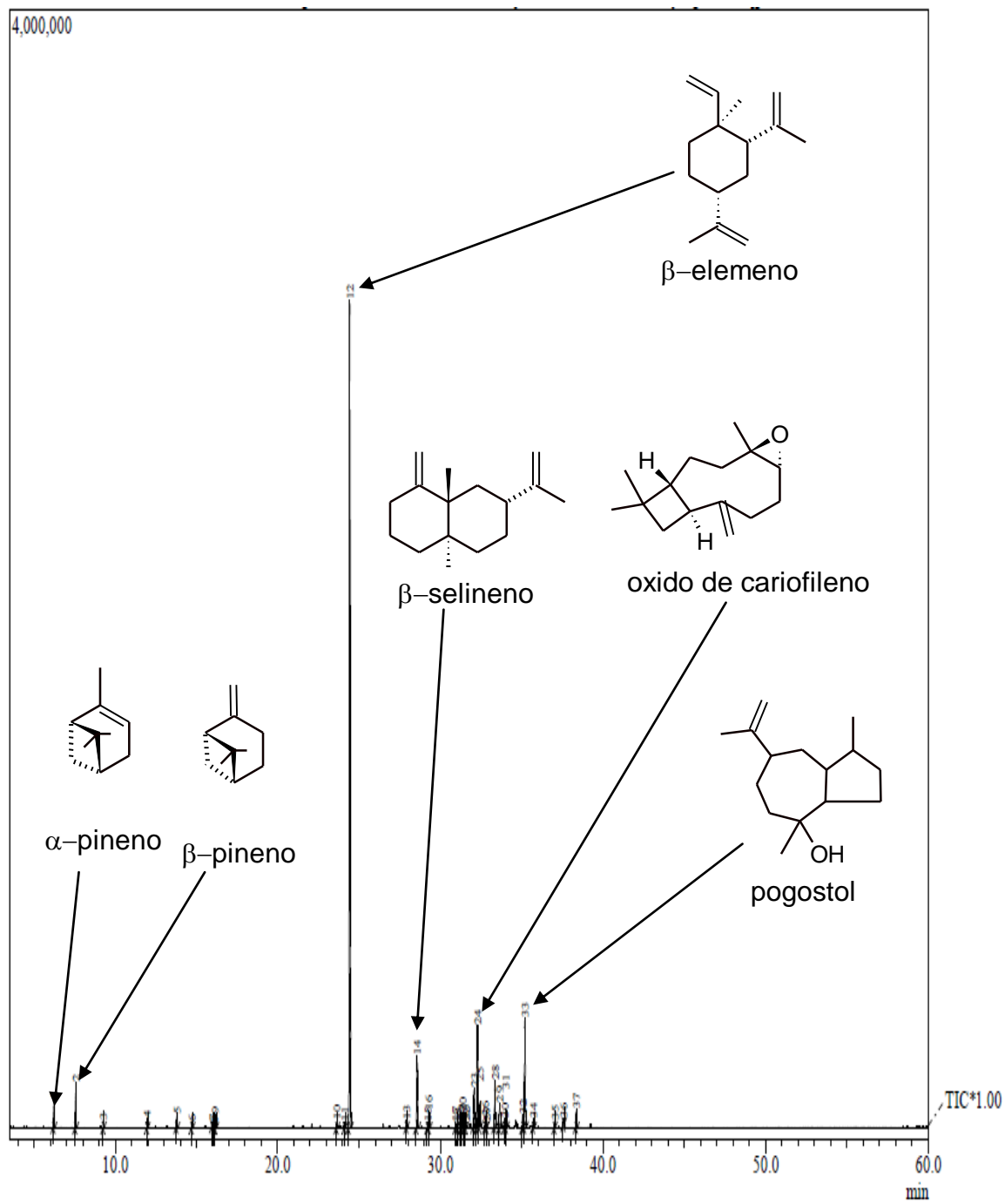


Figura 19. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia feijoi* (Amostra 3A).

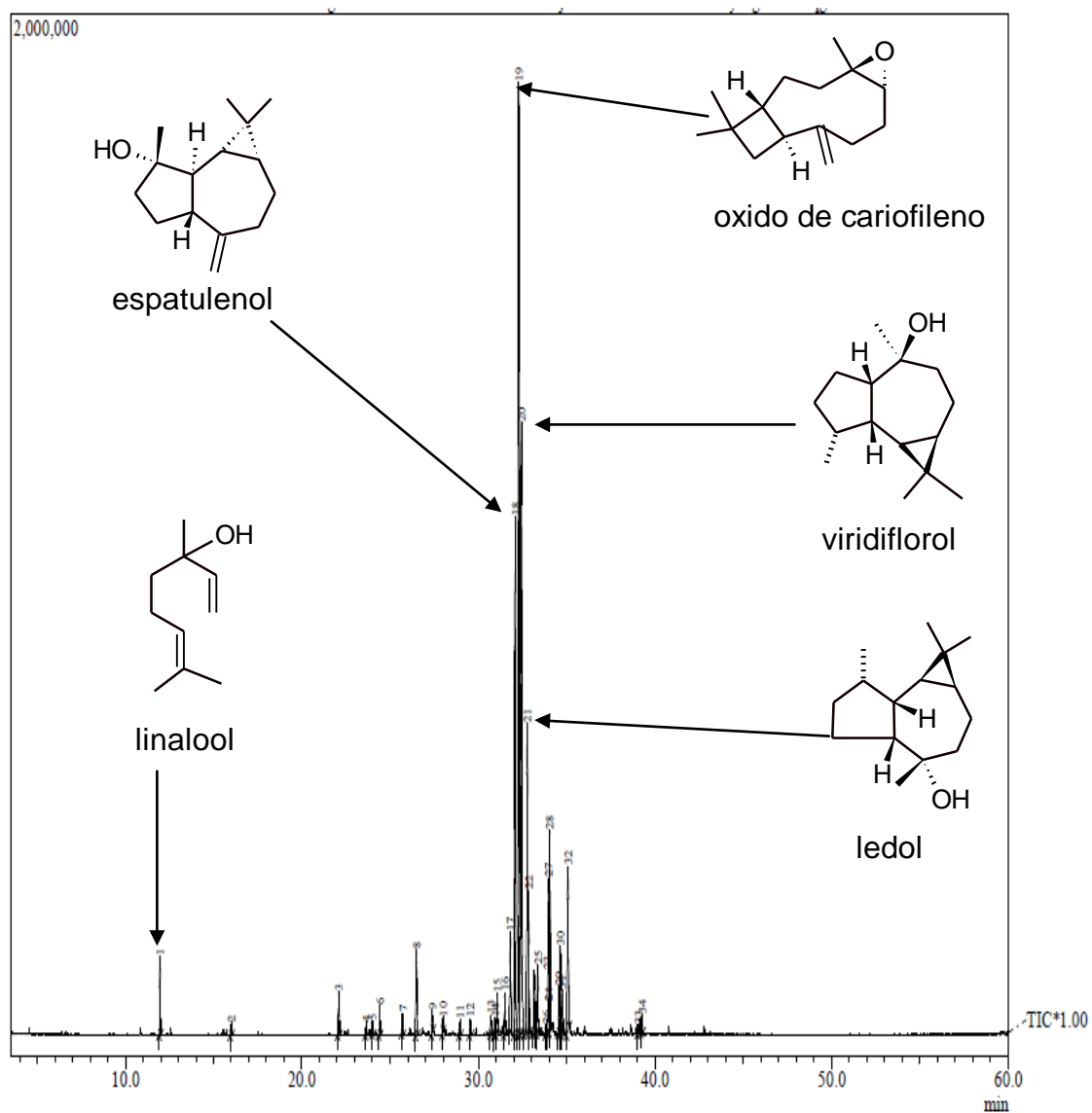


Figura 20. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia feijoi* (Amostra 3B)

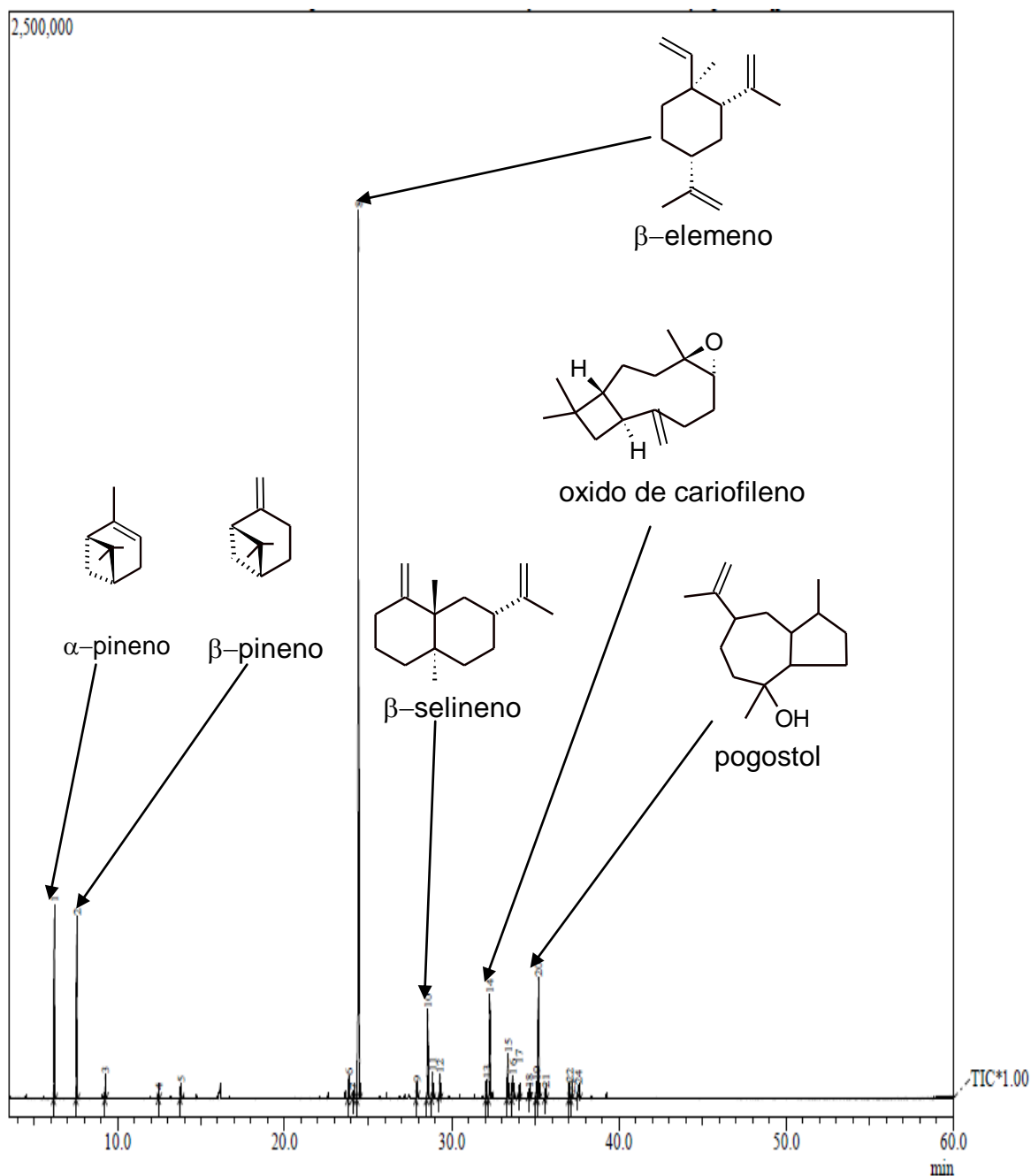


Figura 21. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia feijoi* (Amostra 3C).

Os picos 1 e 2 dos cromatogramas das amostras 3A e 3C (Figura 19. p. 78, Figura 21 p. 80) são referentes aos monoterpenos α- e β-pineno, respectivamente, de fórmula molecular (C₁₀H₁₆) e massa molecular de 136 daltons (ADAMS, 2007). O índice de similaridade dos espectros de massas obtido a partir da fragmentação dos picos, em comparação com a literatura foi 92 e 95% respectivamente. Os espectros de massas dos picos 1 e 2 são apresentados nas Figuras 22 e 23.

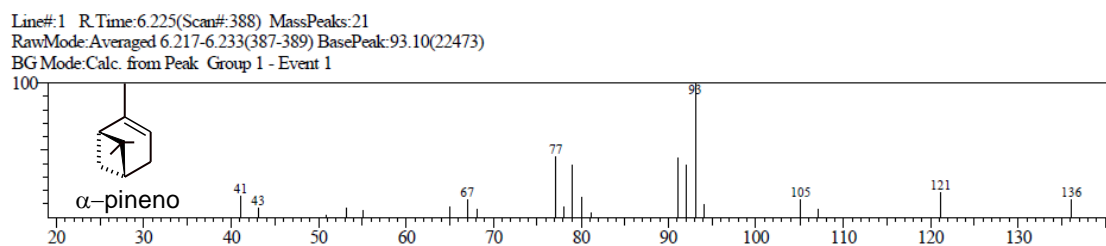


Figura 22. Espectro de massas referente ao pico 1 do cromatograma do espécime de *Eugenia feijoi* (Amostra 3A)

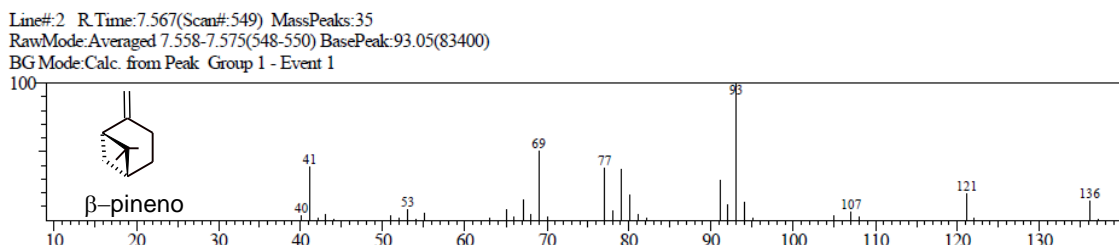
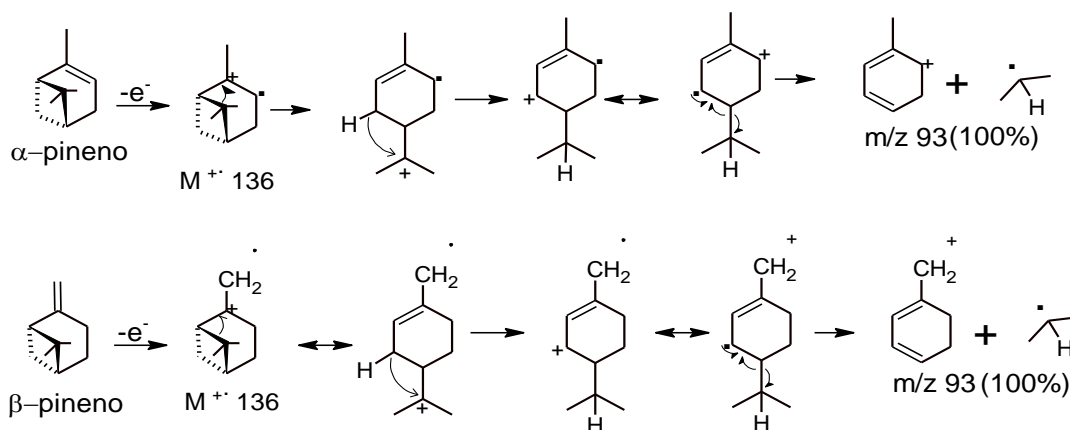


Figura 23. Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma do espécime de *Eugenia feijoi* (Amostra 3C)

Os espectros de massas dos constituintes apresentam fragmentações muito semelhantes. Os mesmos apresentam o pico base com m/z 93, provavelmente referente à perda de um fragmento neutro m/z 43. Provavelmente ocorra uma cisão hemolítica na ligação C-C do isopropil e do anel conforme apresentado no Esquema 7 (KELLER, 2011).

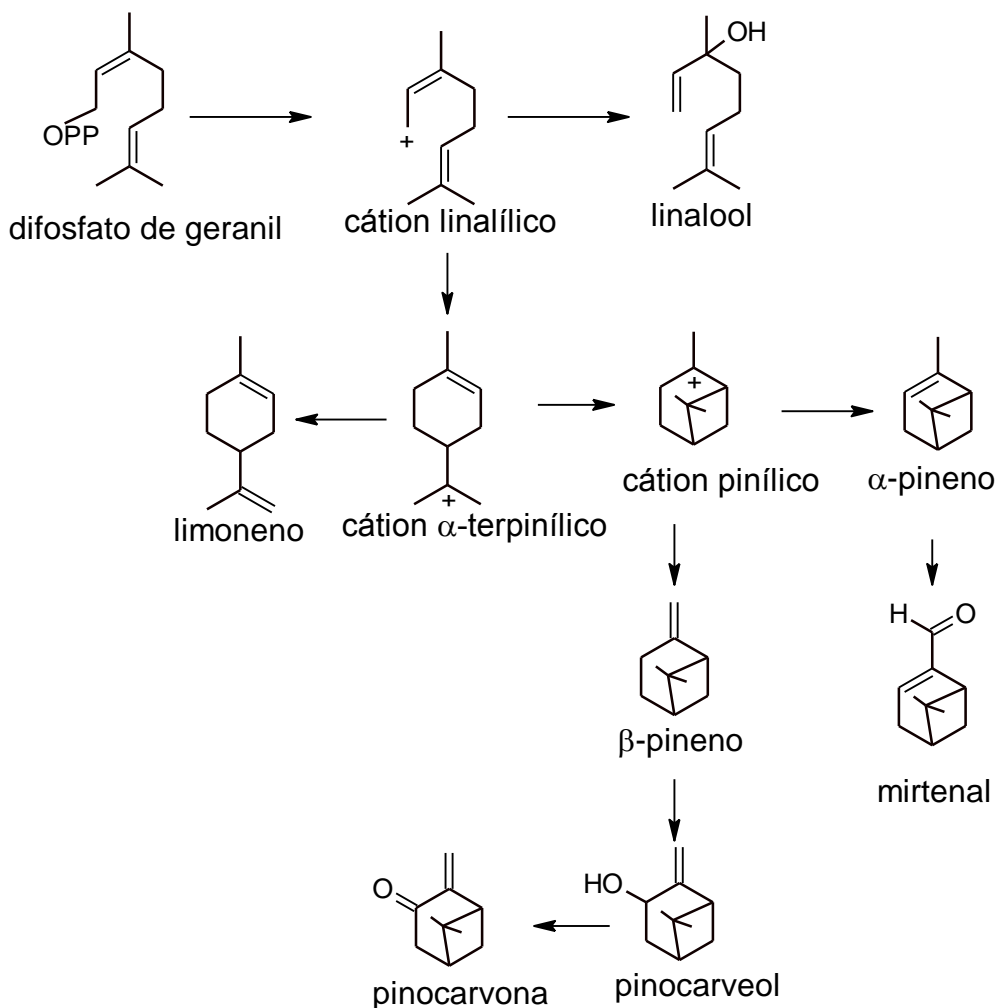


Esquema 7. Proposta de fragmentação do pico base m/z do α - e β -pineno.

Fonte: (KELLER, 2011)

Uma proposta biossintética para os monoterpenos presentes nos óleos essenciais das folhas de *E. feijoi* está proposto no Esquema 8 p 82 com base nos

dados da literatura (KESZEI et al., 2010; BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009).



Esquema 8. Proposta biossintética dos monoterpênicos presentes nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia feijoi*.

A biossíntese inicia quando o precursor difosfato de geranila (GPP) sofre ionização, seguida da isomerização obtida pela migração do grupo (OPP) resultando no difosfato linalílico (LPP), este quando desprotonado leva a formação do cátion linalílico; esse cátion quando hidratado leva a formação do monoterpêno linalol. A partir do cátion linalílico ocorre a formação do cátion α-terpinílico (um intermediário chave da biossíntese dos monoterpênicos cíclicos) através da ciclização entre C₁ e C₆, a

desprotonação deste cátion favorece a formação do monoterpene limoneno (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009).

A ciclização eletrofílica do cátion α -terpinílico gera o cátion pinílico, no qual ocorre uma desprotonação nos carbonos C₄ e/ou C₁₀ formando os monoterpenos α - e β -pineno respectivamente. A partir do β -pineno ocorre a formação do pinocarveol, cuja a desidrogenação oxidativa resulta na pinocarvona (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009; DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

5.5.4. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *Eugenia lisbonii*.

A composição química do óleo essencial de *E. lisbonii* (Amostra 4A) mostrou predominância para compostos sesquiterpênicos hidrocarbonetos, sendo o majoritário *E*-cariofileno (52,86%). Os constituintes identificados no óleo essencial encontra-se relacionados na Tabela 9, por ordem crescente dos seus índices de retenção.

Tabela 9. Constituintes químicos (%) identificados no óleo essencial das folhas de *Eugenia lisbonii* (Amostra 4A).

	Constituintes	4A	IRexp.	IRlit.
1	α -pineno	0,41	933	932
2	α -copaeno	9,61	1376	1374
3	<i>E</i> -cariofileno	52,86	1421	1417
4	<i>E</i> - α -bergamoteno	0,30	1435	1432
5	espirolepechineno	2,91	1450	1449
6	α -humuleno	4,81	1453	1452
7	γ -muuroleno	6,19	1474	1478
8	γ -himachaleno	1,47	1489	1481
9	valenceno	0,48	1492	1496
10	α -selineno	0,58	1494	1498
11	premnaspirodieno	1,36	1502	1505
12	β -bisaboleno	5,48	1507	1505
13	β -bisaboleno	1,44	1501	1505
14	<i>Z</i> - γ -bisaboleno	0,11	1517	1514
15	<i>E</i> - γ -bisaboleno	4,68	1530	1529
16	δ -cadineno	4,57	1522	1522
17	óxido de cariofileno	0,24	1590	1582
Total Identificados		97,5		

Total de monoterpenos	0,41
Monoterpenos hidrocarbonetos	0,41
Monoterpenos oxigenados	0
Total de sesquiterpenos	97,09
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	96,85
Sesquiterpenos oxigenados	0,24

IRexp.= Índice de Retenção experimental, **IRlit.**= Índice de Retenção da Literatura, (ADAMS, 2007).

A porcentagem de sesquiterpenos para a Amostra (4A) foi de 97,09%. Os sesquiterpenos hidrocarbonetos prevaleceram com 96,85%, Gráfico 4.

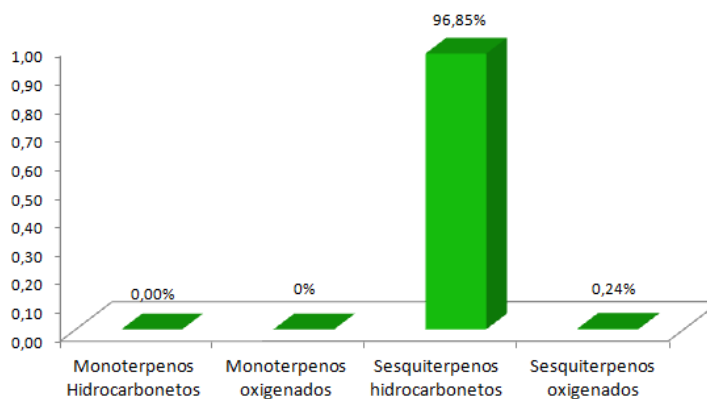


Gráfico 4. Porcentagem de mono e sesquiterpenos encontrados no óleo essencial de *Eugenia lisbonii*.

O perfil cromatográfico do óleo essencial pode ser visto na Figura 24.

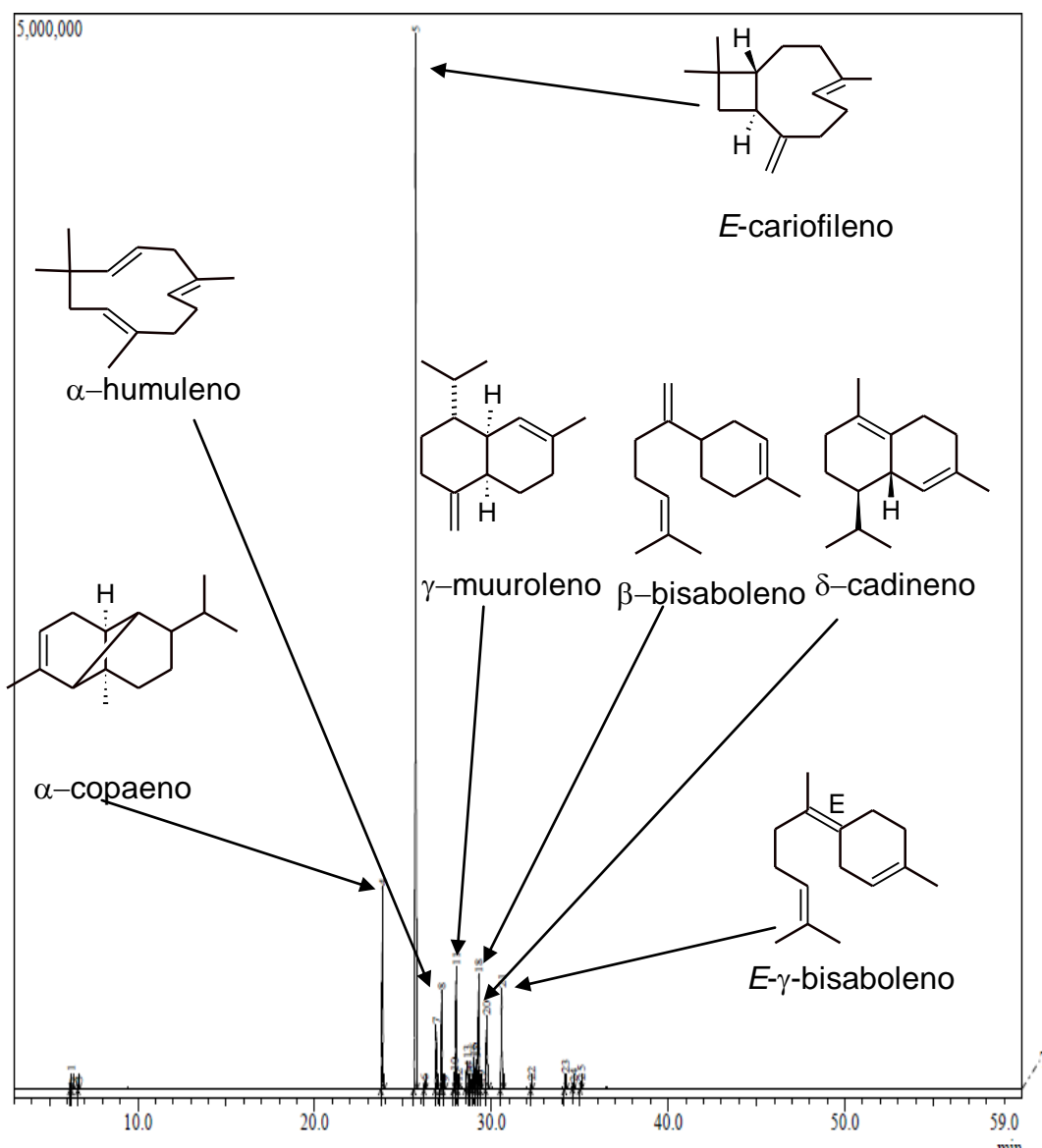


Figura 24. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia lisbonii* (Amostra 4A).

O componente *E*-cariofileno majoritário na Amostra 4A é um componente comum característico à diversas espécies de *Eugenia*, como por exemplo em *E. neonitida*, *E. rotundifolia* (DEFAVERI et al., 2011), *E. caryophillos*, (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1992) *E. uniflora* (WEYERSTAHL et al., 1988), *Eugenia patrisii* (OLIVEIRA, 2012) *E. puniceifolia* (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005; RAMOS et al., 2010), *E. sulcata* (FICHI; FLAMINI; GIOVANELLI, 2007), *E. uvalha* Cambess (OLIVEIRA et al., 2007) e *E. dysenterica* (COSTA et al., 2000).

De acordo com o levantamento realizado este constituinte é ocorrente na maioria das espécies do gênero *Eugenia* (COLE; HABER; SETZER, 2007).

A identificação do E-cariofileno (assim como dos demais) foi feita por comparação do espectro de massas obtido (Figura 25) com os disponíveis na biblioteca WILEY-7 e ADAMS (2007).

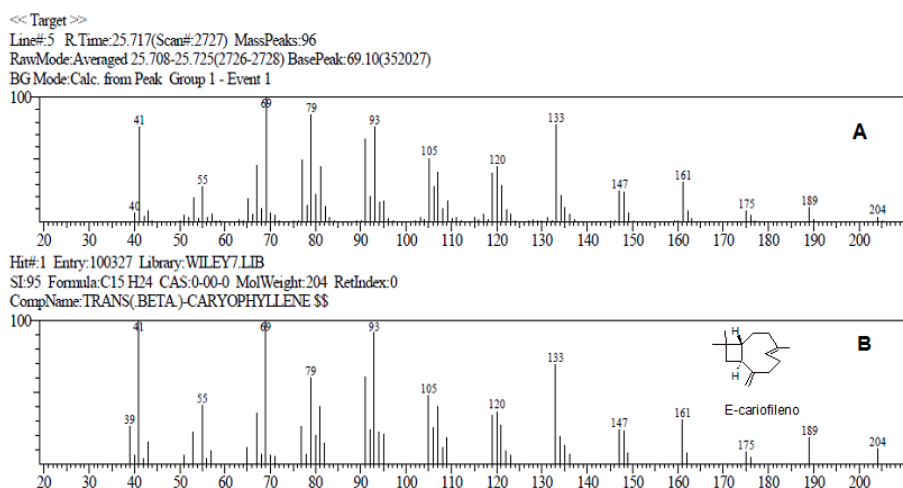
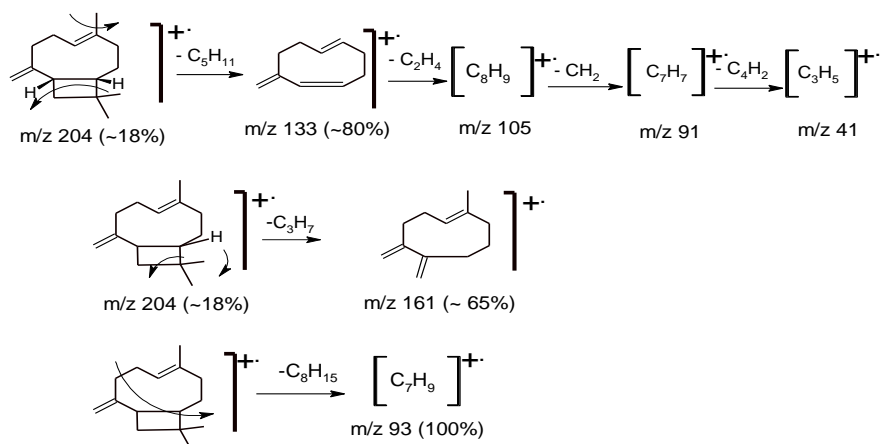


Figura 25. Espectro de massas do *E*-cariofileno (A), em comparação ao espectro da biblioteca WILEY-7 (B).

No espectro de massas a partir do íon molecular de 204 daltons ocorre a perda de $-C_3H_7$ formando o íon m/z 161; ainda a partir do íon molecular ocorre a perda de $-C_5H_{11}$, sequenciado de $-C_2H_4$, $-CH_2$ e $-C_4H_2$, formando os íons m/z 133, 105, 91 e 41 respectivamente conforme o Esquema 9.



Esquema 9. Proposta de fragmentação do *E*-cariofileno associada ao espectro de massas.

Uma possível rota biossintética para os principais componentes do óleo essencial das folhas de *E. ramosii* (Amostra 4A) é proposto baseado na literatura de (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009) com adaptações, onde a formação dos sesquiterpenos inicia-se com a ionização do FPP formando o cátion farnesil, a partir deste através de ciclizações ocorre a formação dos esqueletos cíclicos germacrano (10 C) e humulano (11 C) dos quais a partir de rearranjos, ciclizações e oxidação formam-se os sesquiterpenos β -selineno, γ -gurjuneno, α -humuleno, *E*-cariofileno e óxido de cariofileno. O cátion FPP isomeriza-se formando o cátion nerolidil do qual através de ciclizações forma-se os esqueletos bisabolano e (*Z*/*E*)-germacrano a partir deste formam-se os sesquiterpenos β -bisaboleno, γ -bisaboleno, δ -cadineno, γ -muuroleno e α -copaeno (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

5.5.5. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *Eugenia pseudopsidium*.

Nos óleos essenciais das folhas de *E. pseudopsidium* (Amostras 5A e 5B) foram caracterizados 37 constituintes químicos. Na Tabela 10 estão relacionados os constituintes presentes nos óleos das amostras 5A e 5B, os quais apresentam predominância para compostos sesquiterpênicos 97,42% e 91,9% respectivamente.

O componente majoritário dos óleos essenciais das Amostras 5A e 5B foi o sesquiterpeno hidrocarboneto *E*-cariofileno (25,71-28,54%, respectivamente). Outros constituintes presentes em teor elevado foram *E*-nerolidol, Amostra 5A: 26,36% e Amostra 5B: 10,10%, β -selineno Amostra 5A: 13,96% e Amostra 5B: 12,30%, α -selineno Amostra 5A: 12,00% e Amostra 5B: 9,37%, aromadendreno Amostra 5B: 7,92%.

Tabela 10. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia Pseudopsidium* (Amostras 5A e 5B).

Constituintes	5A	5B	IRexp.	IR lit.
1 α -fencheno	-	0,12	945	945
2 α -cubebeno	0,14	-	1349	1345
3 α -ilangeno	0,11	-	1371	1373
4 α -copaeno	0,95	0,79	1375	1374
5 β -elemeno	0,43	0,42	1391	1389
6 α -gurjuneno	-	1,97	1409	1409
7 <i>E</i> -cariofileno	25,71	28,54	1419	1417
8 β -copaeno	0,30	-	1428	1430
9 β -gurjuneno	-	0,66	1431	1431
10 aromadendreno	-	7,92	1438	1439
11 miltail-4(12)-eno	-	0,53	1442	1445
12 Z-muurola-3,5-dieno	0,25	-	1442	1448
13 α -humuleno	1,71	2,02	1452	1452
14 Allo-aromadendreno	-	0,82	1460	1458
15 4,5 di-epi-aristolocheno	0,32	-	1472	1471
16 β -chamigreno	1,51	-	1476	1476
17 γ -gurjuneno	0,00	1,05	1474	1475
18 β -selineno	13,96	12,30	1485	1489
19 α -selineno	12,00	9,37	1494	1498
20 δ -amorfenol	-	0,85	1506	1511
21 γ -cadineno	0,28	0,34	1516	1513
22 δ -cadineno	4,55	1,03	1522	1522
23 <i>E</i> -cadina-1,4- dieno	0,38	-	1533	1533
24 α -calacoreno	-	0,39	1540	1544
25 selina-3,7(11)-dieno	0,07	-	1543	1545
26 <i>E</i> -nerolidol	26,36	10,10	1561	1561
27 espatulenol	-	1,10	1575	1577
28 óxido de cariofileno	1,07	1,13	1578	1582
29 globulol	-	5,63	1582	1590
30 viridiflorol	-	0,54	1590	1592
31 ledol	-	0,55	1592	1602
32 1 epi cubenol	1,86	-	1626	1627
33 cubenol	0,81	-	1640	1645
34 agarospirol	0,49	-	1648	1646
35 selin-11-en- 4 α -ol	3,81	3,16	1652	1658
36 2z, 6 <i>E</i> farnesol	0,35-	-	1718	1722
37 2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i> farnesol		0,69	1718	1714
Total Identificados	97,42	92,02		
Total de monoterpenos	0	0,12		
Monoterpênicos hidrocarbonetos	-	-		
Monoterpenos oxigenados	-	-		
Total de sesquiterpenos	97,42	91,90		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	62,67	69,00		
Sesquiterpenos oxigenados	34,75	22,90		

IRexp.= Índice de Retenção experimental, **IRlit.**= Índice de Retenção da Literatura, (ADAMS, 2007).

A química de ambas as amostras são bastante similares, os sesquiterpenos hidrocarbonetos foram observados na proporção de 62,67% para 5A e 69% para 5B, enquanto que os sesquiterpenos oxigenados apresentaram maior teor para 5A (34,75%) Gráfico 5.

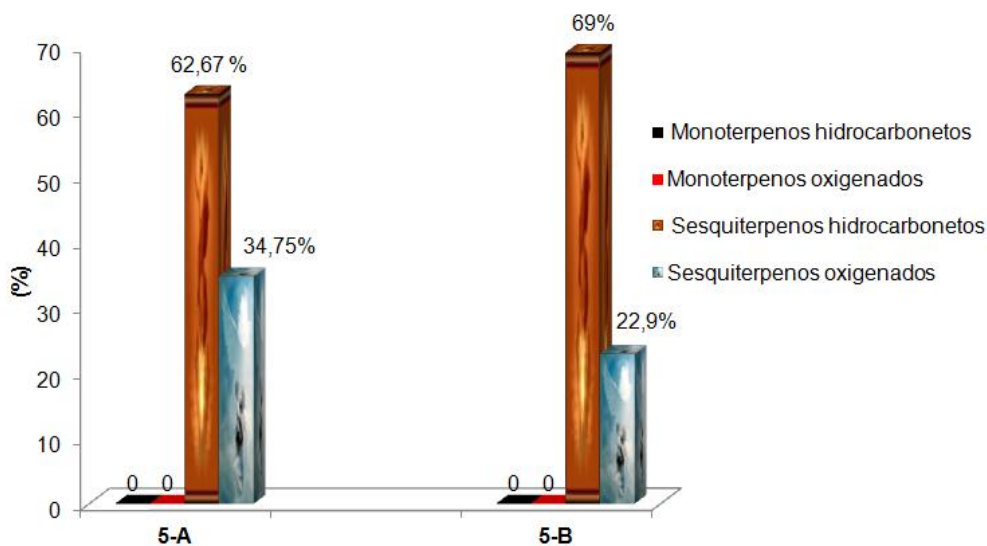


Gráfico 5. Porcentagem dos sesquiterpenos nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia pseudopsidium*.

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais (Figura 26. p. 90 e Figura 27, p. 91) mostraram-se similares, diferindo-se apenas pelo teor dos constituintes e também pela presença de aromadendreno (7,92%) e globulol (5,63%) na Amostra 5B e α -cubebeno, α -ilangeno, cis-muurolo-3,5-dieno, β -chamigreno, selina-3,7(11)-dieno, 1 epi-cubenol e agarospirol, presentes apenas na Amostra 5A.

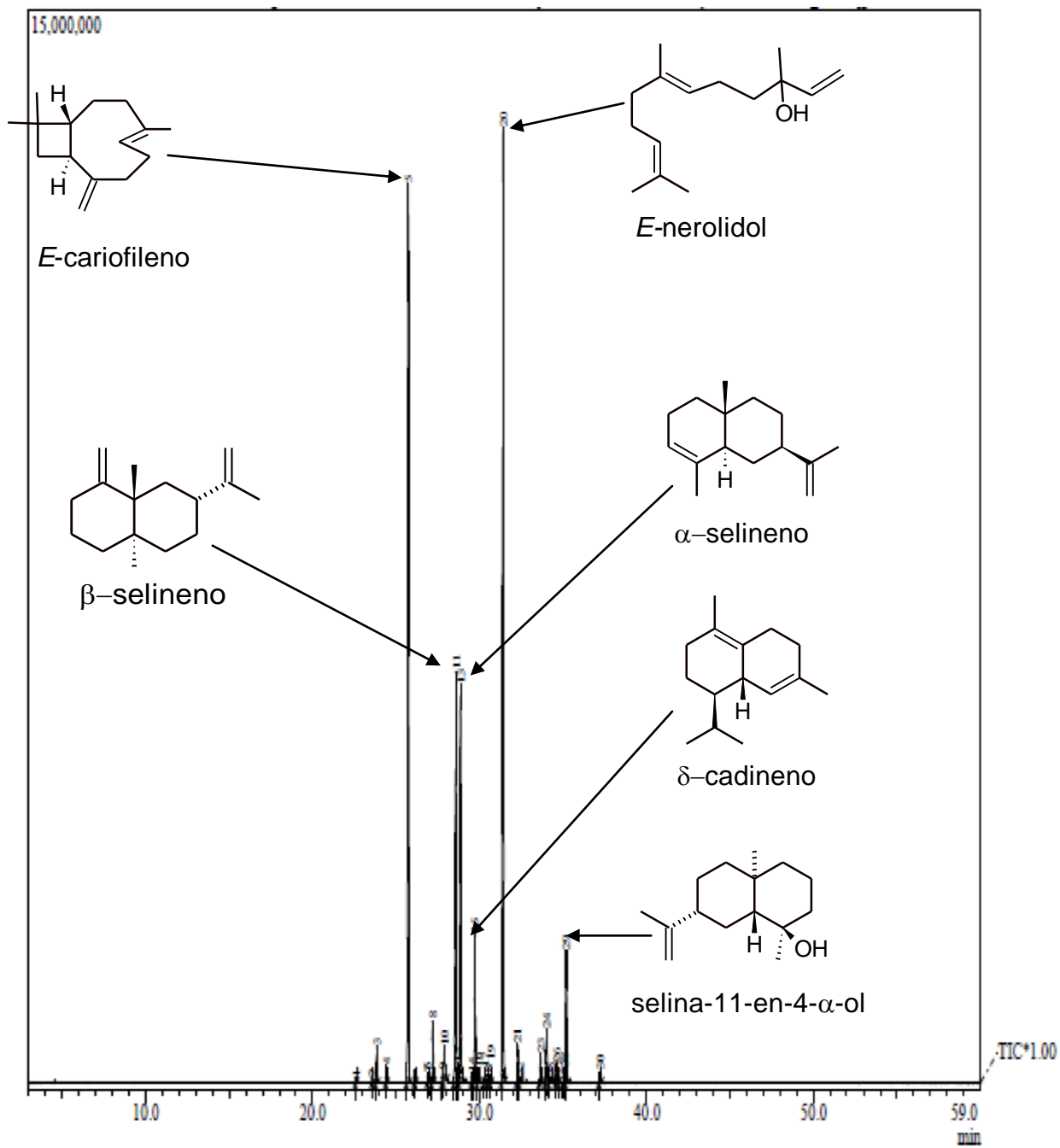


Figura 26. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia pseudopsidium* (Amostra 5A).

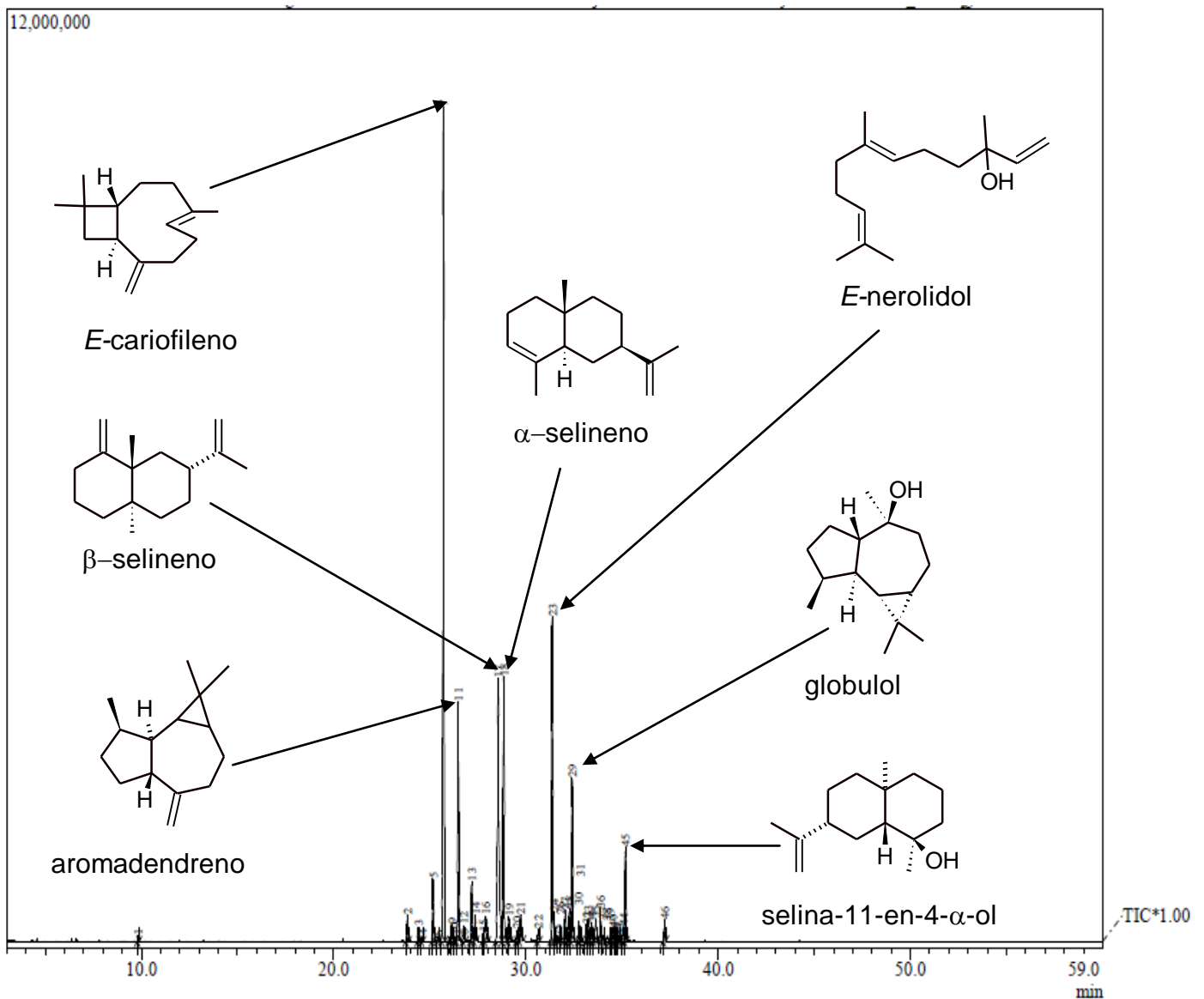


Figura 27. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Eugenia pseudopsidium* (Amostra 5B).

A proposta de rota biossintética para os principais constituintes voláteis de *E. pseudopsidium* ocorre a partir da isomerização do precursor difosfato de farnesila ocorre a formação dos sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais das folhas de *E. pseudopsidium*. Com migração do grupo difosfato do C₁ para C₃ formando o cátion difosfato de nerolidil (NPP), esse cátion quando ciclizado em C₁₁-C₁ seguido de uma desprotonação no C₉ conduz a formação do α -humuleno. Quando essa ciclização vem seguida da formação de uma ligação entre C₂ e C₁₀ além de desprotonação em C₁₅ forma-se o *E*-cariofileno (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009).

A ionização do NPP seguida de ciclização entre C₂ e C₁₀ conduz a formação do cátion germacrilo, a partir deste cátion por meio de desprotonação de C₂ e C₁₂ acompanhada da formação de uma ligação intramolecular entre C₇ e C₂ forma-se α -selineno. Um deslocamento de hidreto 1,3 no cátion germacrilo leva a formação do cátion aromadendrenilo o qual dará origem ao sesquiterpeno aromadendreno (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009). A ciclização do isômero NPP entre C₁₀-C₁ forma o cátion germacredienilo, a partir deste ocorre formação do δ -cadineno e globulol.

5.5.6. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de *Eugenia marleneae* n. sp.

Nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia marleneae* n. sp. (Amostras 6A e 6B) foram identificados 52 componentes químicos Tabela 11.

Tabela 11. Constituintes químicos (%) identificados nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia marleneae* n. sp. (Amostras 6A e 6B).

Componentes	6A	6B	IRexp.	IRlit.
1 linalol	0,45	0,34	1097	1095
2 n-nonanal	0,07	-	1101	1100
3 Butanoato de (3Z)-hexenil	1,64	0,69	1183	1184
4 δ -elemeno	1,20	1,74	1336	1335
5 α -cubebeno	0,19	-	1348	1345
7 α -ilangeno	0,15	-	1370	1373
8 α -copaeno	6,15	6,05	1375	1374
9 (3Z)-hexenoato de (3Z)-hexenil	0,25	0,33	1378	1383
10 β -bourboneno	0,60	-	1385	1387
11 β -elemeno	3,13	2,44	1390	1389
12 <i>E</i> -cariofileno	22,29	35,67	1418	1417
13 β -copaeno	0,62	0,55	1428	1430
14 <i>E</i> - α -bergamoteno	0,42	0,82	1432	1432
15 aromadendreno	0,38	-	1438	1439
16 α -humuleno	2,92	4,06	1452	1452
17 allo-aromadendreno	0,29	-	1459	1458
18 dauca-5,8-dieno	0,23	0,19	1472	1471
19 γ -muuroleno	1,15	0,67	1475	1478
20 germacreno D	5,18	6,47	1479	1485
21 δ -selineno	0,47	-	1488	1492
22 γ -amorfenol	1,03	-	1491	1495

Continuação Tabela 11: Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia marleneae* sp.nov (Amostra 6A e 6B).

Constituintes	6A	6B	IRexp.	IRlit.
23 biciclogermacreno	3,09	4,56	1495	1500
24 α -muuroleno	0,79	0,87	1498	1500
25 <i>E,E</i> - α -farneseno	1,99	-	1505	1505
26 β -bisaboleno	-	2,19	1505	1505
27 δ -amorfenol	0,77	-	1512	1511
28 γ -cadineno	-	0,64	1512	1513
29 δ -cadineno	3,87	4,90	1521	1522
30 zonareno	0,45	-	1530	1528
31 <i>E</i> -cadinina-1,4-dieno	0,20	-	1535	1533
32 α -cadineno	0,16	-	1540	1537
33 α -calacoreno	0,27	-	1546	1544
34 elemol	-	0,62	1546	1548
35 <i>E</i> -nerolidol	1,14	1,61	1560	1561
36 Benzoato de (3 <i>Z</i>)-hexenil	0,66	0,52	1566	1565
37 espatulenol	4,34	0,54	1575	1577
38 óxido de cariofileno	10,84	1,69	1581	1582
39 globulol	1,14	-	1589	1590
40 viridiflorol	1,51	1,49	1589	1592
41 guaíol	-	2,83	1599	1600
42 rosifoliol	0,68	-	1604	1600
43 óxido de humuleno II	1,03	-	1606	1608
44 anti-sin-sin-helifolen-12-al	2,91	-	1625	1619
45 epi- α -cadinol	0,98	1,09	1636	1638
46 epi- α -muurolol	1,73	-	1639	1640
47 α -muurolol (torreiol)	0,90	-	1643	1644
48 α -cadinol	4,00	8,15	1654	1652
49 14-hidroxi-9-epi- <i>E</i> -cariofileno	1,08	-	1668	1668
50 mustacona	0,68	-	1674	1676
51 epi- α -bisabolol	0,28	-	1682	1683
52 eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	0,21	-	1687	1687
Total Identificados	94,51	91,72		
Total de monoterpenos	2,16	1,03		
Monoterpenos hidrocarbonetos	-	-		
Monoterpenos oxigenados	2,16	1,03		
Total de sesquiterpenos	92,35	90,69		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	58,24	72,15		
Sesquiterpenos oxigenados	34,11	18,54		

IRexp.= Índice de Retenção experimental, IRlit.= Índice de Retenção da Literatura (ADAMS, 2007).

Comparando os óleos essenciais das folhas dos espécimes coletados 6A e 6B verifica-se a predominância de compostos sesquiterpenos hidrocarbonetos para ambos (58,24% e 72,15%, respectivamente) (Gráfico 6).

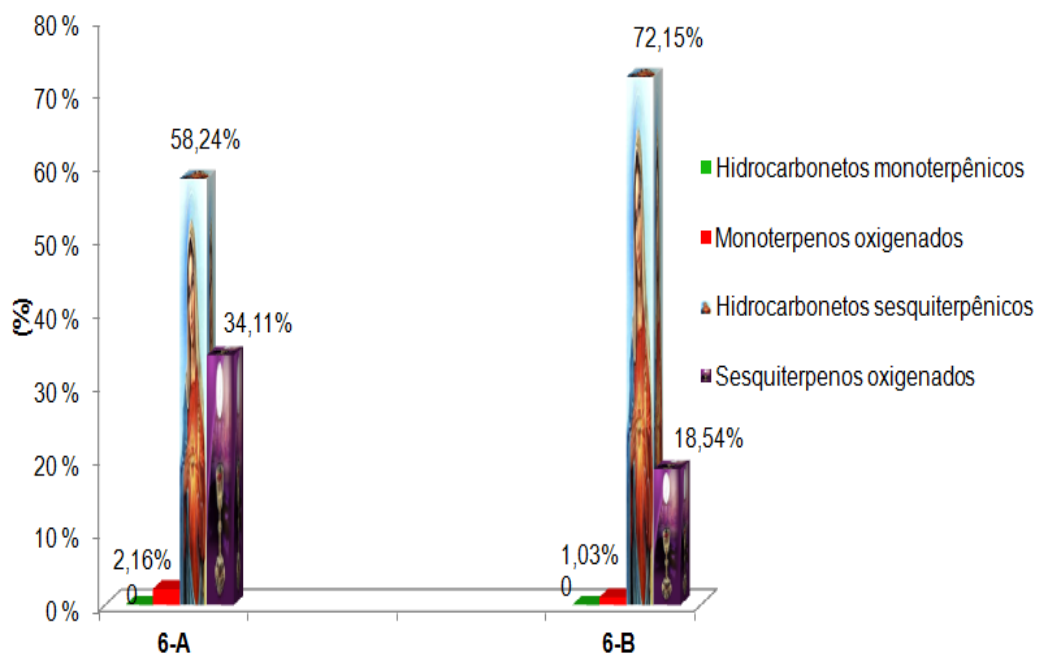


Gráfico 6. Porcentagem de mono e sesquiterpenos nos óleos essenciais de *Eugenia marleneae* n.sp.

Os componentes químicos majoritários presentes em ambas as amostras foram *E*-cariofileno (Amostra 6A: 22,29%; Amostra 6B: 35,67%) seguida α -copaeno (Amostra 6A: 6,15%; Amostra 6B: 6,05%), germacreno D (Amostra 6A: 5,18%; Amostra 6B: 6,47%), δ -cadineno (Amostra 6A: 3,87%; Amostra 6B: 4,9%) biciclogermacreno (Amostra 6A: 3,09%; Amostra 6B: 4,56%), α -cadinol (Amostra 6A: 4,00%; Amostra 6B: 8,15%), α -humuleno (Amostra 6A: 2,92%; Amostra 6B: 4,06%) e β -elemeno (Amostra 6A: 3,13%; Amostra 6B 2,44%). O perfil cromatográfico dos espécimes mostraram-se similares (Figura 28 e Figura 29) diferindo apenas pelo teor dos constituintes.

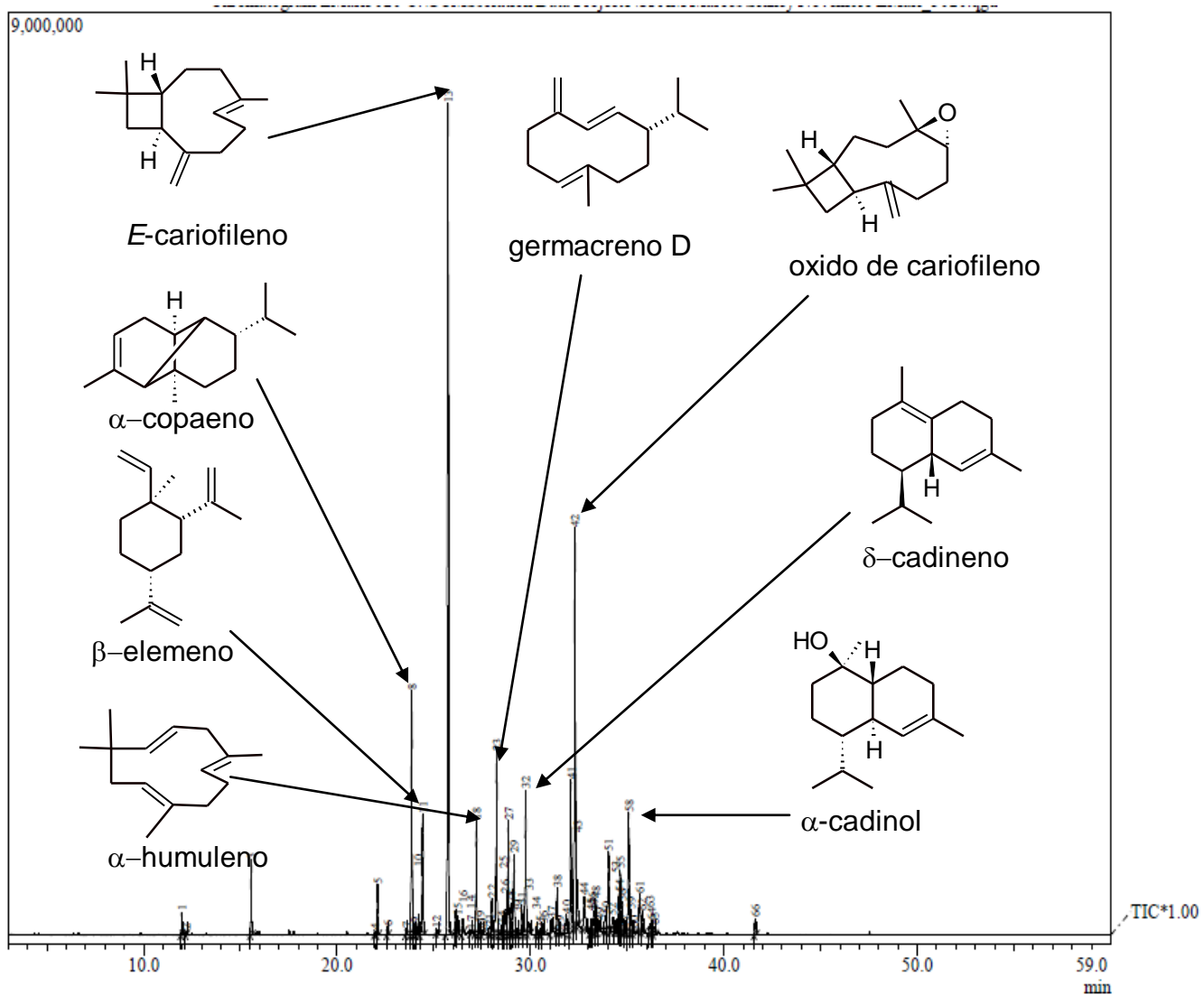


Figura 28. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia marleneae* n. sp. (Amostra 6 A)

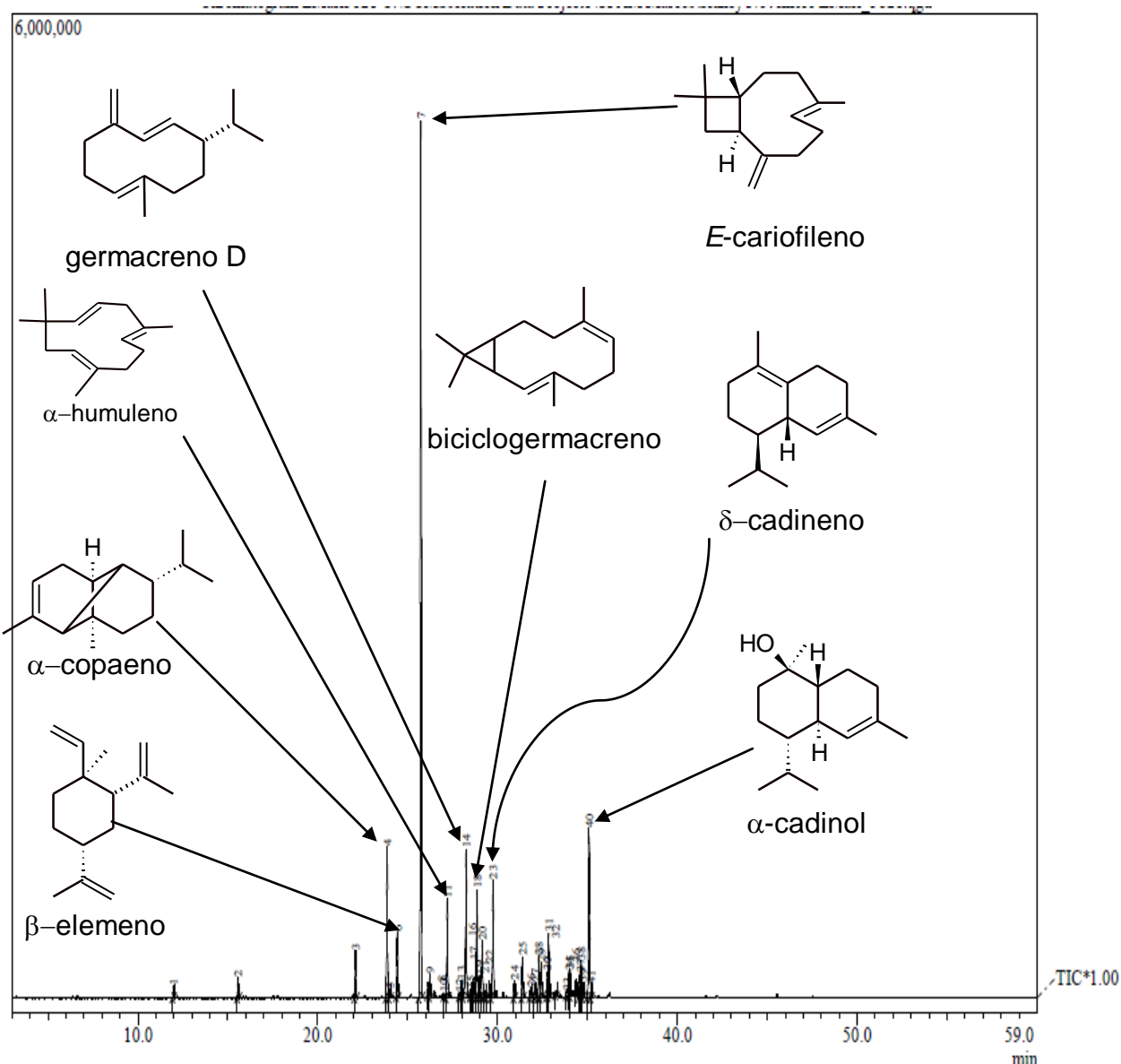


Figura 29. Cromatograma de íons totais dos óleos essenciais das folhas de *E. marleneae* n. sp. (Amostra 6B).

A proposta biossintética para os principais constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas *E. marleneae* foi realizada baseado nos dados da literatura (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009; DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009; KESZEI et al., 2010; DEWICK, 2002), onde a formação dos sesquiterpenos tem início com ionização do difosfato de farnesila. A migração do grupamento difosfato de C₁ para C₃ em resulta no difosfato de nerolidila (NPP). A partir de então, a biossíntese dos sesquiterpenos prossegue via ionização direta e/ou

rotação da ligação entre C₂ e C₃ e posterior ionização do isômero NPP. A ionização e ciclização direta do NPP entre C₁₀-C₁ leva à formação do cátion germacrílico, o qual conduz a formação do germacreno D e também ao β-elemeno (KESZEI et al., 2010; BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009).

A ciclização do cátion NPP entre C₁₁-C₁, associado à desprotonação do C₉, leva à formação do α-humuleno. Quando esta ciclização vem acompanhada da formação de uma ligação adicional entre C₂-C₁₀, além da desprotonação do C₁₅ forma-se o *E*-cariofileno, a partir do qual através de oxidação dará origem ao óxido de cariofileno. A ciclização do isômero do NPP entre C₁₀-C₁ conduz à formação do cátion germacradienílico. O isômero do cátion germacradienílico, obtido após o deslocamento de hidreto, pode ciclizar entre C₆-C₁, formando o cátion cadinílico ou, através da saída de um próton e adicional ciclização entre C₁ e C₁₁ originar o biciclogermacreno e espatulenol. A partir do cátion cadinílico, por meio de uma ligação entre C₂-C₇ forma-se os constituintes α-copaeno e α-cadinol (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009; DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

5.5.7. Identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de um espécime de *Eugenia adenocalyx*.

A partir da análise cromatográfica do óleo essencial das folhas de *E. adenocalyx* (Amostra 7A) foram identificados 23 constituintes químicos, a porcentagem de caracterização foi 97,71% (Tabela 12).

Erro! Auto-referência de indicador não válida.. Constituintes químicos (%) identificado no óleo essencial de *Eugenia adenocalyx*.

Constituintes	7A	IRexp.	IRlit.
1 α -thujeno	0,11	925	924
2 α -pineno	11,07	932	932
3 β -pineno	6,57	976	974
4 mirceno	0,06	988	988
5 limoneno	0,13	1027	1024
6 α -terpineol	0,18	1188	1186
7 α -copaeno	1,42	1375	1374
8 β -elemeno	0,08	1391	1389
9 <i>E</i> -cariofileno	26,31	1419	1417
10 <i>E</i> - α -bergamoteno	1,39	1434	1432
11 α -humuleno	1,99	1452	1452
12 germacreno D	0,12	1479	1484
13 β -bisaboleno	0,22	1506	1505
14 <i>Z</i> - γ -bisaboleno	0,09	1513	1514
15 δ -cadineno	0,55	1521	1522
16 elemol	3,87	1546	1548
17 óxido de cariofileno	1,31	1582	1582
18 guaiol	11,24	1595	1600
19 rosifoliol	0,70	1605	1600
20 γ -eudesmol	1,16	1629	1630
21 β -eudesmol	4,30	1650	1649
22 valerianol	24,76	1655	1656
23 α -bisabolol	0,08	1682	1685
Total Identificado	97,71		
Total de monoterpenos	18,12		
Monoterpenos hidrocarbonetos	17,94		
Monoterpenos oxigenados	0,18		
Total de sesquiterpenos	79,59		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	32,17		
Sesquiterpenos oxigenados	47,42		

IRexp.= Índice de Retenção experimental, **IRlit.**= Índice de Retenção da Literatura (ADAMS, 2007).

A predominância observada foi para compostos sesquiterpênicos (79,59%) sendo os oxigenados com maior teor (47,42%). Os compostos monoterpênicos apresentaram um teor de 18,12%, sendo os mais representativos α - e β -pineno com 11,07% e 6,57%, respectivamente (Gráfico 7).

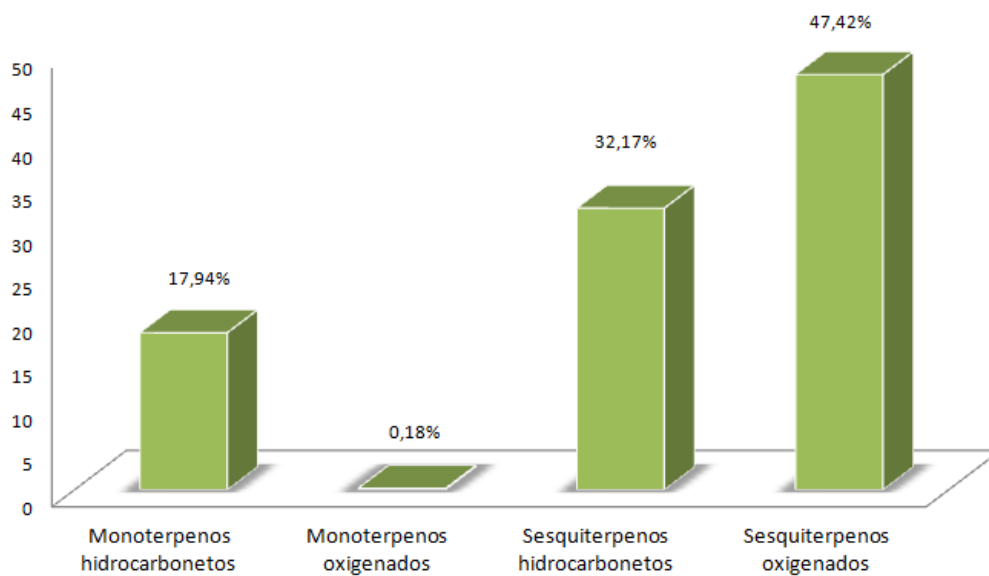


Gráfico 7. Porcentagem de mono- e sesquiterpenos no óleo essencial das folhas de *Eugenia adenocalyx* (Amostra 7A).

O componente majoritário do óleo essencial foi sesquiterpeno hidrocarboneto *E*-cariofileno (26,31%). Outros constituintes presentes em teor elevado foram valerianol (24,76%), guaiol (11,24%), β -eudesmol e elemol (3,87%).

O perfil cromatográfico do óleo essencial é mostrado na Figura 30.

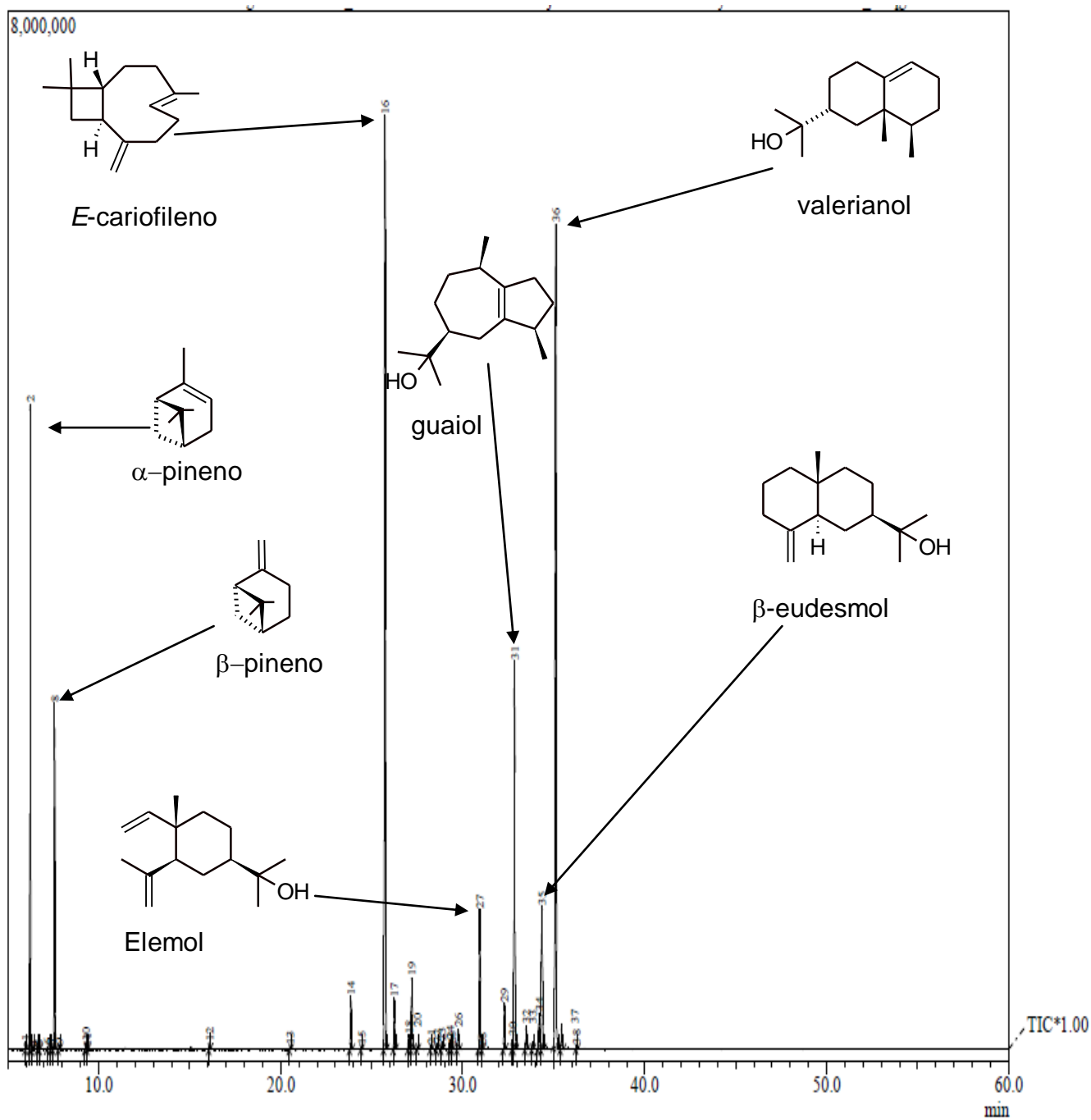


Figura 30. Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de *E. adenocalyx* (Amostra 7A).

Com base na literatura propõem-se uma possível rota biossintética dos principais monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais de *E. adenocalyx* (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009; KESZEI et al., 2010)

Estudos realizados com os voláteis de *E. patrisii* ocorrentes na RFAD mostrou uma composição química rica em sesquiterpenos sendo os majoritários α -gurjuneno,

germacreno D e E-cariofileno. Traços de monoterpenos como α -e β -pineno foram observados (OLIVEIRA, 2012). Os óleos essenciais de *Eugenia patrisi* mostra uma semelhança com os óleos essenciais das espécies estudados nesta dissertação.

Em estudos realizados com *E. citrifolia* ocorrentes na RFAD foi possível isolar e caracterizar o óxido de cariofileno (constituente comum ao metabolitos secundários de *Eugenia* ocorrentes na RFAD) através de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H , trabalho este realizado por membros do Grupo de Pesquisa de Micromoléculas da Amazônia (NEQUIMA) em 2011.

E-cariofileno, α -copaeno e α -humuleno são encontrados com frequência nos estudos da composição volátil de *Eugenia* spp. sugerindo que eles podem fornecer caracteres úteis na compreensão das relações filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas (COLE; HABER; SETZER, 2007).

5.6. Comparação química entre as sete espécies de *Eugenia* spp. ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

As espécies *E. magna*, *E. ramosii*, *E. feijoi*, *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium* e *E. marleneae* apresentaram predominância para compostos sesquiterpênicos hidrocarbonetos com exceção da *E. adenocalyx*, rica em compostos sesquiterpenos oxigenados Gráfico 8.

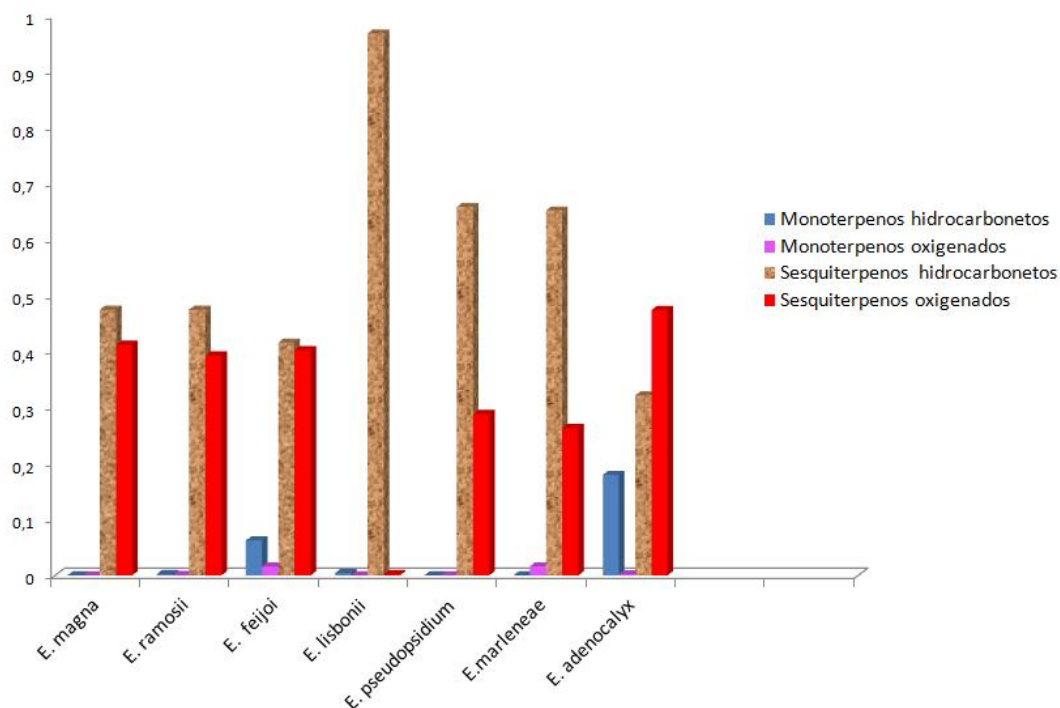


Gráfico 8. Teor de mono- e sesquiterpenos das espécies de *Eugenia* spp. Coletadas na RFAD.

O teor de mono- e sesquiterpenos dos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* estudadas nas estações seca e chuvosa foram aproximadas. Os monoterpenos não oxigenados apresentaram média de 3,22% com variância de 0,36% na estação seca e 3,74% com variância de 0,44% na estação chuvosa. Comparando com os monoterpenos oxigenados a média no período seco foi de 1,06% com variação de 0,05%, enquanto que no período chuvoso foi de 0,97% com variância de 0,01%.

O teor médio dos sesquiterpenos hidrocarbonetos no período seco foi 52% com variância de 6% enquanto que no período chuvoso a média foi 49% com variância de 7%. A média e a variância para os sesquiterpenos oxigenados na estação seca foi de 35% e 3% respectivamente, em comparação com os sesquiterpenos oxigenados na estação chuvosa onde a média foi de 37% com variação de 6%. A análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey (5% de significância) revelou que não há

diferenciação significativa entre as classes para os grupos coletados no período seco e chuvoso.

O Coeficiente de Correlação Linear de Pearson aplicado a todas as amostras (Tabela 13) mostra as correlações quanto a similaridade química entre as mesmas. A maior correlação observada foi para as Amostras 2, 3, 4 e 6. Na Amostra 2 (*E. ramosii*) as amostras 2B-1 e 2B-2 (mesmo indivíduos/coletas diferentes) apresentaram fator de correlação de 0,98, sendo estas Amostras muito similares em relação a composição química. A correlação entre os indivíduos correspondentes às Amostras 2A e 2B revelou uma similaridade significativa entre os mesmos com valores de correlação de 0,91 e 0,93.

Na Amostra 3 (*E. feijoi*) a similaridade entre as Amostras 3A e 3C apresentou fator de correlação de 0,98, portanto com a química bastante similar, já a Amostra 3B não apresentou fator de correlação significativo (0,09 e 0,13 entre indivíduos (Amostras 3B/3C e Amostras 3B/3A, respectivamente) conforme discutido no Tópico 5.5.3 (p. 75). As amostras de *E. lisbonii* apresentaram fator de correlação de 0,93 portanto uma correlação fortemente positiva. As Amostras 6A e 6B também apresentaram similaridade significativa com fator de correlação de 0,89.

A maior correlação foi de 0,92 e 0,89 entre as Amostras 4A-2013/6B. Houve outras correlações fortes, tais como: 0,82 (Amostras 4A/6A), 0,77 (Amostras 4A/5B) e 0,74 (Amostras 5B/6B).

Considerando as correlações de Pearson superiores a 0,50 com variação da média de 21% ($0,5 + 0,21 = 0,71$) se observou uma correlação aproximada entre as espécies:

- 1A se correlaciona com 2A (0,80), 2B-1(0,70) e 2B-2 (0,75);
- 2A se correlaciona com 6A (0,71);

-4A se correlaciona com 5B (0,77), 6A (0,82) e 6B (0,92);

-5B se correlaciona com 6B (0,74).

Tabela 13. Coeficiente de correlação de Pearson entre os espécimes e espécies estudados.

Espécies	Amostras	1A	2A	2B-1	2B-2	3A	3B	3C	4A	5A	5B	6A	6B	7A
<i>E. magna</i>	1A	1												
<i>E. ramosii</i>	2A	0,80	1											
<i>E. ramosii</i>	2B-1	0,70	0,91	1										
<i>E. ramosii</i>	2B-2	0,75	0,93	0,98	1									
<i>E. feijoi</i>	3A	0,08	0,22	0,07	0,09	1								
<i>E. feijoi</i>	3B	0,57	0,70	0,59	0,65	0,13	1							
<i>E. feijoi</i>	3C	0,08	0,21	0,07	0,09	0,98	0,09	1						
<i>E. lisbonii</i>	4A	0,06	0,36	0,44	0,31	-0,02	-0,02	-0,02	1					
<i>E. pseudopsidium</i>	5A	0,02	0,20	0,24	0,17	0,02	-0,02	0,01	0,60	1				
<i>E. pseudopsidium</i>	5B	0,04	0,28	0,32	0,22	0,02	0,02	0,02	0,77	0,77	1			
<i>E. marleneae</i>	6A	0,37	0,71	0,69	0,63	0,14	0,36	0,13	0,82	0,52	0,67	1		
<i>E. marleneae</i>	6B	0,17	0,41	0,44	0,34	0,04	0,06	0,04	0,92	0,59	0,74	0,89	1	
<i>E. adenocalyx</i>	7A	0,02	0,21	0,26	0,18	-0,01	-0,01	0,03	0,63	0,38	0,50	0,51	0,61	1

5.7 Análise de similaridade química de *Eugenia* spp.

A análise de similaridade química dos óleos essenciais das espécies e espécimes estudados revelou uma segregação nítida entre as mesmas. A PCA das intensidades relativas dos 133 constituintes identificados revelou uma segregação por espécie e por espécime [PC1, (44%) e PC2, (30%)]. A análise detalhada do mapa de loadings (PC1 vs PC2) evidenciou os sesquiterpenos β -elemeno, pogostol, β -selineno, α - e β -pineno como característicos dos espécimes de *E. feijoi* (Amostras 3A e 3C). Óxido de cariofileno, δ -elemeno, α -copaeno, α -cubebeno, *E*-calameneno, espatulenol, epóxido de humuleno II e ledol como característico de *E. magna* (Amostra 1A), *E. ramosii* (Amostras 2A e 2B) e de um indivíduo de *E. feijoi* (Amostra 3B). O grupo das Amostras 4, 5, 6 e 7 teve a constituição química evidente pelos constituintes de *E*-cariofileno, *E*-nerolidol e valerianol (Figura 31).

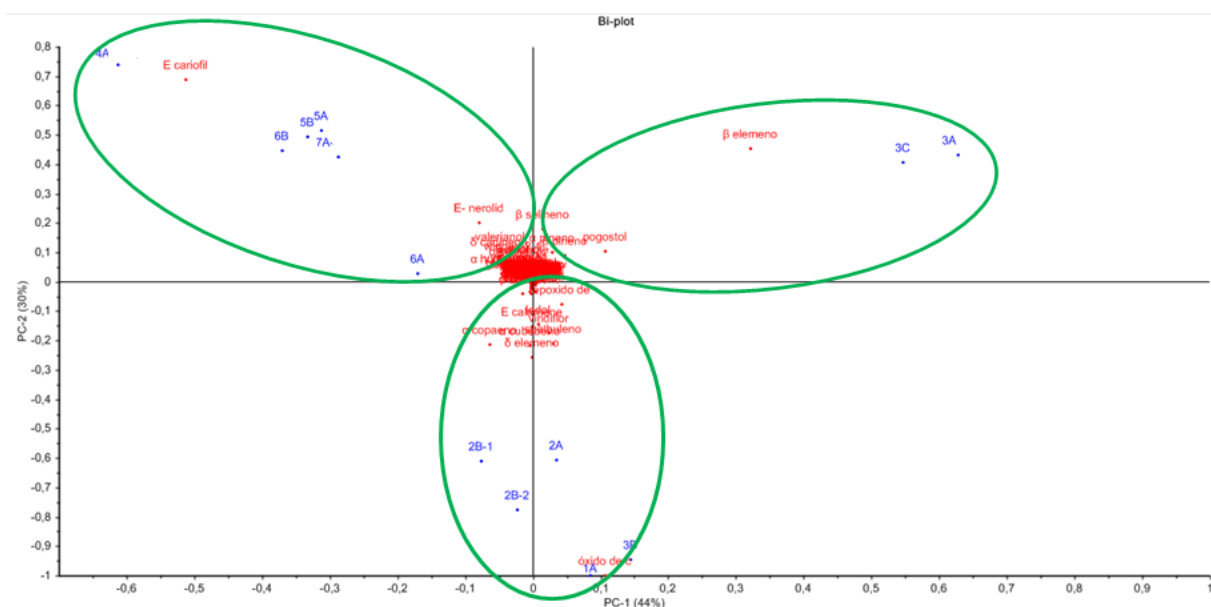


Figura 31. Análise das componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *Eugenia* spp. (Myrtaceae)

A Análise Hierárquica de Cluster (HCA) revelou separação nítida em três grupos e dois subgrupos (4+6/5+7) (Figura 32).

Grupo 1: *Eugenia feijoi* (3)

Grupo 2: *Eugenia magna* e *E. ramosii* (1+2)

Grupo 3: *Eugenia lisbonii*, *E. pseudopsidium*, *E. marleneae* n. sp. e *E. adenocalyx* (4+5+6+7)

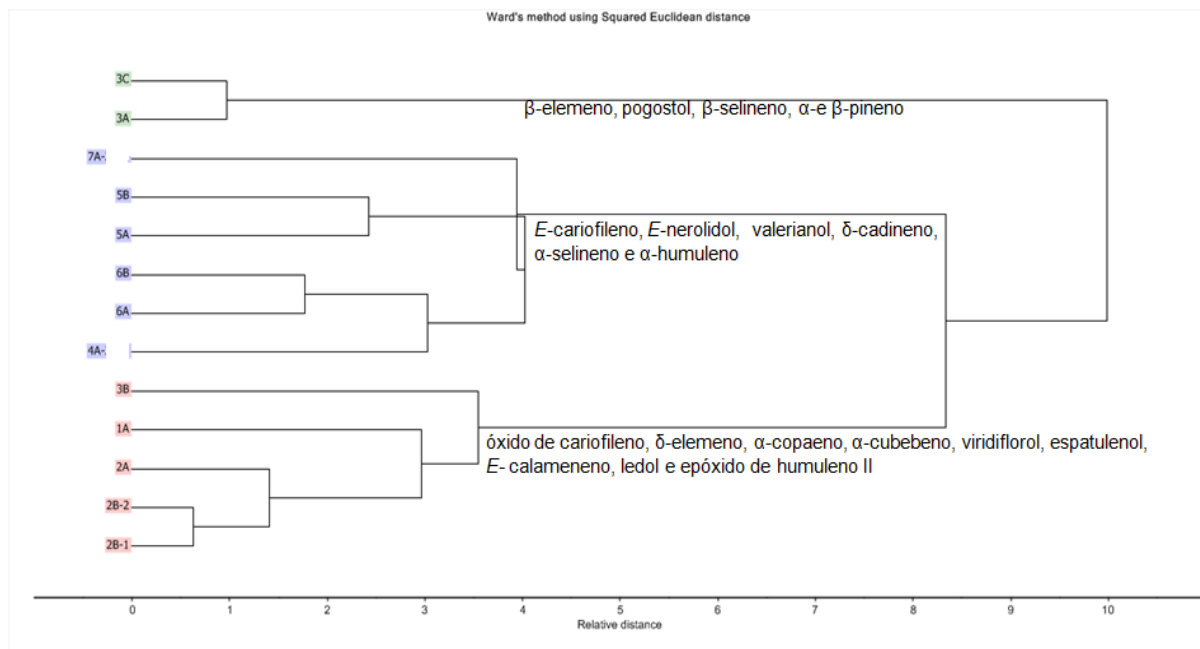


Figura 32. Análise Hierárquica de Custer (HCA) dos óleos essenciais de *Eugenia* spp Myrtaceae.

Em síntese observa-se:

-O Grupo 1 (Amostra 3) concentração relativa de β-elemeno é estatisticamente diferente dos 2 e 3;

-O Grupo 2 (Amostras 4,5,6 e 7) concentração relativa de oxido de cariofileno é estatisticamente de 1 e 3;

-O Grupo 3 (Amostras 1,2 e 3B) concentração relativa de E-cariofileno é estatisticamente diferente dos Grupos 1 e 2.

6. Conclusão

- ✓ Este estudo contribui para o conhecimento do perfil químico das *Eugenia magna*, *E. ramisii*, *E. feijoi*, *E. lisbonii*, *E. pseudopsidium.*, *E. marleneae.* e *E. adenocalyx* (Myrtaceae) ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke, através da análise química dos óleos essenciais das folhas, sendo o primeiro relato da descrição química volátil das espécies.
- ✓ A análise química dos óleos essenciais das sete *Eugenia* spp. possibilitou a identificação de 118 constituintes químicos, tendo predominância para compostos sesquiterpênicos 101 constituintes e 16 monoterpenos.
- ✓ Os óleos essenciais estudados apresentaram atividades biológicas, frente a microorganismos Gram-positivos e Gram- negativos, foram citotóxicos em linhagem de celular de câncer humano sendo necessários estudos mais avançados para comprovar tal eficácia.
- ✓ Os dados obtidos nesta dissertação poderão ser consultados para fins de comparação entre espécies de *Eugenia* ocorrentes na RFAD bem como de outras regiões, a fim de contribuir com o conhecimento da química volátil a cerca do gênero e Família Myrtaceae.

7. Referências Bibliográficas

- ABOUTABL, E. A. et al. Composition and bioactivity of essential oils from leaves and fruits of *Myrtus communis* and *Eugenia supraxillaris* (Myrtaceae) grown in Egypt. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 14, n. 2, p. 192–200, 2011.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Alleued Pub. Corp., IL 2007. 804 p.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
- AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 3, p. 403–406, 28 mar. 2008.
- ALVES, L. V. et al. Essential oil of *Eugenia speciosa* Camb. (Myrtaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 12, n. 6, p. 693–694, nov. 2000.
- ANJOS, A. M. G. DOS; FERRAZ, I. D. K. Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* spp. *soraria*). *Acta Amazonica*, p. 337–348, 1999.
- APEL, M. A. et al. Essential oils from *Eugenia* Species-Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 16, n. 2, p. 135–138, 2004.
- ARAGÃO, J. G.; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Myrtaceae: Espécies das Subtribos Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae Registradas para o Estado do Maranhão. *Revista Sinapse Ambiental*, p. 7–17, 2008.
- BARRERO, A. F. et al. Efficient synthesis of the anticancer β -elemene and other bioactive elemanes from sustainable germacrone. *Organic e Biomolecular chemistry*, v. 9, n. 4, p. 1118–1125, 2011.
- BARROS, F.; ZAMBARDA, E.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 861–867, 2009.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p. 240–248, 2006.
- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. D. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã , Rio de Janeiro , Brasil. p. 263–277, 2008.
- BRAGA-NETO, R.; OLIVEIRA, M.L, MAGNUSSON, W. E, BACCARO, F.B (Orgs.). Reserva Ducke: a biodiversidade amazônica através de uma grade. Manaus: Attema Design Editorial, 2008. p. 166.
- BRUN, G. DA R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividades antimicrobiana dos óleos volateis pitanga (*Eugenia Uniflora* L.). *Perspectiva*, v. 34, n.12, p. 135–142, 2010.

CARVALHO, P. E. R. Espécies abóreas brasileiras- *Eugenia*. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/> Acesso em: 3 dez. 2014.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherap*, v. 506, p. 501–506, 2007.

CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, p. 521–547, 1995.

COLE, R. A. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Natural Medicines*, v. 61, n. 4, p. 414–417, 2007.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, n. 1, p. 33–9, 1999.

COSTA, T. R. et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of ethnopharmacology*, v. 72, n. 1-2, p. 111–117, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. DE. Óleos essenciais e química fina. *Química Nova*, p. 224–228, 1992.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. [s.l.] New Columbia University Press, p. 1262, 1981.

CRUZ, A. V. D. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Metastomaceae. *Floresta e Ambiente*, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004a.

CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae In: Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 26, 2004b; Rio de Janeiro; Anais : Universidade Federal do rio de Janeiro, 2004.

DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food control*, 2008.

DEFAVERI, A. C. A. et al. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 22, n. 8, p. 1531–1538, 2011.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. P. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, v. 70, n. 15-16, p. 1621–1637, 2009.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2nd. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 515 p.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil *Multi Ciência*, v.7, p.1-6. Campinas SP, 2006.

DUFFY, C.; POWER, R. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 17, n. 6, p. 527–529, 2001.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; GIOVANELLI, F. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology*, v.115, p 168-172, 2007.

FISCHER, D. C. et al. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from Southeastern Brazil. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 17, p. 499–500, 2005.

FORZZA, R. C et al. As angiospermas do Brasil. In: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. [s.l.] Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 78–89.

GAYOSO, C. W. et al. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, v. 76, n. 2, p. 247–249 2005.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. Myrtaceae Juss. Disponível em: <<http://www.gbif.org/species/5014>>. Acesso em: 5 mar. 2014.

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

INPA, I. DE N. DE P. DA A. Reserva Florestal Adolpho Ducke. Disponível em: <<http://peld.inpa.gov.br/sitios/ducke>>. Acesso em: 6 jun. 2014.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma Contribuição ao estudo do Óleo Essencial e do Extrato de Tomilho. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

JIMENEZ, P. C. et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 287, n. 1, p. 93–101, 2003.

KELLER, J. Electron Impact (EI) Fragmentation Mechanisms : The Case of B -Pinene. Disponível em: <<http://chem.uaf.edu/keller/Courses/324Sp11/PDF/PineneFragmentation.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2014.

KESZEI, A. et al. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. *Phytochemistry*, v. 71, n. 8-9, p. 844–852, 2010.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 599–604, 2010.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*, v. 16, n. 12, p. 9827–9837, 2011.

LEGAULT, J. et al. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Médica*, v. 69, n. 5, p. 402–407, 2003.

LIMNA MOL, V. P. et al. Calamenenes-aromatic bicyclic sesquiterpenes-from the Indian gorgonian *Subergorgia reticulata* (Ellis and Solander, 1786). *Natural Product Research*, v. 25, n. 2, p. 169–174, 2011.

LITTLE, D. B.; CROTEAU, R. B. *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Comprehensive+Natural+Products+II+:+Chemistry+and+Biology+:+10+Volume#5>> . Acesso em: 20 maio. 2014.

LUPE, F. A. Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. 2007.

MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2008.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends In Plant Science* v.7, n. 8, p. 366–373, 2002.

MCVAUGH, R. Flora of Peru. Myrtaceae: Field Museum of Natural History-Botany. *Botanical Series*, v.13, n. 2, p. 569–818, 1958.

MEHTA, A. K. et al. The effect of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in animal models of depression and locomotor activity. *Nutritional Neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 233–238, 2013.

MERCHÁN ARENAS, D. R. et al. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and Eugenol derivatives employing ABTS decolorization. *Scientia pharmaceutica*, v. 79, n. 4, p. 779–791, 2011.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. Flora Brasileira. Disponível em:<<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2012/04/flora-brasileira>>.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 38, n. 6, p. 1170–1175, 2010.

NAKASHIMA, K. et al. Total synthesis of (-)-(7S,10R)-calamenene and (-)-(7S,10R)-2-hydroxycalamenene by use of a ring-closing metathesis reaction. A comparison of the cis- and trans-Isomers. *Molecules*, v. 7, n. 7, p. 517–527, 2002.

OGUNWAND, E. I. A. et al. Studies on the essential oils composition de *Eugenia uniflora*, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International Journal of Aromatherapy*, v. 15, p. 147–152, 2005.

OKIDA, M. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Eugenia cerasiflora* Miq., *E. mosenii* (Kausel) Sobral e *E. stigmatica* DC. Universidade Federal de São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, J. C. S. DE et al. Óleo essencial de *Eugenia uvalha* Cambess. Águas de Lindoia São Paulo. Sociedade Brasileira de Química, 2007.

OLIVEIRA, R. N. DE; DIAS, I. J. M.; CÂMARA C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 15, n. 1, p. 39–43, 2005.

OLIVEIRA, E. S. C. Investigação química e farmacológica de espécies vegetais contra a leishmaniose. 2012, 187 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Amazonas, Manaus 2012.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 7, p. 978–989, 2011.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria : *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 18, n. 5, p. 414–420, 2007.

PALOMBO, E. A; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 2-3, p. 151–157, 2001.

RAMOS, M. F. DE S. et al. Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian southeastern maritime forest (Restinga). *The Journal of Essential Oil Research*, v. 22, n. 2, p. 109–113, 2010.

RIBEIRO, J. E. L. DA S. et al. Flora da Reserva Ducke Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 800p.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. *The Journal Wood Science*, v. 58, p. 429–436, 2012.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.

SENNA, L. M. et al. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 2, p. 51–54, 2011.

SILVA, J. K. D. R. DA. Óleos essenciais bioativos : alternativa de desenvolvimento sustentável na Região Amazônica. Disponível em: <http://www.ufpa.br/campusmaraba/index/cache/publicacoes/joyce_silva_fisica1.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2014.

SILVA, N. C. C. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research*, v. 26, n. 16, p. 1510–1514, 2012.

SPITZER, C. M. O.S. Óleos Volateis. In: SIMOES, C. M. . et al. (Orgs.) *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 467-495

SOARES-SILVA, L. H. A Família Myrtaceae- Subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. 2000. 462 f. Tese (Doutorado) Campinas SP: Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2000.

SOUZA, A. DE et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 2, p. 175–179, 2010.

SOUZA, M. A. D. DE; KAWASAKI, M.L. HOLST, B. K. Myrtaceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S. et al. (Orgs) *Flora da Reserva Ducke guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. 1. ed. Manaus: INPA, 1999. p. 417-436.

STASI, L. C. DI; HIRAUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. ed. SÃO PAULO: UNESP, 2002. p. 606.

STEELE, C. L. et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 4, p. 2078–89, 23 jan. 1998.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *The Journal of Essential Oil Research*, v. 20, n. 1, p. 75–78, 2008.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

SUN, Y. et al. Synthesis and in vitro anti-proliferative activity of beta-elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 1118–1124, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 722

TRAJANO, V. N. et al. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 1001–1006, 2010.

WAYNE, P. *Performance Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard; 9 Edition*. Clinical and laboratory standards institute, v. 26, 2006.

WEYERSTAHL, P. et al. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Medica*, v. 54, p. 546–549, 1988.

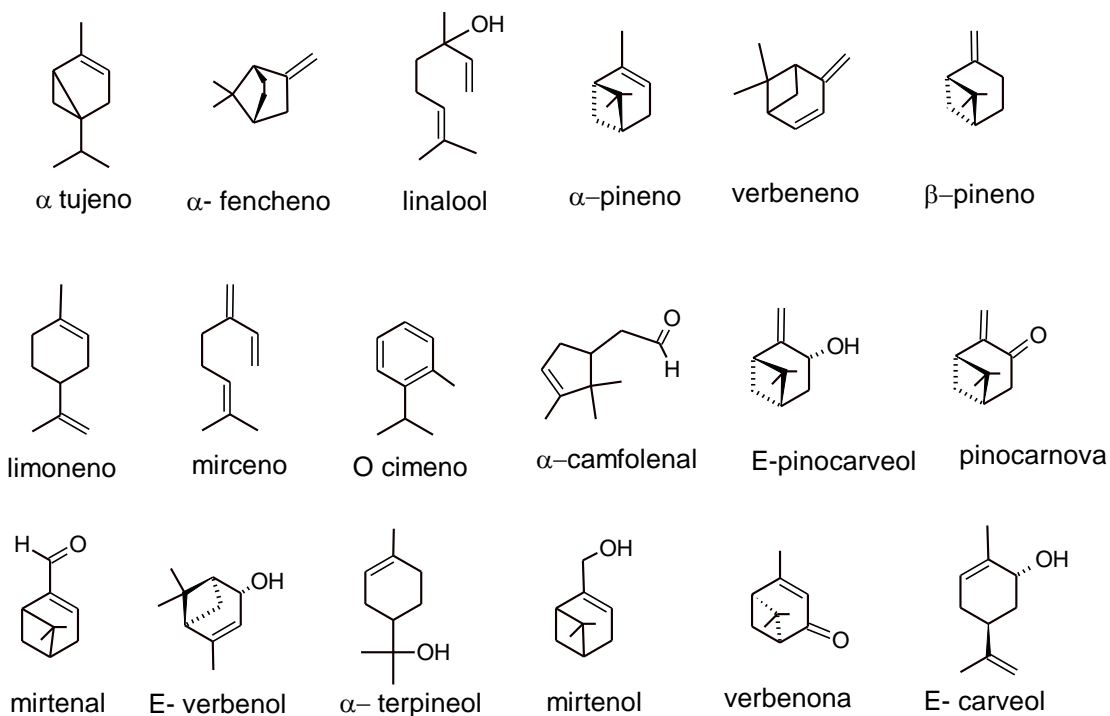
WIKLER, M. A. et al. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - ninth edition. CLSI, v. 26, n. 1, p. 1–35, 2006.

YAMAGUCHI, L. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades Biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. Química Nova, v. 36, n. 6, p. 826–830, 2013.

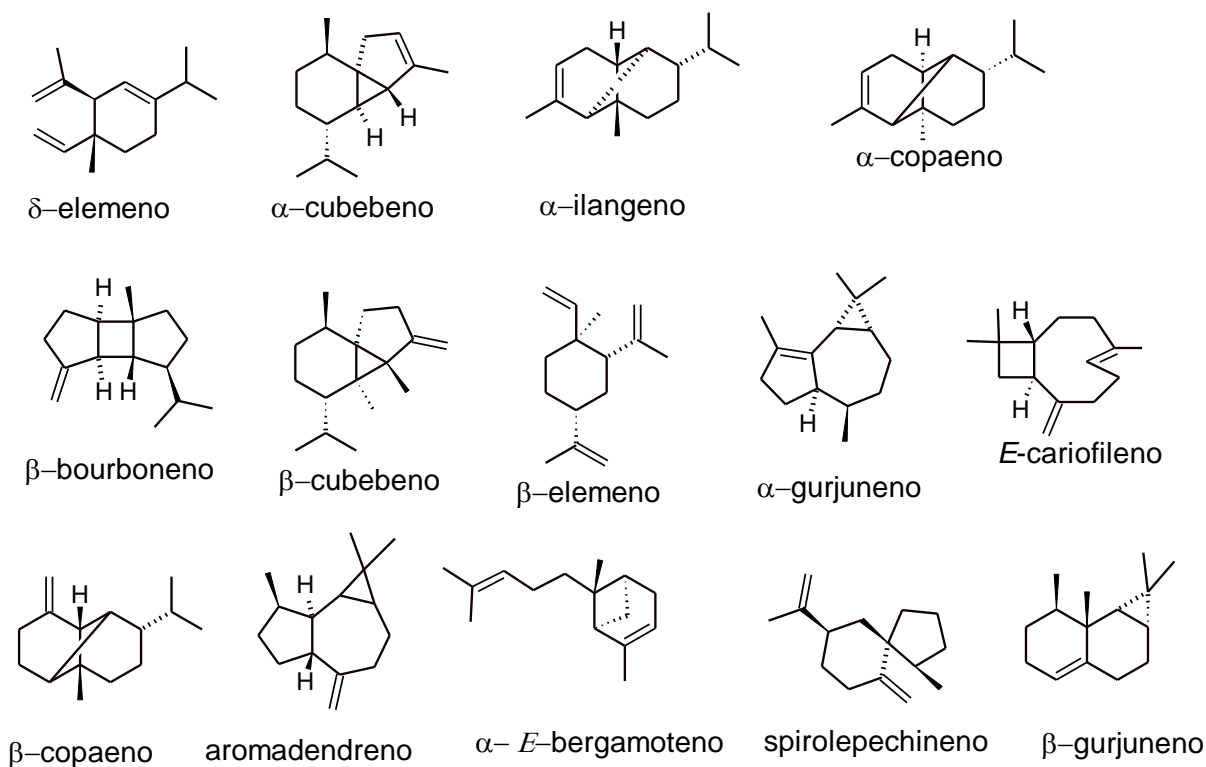
ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. Biochemical Systematics and Ecology, v. 39, n. 4-6, p. 660–665, 2011.

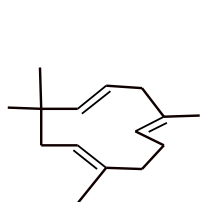
Anexo 1. Constituintes dos óleos essenciais de *Eugenia* spp.

Monoterpenos

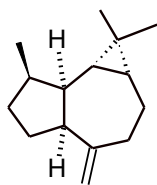


Sesquiterpenos

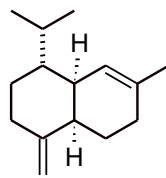




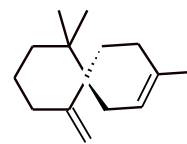
α -humuleno



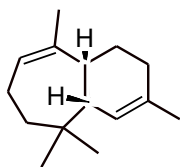
allo aromadendreno



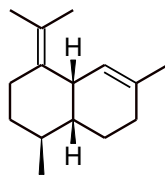
γ -muuroleno



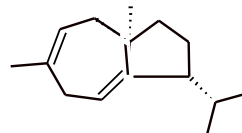
β -chamigreno



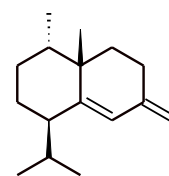
γ -himachaleno



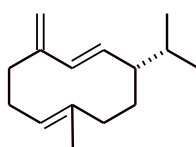
amofa-4,7(11)-dieno



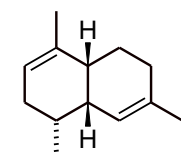
dauca-5,8-dieno



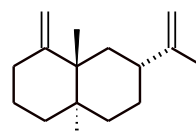
Z- muurola-3,5-dieno



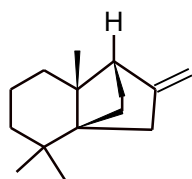
germacreno D



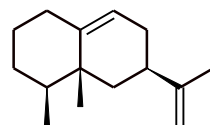
α -amorfeno



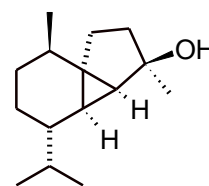
β -selineno



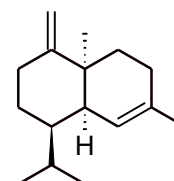
mirtail-4(12)-eno



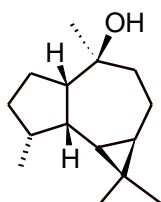
4,5- di-epi-aristolocheno



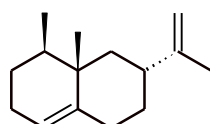
epi cubebol



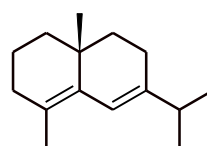
γ -amorfeno



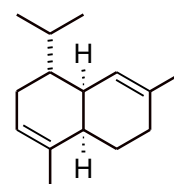
viridiflorol



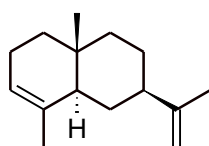
valenceno



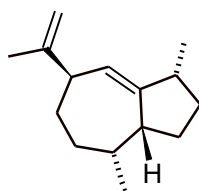
δ -selineno



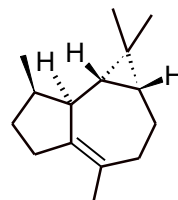
α -muuroleno



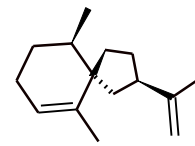
α -selineno



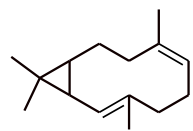
γ -gurjuneno



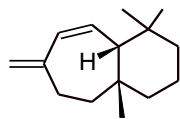
virifloreno



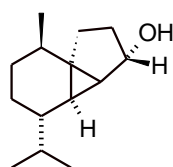
premnaspirodieno



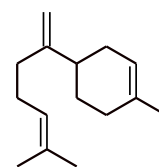
bicylogermacreno



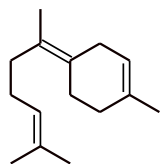
widdra-2,4(14)-diene



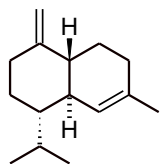
cubebol



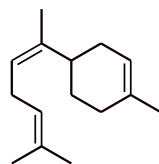
β -bisaboleno



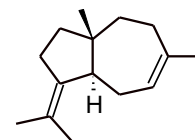
z- γ -bisaboleno



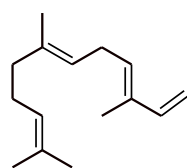
γ -cadineno



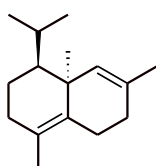
z α -bisaboleno



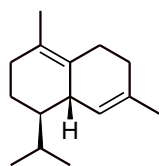
E-dauca-4(11),7-diene



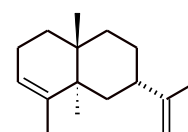
E,E- α -farneseno



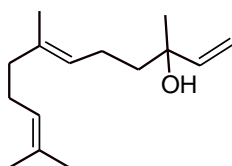
δ -amorfeno



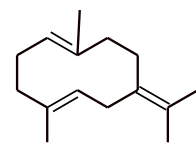
δ -cadineno



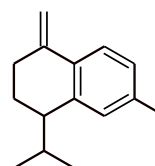
7 *epi*- α -selineno



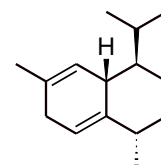
E-nerolidol



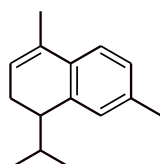
germacreno B



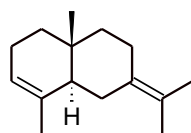
β -calacoreno



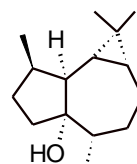
E-cadina-1,4-diene



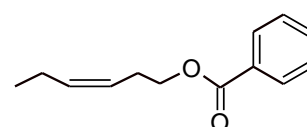
α -calacoreno



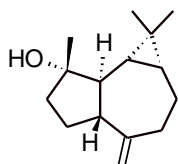
selina-3,7(11)-diene



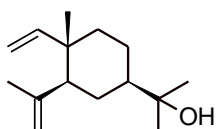
palustrol



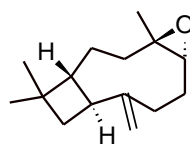
3*z*-hexenil benzoato



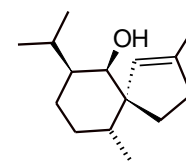
espatulenol



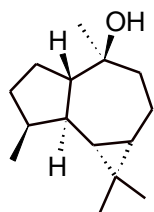
Elemol



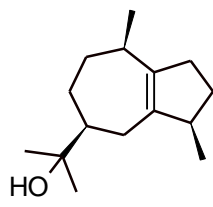
oxido de cariofileno



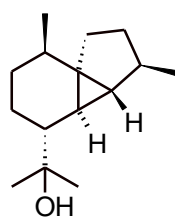
gleenol



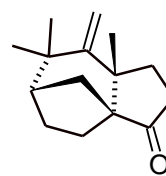
globulol



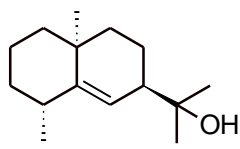
guaiol



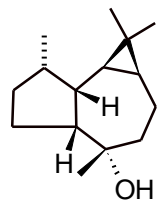
cubeban-11-ol



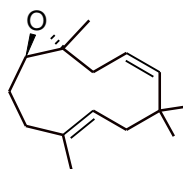
kusimona



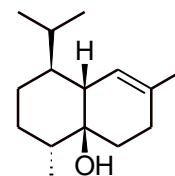
rosifoliol



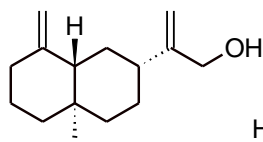
ledol



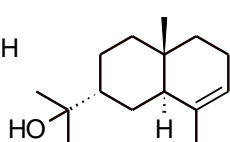
óxido de humuleno II



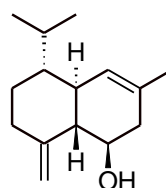
1 epi cubenol



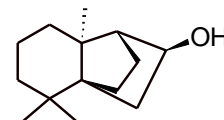
β -costol



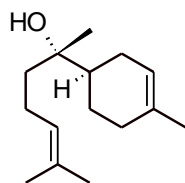
7 epi- α -eudesmol



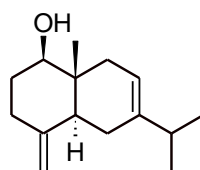
kusinol



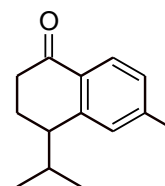
junicedranol



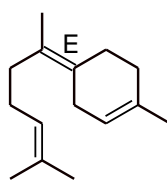
epi- α -bisabolol



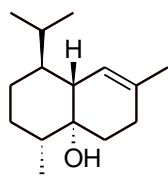
Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol



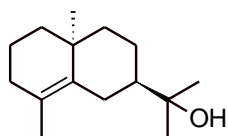
10 nor calamen-10-ona



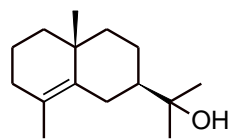
E- γ -bisaboleno



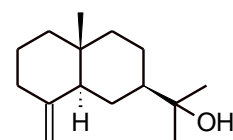
cubenol



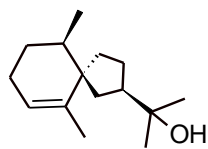
10 epi- γ -eudesmol



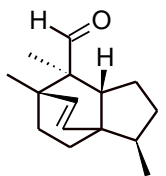
γ -eudesmol



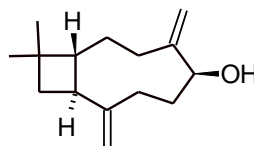
β -eudesmol



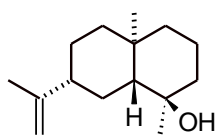
agarospirol



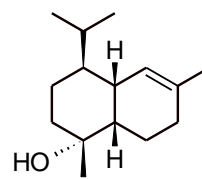
sin-sin-sin helifolen-12-al D



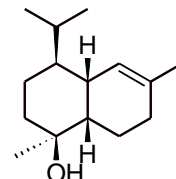
cariofila-4(12),8(13)-dien-5 β -ol



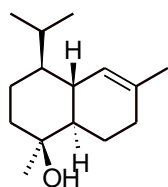
allo oxido aromadendreno



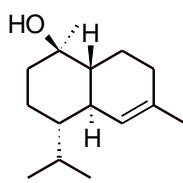
α -muurolol



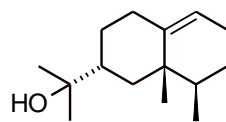
epi- α -muurolol



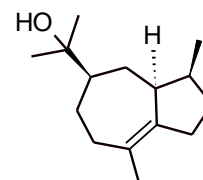
epi- α -cadinol



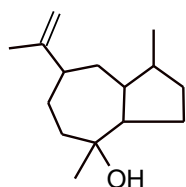
α -cadinol



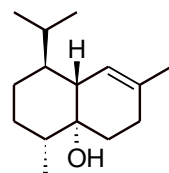
valerianol



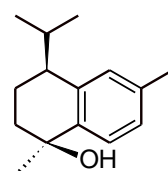
bulnesol



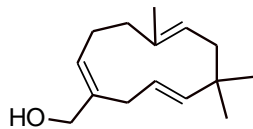
cubenol



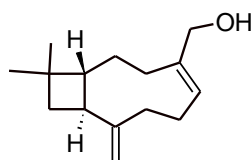
Z-calamene-10-ol



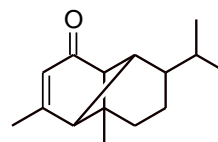
2E, 6Z farnesol



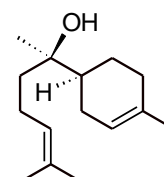
14- α -hidroxi humuleno



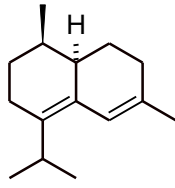
14 hidroxi-9-epi-E-cariofileno



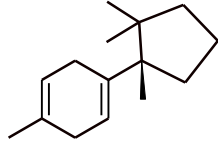
mustacona



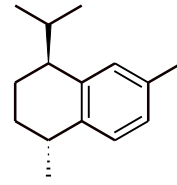
α -bisabolol



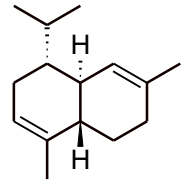
zonareno



γ -cupreneno



E-calameneno



α -cadineno