



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *EUGENIA* DO
CERRADO: COMPOSIÇÕES QUÍMICAS SAZONAIS,
MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NO B-CARIOFILENO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA**

Paulo Henrique Silva Ribeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucilia dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Brasília, DF

2015



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *EUGENIA* DO
CERRADO: COMPOSIÇÕES QUÍMICAS SAZONAIS,
MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NO β -CARIOFILENO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA**

Paulo Henrique Silva Ribeiro

Tese apresentada ao
PPG/IQ, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lucilia dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara

Brasília, DF

2015

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno (a) **Paulo Henrique Silva Ribeiro**, matrícula nº **11/0164857**, intitulada ***“Óleos essenciais de espécies de Eugenia do cerrado: composições químicas sazonais, modificações químicas no B-cariofileno e avaliação da atividade acaricida”***, apresentada no (a) Auditório Verde do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 7 de dezembro de 2015.

Profª Drª Maria Lucilia dos Santos
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Profª Drª Maria Márcia Murta
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Wender Alves da Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Membro Titular (IQ/UnB)

Dr. Roberto Fontes Vieira
Membro Titular (EMBRAPA)

Prof. Dr. Rafael Oliveira Rocha
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 7 de dezembro de 2015.

Dedico esse trabalho a Deus, Nossa Senhora, meus pais Antônio (in memoriam) e Maria Conceição, familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Maria Lucilia dos Santos pela oportunidade e orientação deste trabalho, sua enorme paciência, dedicação e ensinamentos a mim e seus demais alunos;

Ao professor Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara pela oportunidade deste trabalho, além de seus conhecimentos em Química de produtos naturais, com sua enorme paciência, dedicação e tempo para ouvir reclamações e sanar dúvidas;

Aos professores Dr. Wender Alves, Dr.^a Maria Márcia Murta, Dr. Guilherme Dotto Brand e ao Dr. Roberto Fontes Vieira (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) por, gentilmente, aceitarem o convite para participar da banca examinadora, cedendo tempo e conhecimento em favor deste trabalho;

À colega Dr.^a Flávia Born por, gentilmente, conduzir os testes biológicos de ação acaricida descritos neste trabalho;

Ao professor Dr. Christopher W. Fagg pelos ensinamentos botânicos, coletas e excisatas das espécies estudadas.

Aos colegas e amigos do LITMO, Thiago Vianna, Charley, Terezinha, pelo convívio amistoso no laboratório, com destaque para Leandro Andrade e Saulo Marques, pelo tempo, estudo e companhia nas horas do “sufoco” e problemas, como também pelas análises de RMN ¹H e ¹³C descritas neste trabalho;

Ao Instituto Federal de Brasília por ter me liberado 12 horas semanais que dediquei a este trabalho;

A meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Maria Conceição, pelos ensinamentos e a dedicação a mim e meus irmãos, pelos estudos e por mostrarem o caminho correto para se viver;

A Elisângela pelo apoio nos meus momentos críticos de desânimo e amargura como também pela paciência durante a escrita deste trabalho.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Esquemas	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução e Objetivos	1
1.1. Introdução	2
1.2. Objetivos	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Flora brasileira e características gerais do bioma cerrado	4
2.2. Óleos essenciais: considerações físicoquímicas e biológicas	9
2.2.1. Uso de óleos essenciais como inseticidas/acaricidas	18
2.3. β -cariofileno: um sesquiterpenos atraente	24
2.4. Ácaro rajado (<i>Tetranychus urticae</i> Koch, Acari: Tetranychidae)	26
2.5. Família Myrtaceae: aspectos botânicos e químicos	28
2.6. Gênero <i>Eugenia</i> : distribuição e uso medicinal	33
2.6.1. <i>Eugenia dysenterica</i> DC	35
2.6.2. <i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg	37
2.6.3. <i>Eugenia lutescens</i> Cambess	39
3. Materiais e Métodos	41
3.1. Determinação das composições químicas dos óleos essenciais e identificação do componente majoritário e comum nas folhas de <i>Eugenia</i>	42
3.1.1. Coleta das folhas de <i>Eugenia</i> para extração dos óleos essenciais	42
3.1.2. Coleta das folhas de <i>Eugenia</i> para análise dos voláteis no pós-colheita	42
3.1.3. Obtenção dos óleos essenciais das folhas de <i>Eugenia</i>	43
3.1.4. Análise dos óleos essenciais por Cromatografia gasosa (CG)	44
3.1.5. Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)..	44
3.1.6. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais	44
3.2. Testes Acaricidas	45
3.2.1. Criação de <i>Tetranychus urticae</i>	45
3.2.2. Bioensaio de fumigação	45
3.2.3. Teste de fecundidade (deterrência)	46
3.3. Análise estatística	47
3.4. Modificações químicas do composto majoritário e comum às espécies de <i>Eugenia</i>	47
3.4.1. Procedimentos gerais	47
3.4.2. Caracterização da matéria-prima (β -cariofileno 98,5%)	48
3.4.2.1. Dados do β -cariofileno 98,5% [(Z,1R,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undec-4-eno]	48
3.4.3. Preparação e caracterização do derivado 1 (4,12,12-Trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.04,6]dodecano)	49
3.4.3.1. Reação de epoxidação – Método 1	49

3.4.3.2. Reação de epoxidação – Método 2	50
3.4.4. Preparação do derivado 2 (4,11,11-Trimetil-8-metilenobicyclo[7.2.0]undecano-4,5-diol)	50
3.4.5. Preparação do derivado 3 (Acetato de 2-cloro-6-hidroxi-2,6,10,10-tetrametilbicyclo[7.2.0]undecan-5-ila)	51
3.4.6. Preparação dos derivados 4 e 5 via reação de ozonólise	52
3.4.6.1. Dados do derivado 4 (4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanal)	53
3.4.6.2. Dados do derivado 5 (ácido 4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanóico).....	53
4. Resultados e Discussão	54
4.1. Extração e rendimento dos óleos essenciais das folhas das espécies de <i>Eugenia</i>	55
4.2. Análise das composições químicas dos OE das folhas de <i>Eugenia</i> nos anos de 2012 e 2014 (PC e PS)	59
4.2.1. Análise da composição química dos OE por CG-EM	59
4.2.2. Análise estatística dos resultados empregando a técnica PCA	66
4.2.3. Composição química dos OE das folhas de <i>E. dysenterica</i> (EDY)	70
4.2.4. Composição química dos OE das folhas de <i>E. lutescens</i> (ELU)	72
4.2.5. Composição química dos OE das folhas de <i>E. langsdorffii</i> (ELA)	74
4.2.6. Estudo dos compostos volatilizados das folhas das espécies do gênero <i>Eugenia</i> estudadas em PC e PS do ano de 2014	76
4.3. Investigação da toxicidade dos OE das espécies de <i>Eugenia</i> , contra o <i>T. urticae</i> (ácaro rajado)	81
4.3.1. Toxicidade dos OE de <i>Eugenia</i> por fumigação	81
4.3.2. Ação inibitória da fecundidade (deterrência) dos OE de <i>Eugenia</i>	83
4.4. Obtenção e caracterização do β -cariofileno para uso como matéria-prima nas modificações químicas	85
4.5. Preparação dos derivados do β -cariofileno	96
4.5.1. Preparação do óxido de cariofileno (D-1)	96
4.5.2. Preparação do derivado 2 (D-2)	102
4.5.3. Preparação do derivado 3 (D-3)	111
4.5.4. Síntese dos derivados 4 e 5 (D-4 e D-5)	116
4.6. Toxicidade por fumigação dos derivados gerados por modificação química do β -cariofileno	125
5. Conclusões e Perspectivas	127
Bibliografia	131
Anexos	143

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica dos biomas brasileiros (A) e do cerrado (B) no território nacional	5
Figura 2. Distribuição de Latossolos no território nacional: Latossolos Vermelhos (A) e Amarelos/Vermelho-Amarelos (B)	7
Figura 3. Representação gráfica dos perfis de vegetação do tipo “floresta-ecótono-campo” do cerrado	7
Figura 4. Exemplos de terpenóides (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanoides encontrados em óleos essenciais	12
Figura 5. Aparelhagens empregadas para extração de óleos essenciais por arraste a vapor (A) e hidrodestilação (B)	17
Figura 6. Exemplos de piretroides, alcaloides e rotenoides	19
Figura 7. Exemplos de piretroides sintéticos da classe das aletrinas	20
Figura 8. Exemplos representativos de alguns acaricidas sintéticos comerciais.....	22
Figura 9. β -Cariofileno e alguns sesquiterpenos naturais correlacionados.....	24
Figura 10. Imagens do <i>T. urticae</i> Koch	27
Figura 11. Espécies representantes da família Myrtaceae	29
Figura 12. Perfil químico de amostras de espécies da família Myrtaceae	30
Figura 13. Exemplar de <i>Eugenia dysenterica</i> DC	36
Figura 14. Fruto de <i>Eugenia dysenterica</i> DC	37
Figura 15. Exemplar da espécie <i>E. langsdorffii</i>	38
Figura 16. Espécime de <i>E. lutescens</i> (direita) evidenciando as características frontal e dorsal das folhas	39
Figura 17 Detalhe da folha (esquerda) e partes aéreas com fruto na planta da espécie <i>E. lutescens</i> (direita)	40
Figura 18. Aparelhagem do tipo Clevenger usada na hidrodestilação das folhas de <i>Eugenia</i> (A) e ampliação evidenciando a separação do sistema óleo/água (B)	43
Figura 19. Cultura de <i>T. urticae</i> em feijão-de-porco	45
Figura 20. Sequência esquemática do teste de fumigação com os óleos essenciais	46
Figura 21. Dados históricos de sazonalidade do DF nos períodos de coleta (INMET).....	58
Figura 22. Terpenos majoritários encontrados nos OE das folhas das espécies de <i>Eugenia</i>	65
Figura 23. Análise PCA-1 para os compostos que apareceram mais de uma vez nas amostras..	67

Figura 24. Análise das PCA-2 para os compostos que apareceram mais de duas vezes nas amostras	68
Figura 25. Análise das PCA-3 para os compostos que apareceram mais de três vezes nas amostras	69
Figura 26. Amostragem das frações terpênicas nos OE de EDY em 2012 e 2014 (PC e PS)	70
Figura 27. Percentual relativo dos compostos principais dos OE de EDY em 2012 e 2014 (PC/PS)	71
Figura 28. Amostragem das frações terpênicas dos OE de ELU obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS)	72
Figura 29. Percentual relativo dos compostos principais dos OE de ELU em 2012 e 2014 (PC/PS)	73
Figura 30. Amostragem das frações terpênicas dos OE de ELA obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS)	75
Figura 31. Percentual relativo dos componentes principais dos OE de ELA em 2012 e 2014 (PC/PS)	76
Figura 32. Terpenos encontrados nos vapores das folhas das espécies de Eugenia em 2014 (PC e PS)	80
Figura 33. Comparação dos espectros de RMN ¹ H do β-cariofileno 98,5% (A) com o do β-cariofileno isolado do OE de <i>E. dysenterica</i> (B)	84
Figura 34. Comparação dos espectros de RMN ¹ H do β-cariofileno 98,5% (A - 600 MHz, CDCl ₃) com o do β-cariofileno isolado do OE de <i>E. dysenterica</i> (B - 300 MHz, CDCl ₃)	87
Figura 35. Conformêmeros de baixa energia de β-cariofileno com base em estudos de modelagem molecular	88
Figura 36. Equilíbrio entre as conformações β _α e β _β do β-cariofileno e dados da análise conformacional dos isômeros do referido composto	90
Figura 37. Comparação entre as regiões olefínicas do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da matéria prima e os dados das conformações β _α e β _β reportados na literatura (600 MHz, CDCl ₃)	90
Figura 38. Estruturas do β-cariofileno e das quatro conformações consideradas por Clericuzio e colaboradores (todos os hidrogênios dos anéis e os pertencentes aos C12 e C13 foram removidos)	91
Figura 39. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) na região diagnóstica dos hidrogênios olefínicos	94
Figura 40. Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (600 MHz, CDCl ₃) na região diagnóstica dos carbonos olefínicos	95
Figura 41. Espectro de massas do β-cariofileno e proposta estrutural para alguns fragmentos ...	96
Figura 42. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) na região diagnóstica de D-1	99

Figura 43. Espectro de massas do D-1 e proposta estrutural para alguns fragmentos	102
Figura 44. Estrutura química dos ligantes quirais presentes no β e α -Ad-mix	102
Figura 45. Ciclo catalítico da di-hidroxilação com AD-mix	104
Figura 46. Modelo minemônico para a seletividade enantiofacial (esquerda) e configuração estrutural de um éster monoglicolado de osmium (direita)	105
Figura 47. Ampliação da região diagnóstica do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de D-2 , com destaque para as duas hidroxilas	107
Figura 48. Ampliação do espectro de HSQC (RMN ^1H em 600 MHz, DEPT em 135 MHz, CDCl_3) de D-2 na região dos grupos metilênicos	108
Figura 49. Estrutura em perspectiva de D-2 na conformação mais estável (superior) e projeção no eixo C5-C4 (inferior) com a provável esterequímica dos centros assimétricos gerados	110
Figura 50. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de D-3 evidenciando as regiões diagnósticas de H1, H5, H9 e a metila do grupo acetila	112
Figura 51. Mecanismo da reação de hidratação da dupla exocíclica	113
Figura 52. Expansão do espectro de HSQC (RMN ^1H = 600 MHz e DEPT = 135 MHz, CDCl_3) na região diagnóstica dos grupos metilênicos do D-3	114
Figura 53. Espectro de massas do D-1 e proposta estrutural para alguns fragmentos	116
Figura 54. Mecanismo da ozonólise proposta por Criegee	118
Figura 55. Proposta de mecanismo para a formação D-4 e D-5 via ozonólise do β -cariofileno	119
Figura 56. Região diagnóstica do espectro de IV (ATR) de D-4 (A) e D-5 (B)	120
Figura 57. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) nas regiões diagnósticas de D-4	121
Figura 58. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) nas regiões diagnósticas de D-5	122
Figura 59. Comparação das regiões de carbonilas/carboxila do espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de D-4 e D-5	123
Figura 60. Resultados obtidos nos testes de fumigação dos derivados e do β -cariofileno na concentração estimada na CL_{95}	127

Lista de Esquemas

Esquema 1. Elementos de correlação básica entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário das plantas	10
Esquema 2. Relação do metabolismo do carbono com as rotas sintéticas dos metabólitos secundários	11
Esquema 3. Biossíntese do ácido mevalônico e sua conversão em pirofosfato de isopententalila (IPP) e/ou pirofosfato de dimetilalila (DMAPP).....	14
Esquema 4. Formação de terpenos via os precursores IPP e DMAPP	15
Esquema 5. Conversão de 9-epi- β -cariofileno e β -cariofileno no cetoálcool triciclo	89
Esquema 6. Epoxidação do β -cariofileno por duas variantes de metodologias clássicas.....	97
Esquema 7. Formação de D-2 via de di-hidroxilação de Sharpless	106
Esquema 8. Reação de obtenção do D-3 via acetilação por cloreto de acetila	111
Esquema 9. Reação de ozonólise do β -cariofileno e obtenção de D-4 e D-5	117

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos terpenos com base no número de subunidades de isopreno	13
Tabela 2. Classificação de pesticidas por ações biológicas	21
Tabela 3. Substâncias identificadas em diversas espécies de Myrtaceae	32
Tabela 4. Usos populares de diferentes espécies de <i>Eugenia</i>	34
Tabela 5. Rendimentos percentuais obtidos para OE das folhas de das espécies <i>Eugenia</i> obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS)	55
Tabela 6. Constituintes químicos identificados nos OE das folhas das espécies de <i>Eugenia</i> coletadas nos anos de 2012 e 2014 (PC e PS)	60
Tabela 7. Número de vezes que o composto apareceu nas amostras	66
Tabela 8. Constituintes químicos identificados nos vapores das folhas das espécies de <i>Eugenia</i> coletadas em ambas estações de 2014	78
Tabela 9. Parâmetros dos ensaios e toxicidade fumigante dos óleos essenciais de <i>Eugenia</i> obtidos em 2012 (PC e PS) contra <i>T. urticae</i>	82
Tabela 10. Comparação dos dados de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do β-carifileno 98,5% com dados da literatura.....	92
Tabela 11. Comparação dos dados de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) do β-carifileno 98,5% com dados da literatura	93
Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de D-1 (isômeros β α e β β) com os dados encontrados na literatura para óxido de cariofileno.....	100
Tabela 13. Comparação dos dados de RMN ¹³ C de D-1 (isômeros β α e β β) com os dados encontrados na literatura para óxido de cariofileno	101
Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) assinalados para D-2 com dados da literatura para o 4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno	109

Tabela 15. Assinalamento dos hidrogênios dos grupos metilênicos com base nas correlações de HMBC e HSQC	113
Tabela 16. Dados do RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) de D-3	115
Tabela 17. Comparação dos dados de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do D-4 e D-5 com dados da literatura	124
Tabela 18. Comparação dos dados de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) do D-4 e D-5 com dados da literatura	125
Tabela 19. Toxicidade por fumigação do composto β-cariofileno sobre <i>T. urticae</i>	126

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

AchE	Acetilcolinesterase
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
(DHQD) ₂ PHAL	Aduto ftalazina-diidroquinidina
(DHQ) ₂ PHAL	Aduto ftalazina-diidroquinina
PCA	Análise de Componentes Principais
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização
CoA	Coenzima-A
HSQC	Correlação heteronuclear individual-quântica
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
FID	Detector de ionização de chama
eq	Equivalente(s)
EP	Erro padrão médio
EM	Espectrometria de massas
R _f	Fator de retenção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
GL	Grau de Liberdade
IV	Infravermelho
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IC	Intervalo de confiança
IE	Impacto eletrônico
n	Número de ácaros/dose
OE	Óleos essenciais
PC	Período chuvoso
PS	Período seco
RT	Razão de toxicidade
ATR	Reflectância atenuada total
RMN	Ressonância magnética nuclear

RESUMO

O presente trabalho investigou a composição química dos óleos essenciais (OE) das folhas das espécies *Eugenia langsdorffii* (ELA), *Eugenia dysenterica* (EDY) e *Eugenia lutescens* (ELU) coletados nos períodos chuvoso (PC) e seco (PS) dos anos de 2012 e 2014. Os OE foram extraídos por hidrodestilação e os rendimentos percentuais observados para EDY e ELU, foram muito semelhantes nos dois anos/períodos de coleta e os melhores rendimentos foram observados em PC. Ao contrário, foi observada uma grande variação percentual para ELA, que exibiu maiores teores em PS. A composição química foi determinada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), onde se observou uma grande variabilidade sazonal intraespécie no quantitativo de monoterpenos e sesquiterpenos. De forma geral, os OE apresentaram notáveis teores de β -cariofileno, δ -cadineno, α e β -pineno, limoneno, biciclogermacreno e espatulenol. O sesquiterpeno β -cariofileno foi encontrado com elevado percentual em todos OE, independente da fase de coleta, podendo ser considerado como um marcador químico das espécies. Os OE obtidos no ano de 2012 foram testados contra *Tetranychus urticae* (ácaro rajado) e, interessadamente, todos apresentaram atividade acaricida, sendo que *E. langsdorffii* (PS/2012) exibiu o melhor resultado ($CL_{50} = 1,58 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar). β -Cariofileno, um dos componentes majoritário e comum a todas as espécies, foi isolado do OE de *E. dysenterica* por cromatografia em coluna dopada com nitrato de prata e comparado com padrão adquirido comercialmente por IV, CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C bem como testado sua atividade acaricida, exibindo $CL_{50} = 4,7 \times 10^{-2} \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar. Adicionalmente, o β -cariofileno comercial foi submetido a diversas modificações químicas para fornecer cinco derivados, os quais foram caracterizados por métodos espectrométricos como sendo óxido de cariofileno; 4,5-dihidróxi-cariofil-8(15)-eno; acetato de 4,8-dihidróxi-cariof-5-ila; aldeído β -nocariofilon e ácido β -nocariofilônico. A atividade acaricida destes derivados somente foi observada na CL_{95} do β -cariofileno ($97,78 \pm 1,11$ % de letalidade), sendo o melhor resultado de letalidade observada para o aldeído β -nocariofilon ($5,71 \pm 1,20$ %). Além da determinação da composição química, este estudo mostrou os períodos de maior produção e atividade acaricida dos OE das três espécies de *Eugenia*.

Palavras-chave: *Eugenia*, óleos essenciais, acaricida, β -cariofileno.

ABSTRACT

The present work investigated the chemical composition of the leaf essential oils (EO) of the species *Eugenia langsdorffii* (ELA), *Eugenia dysenterica* (EDY) and *Eugenia lutescens* (ELU) collected during the rainy (RS) and dry (DS) seasons of the years 2012 and 2014. The EO were extracted by hydrodistillation and the percentage yields observed for EDY and ELU were very similar in both years/collection periods and the best yields were observed in RS. Unlike, it was observed a large variation for ELA which exhibited higher amount in DS. The chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), where it was observed a large seasonal variability intra species. The global data show that the chemical profile of the EO varied in quantity of monoterpenes and sesquiterpenes. Overall, the EO featured notable amount of β -caryophyllene, δ -cadinene, α and β -pinene, limonene, bicyclogermacrene and spathulenol. The sesquiterpene β -caryophyllene can be considered as a chemical marker for the species, as it was found with high percentage in all EO, independent of the collection phases. The EO obtained in 2012 were tested against *Tetranychus urticae* (spotted spider mite) and, interestingly, all showed acaricide activity, being *E. langsdorffii* (DS/2012) that exhibited best result ($CL_{50} = 1,58 \mu\text{L.L}^{-1}$ of air). The β -caryophyllene, one of the major component and common to all species, isolated from *E. dysenterica* by chromatography column doped with silver nitrate, compared to stand purchased commercially by IR-FT, GC-MS, and NMR (^1H and ^{13}C) and also tested for acaricide activity, displaying $CL_{50} = 4,7 \times 10^{-2} \mu\text{L.L}^{-1}$ of air. Additionally, the commercial β -caryophyllene was subjected to various chemical modifications to afford five derivatives, which were characterized by spectrometric methods as being caryophyllene oxide; 4,5-dihydroxy-caryophyl-8(15)-ene; caryoph-4,8-dihydroxy-5-yl acetate; β -nocaryophyllone aldehyde and β -nocaryophyllonic acid. The acaricide activity against *T. urticae* of these derivatives was only observed at β -caryophyllene CL_{95} ($97,78 \pm 1,11\%$ of lethality), and the best result of lethality was for the β -nocaryophyllone aldehyde ($5,71 \pm 1,20\%$). Beyond the chemical composition, this study showed periods of increased oil production and acaricidal activity.

Keywords: *Eugenia*, essential oils, acaricidal, β -caryophyllene

Introdução e Objetivos

1.1. Introdução

A potencialidade do bioma Cerrado como fonte de substâncias interessantes, sob o ponto de vista químico e biológico, tem despertado grande interesse e atraído investimentos em pesquisa e desenvolvimento.

A abordagem geral do presente trabalho é identificar a composição micromolecular dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Eugenia* que ocorrem no bioma cerrado e conduzir a avaliação da atividade acaricida dos óleos, do terpeno majoritário e comum às espécies bem como dos seus derivados visando a descoberta de inseticidas botânicos contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), uma praga agrícola de importância mundial.

1.2. Objetivos:

- A. Determinar as composições químicas dos óleos essenciais das folhas das espécies *Eugenia dysenterica*, *Eugenia langsdorffii* e *Eugenia lutescens* nos anos de 2012 e 2014, em duas estações: chuvosa (Março/Abril) e seca (Agosto/Setembro) e através de Análise de Componentes Principais (PCA) sobre as amostragens ordenar os constituintes;
- B. Verificar a ocorrência de variação sazonal nos óleos essenciais das folhas das espécies de *Eugenia*, por comparação da composição química dos óleos de folhas coletadas nos diferentes períodos de coleta (ano/estação);
- C. Estimar as concentrações letais médias (CL₅₀) dos óleos essenciais, sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) e comparar a toxicidade relativa entre os óleos testados;
- D. Identificar o terpeno majoritário e comum aos óleos essenciais em estudo, compará-lo com o correspondente padrão comercial e estimar a CL₅₀ deste sobre o ácaro rajado;
- E. Realizar modificações moleculares no terpeno majoritário visando potencializar a atividade acaricida;
- F. Estimar a toxicidade relativa dos derivados formados sobre o ácaro rajado em comparação ao resultado encontrado para o terpeno majoritário.

Revisão

Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Flora brasileira e características gerais do bioma cerrado

Em números atuais, a flora brasileira tem 46.097 espécies reconhecidas.¹ O maior grupo de plantas componentes da flora brasileira são as Angiospermas, que dominam praticamente todos os ambientes terrestres, incluindo terras cultiváveis, sendo também consideradas as mais importantes economicamente pelo vasto emprego nas áreas alimentícia, madeireira, farmacêutica e ornamentação.²

O Brasil caracteriza-se por uma enorme riqueza da flora, possuindo aproximadamente 22% das espécies de plantas existentes no planeta,³ sendo estas espécies distribuídas em vários biomas. O termo “bioma” (“bios” = vida e “oma” = grupo) foi inicialmente utilizado pelo botânico Frederic Edward Clements (1874-1945) que o definiu como uma unidade biológica ou mesmo espaço geográfico, caracterizado por macroclimas, fitofisionomia, solo e altitude.^{4,5} Atualmente, bioma tem como definição tipos de flora e fauna característicos de uma região com condições ambientais específicas.⁶

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil tem seis biomas distintos: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa (Figura 1A).⁷ O cerrado brasileiro, com cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados, ocupa aproximadamente 23% do território nacional. Ocorre em 10 estados e no Distrito Federal (Figura 1B),⁸ apresentando-se como o segundo maior ponto de biodiversidade nacional, perdendo apenas para o bioma amazônico,⁹ e ainda pouco explorado pela indústria e ciência no que tange a bioprospecção de compostos ativos ou mesmo mistura de compostos.

¹<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>, acessado em dezembro de 2015.

² Rates, S.M.K.; *Toxicon* **2001**, 39, 603.

³ Mariante, A.S.; Sampaio, M.J.A.; Inglis, M.C.V.; *Informe Nacional sobre a Situação dos Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura do Brasil*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Brasília, DF, 2008.

⁴ Coutinho, M.L.; *Acta Bot. Bras.* **2006**, 20, 13.

⁵ Figueiró, A.S.; *Rev. Geonorte* **2012**, 4, 57.

⁶ Clements, F.E.; Shelford, V.E.; *Bio-ecology*, J. Wiley, New York, EUA, 1939.

⁷ <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtml>, acessado de setembro de 2015.

⁸ Sano, E.E.; Rosa, R.; Brito, J.L.S.; Ferreira, L.G.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2008**, 43, 153.

⁹ Klink, C. A.; Machado, R. B. A.; *Megadiversidade* **2005**, 1, 147.

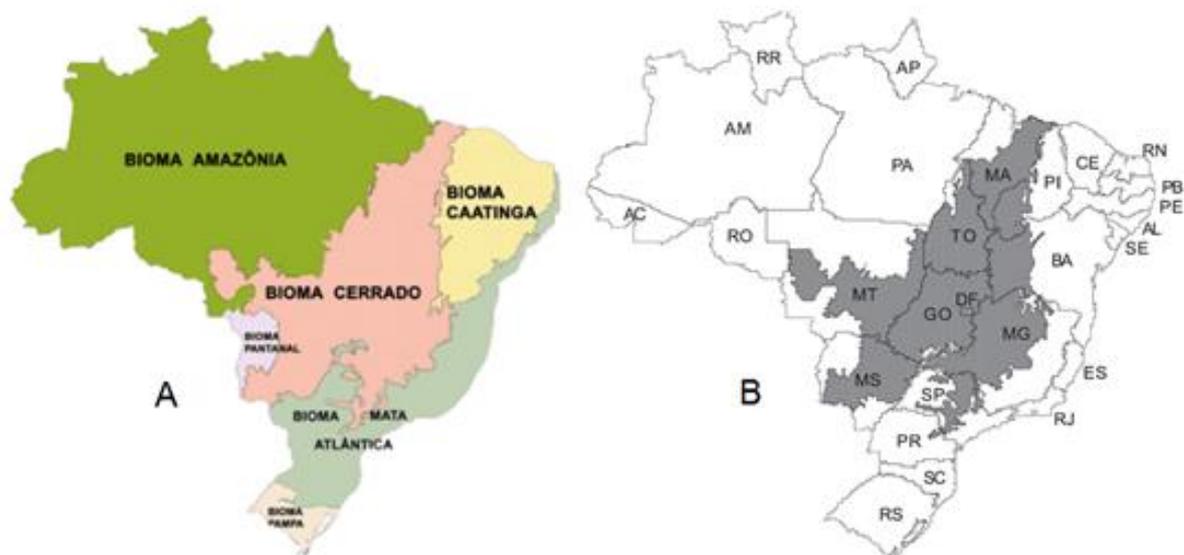


Figura 1. Distribuição geográfica dos biomas brasileiros (A) e do cerrado (B) no território nacional [adaptada das ref. 7 e 8].

O bioma cerrado caracteriza-se por apresentar uma grande diversidade de paisagens, composta por diferentes tipos de formações vegetativas. Destaca-se por possuir mais de 12.000 espécies de plantas vasculares catalogadas,¹⁰ fato que vem estimulando estudos de bioprospecção de compostos químicos com potencial para uso medicinal.¹¹ Mais de 220 espécies do cerrado destacam-se pelo uso medicinal e mais de 416 são usadas na recuperação de solos degradados visando proteção contra erosão ou mesmo criação de habitat de predadores naturais para combater pragas. Muitas espécies de plantas do cerrado possuem frutos comestíveis, como o pequi (*Caryocar brasiliense*), araticum (*Annona crassiflora*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), banha de galinha (*Swartzia langsdorffii*), dentre outras.^{12,13}

O clima predominante no cerrado é o tropical sazonal, com ocorrência de seca no inverno, onde as temperaturas oscilam anualmente entre 22 e 23 °C (mínimos) e 40 °C (patamares máximos). Os índices pluviométricos local têm médias anuais de 1200 a 1800 mm, sendo os maiores valores encontrados nos meses de outubro a março. Durante esta estação chuvosa podem ocorrer pequenos períodos de seca denominados de “veranicos”, capazes de causar problemas às plantas e, conseqüentemente, ao setor agrícola. No intervalo de maio a setembro, as chuvas reduzem

¹⁰ Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T.; Silva Júnior, M.C.; Rezende, A.V.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E.; Fagg, C.W.; In: Cerrado: Ecologia e Flora; Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J.F., (eds) - Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2008, vol. 2, cap. 15.

¹¹ Bessa, N.G.F.; Borges, J.C.M.; Beserra, F.P.; Carvalho, R.H.A.; Pereira, M.A.B.; Fagundes, R.; Campos, S.L.; Ribeiro, L.U.; Quirino, M.S.; Chagas Junior, A.F.; Alves, A.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2013**, *15*, 692.

¹² <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, acessado em setembro de 2013.

¹³ Roesler, R.; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Holanda, R.B.; Sousa, C.A.S.; Pastore, G.M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 53.

drasticamente, podendo até zerar o índice pluviométrico. Essa escassez de água resulta na estação de seca que pode durar de três a cinco meses por ano. Durante a estação seca, pode ocorrer a formação de nevoeiros nas primeiras horas do dia, com deposição de orvalho da manhã sobre as plantas e também sobre o solo, umedecendo-o. No decorrer do dia, a umidade relativa do ar decai apreciavelmente, podendo chegar ao nível de aproximadamente 15%, sobretudo nos meses que vão de julho a agosto.¹⁴

O solo do cerrado é formado por dois tipos de Latossolos, o Vermelho e o Vermelho-Amarelo. O Distrito Federal tem 54,47% da composição de seu solo formada por Latossolos, onde deste montante 38,63% é de Latossolos Vermelhos (Figura 2A), anteriormente conhecido por: Latossolos Vermelho-Escuros e 15,84% de Latossolos Vermelho-Amarelos (Figura 2B). Estes Latossolos têm baixos teores de silte, pequenas partículas que formam o solo, juntamente com a areia e a argila, onde a diferença está no tamanho entre elas.¹⁵ O silte contém quantidades variáveis de argila (de 15 a 80%) e por isso são classificados como: excessivamente drenador, fortemente drenador ou apenas drenador, sendo este efeito dependente da textura, da estrutura e da topografia do terreno.¹⁶

Os Latossolos Vermelhos e Vermelho-Amarelos têm alta permeabilidade a água, na faixa de até 2 m de profundidade. A disponibilidade de água no solo varia em média de 500 a 760 mm em solos muito argilosos, de 300 a 500 mm em solos argilosos e de 260 a 330 mm em solos pouco argilosos.¹⁶ Em época de seca, espécies de árvores (com enraizamento profundo) que habitam o Cerrado e a Floresta Amazônica absorvem água das camadas mais profundas (e também mais úmidas) do solo, depositando-a perto da superfície. Estas árvores com grandes enraizamentos e outras com raízes menores/curtas se beneficiam quanto ao acesso à umidade, desta forma são menos drásticos os efeitos da escassez de água durante o período seco.¹⁷

¹⁴ Coutinho, L.M.; Em Eugen Warming e o Cerrado Brasileiro: um Século Depois, Klein, A.L. (org); Editora Unesp, São Paulo, SP, **2002**.

¹⁵ Martins, E.S.; Reatto, A.; Carvalho Junior, O.A.; Guimarães, R.A.; *Evolução Geomorfológica do Distrito Federal*, Embrapa, Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, 2004.

¹⁶ Mota, F.O.B.; Oliveira, J.B.; *R. Bras. Ci. Solo* **1999**, 23, 799.

¹⁷ Lopes, R.J.; *Rev. Pesquisa Fapesp* **2008**, 151, 53.

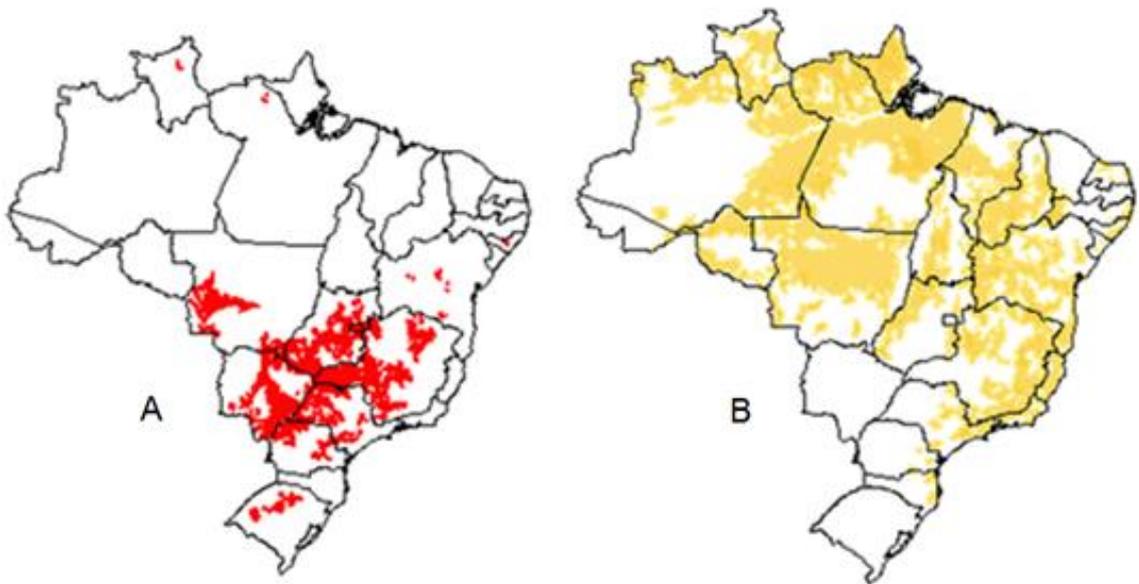


Figura 2. Distribuição de Latossolos no território nacional: Latossolos Vermelhos (A) e Amarelos/Vermelho-Amarelos (B) [adaptada das ref. 18 e 19].

Em relação à flora do cerrado, Castro e colaboradores²⁰ definem que a sua maior composição é do tipo herbáceo-subarbustivas, seguida pelo arbustivo-arbóreas. As diferenças fisionômicas é um dos aspectos que marcam o cerrado, assim existem várias formas de classificá-lo, com destaque para classificação de Coutinho²¹ que propõe o conceito de "floresta-ecótono-campo". Este conceito sugere que o mosaico das fisionomias se dá inicialmente pela formação campestre, passando por intermediárias (sendo ecótono uma comunidade mista ou mesmo uma área de transição entre dois ambientes vizinhos) e concluindo na formação florestal (Figura 3).

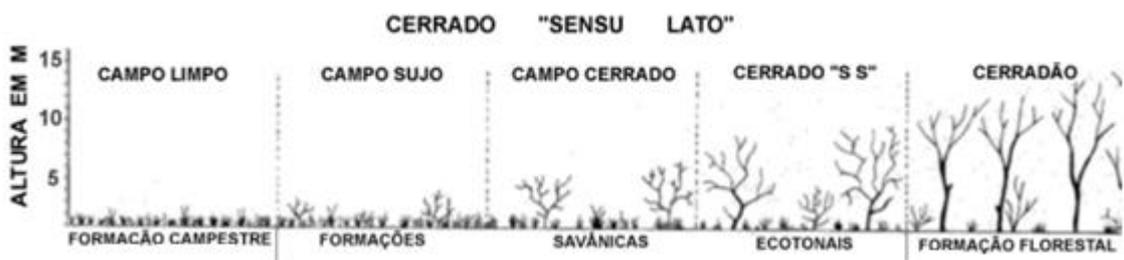


Figura 3. Representação gráfica dos perfis de vegetação do tipo "floresta-ecótono-campo" do cerrado [adaptada da ref. 21].

¹⁸ <http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portuques/CLVNFerrico.htm>, acessado em setembro de 2015.

¹⁹ <http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portuques/CLVAmarelo.htm>, acessado em setembro de 2015.

²⁰ Castro, A.A.J.F.; Martins, F.R.; Tamashiro, J.Y.; Shepherd, G.J.; *Ann. Missouri. Bot. Gard.* **1999**, 86, 192

²¹ Coutinho, L.M.; *Rev. Brasil. Bot.* **1978**, 1, 17.

Outra descrição da composição florística do cerrado foi feita por Ribeiro & Walter²² que relatam a existência de onze modelos fitofisionômicos: florestal (cerradão, mata seca, mata de galeria e mata ciliar), savânico (vereda, palmeiral, parque de cerrado e cerrado *stricto sensu* (“S S”) e campestre (campo sujo, campo rupestre e campo limpo). O cerrado *sensu stricto* é o mais abundante com aproximadamente 70% de ocupação no cerrado,²³ apresentando árvores tortuosas, inclinadas e de pequeno porte, com ramificações irregulares e retorcidas. Com isso, estas diferenças fisionômicas mostram a competitividade entre os estratos, que se diferenciam pela flora, profundidade de seus sistemas radiculares, comportamento em meio à seca, fogo, dentre outros.²⁴

Para além dos fatores filogenéticos e endógenos/internos, diferenciações nas composições florísticas, no modelo/tipo de solo e quanto aos efeitos edafoclimáticos (fatores climáticos, relevo, temperatura, umidade do ar, etc.) do cerrado podem estimular alterações nas plantas no que tange a composição química de seus ativos biológicos.

Compostos biológicos são denominados ativos, quando exercem uma atividade específica sobre um ser vivo. Existe uma diversidade de compostos orgânicos naturais oriundos de espécies vegetais, produzidos via metabolismo secundário, que podem exibir ação larvicida,²⁴ atividade antioxidante,²⁵ analgésica e anti-inflamatória,²⁶ fungicida,²⁷ antitumoral²⁸ e outras. Adicionalmente, como fontes naturais de diversos princípios ativos inseticidas e/ou antimicrobianos que são formados pelas próprias plantas no intuito de combater o ataque de insetos e microorganismos, as plantas por meio dos ativos químicos (p.e. óleos essenciais) podem ser empregadas no controle de insetos antes mesmo da utilização de compostos orgânicos sintéticos.²⁹

Os princípios ativos vegetais que tem atividade inseticida, em geral, atuam por três distintos mecanismos: fumigação, ingestão e/ou contato,³⁰ podendo ser utilizados na forma de extratos orgânicos, extratos aquosos ou até mesmo os próprios óleos essenciais. Esses preparados podem ser usados em concomitância com outras táticas de controle, por exemplo, controle biológico e plantas resistentes.^{31,32} Assim, os estudos relativos às atividades biológicas dos extratos vegetais são bastante interessantes, em especial, dos seus óleos essenciais, no intuito de identificar e entender os seus potenciais inseticidas.³³

²²Ribeiro, J.F.; Walter, B.M.T; *Fitofisionimias do bioma do cerrado: os biomas do Brasil*. Em: *Cerrado: ambiente e flora*, Embrapa, Planaltina, DF, pág. 89-116, 1998.

²³Felfili, J.M.; Nogueira, P.E.; Silva Júnior, M.C.S.; Marimon, B.S.; Delitti, W.B.C.; *Acta Botânica Brasilica* **2002**, *16*, 103.

²⁴Furtado, R.F.; Lima, M.G.A.; Andrade Neto, M.; Bezerra, J.N.S.; Silva, M.G.V.; *Neotrop Entomol.* **2005**, *34*, 843.

²⁵Wannes, W.A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M.B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M.E.; Marzouk, B.; *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1362.

²⁶Mendes, S.S.; Bomfim, R.R.; Jesus, H.C.R.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Estevam, C.S.; Antonioli, A.R.; Thomazzi, S.M.; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *129*, 391.

²⁷Carmo, E.S.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 362.

²⁸da Silva, S.L.; Chaar, J.S.; Figueiredo, P.M.S.; Yano, T.; *Acta Amaz.* **2008**, *38*, 107.

²⁹Mann, R.S.; Kaufman, P.E.; *Mini-Rev. Org. Chem.* **2012**, *9*, 185.

³⁰Coutinho, R. L. B. C.; Oliveira, J. V.; Gondim Junior, M. G. C.; Câmara, C. A. G.; *Ciênc. Agrotec.* **2011**, *35*, 172.

³¹Ketoh, G.K.; Koumaglo, H.K.; Glitho, I.A.; *J. Stored Produc. Resea.* **2005**, *41*, 363.

³²Corrêa, J.C.R.; Salgado, H.R.N.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2011**, *13*, 500.

³³Novaes, P.; Molinillo, J.M.G.; Varela, R.M.; Macías, F.A.; *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 839.

Os óleos essenciais são constituídos basicamente por substâncias terpênicas e seus análogos terpenóides, que apresentam elevada potencialidade no controle de pragas, com grande interferência na parte fisiológica e comportamental dos insetos, podendo até serem letais.³⁴

2.2. Óleos essenciais: considerações físicoquímicas e biológicas.

Óleos essenciais são substâncias odoríferas presentes nas plantas e que exibem diversas funções: inibidores da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura, dentre outras.³⁵

Os compostos produzidos pelas plantas durante a fotossíntese são precursores primários de diversas classes de compostos, tais como, aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e clorofilas.³⁶ Os processos bioquímicos que formam e degradam estes compostos são conhecidos como metabolismo primário, e estas substâncias são denominadas metabólitos primários, já as micromoléculas que tem produção e distribuição mais restrita nas espécies vegetais são denominadas metabólitos secundários.³⁷ Os metabólitos primários são os compostos que participam dos processos metabólicos essenciais da planta (crescimento, desenvolvimento e reprodução), enquanto os metabólitos secundários ou especiais são os que influenciam nas interações das plantas com o seu meio ambiente.^{38,39}

O Esquema 1 mostra as interconexões entre os produtos gerados no metabolismo primário com o metabolismo secundário, onde se verifica que a partir de um número limitado de precursores é produzida uma gama de compostos encontrados nas plantas.⁴⁰

³⁴Prates, H.T.; Santos, J.P.; *Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados*, Em: Lorini, I.; Miike, L.H.; Scussel, V.M. (Ed.). *Armazenagem de Grãos*, Campinas: IBG, 2002, cap. 7.3, p. 443-461.

³⁵Knaak, N.; Fiuza, L.M.; *Neotropical. Biol. Conserv.* **2010**, 5, 120.

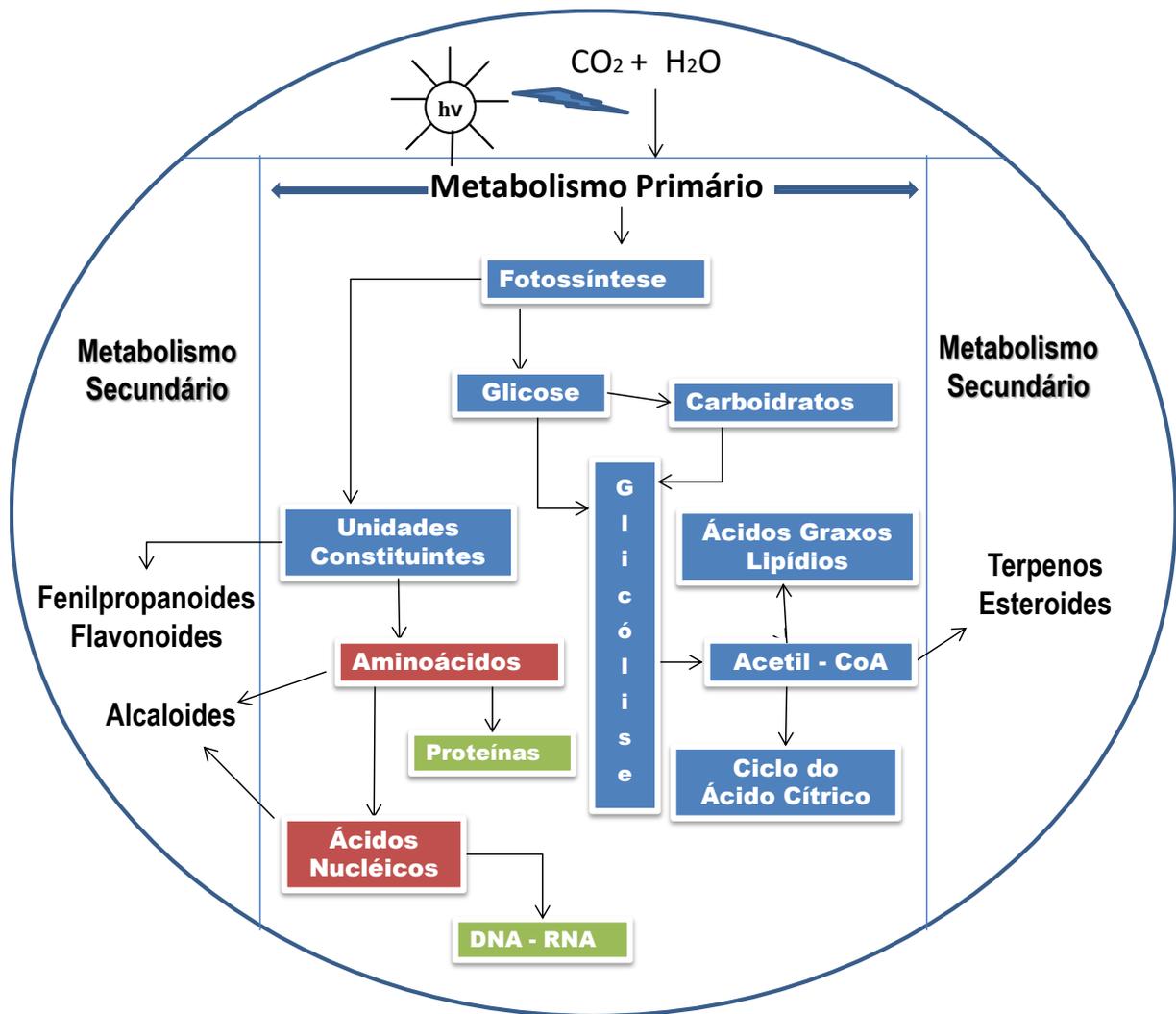
³⁶<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>, acessado em setembro de 2015.

³⁷Neto, P.A.S.P.; Caetano, L.C.; *Plantas medicinais do popular ao científico*, edufal, UFAL, Maceió, AL, **2005**.

³⁸Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G.; *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B.; Grissem, W.; Jones, R., (eds); American Society of Plant Physiologists, Califórnia, EUA, 2009, cap. 24, pág. 1250-1318.

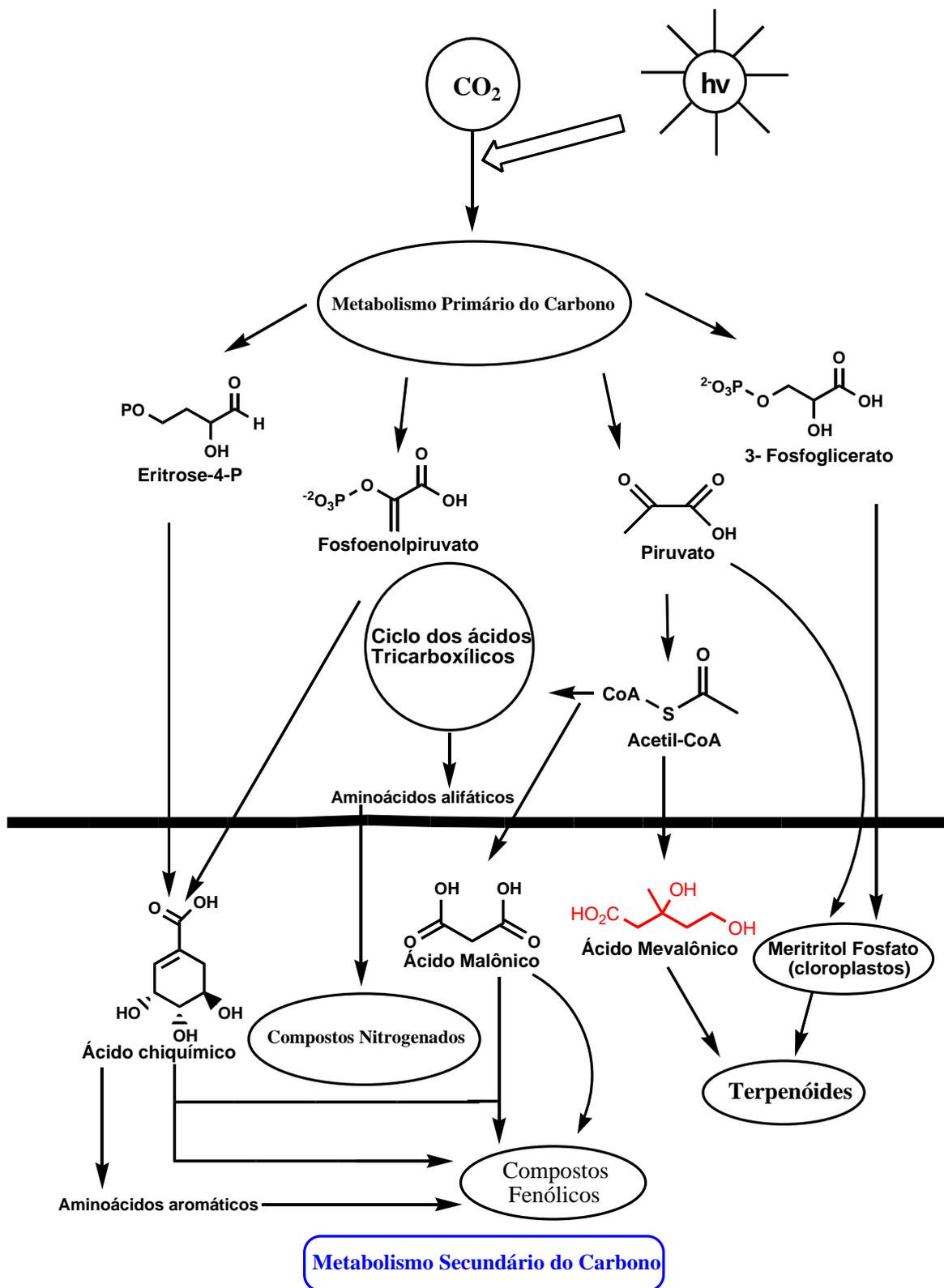
³⁹Pichersky, E.; Noei, J.P.; Dudareva, N.; *Science* **2006**, 311, 808.

⁴⁰García, A.A.; Carril, E.P.U.; *Rev. Reduca (Biolog.)* **2009**, 2, 119.



Esquema 1. Elementos de correlação básica entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário das plantas [adaptado da ref. 40].

Uma melhor compreensão das diferenças entre metabolismo primário e secundário pode ser obtida a partir da análise do Esquema 2, onde pode ser observado que um número reduzido de compostos do metabolismo primário são precursores das principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário, a exemplo das vias do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato (nos cloroplasto) que conduzem à biossíntese dos óleos essenciais.



Esquema 2. Relação do metabolismo primário do carbono com as rotas sintéticas dos metabólitos secundários [adaptado da ref. 40].

Os óleos essenciais compreendem uma mistura complexa de diversas substâncias orgânicas voláteis (de 85 a 99% dos compostos) e não voláteis (de 1 a 15%),⁴¹ oriundas do metabolismo secundário das plantas, cuja composição básica é formada majoritariamente pelos terpenos ou terpenóides, em especial mono^{42,43} e sesquiterpenos⁴⁴, além de fenilpropanóides.⁴⁵ Exemplos de alguns membros dessas classes são mostrados na Figura 4.

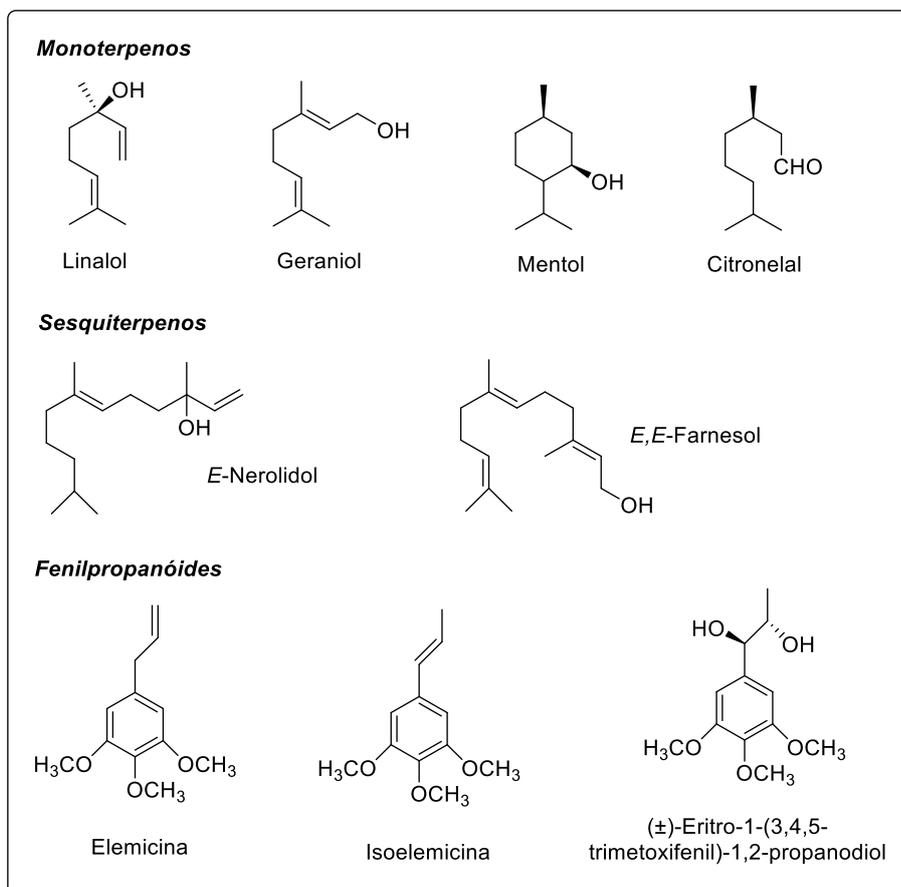


Figura 4. Exemplos de terpenóides (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanóides encontrados em óleos essenciais.³⁵

Ainda que a função específica dos óleos essenciais para as plantas não seja totalmente conhecida, as plantas superiores (angiospermas e gimnospermas) sintetizam terpenóides essenciais

⁴¹ González, L.S.; Vargas, M.; Martínez, C.G.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; *Food Eng. Rev.* **2011**, 3,1.

⁴² Maffei, M.E.; *S. Afr. J. Bot.* **2010**, 76, 612.

⁴³ Nerio, L.S.; Verbel, J.O.; Stashenko, E.; *Bioresource Technology* **2010**, 101, 372.

⁴⁴ Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Ortoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Gavin, C.L., Adams, T.B.; *Food and Chem. Toxicology*, **2005**, 43, 345.

⁴⁵ Morais, L.A.S.; *Horticultura Brasileira*, **2009**, 27, 4050.

como pigmentos, esteroides e reguladores de crescimento (giberelinas), supostamente para o próprio desenvolvimento.³⁵

Os terpenos (terpenóides ou isoprenóides) constituem a maior classe dentre as substâncias naturais, com mais de 40.000 membros já identificados.⁴⁶ Do ponto de vista químico, são substâncias hidrofóbicas, armazenadas em canais de resina, células de óleos essenciais ou mesmo tricomas glandulares,⁴⁷ contendo ou não oxigênio que, devido à origem biossintética são classificados em função do número de subunidades isoprenoides com 5 átomos de carbono, em analogia ao isopreno (Tabela 1).⁴⁸

Tabela 1. Classificação dos terpenos com base no número de subunidades isoprenoides.⁴⁸

 Unidade Isoprênica (C5)		 Isopreno	
Nº de unidades de isopreno	Nº total de átomos C	Classe	
1	5	Hemiterpenos	
2	10	Monoterpenos	
3	15	Sesquiterpenos	
4	20	Diterpenos	
5	25	Sesterpenos	
6	30	Triterpenos	
8	40	Tetraterpenos	
10 ou >10	50 ou > 50	Politerpenos	

Na biossíntese dos componentes terpênicos, os precursores ativados difosfato de isopentenila (**IPP**) e pirofosfato de dimetilalila (**DMAPP**) são gerados a partir do ácido mevalônico ou mevalonato (**MVA**) ou por caminho alternativo (independente do mevalonato) via 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato ou fosfato de metileritritol (**MEP**) formado a partir de intermediários da via glicolítica, gliceraldeído 3-fosfato e ácido pirúvico, com a perda da carboxila deste último.⁴⁹ Neste espaço, será dada ênfase à

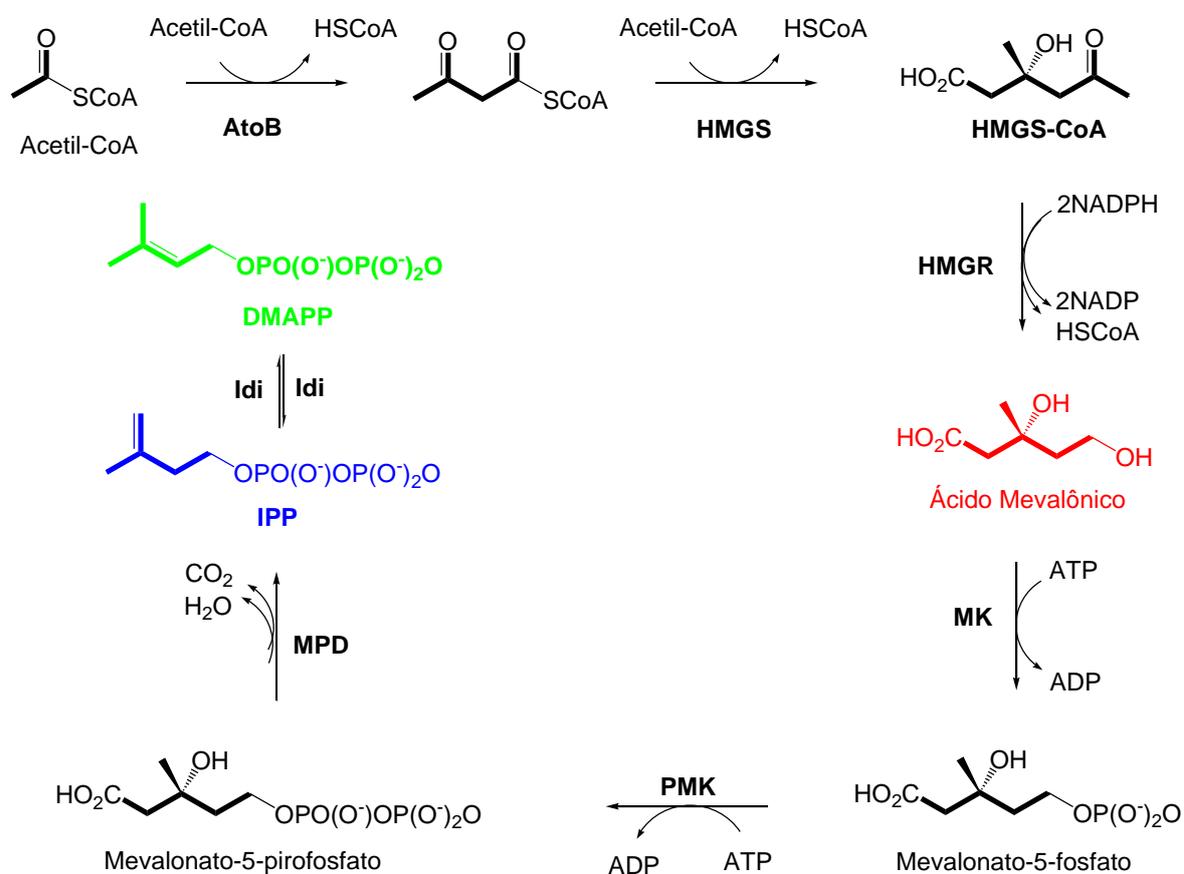
⁴⁶ Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; *Nat. Prod. Rep.* **2006**; 23, 394.

⁴⁷ Wink, M.; *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. In: *Annual Plant Reviews*, vol. 2, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 1999.

⁴⁸ Rattan, R. S.; *Crop. Protec.* **2010**, 29, 913.

⁴⁹ Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd, 2ª Ed., Chichester, UK, 2002.

via do ácido mevalônico, onde os precursores terpenoides ativados são gerados a partir de condensações entre unidades de acetil-CoA, sob a ação de diversas enzimas (Esquema 3).⁵⁰



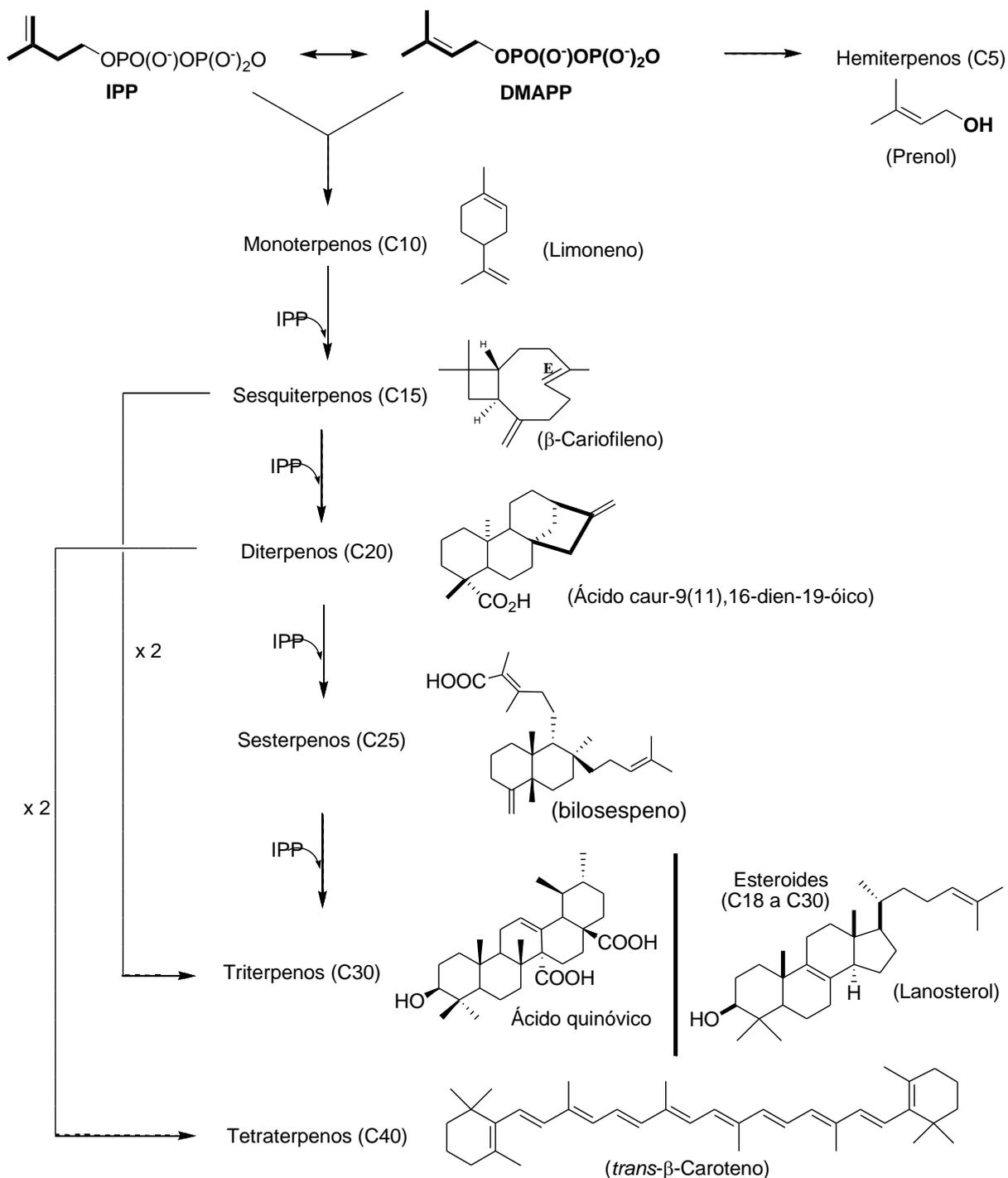
AtoB = acetil-CoA C-acetiltransferase; **HMGS** = hidroximetilglutaril-CoA sintase; **HMGR** = hidroximetilglutaril-CoA redutase; **MK** = mevalonato quinase; **PMK** = fosfomevalonato quinase; **MPD** = mevalonato pirofosfato decarboxilase; **Idi** = isopentenil pirofosfato isomerase.

Esquema 3. Biossíntese do ácido mevalônico e sua conversão em pirofosfato de isopententilalila (IPP) e/ou pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) [adaptado das refs 50 e 51].

A conversão dos ésteres difosfatos **IPP** e **DMAPP** em uma diversidade de substâncias terpênicas é demonstrada no Esquema 4, onde também são apresentados alguns exemplos representativos.

⁵⁰Goto, T.; Takahashi, N.; Hirai, S.; Kawada, T.; *PPAR Resea.* **2010**, 2010,1

⁵¹ Withers, S.T.; Keasling, J.D.; *Applied Microbiol. Biotechn.* **2007**, 73, 980.



Esquema 4. Formação de terpenos via os precursores IPP e DMAPP [adaptado da ref. 49]

Os terpenos são encontrados em bolsas secretoras ou cápsulas de armazenamento de muitas espécies vegetais. Praticamente todas as partes de uma planta (flores, folhas, cascas, frutos, rizomas) são utilizadas como matéria-prima na obtenção de óleos essenciais, como exemplo, óleo de eucalipto (folhas), de gengibre (rizoma), de laranja (folhas, flores ou mesmo frutos), de rosas

(pétalas), os quais apresentam grande aplicação na indústria de alimentos, perfumaria, cosméticos, medicamentos e outras.⁵²

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos etéreos ou óleos voláteis, são os responsáveis por características organolépticas como cheiro, sabor picante e ácido do vegetal ou de partes dele. Quando recentemente extraído podem ser incolores ou apresentarem coloração, não sendo muito estáveis, principalmente em presença de luz, ar, umidade, calor e/ou metais. Geralmente, o teor de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais é muito baixo, inferior a 1%, podendo haver exceções onde o rendimento pode chegar a 15%.⁵³

Estas misturas naturais complexas contêm normalmente entre 20 e 60 compostos terpênicos em concentrações variáveis, onde aproximadamente 5 a 10% destes componentes se destacam em valores percentuais (e.g. 15 a 70%) quando comparados aos demais terpenos encontrados na mistura, sendo denominados principais ou majoritários.⁵⁴

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diversas técnicas, onde as mais usuais são a hidrodestilação;⁵⁵ o arraste a vapor;^{55,56} e o arraste por CO₂ supercrítico.⁵⁷ Na extração por arraste a vapor (usada em escala laboratorial e industrial), o material é colocado sobre uma placa perfurada, a certa distância da água fervente, de modo a evitar o contato direto com esta (Figura 5A). Enquanto que na hidrodestilação, método de escolha em escala laboratorial, o material a ser destilado permanece em contato direto com a água em ebulição. Em geral, emprega-se um aparelho de Clevenger (Figura 5B) por meio do qual o óleo essencial presente no material biológico vegetal destila junto com a água e posteriormente condensa formando uma mistura com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo.⁵⁸

⁵²Bizzo, H.R.; Hovell, A.M. C.; Rezende, C.M.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 588.

⁵³Santos, A.S.; Alves, S.M.; Figueiredo, F.J.C.; Rocha Neto, O.G.; *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratórios*, Comunicado Técnico, Embrapa, Belém, Pará, 2004.

⁵⁴Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.

⁵⁵Borsato, A.V.; Doni-Filho, L.; Côcco, L.C.; Paglia, E.C.; *Semina: Ciências Agrárias* **2008**, *29*, 129.

⁵⁶Koketsu, M.; Gonçalves, S.L.; *Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor*, Embrapa- CTAA, Rio de Janeiro, RJ, 1991.

⁵⁷Chassagnez, A.L.M.; Corrêa, N.C.F.; Meireles, M.A.A.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1997**, *17*, 399.

⁵⁸Silveira, J.C.; Busato, N.V.; Costa, A.O.S.; Costa Junior, E.F.; *Enciclopédia Biosfera/Centro Científico Conhecer* **2012**, *8*, 2038.

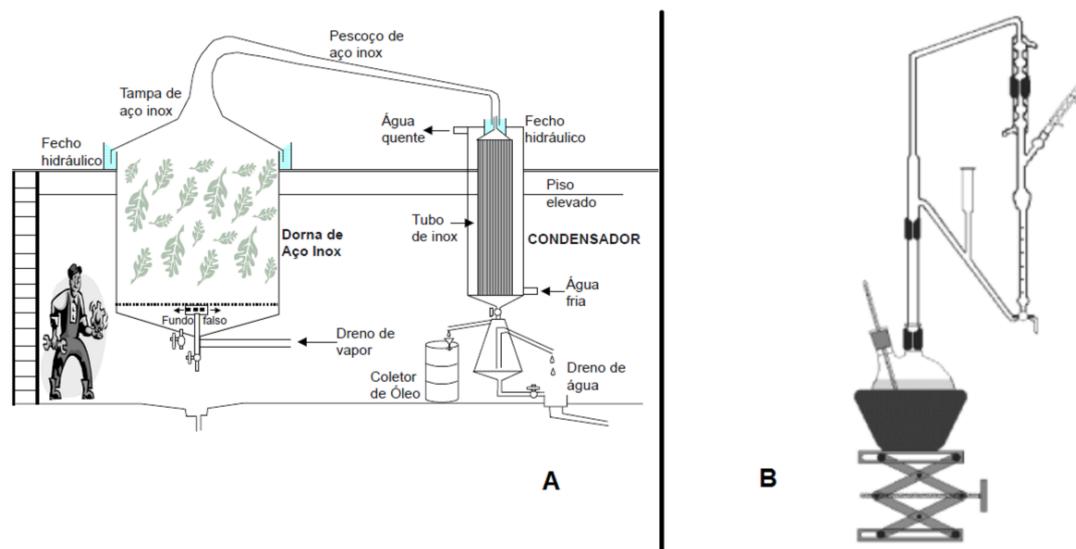


Figura 5. Aparelhagens empregadas para extração de óleos essenciais por arraste a vapor (A) e hidrodestilação (B) [adaptadas das ref. 59 e 60].

A composição química dos óleos essenciais é influenciada por fatores climáticos e práticas agrícolas, tais como, fertilização do solo, irrigação, colheita e também a fase de desenvolvimento da planta na época da colheita.⁶¹ No que tange o clima, três variáveis são imprescindíveis: a temperatura, a umidade relativa do ar e a ocorrência ou não de precipitações chuvosas.

Os fatores fisiológicos das plantas, fotossíntese, mobilidade de reservas, expansão foliar e o crescimento foliar, poderão se alterar caso ocorra estresse hídrico, com isso a composição química do óleo essencial também poderá se alterada.⁶² Assim, é importante saber a época de coleta das espécies vegetais para obtenção dos óleos essenciais, visto que as composições quali e quantitativas dos compostos não são constantes durante o ano inteiro, sendo este efeito um dos objetivos deste estudo.

Além das atividades biológicas citadas anteriormente, os óleos essenciais também, exibem citotoxicidade. Por se tratarem de uma mistura complexa, essa propriedade não se manifesta em um alvo específico.⁵⁴ Compostos pertencentes às classes dos aldeídos, álcoois e fenóis podem estar envolvidas na citotoxicidade.^{52,63} Dada a grande variabilidade de compostos terpênicos, os efeitos biológicos dos óleos essenciais são um resultado sinérgico de todas as substâncias ou apenas dos componentes principais (majoritários).⁶⁴ Existem diversos relatos na literatura acerca do efeito

⁵⁹Vitti, A.M.S.; Brito, J.O.; *Óleo Essencial de Eucalipto*, Documentos Florestais, Nº17, USP, São Paulo, SP, 2003.

⁶⁰da Silva, D.D.; Chierice, G.O.; Galhiane, M.S.; Chaar, J.S.; Mouchrek-Filho, V.E.; *Quím. Nova* **2003**, *26*, 461.

⁶¹Luz, J.M.Q.; Morais, T.P.S.; Blank, A.F.; Sodré, A.C.B.; Oliveira, G.S.; *Hortic. Bras.* **2009**, *27*, 349.

⁶²Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 374.

⁶³Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R.; *Food Chem.* **2005**, *91*, 621.

⁶⁴Penuelas, J.; Munne-Bosch, S.; *Trends Plant Scienc.* **2005**, *10*, 166.

sinérgico em relação à atividade mútua dos compostos dentro dos óleos essenciais *in natura*,⁶⁵ ou a mistura de alguns compostos terpênicos obtidos através de sínteses,⁶⁶ bem como a relação dos óleos essenciais simulados através da mistura de terpenos isolados.⁶⁷ Contudo, são os compostos principais que parecem refletir as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais de qual espécie foi extraído.⁶⁸

A ação sinérgica dos vários compostos presentes em um óleo essencial, quando comparados à ação de um ou dois dos compostos majoritários existentes no óleo, é questionável.⁵⁴ Entretanto, é provável que a atividade dos compostos majoritários seja modulada pelos compostos minoritários.^{54,69} Muitas destas substâncias presentes nos óleos essenciais também definem propriedades como coloração, fragrância, densidade, textura, dentre outras.^{59,70}

As características sensoriais e atividades biológicas manifestadas pelos óleos essenciais podem ser o resultado do sinergismo entre os compostos encontrados na mistura, como já relatado, mas também do antagonismo entre eles. Savelev e colaboradores estudaram interações sinérgicas e antagônicas de misturas de terpenos com ação anticolinesterásica, obtidos do óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia*, e concluíram que houve ação sinérgica da mistura 1,8-cineol/ α -pineno e o 1,8-cineol/óxido de cariofileno bem como antagonismo relacionado à mistura 1,8-cineol/cânfora.⁷¹

A grande importância da citotoxicidade dos óleos essenciais das plantas revela-se na ação contra patógenos diversos e na preservação de produtos agrícolas e marinhos. Os óleos essenciais ou mesmo os seus componentes isolados podem ser eficazes no combate a infestações causadas por fungos, parasitas, ácaros, larvas, nematoides, insetos, moluscos, dentre outros.⁶⁰

2.2.1. Uso de óleos essenciais como inseticidas/acaricidas

A busca do homem para controlar pragas da agricultura iniciou há aproximadamente 16 mil anos atrás.⁷² Historiadores relatam que as primeiras utilizações de inseticidas ocorreram há cerca de 1000 anos a.C., os quais apresentavam ação fumigante.⁷³

⁶⁵Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P.; *J. Stored Prod. Res.* **2003**, *39*, 21.

⁶⁶Beckel, H.S.; Lorini, I.; Lazzari, S.M.N.; *Rev. Bras. Entomol.* **2006**, *50*, 110.

⁶⁷Abbassy, M.A.; Abdelgaleil, S.A.M.; Rabie, R.Y.A.; *Entomol. Exp. Appl.* **2009**, *131*, 225.

⁶⁸Ipek, E.; Zeytinoglu, H.; Okay, S.; Tuylu, B.A.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; *Food Chem.* **2005**, *93*, 551.

⁶⁹Santana-Ríos, G.; Omer, G.A.; Amantana, A.; Provost, C.; Wu, S.Y.; Dashwood, R.H.; *Mutat. Res.* **2001**, *495*, 61.

⁷⁰Cal, K.; *Planta Med.* **2006**, *72*, 311.

⁷¹Savelev, S.; Okello, E.; Perry, N.S.L.; Wilkins, R.M.; Perry, E.K.; *Pharmacol. Biochem. Be.* **2003**, *75*, 661.

⁷²Thacker, J. R. M.; *An introduction to Arthropod Pest Control*, 1ª Ed., Cambridge University Press: London, UK, 2002.

⁷³Ware, G.W.; Whitacre, D.M.; *The Pesticide Book - History of Pesticides*, 6ª Ed.; Meister Publication, 2004, pág. 335. Em: Jardim, I.C.S.; Andrade, J.A.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 996.

No século XX, o uso de pesticidas sistêmicos no controle de insetos e pragas em geral tornou-se crucial para se obter um aumento na produtividade agrícola mundial. No entanto, os efeitos nocivos causados à saúde pública com o uso indiscriminado desses produtos aliados aos impactos sobre o ecossistema foram determinantes para a limitação do emprego destes.⁷⁴

O controle químico, bastante utilizado em diversas infestações, é a principal tática de controle de pragas. Encontrar uma alternativa que beneficiasse a produção e minimizasse os impactos negativos causados pelos inseticidas sintéticos vendidos no mercado passou a ser a grande preocupação dos empresários, governantes e a sociedade em geral.

Basicamente, os inseticidas utilizados pertencem a duas classes: inorgânicos e orgânicos. Da classe dos inorgânicos temos os cupratos, enxofre em pó, óleos minerais, fluorossilicato de bário, diversos sulfatos, carbonato de cálcio, cálcio e chumbo na forma de arseniados, dentre outros. Para os classificados como “orgânicos”, oriundos de fontes vegetais, destacam-se os piretroides, rotenoides e alcaloides (Figura 6).⁷⁵

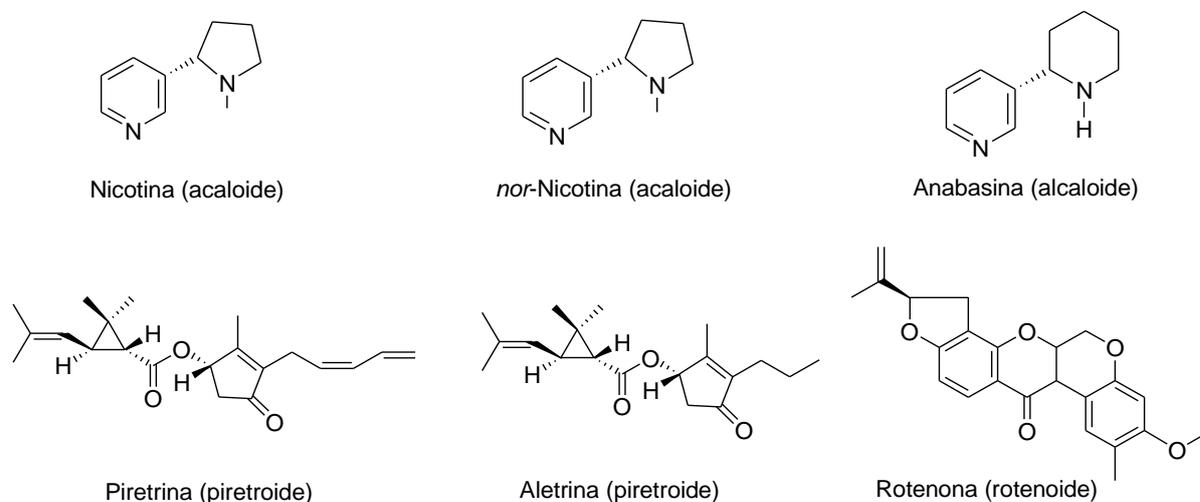


Figura 6. Exemplos de piretroides, alcaloides e rotenoides.^{75,76}

Os piretroides são inseticidas de origem vegetal derivados da piretrina, compostos tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (piretro) e outras espécies relacionadas.^{75,77,78} As piretrinas são utilizadas como inseticidas por terem ação sobre uma grande variedade de insetos e com baixa toxicidade em mamíferos (sob circunstâncias de utilização adequada). Entretanto, são instáveis em contato com a luz e o ar, diminuindo a eficácia no combate a

⁷⁴Tunaz, H.; Uygun, N.; *Turk J. Agric For.* **2004**, *28*, 377.

⁷⁵Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; da Costa, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 159.

⁷⁶Júnior, C. V.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 390.

⁷⁷Nasuti, C.; Cantalamessa, F.; Falcioni, G.; Gabbianelli, R.; *Toxicology* **2003**, *191*, 233.

⁷⁸Spencer, C.I.; Yuill, K. H.; Borg, J.J.; Hancox, J.C.; Kozłowski, R.Z.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 1067.

pragas.⁷⁹ Os piretroides são utilizados desde 1800 pelos persas e também pela antiga Iugoslávia, mas a utilização destes produtos naturais decaiu em meados de 1950 devido a produção sintética de análogos dos piretróides, a exemplo das aletrinas (Figura 7) que apresentaram maior estabilidade e eficácia.⁷⁵

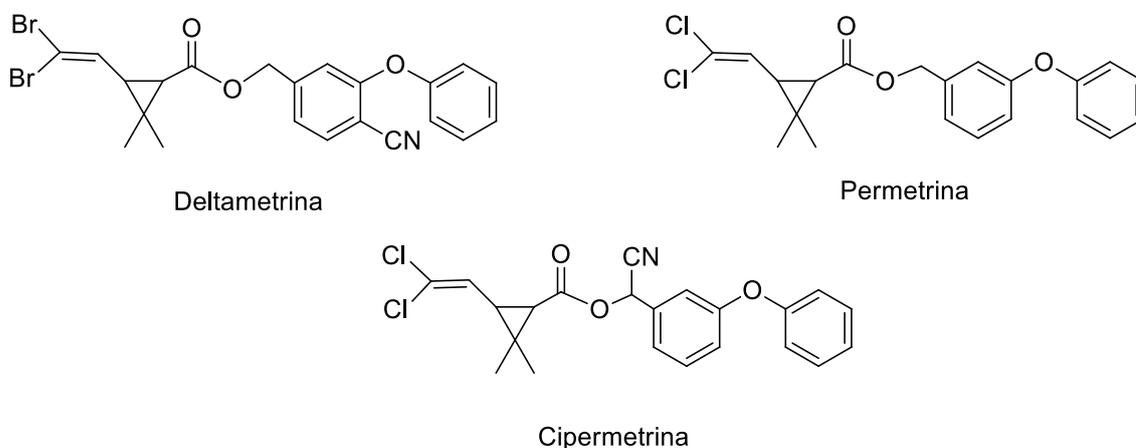


Figura 7. Exemplos de piretroides sintéticos da classe das aletrinas.⁸⁰

Outro grupo de inseticidas são os rotenóides, pertencentes à classe dos isoflavonóides, sendo a rotenona (Figura 6, página 19) normalmente encontrada em leguminosas conhecidas popularmente por timbó (*Derris lonchocarpus*).⁸¹ Flavonoides tem apresentado uma gama de propriedades benéficas ao ser humano, como antialérgicas, antivirais e antifúngicas,⁸² sendo os derivados de flavonas os de maior importância terapêutica.⁸³

Já os alcalóides formam um grupo de várias substâncias de complexa classificação, pois, existem diversificações estruturais de compostos. Sendo definidos como substâncias cíclicas orgânicas, naturais e cuja distribuição é limitada entre os seres vivos, onde quase todos os alcalóides são derivados de aminoácidos como ornitina, lisina e triptofano,⁸⁴ portanto encontrados em bactérias, fungos e animais, como os insetos.^{85,86}

⁷⁹Chen, Z.M.; Wang, Y.H.; *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 367.

⁸⁰ Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G.R.; *Alim. Nutr. Araraguara* **2007**, 18, 339.

⁸¹ Ho, S.H.; Wang, J.; Sim, K.Y.; Ee, G.C.L.; Imiyabir, Z.; Yap, K. F.; Shaari, K.; Goh, S. *Phytochem.***2003**, 62, 1121.

⁸² Martens, S.; Mithöfer, A.; *Phytochem.* **2005**, 66, 2399.

⁸³ Williams, R.J.; Spencer, J.P.E.; Evans, C.R.; *Free Radical Bio. Med.* **2004**, 36, 838.

⁸⁴ Roberts, M.F.; Wink, M.; *Alkaloids – Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, Plenum Press, New York and London, 1998.

⁸⁵ Evans, W.C.; *Trease Evans Farmacognesia*, 13th ed., interamericana, Mc Graw Hill, México, 1991.

⁸⁶ Kokate, C.K.; Purohit, A.P.; Gokhale, S.B.; *Pharmacognosy*, 42th ed.; Nirali Prakashan, New Delhi, India, 2008.

Existem várias categorias de pesticidas disponíveis comercialmente, a Tabela 2 mostra a classificação de alguns pesticidas com base em suas ações sobre os organismos alvo.⁸⁷

Tabela 2. Classificação de pesticidas por ações biológicas.⁸⁷

Classificação	Organismo alvo/pragas
Inseticida	Insetos
Herbicida	Ervas daninhas
Rodenticida	Roedores
Fungicida	Fungos
Acaricida e Miticida	Aracnídeos da ordem Acarina (carrapatos e ácaros)
Moluscucida	Moluscos
Bactericida	Bactérias
Avicida	Pragas de pássaros
Virucida	Vírus
Algicida	Algas

Outra categoria de sistematização dos pesticidas leva em consideração a classe funcional/ação sobre o sistema nervoso central dos insetos, onde os organoclorados sintéticos (A), os organofosfatos sintéticos (B), os carbamatos sintéticos (C), as piretrinas (D) e os piretróides sintéticos (E), onde temos os pesticidas das classes B e C que atuam inibindo a ação da acetilcolinesterase (AChE) e os das classes A, D e E inibindo os canais iônicos de sódio.⁸⁸

A Figura 8 mostra a estrutura química de alguns acaricidas sintéticos, comercializados no Brasil, que atuam pelos mecanismos de ação acima citados, e já ressalta-se que já existe na literatura^{89,90} detecção de resistência de ácaros para abamectina, clofepir e outros.

⁸⁷ Zacharia, J. T.; *Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, INTECH open Access Publisher, 2011.

⁸⁸ Raymond-Delpch, V.; Matsuda, K.; Sattelle, B. M.; Rauh, J. J.; Sattelle, D. B.; *Invert. Neurosci.* **2005**, *5*, 119.

⁸⁹ Sato, M.E.; da Silva, M.Z.; Cangani, K.G.; Raga, A.; *Bragantia* **2007**, *66*, 89.

⁹⁰ Sato, M.E.; Silva, M. da; Raga, A.; Souza, M.F.; *Neotrop. Entomol.* **2005**, *34*, 991

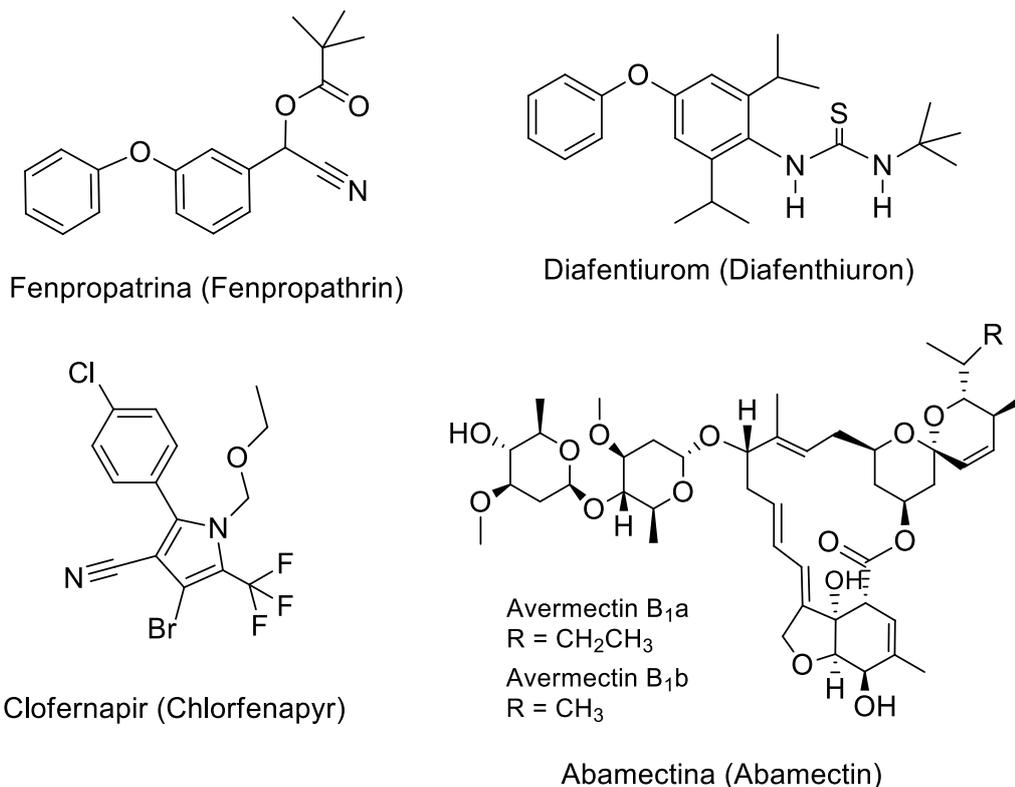


Figura 8. Exemplos representativos de alguns acaricidas sintéticos comerciais.^{91,92}

Os extratos vegetais e os óleos essenciais podem ser utilizados na agricultura como uma metodologia alternativa no controle de insetos-pragas, como também no controle de doenças causadas nos seres humanos por nematoides, fungos, vírus e bactérias.⁹³ A exploração dos óleos essenciais na agricultura iniciou no Oriente Médio antes de Cristo, sendo produzido na Pérsia, Índia e Egito.⁹⁴ O uso de diversos óleos essenciais com ação inseticida e/ou de repelência tem sido explorado com bom potencial no manejo integrado de pragas.⁸⁴

Um dos fatores relevantes no estudo sistemático da atividade biológica dos óleos essenciais é a constituição química que, como mencionado anteriormente, pode variar devido às influências de fatores genéticos, sazonais, locais da coleta, condições do solo, dentre outros.⁹⁵ Outro fator preponderante é a espécie do inseto/praga, que pode não ser suscetível a ação de um determinado óleo essencial.⁸⁴

⁹¹ Esteves Filho, A.B.; Oliveira, J.V.; Matos, C.H.C.; *Rev. Bras. Ciênc. Agrar.* **2013**, *8*, 583.

⁹² http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em agosto de 2015.

⁹³ Isman, M.B.; *Crop Protection* **2000**, *19*, 603.

⁹⁴ Ootani, M.A.; Aguiar, R.W.; Ramos, A.C.C.; Brito, D.R.; Da Silva, J.B.; Cajazeira, J.P.; *J. Biotechnol. Biodiversit.* **2013**, *4*, 162.

⁹⁵ Lima, H.R.P.; Kaplan, M.A.C.; Cruz, A.V.M.; *Floresta e Ambiente*, **2003**, *10*, 71.

Diversas substâncias químicas produzidas pelas plantas, quando isoladas, são utilizadas como repelentes ou mesmo provocar morbidade a diversas espécies de insetos. Os monoterpenos contidos nos óleos essenciais tem citotoxicidade na sua forma isolada para animais ou mesmo outras plantas.^{96,97} Entretanto, o FDA (*Food and Drug Administration*, USA) considera que nem todos os monoterpenos podem causar danos aos seres vivos, sendo assim seguros aos seres humanos e podem ser utilizados em perfumes, expectorantes, alimentos orgânicos, analgésicos, aditivos alimentares, anti-sépticos, condimentos e outros.⁸⁷

Os óleos essenciais podem ser tóxicos aos insetos em todas as fases de desenvolvimento. Um exemplo foi relatado por Nukenine e colaboradores⁹⁸ que utilizaram óleos essenciais obtidos de *Plectranthus glandulosus* Hook no combate a *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) e detectaram que houve 100% de redução na descendência de duas populações desta praga. Já Paes e colaboradores⁹⁹ testaram o efeito fumigante do óleo essencial de mostarda (sintético) em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. zeamais*, na forma de bioensaios de tempo-resposta, e observaram mortalidade em todos os estágios, sendo que as larvas foram as mais atingidas, seguido pelo estágio de pupa e os ovos foram menos atingidos.

Os efeitos tóxicos dos óleos essenciais sobre insetos, ácaros e outros artrópodes pode estar relacionado diretamente à alta volatilidade e propriedades hidrofóbicas de seus compostos, pois essas propriedades facilitam a volatilidade e penetração nos insetos. Uma explicação provável para essa ação se deve à existência de receptores de octopamina (*p*-hidroxietanolamina) nos insetos, promovendo uma maior seletividade uma vez que estes receptores não existem nos vertebrados.^{100,101} Relatos na literatura especializada consideram os receptores de octopamina como sendo o sítio de atividades inseticidas/acaricidas dos óleos essenciais. Desta forma, os terpenos com estrutura química análogas à octapamina podem interagir com estes recetores causando o efeito tóxico aos invertebrados.^{102,103} Portanto, a presença ou não destes receptores determina uma maior seletividade da ação maléfica dos óleos ou dos compostos isolados contra uma espécie alvo.^{86,87}

O interesse no combate às pragas que causam danos e afligem a agricultura mundial, sobretudo as culturas brasileiras têm incentivado estudos visando à utilização dos óleos essenciais e dos compostos isolados de plantas ou insetos (feromônios) por apresentarem menor agressão ao

⁹⁶Tripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R.; *J. Pharm. Phytother.* **2009**, *1*, 52.

⁹⁷Chagas, A.C.S.; Passos, W.M.; Prates, H.T.; Leite, R.C.; Furlong, J.; Fortes, I.C.P.; *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, **2002**, *39*, 247.

⁹⁸Nukenine, E.N.; Adler, C.; Reichmuth, C.; *J. Appl. Entomol.* **2010**, *134*, 132.

⁹⁹Paes, J.L.; Faroni, L.R.D'A.; Dhingra, O.D.; Cecon, P.R.; Silva, T.A.; *Crop Prot.* **2012**, *34*, 56.

¹⁰⁰Lima, H.R.P.; Kaplan, M.A.C.; Cruz, A.V.M.; *Floresta e Ambiente*, **2003**, *10*, 71.

¹⁰¹Tripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R.; *J. Pharm. Phytother.* **2009**, *1*, 52.

¹⁰²Enan, E.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **2001**, *130*, 325.

¹⁰³Kostyukovsky, M.; Rafaeli, A.; Gileadi, C.; Demchenko, N.; Shaaya, E.; *Pest Manag. Sci.* **2002**, *58*, 1101.

meio ambiente e ao ser humano além de combater pragas, como exemplo o ácaro rajado que assola diversas plantações importantes ao agronegócio.¹⁰⁴

2.3. β -Cariofileno: um sesquiterpeno atraente

O β -cariofileno é sesquiterpeno bicíclico tem sido detectado em uma grande variedade de óleos essenciais de espécies vegetais, inclusive os oriundos de plantas do gênero *Eugenia*, em geral, na forma de mistura com outros sesquiterpenos correlatos (Figura 9).

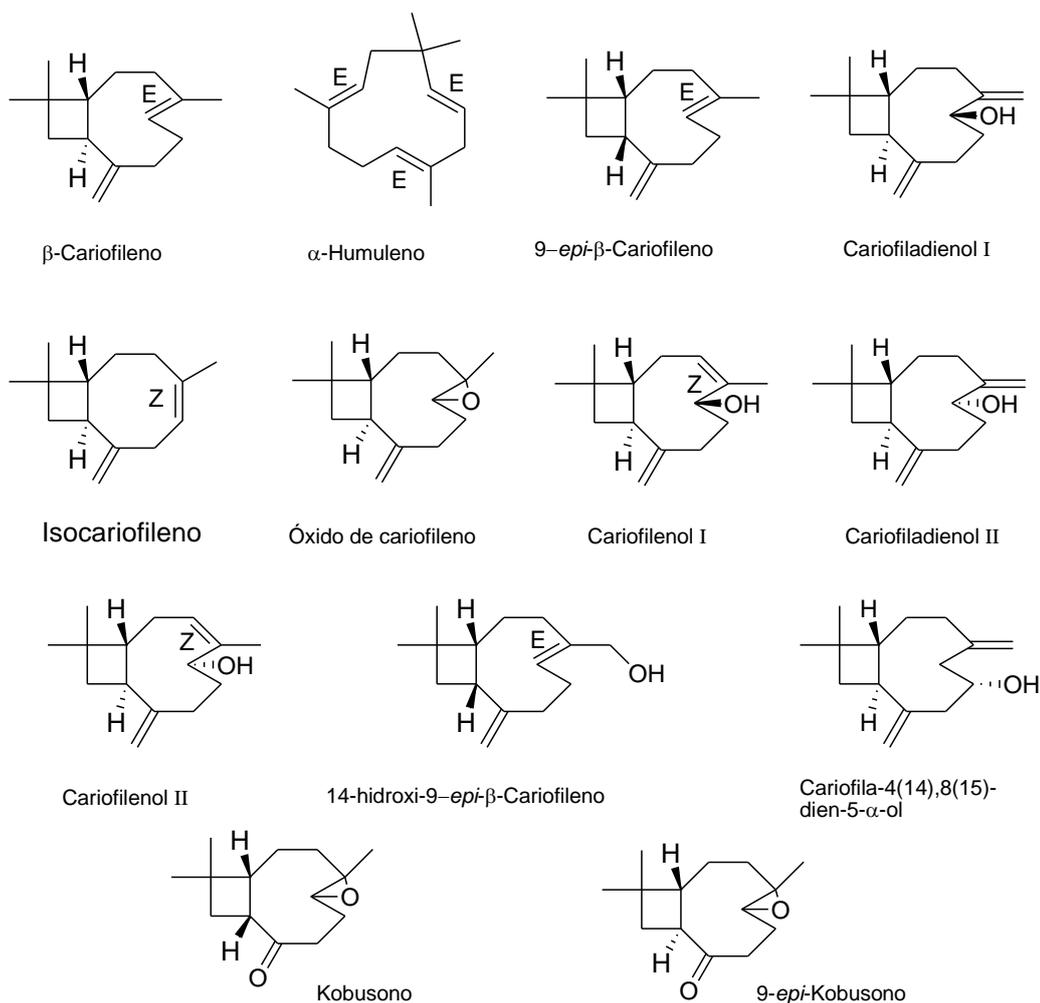


Figura 9. β -Cariofileno e alguns sesquiterpenos naturais correlacionados.

Relatos da literatura evidenciam diversos óleos essenciais contendo β -cariofileno exibem comprovadas ações terapêuticas, como por exemplo, anti-inflamatória,^{105,106} antioxidante,¹⁰⁵ e anti-

¹⁰⁴Vieira, M.R.; Sacramento, L.V.S.; Furlan, L.O.; Figueira, J.C.; Rocha, A.B.O.; *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu* **2006**, 8, 210.

¹⁰⁵Baylac, S.; Racine, P.; *Int. J. Aromather.* **2003**, 13, 138.

¹⁰⁶Lourens, A.C.; Reddy, D.; Baser, K.H.; Viljoen, A.M.; Van Vuuren, S.F.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 95, 253.

microbiana.^{105,107,108,109} Destacamos aqui o trabalho de Sabulal e colaboradores,¹⁰⁹ que determinaram a composição química e atividade antimicrobiana do óleo do rizoma de *Zingiber nimmonii*, uma espécie de gengibre endêmica no sul da Índia. Neste, os autores relatam ser o óleo uma fonte natural rica em β -cariofileno (42,2%) além dos isômeros α -humuleno (27,7%) e isocariofileno (traços), que exibe significativa atividade inibitória contra fungos (*Candida glabrata*, *C. albicans* e *Aspergillus niger*) e bactérias (*Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Outro estudo interessante refere-se à caracterização química de óleo-resinas de *Copaifera guianensis*, *C. duckei* e *C. multijuga* realizada Cascon e Gilbert.¹⁰⁸ Os óleo-resinas de espécie de *Copaifera spp.*, amplamente distribuídas na Amazônia, são intensivamente utilizados em produtos cosméticos e na medicina popular, sob a designação de “óleo de copaíba”, uma das medicações mais usadas na região, principalmente, como um agente de cura, anti-séptico e anti-inflamatório. O β -cariofileno e o α -bergamoteno foram encontrados em todas as três espécies (podendo ser considerados então marcadores químicos), com destaque para as amostras de *C. multijuga* onde os teores de β -cariofileno foram de 60% e 43% em ambas as análises. O óxido de cariofileno encontrado em uma das amostras de *C. multijuga* em 8.8%, apresentou elevado teor (ca. 20%) em *Copaifera guianensis*, evidenciando ser este um produto genuíno do metabolismo secundário de *Copaifera*. *C. duckei* exibiu menores teores e grande variabilidade sazonal dos dois marcadores.

Do ponto de vista sintético, o β -cariofileno desperta o interesse de pesquisadores renomados pela sua arquitetura molecular incomum, biciclo [7,2,0] undecano de junção *trans* com uma dupla ligação de configuração *E* no anel nonano. A primeira síntese total do (\pm)-cariofileno e (\pm)-isocariofileno foi desenvolvida por Corey e colaboradores,¹¹⁰ via um intermediário tricarbocíclico fundido a um anel de 4 membros preparado a partir da 2-cicloexanona. Desde então, β -cariofileno e seus análogos (cariofilóides) tornaram-se um desafio para os químicos sintéticos e a maioria dos membros ainda não foi ainda sintetizada ou teve sua síntese concluída apenas recentemente, a exemplo da síntese enantioseletiva de cariofilóides descrita por Larionov e Corey,¹¹¹ a qual envolveu uma abordagem não convencional via uma dienona quiral até então desconhecida. A nova estratégia possibilitou a primeira síntese enantioseletiva total do β -cariofileno com configuração absoluta do o enantiômero natural, (-)-cariofileno.

As diversas ações biológicas atribuídas ao β -cariofileno ou aos óleos contendo este terpeno e análogos em elevados percentuais e a dificuldade de sua preparação com a estereoquímica adequada, por via sintética, justificam a busca por fontes naturais alternativas e eficientes para sua obtenção.

¹⁰⁷Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 204.

¹⁰⁸Cascon, V.; Gilbert, B.; *Phytochem.* **2000**, *55*, 773.

¹⁰⁹Sabulal, B.; Dan, M.; Anil, J.A.; Kurup, R.; Pradeep, N.S.; Valsamma, R.K.; Varughese, G.; *Phytochem.* **2006**, *67*, 2469.

¹¹⁰Corey, E.J.; Mitra, R.B.; Uda, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 485.

¹¹¹Larionov, O.V.; Corey, E.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2954.

Com bem conhecido, substâncias análogas ou estruturalmente relacionadas a um composto bioativo podem manifestar atividades biológicas aprimoradas devido ao melhor reconhecimento molecular pelos alvos biológicos ou melhorias nas propriedades físico-químicas. Assim, como a composição dos óleos essenciais é dada basicamente por terpenos das classes mono e sesquiterpênicos, as modificações químicas escolhidas neste estudo visam à preparação de análogos oxigenados dos terpenos majoritários identificados nos óleos, incluindo do β -cariofileno.

Ressalta-se que na literatura não há relatos sobre sua atividade acaricida do β -cariofileno ou dos óleos contendo este terpeno ou análogos contra *T. urticae*.

2.4. Ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae)

Tetranychus urticae (Koch, 1836) é uma espécie altamente polífaga e cosmopolita conhecida como ácaro rajado ou ácaro de duas manchas (Figura 10).¹¹² O adulto desta espécie tem uma forma ovalada e sua coloração é esverdeada, com duas manchas mais escuras de cada lado em seu dorso, medindo de 0,45 mm de comprimento e 0,24 mm de largura. Vive na parte posterior das folhas, normalmente no meio delas, tecendo teias (Figura 10, inferior) e sua alimentação é feita por escarificação do tecido vegetal de onde ocorre um extravasamento e o ácaro a succiona.¹¹³

¹¹²Moraes, G.J.; Flechtmann, C.H.W.; *Manual de Acarologia: Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil*, Holos: Ribeirão Preto, Brasil, 2008.

¹¹³Quintela, E.D.; *Manual de Identificação dos Insetos e Invertebrados: Pragas do Feijoeiro*, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2002.



Figura 10. Imagens do *T. urticae* Koch.¹¹⁴

Este tipo de ácaro causa danos consideráveis em culturas com grande importância econômica no Brasil, tais como, alface, algodão, amendoim, feijão, maçã, mamão, mandioca, melancia, melão, milho, morango, pepino, pera, pêssigo, pimentão, tomate e outras.^{112,115,116} As folhas infestadas por estes, tornam-se inicialmente amareladas, posteriormente ficam necrosadas com perfurações e, por fim, secam.¹¹⁷

No centro-oeste, onde se destacam os plantios de tomate, soja, feijão, algodão, milho, mandioca, as lavouras são atacadas por este tipo de praga que, durante os períodos secos (alta

¹¹⁴http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/acaro-do-morangueiro_2805.html, acessado em setembro de 2015.

¹¹⁵ Souza Filho, M.F.; Suplicy Filho, N.; Sato, M.E.; Takematsu, A.P.; *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília **1994**, 29, 1187.

¹¹⁶ Gallo, D.; Nakano O.; Neto, S. S.; Carvalho, R. P. L.; De Baptista, G. C.; Filho, E. B.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C.; *Entomologia Agrícola*. FEALQ: Piracicaba, 2002.

¹¹⁷ http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/acaro-rajado_126.html, acessado em setembro de 2015.

temperatura e baixa umidade relativa do ar), tem suas taxas de reprodução aumentadas.¹¹⁸ O aumento nas taxas de reprodução também varia segundo a espécie de planta hospedeira bem como outros fatores.^{119,120}

O ciclo de vida do *T. urticae* varia entre 10 e 12 dias a uma temperatura de 25 °C, sendo que em altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar seu desenvolvimento (da fase de ovo a fase adulta) pode se completar em 7 dias.¹²¹ Silva e colaboradores¹²² relataram que as fêmeas têm um período médio de pré-oviposição de 1,2 dias e de oviposição de 17,3 dias em média, alcançando um montante de 116,3 ovos postos durante o período reprodutivo. Em feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), planta da família Fabaceae amplamente cultivada nos países tropicais, o desenvolvimento do ácaro rajado é de 10,3 dias,

Nos tempos atuais, o controle dessa praga se dá por meio do emprego de pesticidas sintéticos (Figura 8, página 22) como também pela utilização de inimigos naturais, agentes de controle biológico como ácaros predadores (*N. californicus* e *P. macropilis*).^{123,124}

Existem ainda poucos registros do uso de óleos essenciais no combate ao ácaro rajado, o que torna o cerrado fonte promissora para investigações visando à descoberta de novos inseticidas botânicos para o controle dessa praga, em especial a família *Myrtaceae* dada a sua potencialidade na produção de óleos essenciais.¹²⁵

2.5. Família Myrtaceae: aspectos botânicos e químicos

A família Myrtaceae se insere na ordem das Myrtiliflorae (Myrtales) e subdivide-se em Myrtoideae e Leptospermoideae. Com cerca de 150 gêneros e aproximadamente 3600 espécies, Myrtaceae é considerada a segunda família da ordem.^{126,127} Espécies pertencentes a esta família, como *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Syzygium*, *Malaleuca*, *Crymbia*, *Calytrantes* e *Psidium*, têm ampla distribuição em território brasileiro.¹²⁶

¹¹⁸<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/pragas.htm>, acessado em setembro de 2015.

¹¹⁹ Peixoto, M.F.; Barbosa, R.V.; Oliveira, R.R.C.; Fernandes, P.M.; Costa, R.B.; *Biosci. J. Uberlândia* **2009**, *25*, 24.

¹²⁰ Kato, W.Y.; Motta, R.; Raizer, A.J.; Silva, J.M.; Takaoka, M.; Mariconi, F.A.M.; *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"* **1985**, *42*, 599.

¹²¹ Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Nava, D.E.; Garcia, M.S.; *Bioecologia, monitoramento e controle do ácaro-rajado com o emprego da azadiractina e ácaros predadores na cultura do morangueiro*, Circular Técnica 83, Embrapa, Bento Gonçalves, RS, 2010.

¹²² Silva, M.A., Parra, J.R.P.; Chiavegato, L.G.; *Pesqu. Agropecu. Bras.* **1985**, *20*, 7.

¹²³ Guimarães, J.A.; Michereff Filho, M.; Graciano, F.A.M.; Junqueira, A.M.R.; Setti de Liz, R.; *Ácaros Predadores no Manejo do Ácaro Rajado em Morangueiro no Distrito Federal*, Comunicado Técnico, Embrapa, Brasília, DF, 2010.

¹²⁴ Machi, A.R.; Araújo, R.V.; Morais, G.J.; Arthur, V.; *Bol. San. Veg. Plagas* **2012**, *38*, 17.

¹²⁵ Lima, M.E.L., Cordeiro, I.; Young, M.C.M.; Sobra, M.E.G.; Moreno, P. R. H.; *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 589.

¹²⁶ Landrum, L.R.; Kawasaki, M.L.; *Brittonia* **1997**, *49*, 508.

¹²⁷ Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, L.P.C.; *Rev. Bras. Bot.* **2006**, *29*, 509.

Apesar de sua grande representatividade, a quantidade de trabalhos que se referem ao tratamento taxonômico desta família ainda é considerado reduzido, talvez devido a grande diversidade de espécies e complexidade taxonômica.¹²⁸ São exemplos de espécies dessa família a pitangueira, a jabucabeira, a cambucazeiro, a araçazeiro, a goiabeira, dentre outras.¹²⁹

A subfamília Myrtoideae é encontrada no mundo inteiro, apresentando uma maior concentração na América tropical. Numericamente, as espécies com maior representatividade são: *Eugenia* com cerca de 600 espécies, *Myrcia* (300 espécies), *Syzygium* (200 espécies) e, por fim, a *Psidium* (100 espécies).¹²⁶ Já a subfamília Leptospermoideae apresenta maior concentração nos países da Oceania (Polinésia, Austrália e Malásia). Suas espécies mais representativas são *Eucalyptus*, com cerca de 500 espécies, e a *Melaleuca*, com 100 espécies.¹²⁸

A família Myrtaceae é bem representada na flora brasileira com muitas espécies representativas, aproximadamente 1034 espécies, distribuídas em 23 gêneros, sendo encontrados no cerrado 17 destes gêneros e um total de 262 espécies.¹³⁰ Apresenta uma diversificação vegetal como floresta atlântica¹³¹ e restinga,¹³² onde praticamente todos os espécimes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae.

Esta família vem se destacando em diversos estudos florísticos e fitossociológicos realizados nas diversas formações florestais do sudeste brasileiro.¹²⁵ Muitas espécies desta família que são nativas do cerrado brasileiro oferecem frutos que possuem características sensoriais singulares como também altas concentrações de nutrientes. Na Figura 11 são mostrados alguns exemplos de espécies comestíveis de gêneros pertencentes à família Myrtaceae.



Nome científico: *Eugenia cauliflora* O. Berg.
Nome comum: Jabuticabeira



Nome científico: *Psidium guajara*
Nome comum: Goiabeira



Nome científico: *Eugenia uniflora*
Nome comum: Pitangueira

Figura 11. Espécies representantes da família Myrtaceae.

¹²⁸Arantes, A.A.; Monteiro, R.; *Lundiana* **2002**, 3, 111.

¹²⁹Guilherme, F.A.G.; Morellato, L.P.C.; Assis, M.A.; *Rev. Bras. Bot.* **2004**, 27, 725.

¹³⁰ <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>, acessado em dezembro de 2015.

¹³¹Myers, N; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J.; *Nature* **2000**, 403, 853.

¹³² Lorenço, A.R.; Barbosa, M.R.V.; *Rodriguésia* **2012**, 63, 373.

Do ponto de vista da composição química, a característica básica de plantas da família Myrtaceae, conhecidas por serem ricas em óleos essenciais e pelo uso na medicina tradicional,¹²⁴ é a presença de taninos, flavonóides, monoterpênos, sesquiterpênos, triterpênos, cromenos, estilbenóides, dentre outros.¹³³ Fluoroglucínóis, cromenos e flavonóides são compostos fenólicos simples provenientes da via do ácido chiquímico, sendo os benzenóides derivados diretos do ácido cinâmico. A Figura 12 mostra as principais classes de substâncias encontradas em amostras de diversas espécies vegetais e as estruturas de alguns compostos que representam cada classe.

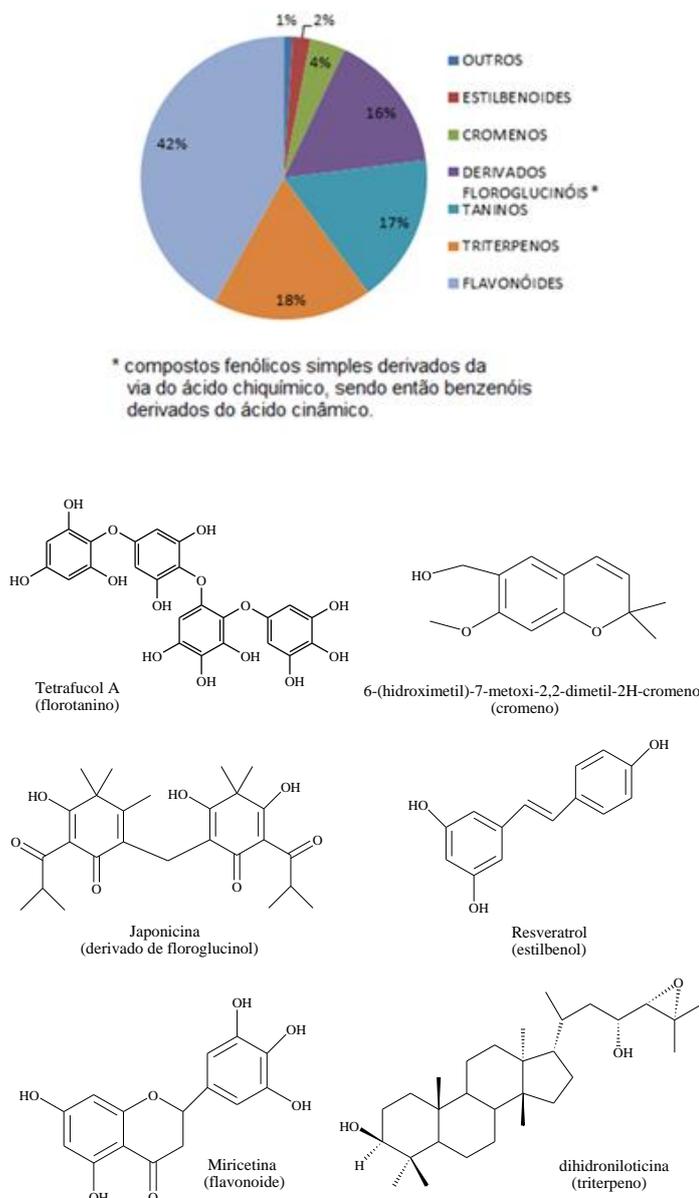


Figura 12. Perfil químico de amostras de espécies da família Myrtaceae.^{132,134,135}

¹³³ Cruz, A.V.M.; Kaplan, M.A.C.; *Floresta e Ambiente* **2004**, *11*, 47.

¹³⁴ Hagerman, A.E.; Riedl, K.M.; Jones, G.A.; Sovik, K.N.; Ritchard, N.T.; Hartzfeld, P.W.; Riechel, T.L.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1887.

Diversas substâncias já foram identificadas em espécies pertencentes aos gêneros da família Myrtaceae e descritas em literatura especializada. Na Tabela 3 são mostrados exemplos representativos desta natureza.¹³⁵⁻¹⁴³

Em trabalho recente, Cruz e colaboradores relataram que plantas da família Myrtaceae são pouco empregadas para fins medicinais no território brasileiro. Ainda assim, são encontrados registros do uso de espécies desta família no tratamento de hemorragias, distúrbios gastrointestinais, doenças infecciosas, dentre outros.¹³²

¹³⁵ França, H.S.; Kuster, R.M.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 1103.

¹³⁶ Braga, R. *Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará*, 2ª Ed., UFC, Fortaleza, Brasil, 1960.

¹³⁷ Matos, F.J.A.; *Farmácias Vivas*, 3ª Ed., EUFC, Fortaleza, Brasil, 1988.

¹³⁸ Corrêa, P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, Brasil, 1984.

¹³⁹ Doran, J. C.; Caruhapattana, B.; Namsavat, S.; *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 627.

¹⁴⁰ Guenther, E.; *The Essential Oils*; 4º vol., Ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, EUA, 1952.

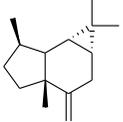
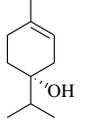
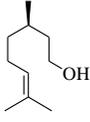
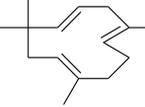
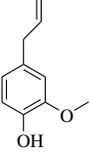
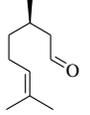
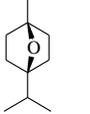
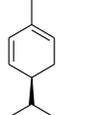
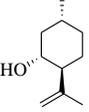
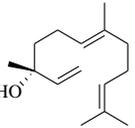
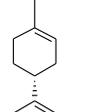
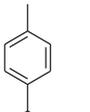
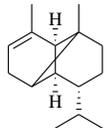
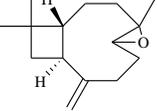
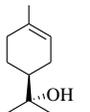
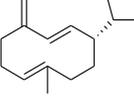
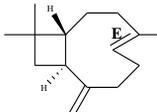
¹⁴¹ Roulier, G. *Les Huiles Essentielles Pour Votre Santé*; Éditions Dangles, St-Jean-de-Braye, France, 1990.

¹⁴² Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; Alencar, J.W.; Machado, M.I.L.; Teixeira, L.L.; *Quím. Industrial* **1989**, *2*, 60.

¹⁴³ Limberger, P.R.; Sobral, M.; Henriques, A.T.; Menut, C.; Bessière, J.M.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 916.

¹⁴⁴ Vallilo, M.I.; Lamardo, L.C.; Gaberlotti, M.L.; De Oliveira E.; Moreno, P.R.H.; *Ciênc. Technol. Aliment.* **2006**, *26*, 805.

Tabela 3. Exemplos representativos de substâncias identificadas em diversas espécies de Myrtaceae.

	<i>Eucalyptus maculata</i> Hook ¹³⁵ <i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ^{132,136}		<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn ^{135,139} <i>Eucalyptus maculate</i> Hook ¹³⁵ <i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ^{135,139,140}		<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook ^{135,139,140}
Aromadendreno		Terpinen-4-ol		Citronelol	
	<i>Eugenia caryophyllus</i> Spreng ¹³⁷ <i>Eugenia uniflora</i> L. ¹³⁵		<i>Eugenia caryophyllus</i> Spreng ^{137,139}		<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook ^{135,137,140}
α -Humuleno		Eugenol		Citronelal	
	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn ¹³⁸ <i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ¹³⁵		<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn ^{139,140} <i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ^{135,139}		<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn ^{138,139,140}
α -Pineno		1,8-Cineol		α -Felandreno	
	<i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ^{135,139} <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook ^{135,137}		<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook ^{135,136,137}		<i>Myrcia bracteata</i> (Rich) DC ¹⁴² <i>Myrcia cúprea</i> ¹⁴² <i>Myrcia sylvatica</i> (G.Mey.) DC ¹⁴²
β -Pineno		Isopulegol		Nerolidol	
	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn ^{138,125} <i>Eucalyptus theteticornis</i> Smith ^{135,139} <i>Eucalyptus maculate</i> Hook ¹³⁵		<i>Eucalyptus maculata</i> Hook ¹³⁵		<i>Campomanesia adamantium</i> O. Berg ¹⁴³
Limoneno		p-Cimeno		α -Copaeno	
	<i>Eugenia caryophyllus</i> Spreng ^{137,141} <i>Eucalyptus maculata</i> Hook ¹³⁵		<i>Campomanesia adamantium</i> O. Berg ¹⁴³		<i>Myrcia fallax</i> ¹⁴² <i>Myrcia bombycina</i> (O. Berg) Kiaersk ¹⁴² <i>Myrcia acuminatissima</i> O. Berg ¹⁴² <i>Myrcia multiflora</i> ¹⁴² <i>Myrcia glarba</i> (O.Berg) D. Legrand ¹⁴²
Oxido de cariofileno		α -Terpineol		D-Germacreno	
	<i>Eugenia uniflora</i> L. ^{135,137} <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook ^{135,137,139} <i>Eugenia caryophyllus</i> Spreng ^{136,138,140} <i>Eucalyptus maculata</i> Hook ¹³⁵				
β -Cariofileno					

2.6. Gênero *Eugenia*: distribuição e uso medicinal

O gênero *Eugenia* tem ampla distribuição na América latina, estendendo-se da Argentina ao México. Mais de 500 espécies foram catalogadas nas Américas tropicais e subtropicais,¹⁴⁵ destas aproximadamente 388 espécies podem ser encontradas na flora brasileira.¹⁴⁶

O site “reflora” realizou uma pesquisa por espécies do gênero *Eugenia* no domínio fitográfico do cerrado, na qual foi descrito em torno de 300 espécies endêmicas ao Brasil, dentre estas citamos: *E. albo-tomentosa* Cambess, *E. angustana* Kiaersk, *E. biflora* DC., *E. campestris* DC., *E. dysenterica* DC., *E. egensis* DC., *E. florida* DC., *E. glandulosa* Blanco, *E. klotzchiana* Berg, *E. lutescens* Camb., *E. pitanga* (Berg.) Kiaersk, *E. uniflora* L.¹⁴⁷

Espécies do gênero *Eugenia* produzem grande quantidade de óleos essenciais e taninos, e fornecem frutos comestíveis muito apreciados pelos homens e animais silvestres.¹⁴⁸ Também podem ser empregadas na medicina popular para tratamento de casos de diarreia, asma, dor de garganta, febre, reumatismo e outras enfermidades.¹⁴⁹ A Tabela 4 mostra utilizações populares de algumas espécies.

¹⁴⁵Auricchio, T.; Bacchi, M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2003**, 62, 55.

¹⁴⁶de Oliveira, R.N.; Dias, I.J.M.; Câmara, C.A.G., *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 39.

¹⁴⁷<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>, acessado em setembro de 2015.

¹⁴⁸Lunardi, I.; Peixoto, J.L.B.; da Silva, C.C.; Shuquel, I.T.A.; Basso, E.A.; Vidotti, G.J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 180.

¹⁴⁹Carvalho Júnior, A.R.; Gomes, G.E.; Ferreira, R.O.; de Carvalho M. G.; *Quím. Nova* **2014**, 37, 477.

Tabela 4. Usos populares de diferentes espécies de *Eugenia*.¹⁴⁹

Espécie	Nome popular	Uso medicinal	Parte utilizada
<i>E. cauliflora</i> O. Berg	Jabuticaba	Asma, dor de garganta, provoca diarreia	Cascas
<i>E. brasiliensis</i> Lam.	Grumixama, Ibaporoiti	Diurético, antirreumático	Casca, folhas
<i>E. dysenterica</i> DC.	Cagaita	Reduz a prisão de ventre, provoca diarreia, cicatrizante, males dos rins e da bexiga	Frutos, folhas
<i>E. cf biflora</i> L.	Murta, Pedra-hume	“Doença de mulher”	Folhas
<i>E. jambos</i> L.	Jambo	Diabetes, adstringente	Folhas
<i>E. jambolana</i> Lam.	Jambolão	Diabetes	Folhas
<i>E. puniceifolia</i> (H.B.K.) DC.	Murta	Febre, resfriado, diabetes, males do fígado.	Folhas, raízes
<i>E. sulcata</i> Spring	Pitangueira selvagem	Provoca diarreia	Folhas
<i>E. uniflora</i> L.	Pitanga	Gota, reumatismo, febre, hipercolesterolemia, gripe, provoca diarreia	Folhas
<i>E. supra-axillaris</i> Spring	Fruta de tatu ou Tatucaá	Provoca diarreia	Folhas

A grande riqueza das espécies do gênero *Eugenia* no que se refere ao teor de óleos essenciais aliada aos seus usos na medicina popular, fazem com essas plantas sejam bastante estudadas quanto suas possíveis atividades biológicas como antifúngicas e antibacterianas. Tais atividades parecem estar relacionadas ao alto teor de monoterpenos oxigenados.¹⁵⁰

¹⁵⁰ Stefanello, M.E.A.; Pascoal, A.C.R.F.; Salvador, M.J.; *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 73.

Estudos sobre a composição química de óleo de várias espécies do gênero *Eugenia* demonstram que os sesquiterpenos cíclicos, a exemplo β -cariofileno, predominam nos óleos essenciais das folhas, seguidos por uma fração menor de monoterpenos.^{151,152}

No intuito de conhecer a composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eugenia* endêmicas do cerrado e avaliar a susceptibilidade a variação química em função de efeitos genéticos e edafoclimáticos, escolheu-se três de *Eugenia* amplamente distribuídas no Distrito Federal para obtenção dos óleos, estudo dos efeitos sazonais e da atividade acaricida destes OE e do composto majoritário e comum às espécies, sendo elas: *E. dysenterica*, *E. lutescens* e *E. langsdorffii*.

2.6.1. *Eugenia dysenterica* DC

Conhecida popularmente como “cagaita” ou “cagaiteira”, *Eugenia dysenterica* DC (Figura 13) é encontrada nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Tocantins e Bahia.¹⁵³ O nome popular da *E. dysenterica* teve origem no fato de a polpa do fruto, quando muito maduro e ingerido em grande quantidade atuar como laxante natural, chegando a provocar complicações mais severas como a diarreia.¹⁵⁴

¹⁵¹Alcântara, J.M.; Yamaguchi, K.K.L.; Silva, J.R.A.; Veiga Junior, V.F.; *Acta Amazonica* **2010**, *40*, 567.

¹⁵²Fiuza, T.S.; Rezende, M.H.; Sabóia-Morais, S.M.T.; Bara, M.T.F.; Tresvenzol, L.M.F.; de Paula, J.R.; *Rev. Eletrônica de Farmácia* **2008**, *V*, 1.

¹⁵³Silva, R.S.M.; Chaves, L.J.; Naves, R.V.; *Ver. Bras. Frutic.* **2001**, *23*, 330.

¹⁵⁴Sousa, J.S.I.; Peixoto, A.M.; de Toledo, F.F.; Reichardt, K.; *Enciclopédia Agrícola Brasileira*, Vol. 2 C-D, Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998, pág. 59.



Figura 13. Exemplo de *E. dysenterica* DC (Fotos: arquivo pessoal).

No Distrito Federal, esta espécie é protegida de corte devido ao seu tombamento como patrimônio ecológico (Decreto Distrital nº 14.783 de 17 de Junho de 1993).¹⁵⁵ Os seus frutos (Figura 14) são considerados exóticos e desempenham um importante papel do ponto de vista econômico no centro-oeste brasileiro.^{156,157}

E. dysenterica é encontrada como uma árvore de até 10 metros de comprimento, copa compacta e avermelhada quando há predominância de folhas jovens (início da floração). Suas folhas são simples, opostas entre elas e cruzadas, glabras (não possuem pelos) apresentando suas margens lisas e com dimensões de 3 a 10 cm de comprimento e de 1 a 5 cm de largura.¹⁵⁸

¹⁵⁵<http://cidadaoecologicobrasiliense.files.wordpress.com/2011/05/lei-df-14783-93-tombamento-de-esp3a9cies-de-c3a1rvores-do-df.pdf>, acessado em setembro de 2015.

¹⁵⁶Santos, P.R.G.; Cardoso, L.M.; Bedetti, S.F.; Hamacek, F.R.; Moreira, A.V.B.; Martino, H.S.D.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2012**, *71*, 281.

¹⁵⁷Cardoso, L.M.; Martino, H.S.D.; Moreira, A.V.B.; Ribeiro, S.M.R.; Sant'ana, H.M.P., *Food Res Int.* **2011**, *44*, 2151.

¹⁵⁸Mazuti-Silva, S.M.; Gasca-Silva, C. A.; Fonseca-Bazzo, Y.M.; Magalhães, P.O.; Silveira, D.; *Infarma – Ciênc. Farm.* **2015**, *27*, 49.



Figura 14. Fruto de *E. dysenterica* DC.¹⁵⁹

Duarte e colaboradores¹⁶⁰ relataram a influência que o efeito sazonal causa na composição dos óleos essenciais de *E. dysenterica*. Amostras de folhas coletadas na cidade de Senador Canedo - Goiás (16°41'13.9"S 49°06'19.4" W), na época do inverno foi caracterizada por seu elevado percentual de β -pineno, α -pineno e (*Z*)- β -ocimeno. Por outro lado, nas amostras coletadas (nos mesmos indivíduos) no verão, os constituintes com teor mais elevado foram: γ -cadineno, limoneno e β -pineno. Assim, concluíram que as variações se dão também pela influência do fator sazonal da chuva ou seca.¹⁶⁰

Estudos da composição química indicam variações em relação ao percentual dos constituintes em função de outras partes da planta utilizada na extração. Onde nas cascas predominam os sesquiterpenos, em especial α -tujuleno, óxido de cariofileno, β -cariofileno, α -humuleno e α -copaeno.¹⁶¹

2.6.2. *Eugenia langsdorffii* O. Berg.

Eugenia langsdorffii é considerada uma espécie representativa do cerrado, tendo como sinônimo o homotípico *Myrtus langsdorffii* (O.Berg) Kuntze. Seu domínio fitogeográfico é predominantemente o cerrado *stricto sensu* (fisionomia caracterizada por savana com árvores baixas e retorcidas, do tipo arbustos, subarbustos e ervas)¹⁶² e cerradão (savanas densas),¹⁰ com

¹⁵⁹<https://www.petitgastro.com.br/gastronomia-brasileira-ingredientes-tipicos-tucupi-jambu-e-cagaita/>, acessado em setembro de 2015.

¹⁶⁰Duarte, A.R.; Naves, R.R.; Santos, S.C.; Seraphin, J.C.; Ferri, P.H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 967.

¹⁶¹<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/5858.htm>, acessado em setembro de 2015.

¹⁶²Spínola, C.M.; Bechara, F.C.; Barretto, K.D.; *Rev. Bras. Biociên.* **2007**, *5*, 378.

destaque no centro-oeste para os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e na região sudeste o estado de Minas Gerais.¹⁶³

Trata-se de um arbusto pequeno, aproximadamente 40 cm de altura, com muitos brotos partindo de um xilopódio subterrâneo (Figura 15). Suas folhas são simples, opostas e cruzadas, com glabras e margens lisas e curvadas, apresentando dimensões de 5 a 20 cm de comprimento e de 1 a 3 cm de largura.¹⁶⁴ Possui fruto na forma de uma núcula sem cúpula, formado sobre um pedúnculo carnoso (semelhante ao caju).¹⁶⁵



Figura 15. Exemplar da espécie *E. langsdorffii* (Fotos: arquivo pessoal).

Na literatura existem poucos registros a respeito da *E. langsdorffii*, em especial quanto à composição química e atividade biológica. Estudos preliminares realizados em nosso grupo de pesquisa revelaram que os óleos essenciais de *E. langsdorffii* exibem alta percentagem de sesquiterpenos e pronunciada atividade fumigante contra *T. urticae*, com baixa toxicidade residual.¹⁶⁵

¹⁶³<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>, acessado em setembro de 2015.

¹⁶⁴Martius, K.F.P.V.; Eichler, A.W.; Endlicher, I.L.; Fenzl, E.; Mary, B.; Oldenburg, R.; Urban, I.; *Flora Brasiliensis – Enumeratio Plantarum, in Brasilia Hactenus Detectarum*, vol. 14, Part. 1, Monachii et Lipsiae, R. Oldenbourg, 1840-1906, Cap. 7, pág. 568-569,

¹⁶⁵de Moraes, M.M.; Camara, C.A.G.; Dos Santos, M.L.; Fagg, C.W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 1647.

2.6.3. *Eugenia lutescens* Cambess

Eugenia lutescens Cambess é uma espécie pouco frequente no cerrado, apesar de ser este o seu domínio fitogeográfico. Encontra-se distribuída nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Tem como sinônimo o heterotípico *Eugenia sellowiana* DC.¹⁶³

Esta se apresenta como um arbusto de 30 cm a 1,0 metros de comprimento. Suas folhas são elípticas e lanceoladas, com a base arredondada, cuneada ou aguda, as dimensões variam de 0,6 a 7,2 cm de comprimento e a largura de 0,4 a 3,5 cm. Apresenta nervura média saliente na face axial, pubescentes (possuem pelos esbranquiçados) com diferenciações nas várias partes da planta, ramos, folhas, botões florais e flores densamente pilosos, com indumento acinzentado.¹⁶⁶ Se cultivada em solos fertilizados pode chegar a quase 3,5 metros de altura, e se parece muito com a *E. pyriformis* (conhecida como uvaia), diferenciando-se apenas pelos frutos e folhas pubescentes (Figura 16).



Figura 16. Espécime de *E. lutescens* (direita) evidenciando as características frontal e dorsal das folhas (Fotos: arquivo pessoal).

¹⁶⁶Martius, K.F.P.V.; Eichler, A.W.; Endlicher, I.L.; Fenzl, E.; Mary, B.; Oldenburg, R.; Urban, I.; *Flora Brasiliensis – Enumeratio Plantarum*. Em: *Brasilia Hactenus Detectarum*, vol. 14, Part. 1, Monachii et Lipsiae, R. Oldenburg, 1840-1906, Cap. 7, pág. 308.

Os frutos *E. lutescens* chamados de uvaia do campo, também são conhecidos por perinha do cerrado, uvainha doce ou mesmo uvainha pubescente (Figura 17).¹⁶⁷



Figura 17. Detalhe da folha (esquerda) e partes aéreas com fruto na planta de *E. lutescens* (direita).¹⁶⁸

Não foram encontrados registros na literatura a respeito da *E. lutescens* relativos à composição química e atividade biológica.

Considerando que o cerrado brasileiro é pouco explorado no que tange a prospecção de ativos biológicos como óleos essenciais ou mesmo isolamento de compostos ativos, o presente estudo com três espécies do gênero *Eugenia* acessíveis no cerrado se torna importante, pois os óleos ou compostos isolados poderão ter ação inseticida, acaricida e outras.

¹⁶⁷<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/10782741264>, acessado em setembro de 2015.

¹⁶⁸<http://www.colecionandofrutas.org/eugenialutescens.htm>, acessado em setembro de 2015.

**Materiais e
Métodos**

3. Materiais e Métodos

Ações estratégicas do presente estudo estão baseadas em várias etapas metodológicas, as quais encontram detalhadas a seguir:

3.1. Determinação das composições químicas dos óleos essenciais e identificação do componente majoritário e comum nas folhas de *Eugenia*

3.1.1. Coleta das folhas de *Eugenia* para extração dos óleos essenciais

Folhas frescas de *E. dysenterica* (15°46'17.3"S 47°52'00.3"W), *E. lutescens* (15°45'56.2"S 47°51'26.1"W) e *E. langsdorffii* (15°46'23.5"S 47°51'58.2"W) para extração dos óleos essenciais foram coletadas no período da manhã em duas épocas dos anos de 2012 e 2014 (março e agosto) no bioma cerrado, ao redor do campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal. As plantas foram identificadas pelos botânicos Christian W. Fagg e Jair Faria Jn do Departamento de Botânica da UnB e depositadas no herbário da UnB, sob os números: Fagg CW 2188 (*E. dysenterica*); Fagg CW 2189 (*E. lutescens*) e Faria Jn JEQ & Fagg CW 918 (*E. langsdorffii*).

3.1.2. Coleta das folhas de *Eugenia* para análise dos voláteis no pós-colheita

Porções de folhas de cada espécie foram coletadas, simultaneamente à coleta para a extração do óleo essencial de ambos os períodos do ano de 2014, e acondicionadas em sacos revestidos por alumínio (um para cada coleta/espécie) com capacidade para 500 mg de amostra. Estes sacos foram recheados por folhas até sua metade, o que permitiu fechamento do lacre. Frascos de 50 mL de volume, com batoques que permitiam a entrada da agulha sem que houvesse ruptura, foram preenchidos com 25 mL de diclorometano P.A. e a estes foi aborbulhado 50 mL do ar proveniente de cada saco contendo as folhas coletadas, utilizando-se uma seringa de vidro com volume interno de 50 mL acoplada a uma agulha metálica. Esta ação foi repetida por cinco vezes e em triplicata para cada amostra.

3.1.3. Obtenção dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia*

Para obtenção dos óleos essenciais, em experimentos independentes, porções de folhas frescas das espécies *E. dysenterica* (EDY), *E. lutescens* (ELU) e *E. langsdorffii* (ELA) foram lavadas, pesadas (100g), trituradas com água destilada (1000 mL) e submetidas à hidrodestilação por 2 horas em um aparelho de Clevenger modificado (Figura 18). Após transferência do extrato para funil decantador, o óleo essencial menos denso do que a água é preliminarmente separado. A fase aquosa foi extraída com três porções de diclorometano P.A., os extratos foram misturados e o combinado foi secado com sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente, os óleos foram transferidos para um frasco âmbar de 5 mL tarado e por fim armazenados em geladeira comum para análise posterior por CG-EM. Para determinação dos rendimentos, as extrações foram realizadas em triplicata e no cálculo considerou-se a massa do material fresco utilizado. Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva para obtenção dos respectivos desvios padrões.

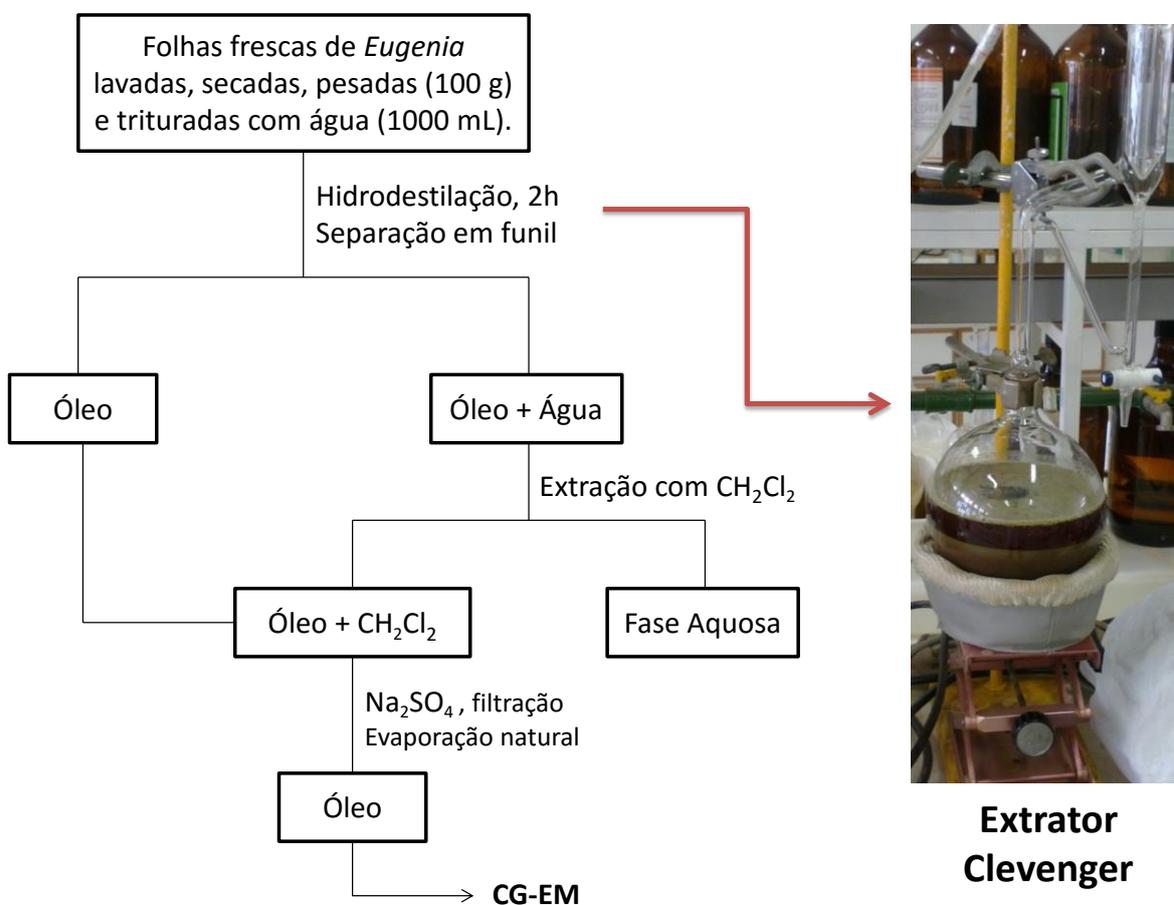


Figura 18. Aparelhagem do tipo Clevenger usada na hidrodestilação das folhas de *Eugenia* (A) e ampliação evidenciando a separação do sistema óleo/água (B) (Foto: arquivo pessoal).

3.1.4. Análises dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa

As análises por CG foram realizadas utilizando um instrumento Hewlett-Packard 5890 Series II GC, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com dimensões 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm (modelo DB-5 da J & W Scientific). A temperatura do forno foi programada entre 50 a 250 °C a uma taxa de 3 °C/min para fins de integração. Temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 250°C. Hidrogênio foi utilizado como gás transportador, a uma velocidade de 1 L/min e 30 p.s.i. no modo *split* (1:30). O volume de injeção foi de 0,5µL de solução diluída (1/100) de amostra em hexano. A análise quantitativa de cada composto foi realizada a partir das áreas dos picos do cromatograma e os valores foram expressos como uma percentagem relativa da área total de cada pico. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados submetidos à análise estatística descritiva.

3.1.5. Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

As análises por CG-ME foram realizadas em um instrumento Hewlett-Packard GC/MS (GC: 5890 SERIES II/ GC-MS: MSD 5971) operando com impacto eletrônico de 70 eV equipado com a mesma coluna e programa dos experimentos utilizados no CG. O gás transportador utilizado foi o hélio, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, no modo *split* (1:30). O volume de injeção foi de 1 µL de uma solução 1/100 de amostra em hexano. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados submetidos à análise estatística descritiva.

3.1.6. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais

A identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* foi baseada em índices de retenção do CG, com referência a uma série homóloga de *n*-alcanos (C₁₁-C₂₄), utilizando para o cálculo a equação de Van den Dool & Kratz,¹⁶⁹ pela comparação direta das sugestões das massas disponíveis na biblioteca de espectro de massas do sistema de dados do CG-EM (NIST 98 e WILEY) bem como por comparação com outros espectros de massas publicados.¹⁷⁰ As áreas percentuais foram obtidas eletronicamente a partir da resposta do CG-FID, sem a utilização de um padrão ou fator de correção. Foram utilizados para identificação de componentes voláteis monoterpênicos e sesquiterpênicos comerciais (β -pineno, α -pineno, limoneno, α -terpineol, β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno e valenceno) adquiridos junto à Sigma-Aldrich – Brasil.

¹⁶⁹ Van Den Dool, E.; Kratz, P.A.; *J. of Chromatogr. Scienc.* **1963**, *11*, 463.

¹⁷⁰ Adams, R.P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, EUA, 1995.

3.2. Testes Acaricidas

3.2.1. Criação de *Tetranychus urticae*

A população de *T. urticae* foi adquirida do Laboratório de Acarologia Agrícola da Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE). A criação foi estabelecida no Laboratório de Inseticidas Naturais, Departamento de Agronomia da UFRPE sobre plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.), que frequentemente foram cultivadas em vasos com capacidade de 5L contendo terra misturada com húmus 3:1 (Figura 19). Para manutenção da criação, plantas com 25 dias de idade foram infestadas com ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro rajado. A criação estoque não foi exposta aos acaricidas e foi mantida sob a temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 65 ± 5 % e 12 h fotofase.

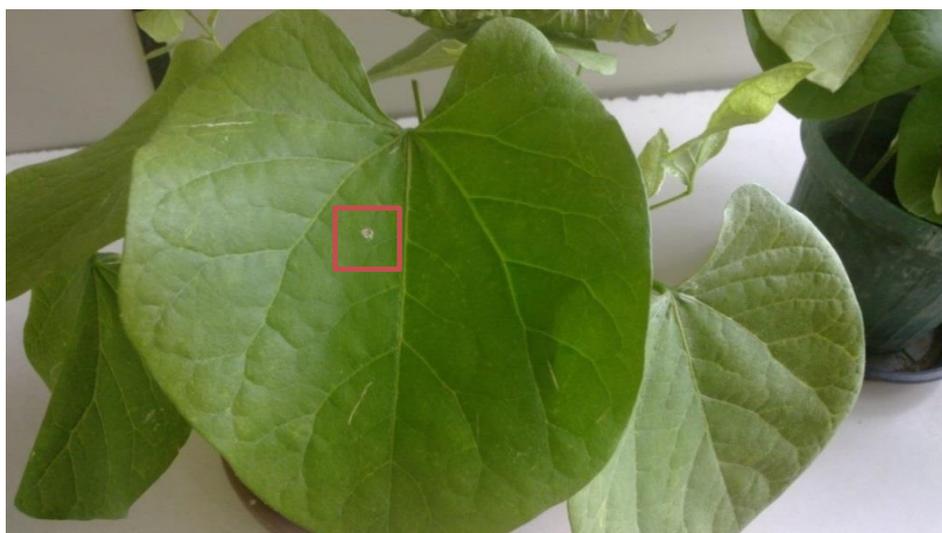


Figura 19. Cultura de *T. urticae* em feijão-de-porco (Foto: arquivo pessoal).

3.2.2. Bioensaio de fumigação

Os experimentos de fumigação foram conduzidos em conformidade com a metodologia descrita por Pontes e colaboradores.¹⁷¹ Recipientes de vidros com capacidade de 2,5 L foram usados como câmaras de fumigação. Três discos de folha de feijão-de-porco com diâmetro de 2,5 cm, foram colocados equidistantes um do outro sobre uma placa de Petri com 9 cm de diâmetro contendo um disco de papel de filtro saturado com água destilada para evitar a migração dos ácaros e manter a turgidez das folhas. Em cada um dos discos de folha recortados foram colocados 10 ácaros (fêmeas adultas). As placas de Petri foram colocadas dentro das câmaras de fumigação (Figura 20), resultando em 30 fêmeas adultas por câmara (10 ácaros por disco). Os

¹⁷¹Pontes, W.J.T.;Oliveira, J.C.S.; Câmara, C.A.G.; Lopes, A.C.H.R.; Godim Junior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Barros, R.; Schwartz, M.O.E.; *Acta Amazonica* **2007**, 37, 103.

óleos das espécies de *Eugenia* foram aplicados com auxílio de uma pipeta automática (5 µL) em tiras de papel de filtro na medida de 10 x 2 cm, presas à superfície interna da tampa da câmara de fumigação. As concentrações usadas variaram de $6,4 \times 10^{-5}$ a $1,2 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar, de acordo com a atividade que os óleos desenvolverem. As diluições das amostras foram feitas em diclorometano P.A., aplicado também como controle negativo. Eugenol comercial (Sigma-Aldrich – Brasil) foi usado como controle positivo. Todas as análises foram feitas em triplicata, empregando-se câmaras de fumigação diferentes. Os resultados foram avaliados após 24h de exposição. Ácaros incapazes de caminhar ao leve toque foram considerados mortos.

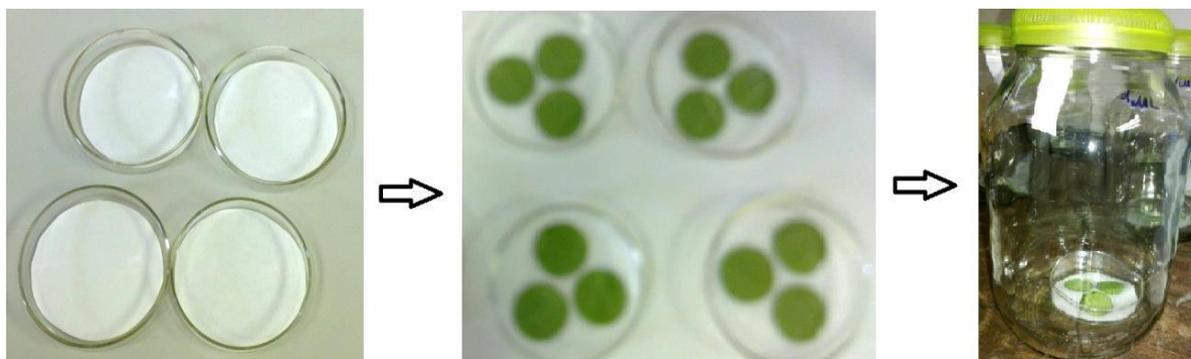


Figura 20. Sequência esquemática do teste de fumigação com os óleos essenciais.

3.2.3. Teste de fecundidade (deterência)

O efeito deterrente dos vapores dos óleos das espécies de *Eugenia* na oviposição de *T. urticae* foi determinado utilizando a metodologia adaptada do bioensaio de fumigação de Pontes e colaboradores.¹⁵⁵ Cinco folhas de feijão-de-porco (1,5 cm) foram colocadas equidistantes em uma placa Petri (10 cm), contendo papel de filtro saturado com água. Cada disco de folha foi infestado com um adulto *T. urticae* fêmea, totalizando cinco fêmeas por placa de Petri. Os óleos essenciais foram aplicados a tiras de papel de filtro (10 X 2 cm), ligado à superfície com o auxílio de uma pipeta automática. As concentrações utilizadas nos ensaios de fecundidade foram as CL_{25} as encontradas para os óleos das folhas de *Eugenia* e do eugenol utilizado como controle positivo ($0,001 \text{ mL.L}^{-1}$ de ar). Nenhuma substância foi utilizada como controle negativo. Imediatamente após a aplicação do óleo, a câmara de fumigação foi fechada e coberta com filme plástico PVC®. Um delineamento inteiramente casualizado foi empregado, com cinco repetições, totalizando 10 repetições. Os números de ovos nos tratamentos e controles foram registrados após 24 horas.

3.3. Análises estatísticas

Para verificar, em uma mesma análise, a correlação entre os compostos identificados nos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* e suas respectivas concentrações, as associações entre as espécies de *Eugenia* e a relação dos compostos inter e intraespécies realizou-se um estudo por Análise de Componentes Principais (PCA), empregando o Software R versão 3.2.2 e conduzido de acordo com a metodologia de Mingoti.¹⁷² Nos bioensaios de toxicidade fumigante e de fecundidade com *T. urticae*, após atenderem aos testes de normalidade e homogeneidade de variância, os dados foram submetidos à análise de Probit e as concentrações letais (CL₅₀) estimadas utilizando-se software POLO-PC adquirido.¹⁷³ A metodologia de Robertson e Preisler¹⁷⁴ foi utilizada para o cálculo das razões de toxicidade, com seus respectivos intervalos de confiança a 95%. Os dados referentes aos percentuais relativos dos compostos identificados nos óleos das espécies de *Eugenia* nos diferentes períodos de coleta, bem como os dados de fecundidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) no programa estatístico SAS Institute.¹⁷⁵

3.4. Modificações químicas no composto majoritário e comum às espécies de *Eugenia*

3.4.1. Procedimentos gerais

- Os reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Merck, Vetec) e, quando necessários, purificados de acordo com procedimentos descritos na literatura.¹⁷⁶
- As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em placas de silicagel suportada em alumínio 60F₂₅₄/0,2 mm (ALUGRAM[®], Macherey-Nagel), utilizando como revelador uma solução de vanilina sulfúrica.
- Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna clássica utilizando silicagel 60 (0,05 – 0,2 mm) como suporte, empregando hexano-acetato de etila em concentrações apropriadas como eluente.
- Os espectros de IV foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 100 FT – IR, utilizando análise por ATR, com frequências expressas em cm⁻¹.
- Os espectros de RMN foram obtidos em sua maioria em espectrômetro Bruker Avance[™] UltraShield[™] Plus (9,4 T), operando a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C, outros em espectrômetro Varian Mercury Plus (7,05 T), operando a 300 MHz para ¹H e 75,46 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) com

¹⁷²Mingoti, S.A.; *Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: Uma Abordagem Aplicada*, UFMG, Belo Horizonte, MG, 2007.

¹⁷³Leora, *POLO-PC: An user's guide to Probit or Logit analysis*, LeOra Software, Berkely, CA, 1987.

¹⁷⁴Robertson, J. L.; Preisler, H. K.; *Pesticide Bioassays with Arthropods*, CRC Press: California, 1992.

¹⁷⁵SAS Institute. SAS, *User's Guide: Statistics, Version 9.0*, 7th Ed., SAS Institute, Cary, NC, 2002.

¹⁷⁶Armarego, W.L.F.; Perrin, D.D.; *Purification of laboratory chemicals*. 4^a Ed. 2000.

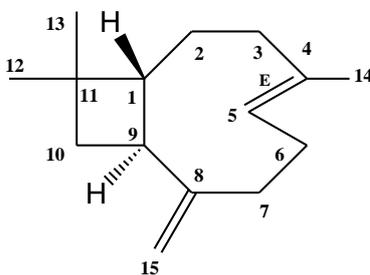
referência ao tetrametilsilano (TMS) para RMN ^1H e clorofórmio deuterado (CDCl_3) para RMN ^{13}C . As constantes de acoplamento (J) foram reportadas em Hz e os padrões de acoplamento definidos por: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), dd (duplete de duplete), dt (duplete de triplete), td (triplete de duplete), ddd (duplete de duplete de duplete), ddt (duplo duplete de triplete), dtd (duplo triplete de duplete) e bl (banda larga). Os espectros foram processados no programa ACD Labs 12.01.

- Os espectros de massa foram registrados em equipamento Hewlett-Packard GC/MS (GC: 5890 SERIES II/ GC-MS: MSD 5971) operando nas mesmas condições empregadas nas análises dos óleos das espécies de *Eugenia*.
- As estruturas dos compostos e seus nomes foram obtidos utilizando-se o programa ChemBioOffice 2008.

3.4.2. Caracterização da matéria-prima (β -cariofileno 98,5%)

O sesquiterpeno β -cariofileno, adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, Brasil), foi analisado para determinação da pureza e da compatibilidade analítica com o β -cariofileno isolado de *E. dyzenterica* (*in natura*). As análises foram realizadas via CG-EM (co-injeção) e a elucidação estrutural foi confirmada por IV, RMN ^1H e ^{13}C .

3.4.2.1. Dados do β -cariofileno 98,5% [(Z,1R,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-4-eno]



Características: óleo incolor ou amarelo pálido, com $R_f = 0,76$ (Hexano:AcOEt 9:1).

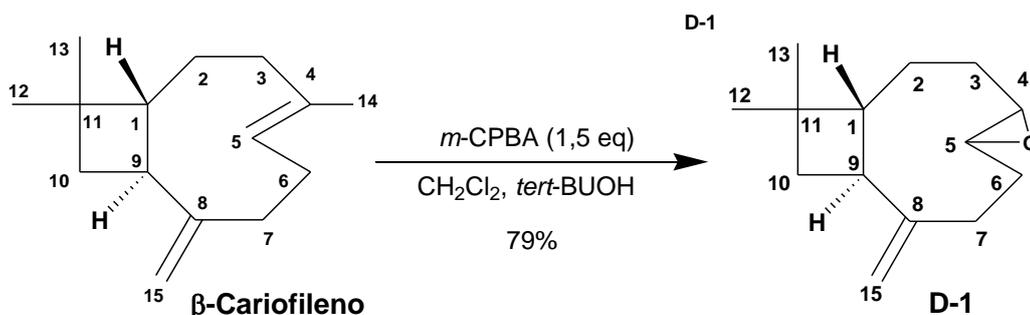
IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 167) cm^{-1} : 2949; 2926; 2855; 2356; 1615; 1463; 1257; 838; 581; 478.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 168) δ : 5,31 (dd, 1H, $J = 9,8, 4,5$ Hz); 4,94 (s, 1 H); 4,82 (s, 1 H); 2,52-2,41 (m, 1H); 2,37-2,30 (m, 2 H); 2,27-2,18 (m, 1 H); 2,13-2,07 (m, 1 H); 2,02-1,97 (m, 2 H); 1,91, td ($J = 12,3, 12,3, 4,8$ Hz); 1,64-1,70 (m, 2 H); 1,61 (s, 3 H); 1,43-1,55 (m, 2 H); 1,00 (s, 3 H); 0,97 (s, 3 H);

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, página 169) δ: (Isômero β α) 154,7; 135,5; 124,3; 111,6; 53,6; 48,5; 40,3; 40,0; 34,8; 33,0; 30,1; 29,3; 28,4; 22,6; 16,3. (Isômero β β) 155,0; 135,0; 124,5; 110,8; 55,9; 49,3; 42,6; 34,8; 39,8; 34,0; 29,9; 31,3; 29,8; 21,6; 17,0;

3.4.3. Preparação e caracterização do derivado 1 (4,12,12-Trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.0^{4,6}]dodecano)

3.4.3.1. Reação de epoxidação – Método 1



Em um balão de capacidade para 50 mL, foram adicionados 253,75 mg (1,22 mmol) de β -cariofileno (98,5%), 316,7 mg (1,5 eq; 1,84 mmol) de *m*-CPBA, 3 mL de álcool *tert*-butilico e 3 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 10 horas. Após esse tempo, a mistura foi transferida para um funil de decantação e extraída com diclorometano (3 x 10 mL), a fase orgânica foi tratada sequencialmente com solução de NaOH 10% (3 X 25 mL), solução de NaCl saturada (3 X 25 mL), secada com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador e o resíduo foi purificado em coluna de sílica 60 com hexano:AcOEt (7:3), obtendo-se 212,96 mg (79%) do derivado monoepoxidado(D-1).

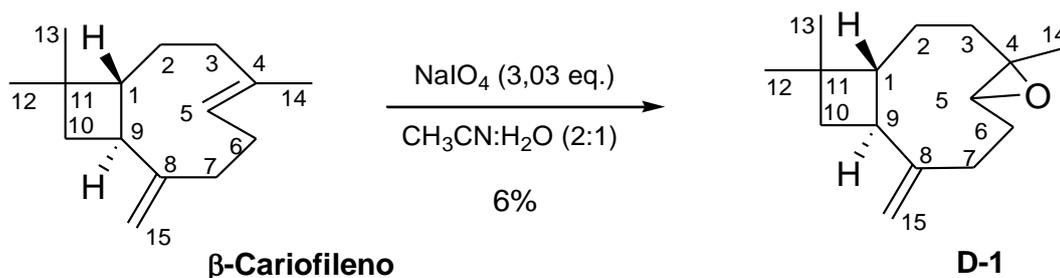
Características: óleo incolor ou amarelo pálido, com $R_f = 0,55$ (Hexano:AcOEt 7:3).

IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 172) cm^{-1} : 2942,68; 1627; 1456,30; 1383; 1071; 906,29; 727,31.

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, página 173) δ: 4,98 (s, 1 H); 4,86 (s, 1 H); 2,87 (dd, 1 H, $J = 10,5, 4,2$ Hz); 2,64-2,59 (m, 1 H); 2,34 (ddd, 1 H, $J = 12,9, 8,2, 4,6$ Hz); 2,25 (ddt, 1 H, $J = 12,5; 8,3; 4,3, 4,3$ Hz); 2,10 (ddt, 2 H, $J = 16,3, 12,6, 3,9, 3,9$ Hz); 1,81-1,73 (m, 1H); 1,81-1,73 (m, 1 H); 1,72-1,65 (m, 2H); 1,46-1,39 (m, 1 H); 1,30-1,38 (m, 1H); 1,20 (s, 3 H); 1,01 (s, 3 H); 0,99 (s, 3 H); 0,97-0,94 (m, 1H).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, página 174) δ: (isômero $\alpha\beta$) 151,9; 112,8; 63,7; 59,8; 50,8; 48,8; 39,8; 39,2; 34,0; 30,2; 29,9; 29,8; 27,2; 21,6; 17,0. (isômero $\beta\beta$) 112,1; 61,0; 60,9; 53,9; 47,1; 42,3; 36,6; 36,3; 33,0; 29,9; 29,6; 27,7; 22,6; 21,7.

3.4.3.2. Reação de epoxidação – Método 2



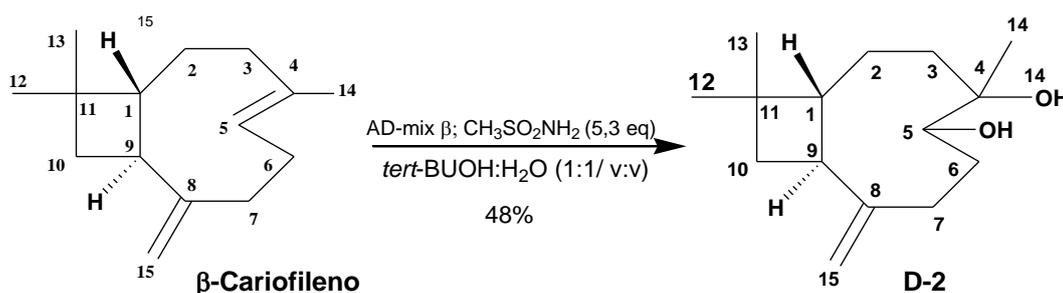
Em um balão de capacidade para 50 mL, foram colocados 500 mg (1,96 mmol) de β -cariofileno (80%), 20 mL de CH_3CN e 10 mL de água destilada, esta mistura foi resfriada há $\pm 0^\circ\text{C}$ e em agitação magnética por 2 minutos, posteriormente foi adicionado 316,7 mg (3,03 eq; 5,94 mmol) de NaIO_4 . A mistura reacional foi mantida sob resfriamento ($\pm 0^\circ\text{C}$) e agitação, por 48 horas. Após esse tempo, a mistura foi transferida para um funil de decantação foi adicionado mais 10 mL de água destilada e posterior extração com diclorometano (3 x 20 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. O filtrado foi concentrado em roto-evaporador e o resíduo foi purificado em coluna de sílica 60 com hexano:AcOEt (7:3), obtendo-se 30 mg (28%) do derivado monoepoxidado (D-1).

Características: óleo incolor ou amarelo pálido, com $R_f = 0,55$ (Hexano:AcOEt 7:3).

IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 176) cm^{-1} : 2944; 2924; 2838; 1624; 1460; 1389; 1372; 1257; 1071; 891; 862; 764; 639.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 177) δ : 4,97 (s, 1 H); 4,85 (s, 1 H); 2,90-2,83 (m, 1 H); 2,66-2,58 (m, 1 H); 2,39-2,20 (m, 2 H); 2,15-2,04 (m, 2 H); 1,79-1,72 (m, 1 H); 1,69-1,55 (m, 3H); 1,49-1,25 (m, 2 H); 1,20 (s, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 0,99 (s, 3 H); 0,95-0,89 (m, 1H).

3.4.4. Preparação do derivado 2 (4,11,11-Trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undecano-4,5-diol)



Em um balão de capacidade para 50 mL, foram adicionados 1,71 g de AD-mix β (1,4 g para cada 1 mmol de alceno),²⁰⁴ 6 mL de uma mistura de *tert*-BuOH:H₂O (1:1) e 617,4 mg (5,3 eq.; 6,49 mmol) de metanossulfonamida. A mistura reacional foi agitada até homogeneização, quando então foram adicionados 250,0 mg (1,22 mmol) de β -cariofileno (98,5%) e o sistema continuou sob agitação à temperatura ambiente por 7 dias. Após esse tempo de reação foram adicionados 4,0 g de bissulfito de sódio e a agitação foi mantida por mais 1 hora. Então, a mistura reacional foi transferida para um funil de decantação, diluída com solução saturada com NaCl e extraída com diclorometano (3 x 20 mL). O extrato orgânico combinado foi secado com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado em rotaevaporador. O resíduo obtido foi colunado em sílica gel 60 com um gradiente de hexano:AcOEt até a proporção de 6:4, obtendo-se 139,98 mg (48%) do diol (**D-2**).

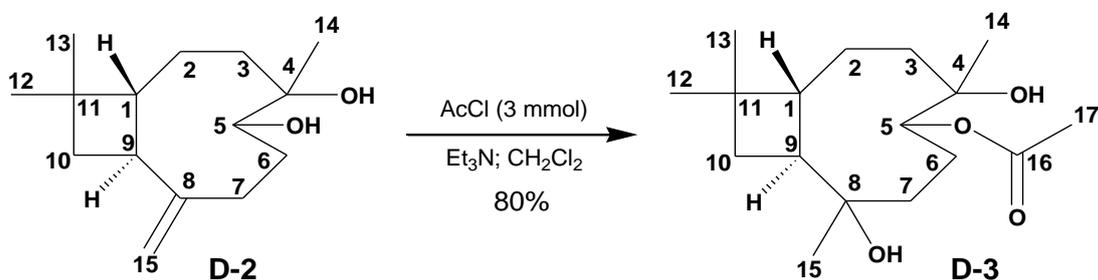
Características: óleo incolor ou amarelo pálido, com $R_f = 0,47$ (Hexano:AcOEt 6:4).

IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 179) cm^{-1} : 3442; 2944; 2866; 1718; 1643; 1457; 1119; 1074; 887; 764; 615.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 180) δ : 4,94 (s, 1H); 4,92 (s, 1H); 3,59 (t, 1 H, $J = 5,5, 5,5$); 2,47 (br. s, 1 OH); 2,43 (ddd, 1 H, $J = 13,94, 9,17, 4,4$ Hz); 2,37 (q, 1 H, $J = 9,57$ Hz); 2,24 (br. s, 1 OH); 2,07 (ddd, 1 H, $J = 3,30, 8,4, 8,4, 12,9$ Hz); 1,95-1,90 (m, 1 H); 1,78-1,72 (m, 2 H); 1,69-1,62 (m, 2 H); 1,61-1,53 (m, 3 H); 1,36-1,30 (m, 1 H); 1,14 (s, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 0,98 (s, 3 H).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , página 181) δ : 151,8; 110,4; 75,1; 73,3; 57,0; 42,3; 40,8; 36,1; 34,7; 34,1; 32,5; 30,0; 23,2; 22,0; 21,4.

3.4.5. Preparação do derivado 3 (Acetato de 2-cloro-6-hidroxi-2,6,10,10-tetrametilbicyclo[7.2.0]undecan-5-ila)



Em um balão de capacidade para 50 mL, foram colocados 119 mg (0,50 mmol) do monodiol do cariofileno (**D-2**), 3 mL de diclorometano anidro e 0,2 mL (1,44 mmol) de trietilamina anidra. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, em banho de gelo ($\pm 5^\circ \text{C}$) por 5 minuto, e a esta foram adicionados 0,2 mL de uma mistura de cloreto de acetila (3 mmol) recém destilado dissolvido em 1 mL de diclorometano anidro, ocasião em que se observou a formação de um gás e liberação de calor. Após a adição total do agente acilante, a mistura foi deixada sob agitação por mais 24 horas, à temperatura ambiente, ao final das quais foi adicionada água destilada,

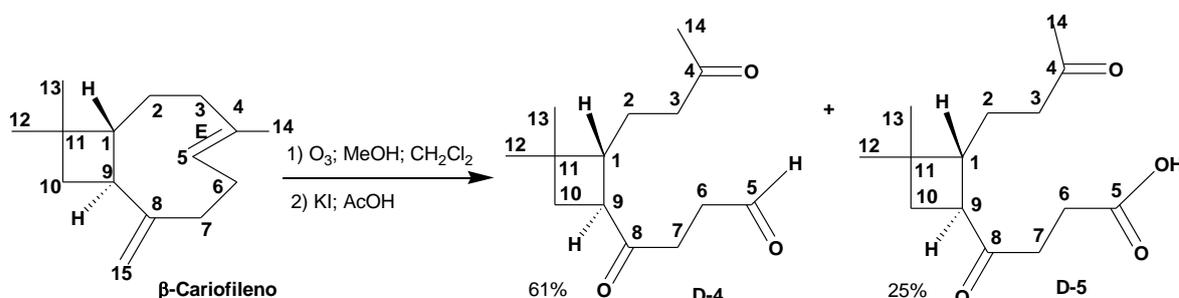
mantendo-se a agitação por mais 20 minutos, quando então foi transferida para um funil de decantação e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 X 10 mL). A fase orgânica combinada foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi colunado em sílica gel 60 com um gradiente de hexano:AcOEt até a proporção de 7:3, obtendo-se 128,1 mg (80%) do acetato (**D-3**).

Características: óleo avermelhado e escuro, com $R_f = 0,57$ (Hexano:AcOEt 7:3)

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 186) δ : 4,64 (dd, 1 H, $J = 11,6, 5,0$ Hz); 2,57-2,52 (m, 1H); 2,08 (ddd, 1 H, $J = 11,8, 10,5, 6,2$ Hz); 2,01-1,94 (m, 1H); 2,03 (s, 3 H); 1,84 (dtd, 1 H, $J = 13,1, 4,9, 4,9, 2,8$ Hz); 1,70-1,63 (m, 2 H); 1,59 (dd, 1 H, $J = 4,8, 2,6$ Hz); 1,57 (dd, 1 H, $J = 4,8, 2,9$ Hz); 1,45-1,41 (m, 2 H); 1,34-1,33 (m, 1H); 1,33-1,31 (m, 1H); 1,09 (s, 3 H); 1,04 (s, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,00 (s, 3 H).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , página 187) δ : 170,5; 77,0; 75,3; 73,0; 42,5; 36,3; 35,6; 35,1; 34,4; 30,5; 30,3; 27,1; 25,9; 21,8; 21,3; 21,2; 18,5.

3.4.6. Preparação dos derivados 4 e 5 via reação de ozonólise



Em um frasco apropriado para ozonólise, foram dissolvidos 4,0 g (15,66 mmol) de β -cariofileno (80%) em 30 mL de uma mistura anidra de diclorometano:metanol (1:1). A mistura foi resfriada a -30 °C e um fluxo de ozônio foi borbulhado através da mistura reacional até que toda a matéria prima tivesse sido consumida (monitorada por CCD, hexano:acetato 9:1). Ao final de 2 horas, à mistura reacional ainda resfriada foi borbulhado gás nitrogênio para expurgar o ozônio em excesso e, então, foram adicionados 32 mL de ácido acético glacial e 32 g de iodeto de potássio em pequenas porções. Após a adição a reação foi mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, o iodo formado foi reduzido com adição de uma solução de tiosulfato de sódio 10%, o metanol foi evaporado no rotaevaporador, a mistura foi diluída com solução saturada de cloreto de sódio e extraída com acetato de etila (3 x 20 mL). Posteriormente a fase orgânica combinada foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio e seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada. O resíduo foi colunado em sílica gel 60 com um

gradiente hexano:AcOEt até a proporção de 6:4, obtendo-se 2,84 g (69%) do derivado aldeído **4** (majoritário) e 1,25 g (31%) do derivado ácido carboxílico **5** (minoritário).

3.4.6.1. Dados do derivado **4** (4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanal)

Características: óleo negro escuro, com $R_f = 0,46$ (Hexano:AcOEt 9:1)

IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 192) cm^{-1} : 2941,86; 1707,00; 1366,43; 1165,71.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 193) δ : 9,80 (s, 1 H); 2,83 (q, 1 H, $J = 9,5$ Hz); 2,76-2,73 (m, 2 H); 2,72-2,61 (m, 2H); 2,41-2,32 (m, 2 H); 2,16-2,13 (m, 1 H); 2,11 (s, 3 H); 1,90-1,87 (m, 1 H); 1,74 (t, 1 H, $J = 10,1, 10,1$ Hz); 1,68-1,64 (m, 2H); 1,64-1,57 (m, 3 H); 1,06 (s, 3 H); 1,05 (s, 3 H).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , página 194) δ : 209,8; 208,7; 200,4; 46,7; 45,8; 41,5; 37,4; 36,7; 33,9; 32,8; 30,1; 29,9; 23,8; 22,4.

3.4.6.2. Dados do derivado **5** (ácido 4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanóico)

Características: óleo negro escuro, com $R_f = 0,42$ (Hexano:AcOEt 9:1)

IV (ATR, $V_{\text{máx}}$, página 197) cm^{-1} : 2951,76; 1708,46; 1364,34; 1265,61; 733,22; 703,14.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , página 198) δ : 2,81 (q, 1 H, $J = 9,5$ Hz); 5,30 (s, 1 H); 2,72-2,67 (m, 1H); 2,66-2,64 (m, 1H); 2,63-2,60 (m, 2 H); 2,40-2,31 (m, 2 H); 2,16-2,13 (m, 1 H); 2,11 (s, 3 H); 1,89-1,86 (m, 1 H); 1,73 (t, 1 H, $J = 10,3, 10,3$ Hz); 1,67-1,62 (m, 1H); 1,62-1,56 (m, 1H); 1,06 (s, 3 H); 1,04 (s, 3 H).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , página 199) δ : 210,00; 209,0; 177,9; 46,7; 45,8; 41,6; 36,7; 34,9; 33,9; 30,0; 29,9; 27,6; 23,7; 22,4.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração e rendimento dos óleos essenciais das folhas das espécies de *Eugenia*

Na Tabela 5 encontram-se registrados os rendimentos percentuais médios dos OE de *E. dysenterica* (EDY), *E. lutescens* (ELU) e *E. langsdorffii* (ELA), coletadas no PC e PS relativos aos anos de 2012 e 2014.

Tabela 5. Rendimentos percentuais obtidos para OE das folhas de *Eugenia* obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS).

	Espécie/ Parâmetros avaliados	EDY		ELU		ELA	
		PC	PS	PC	PS	PC	PS
2012	Data de coleta	29/03/12	29/08/12	03/03/12	30/08/12	31/03/12	31/08/12
	M/M (%)* ± DP	0,25 a	0,19 a	0,25 a	0,21 a	0,40 b	0,60 c
2014	Data de coleta	29/03/14	29/08/14	30/03/14	30/08/14	31/03/14	31/08/14
	M/M (%)* ± DP	0,25 a	0,20 a	0,25 a	0,18 a	0,48 b	0,55 c

DP = desvio padrão; M/M = rendimento dos óleos essenciais (massa de óleo essencial obtido/massa de folha fresca utilizada); (*) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os OE das três espécies no ano de 2012 forneceram rendimentos percentuais que variaram de 0,19 a 0,60 % nos períodos analisados, não havendo diferença significativa nos resultados de EDY-PC/12, EDY-PS/12, ELU-PC/12 e ELU-PS/12. Dentre as espécies estudadas durante o ano de 2012, o maior rendimento em termos de teor de OE foi observado para a espécie ELA-PS, apesar das maiores temperaturas e menores umidades relativas do ar registradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) no período de coleta.¹⁷⁷

Para o ano de 2014, a variação no rendimento de OE foi de 0,18 % a 0,55 % para as três espécies, nos períodos analisados, não diferindo estatisticamente entre os resultados de EDY-PC/14, EDY-PS/14, ELU-PC/14 e ELU-PS/14. Ao contrário dos resultados de ELA-PS (0,55 %) e ELA-PC (0,48 %), que diferiram estatisticamente entre si e os demais resultados, sendo observado para ELA-PS o maior percentual de OE no ano de 2014.

Ao contrário do que se esperava, os rendimentos percentuais dos OE das folhas coletadas nos dois anos, em ambos os períodos, não diferiram estatisticamente para EDY (PC/2012 e

¹⁷⁷Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), em <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>, acessado em Setembro de 2014.

PC/2014) e ELU (PC/2012 e PC/2014), ao contrário da grande variação inter e intra-espécie observada para ELA independente do período e ano.

De Oliveira e colaboradores¹⁷⁸ relatam que os principais fatores responsáveis pelo acúmulo e produção de OE nos vegetais são variabilidade genética, condições climáticas e fatores ambientais. Ou seja, as plantas estão sujeitas a vários tipos de influências, que podem afetar a produção e acúmulo de metabólitos secundários, como por exemplo, no teor do OE, etc.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que quaisquer efeitos edafoclimáticos que pudessem alterar o rendimento dos OE, de um ano/período para o outro, aparentemente, não foi relevante para EDY e ELU. Assim, o comportamento diferenciado de ELA pode ser racionalizado em termos da previsível variação genética em conjunto com efeitos de fatores ambientais, responsáveis também pela produção e variabilidade de metabólitos especiais em plantas.

De forma geral, os resultados obtidos para as espécies ELU e EDY mostraram que os maiores rendimentos em termos do teor de seus OE foram observados em PC nos dois anos de referência, ou seja, estação com alta umidade relativa do ar e menores temperaturas. Surpreendentemente, os rendimentos registrados para ELA (PS), em ambos os anos, foram maiores na estação de estiagem (temperaturas mais altas e baixa umidade relativa do ar). Ressalta-se que comportamento semelhante foi observado por Moraes e colaboradores para *E. langsdorffii*.¹⁶⁵

Outro fator ambiental que pode contribuir para a variação na produção de OE de uma espécie para outra é o estresse hídrico, onde o tipo de solo também tem importante contribuição. Com o intuito de avaliar os efeitos do solo nos teores dos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* foi providenciado junto à empresa Nativa Laboratório de Análises Agrícolas, Planaltina-DF, uma análise do “mix” do solo para identificar seu tipo e composição nos locais de acesso. O laudo da análise encontra-se na seção Anexos (página 144), de onde se observa que a textura do solo é muito argilosa com altos teores de ferro e potássio, seguido por manganês, cobre e alumínio (H+Al).

Srivastava e colaboradores¹⁷⁹ desenvolveram estudos sobre a correlação dos micronutrientes no solo no rendimento do óleo e na produção de mentol para plantas da espécie *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) e relataram que a presença de ferro e manganês no solo promove maiores percentuais em concentração de mentol e a presença de zinco e cobre afetaram positivamente no rendimento de OE das plantas. Em relação ao pH do solo, é relatado que o teor de ferro e o quantitativo de matéria orgânica afeta pouco no rendimento de OE.

El-Sawi e Mohamed¹⁸⁰ avaliaram o efeito do aumento na dosagem dos micronutrientes zinco e manganês aplicado ao solo do cultivo da espécie *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae),

¹⁷⁸de Oliveira, A.R.M.F.; Jezler, C.N.; Oliveira, R.A.; Costa, L.C.B.; *Rev. Ceres* **2012**, 59, 241.

¹⁷⁹Srivastava, R.K.; Singh, A.K.; Kalra, A.; Tomar, V.K.S.; Bansal, R.P.; Patra, D.D.; Chand, S.; Naqvi, A.A.; Sharma, S.; Kumar, S.; *Ind. Crop. Prod.* **2002**, 15, 189.

¹⁸⁰El-Sawi, S.A.; Mohamed, M.A.; *Food Chem.* **2002**, 77, 75.

observando que o aumento no rendimento do óleo é dado pela adição combinada destes dois íons metálicos. De acordo com os autores também há uma correlação positiva dessa adição na produção de ρ -cimeno, óxido de cariofileno, γ -terpineno, cupareno e, negativa na produção dos compostos β -pineno e carotol.

Em relação ao tipo de solo, o DF é formado de aproximadamente 38% de Latossolos Vermelho,¹⁸¹ de onde decorrem menores condutividades hídricas e variações da profundidade freática. Para Santos & Carlesso¹⁸² a redução no quantitativo de água no solo pode afetar no transporte e no crescimento das raízes, chegando a alterar o período e a quantidade de água disponível para as plantas. Este sistema é dependente das características físico-hídricas do solo, ou seja, um solo do tipo argiloso retém grande quantidade de água, devido à baixa porosidade que dificulta a drenagem hídrica enquanto é observado o contrário para solo tipo arenoso, com exceção do solo do cerrado que, segundo Goedert¹⁸³ apesar de argiloso, comporta-se similarmente a um solo arenoso no que tange a retenção hídrica.

Ivanauskas e colaboradores¹⁸⁴ relataram que os solos do domínio cerrado têm baixa retenção hídrica e com o fim da estação chuvosa a quantidade de água no solo diminui drasticamente atingindo os piores patamares durante a estação seca. Entretanto, as plantas do cerrado não sofrem severamente com estresse hídrico, pois, dependendo do modelo de enraizamento, absorve água das camadas mais profundas e com isso suporta melhor os efeitos durante os períodos de estiagem. Em sistemas de raiz sub-superficial o estresse hídrico é intensificado e, para compensar a falta de água, ocorre o aumento dos níveis de OE.¹⁸⁵ Assim, suspeita-se que os maiores rendimentos de OE de ELA-PS em 2012 e 2014, quando comparados aos resultados para EDY e ELU, podem estar relacionados à um maior estresse hídrico no PS, possivelmente devido ser ELA uma espécie arbustiva, pequena (± 40 cm de comprimento), com um modelo de enraizamento (pequeno e sub-superficial).

Em adição a influência dos fatores abióticos acima relatados na produção de OE das três espécies no PS, os rendimentos dos OE do PC também podem ter sido influenciados por algum tipo de deficiência hídrica no referido período. De acordo com os dados históricos de sazonalidade (temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico) registrados pelo INMET¹⁷⁷, na região onde se encontram as espécies utilizadas neste estudo ocorreram baixos índices pluviométricos durante os anos de 2012 e 2014 (Figura 21). Uma análise mais cuidadosa dos gráficos permite concluir que ocorreram zonas de estiagem durante o PC em ambos os anos, o que poderia resultar em um provável estresse hídrico sobre as espécies, proporcionando maiores rendimentos neste período. Este fenômeno é conhecido como “veranico”, cuja probabilidade de ocorrência no

¹⁸¹Campos, P. M.; Lacerda, M. P. C.; Da Silva, C. L.; De Sá, M. A. C.; De Sousa, D. M. G.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2010**, *45*, 306.

¹⁸²Santos, R.F.; Carlesso, R.; *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* **1998**, *2*, 287.

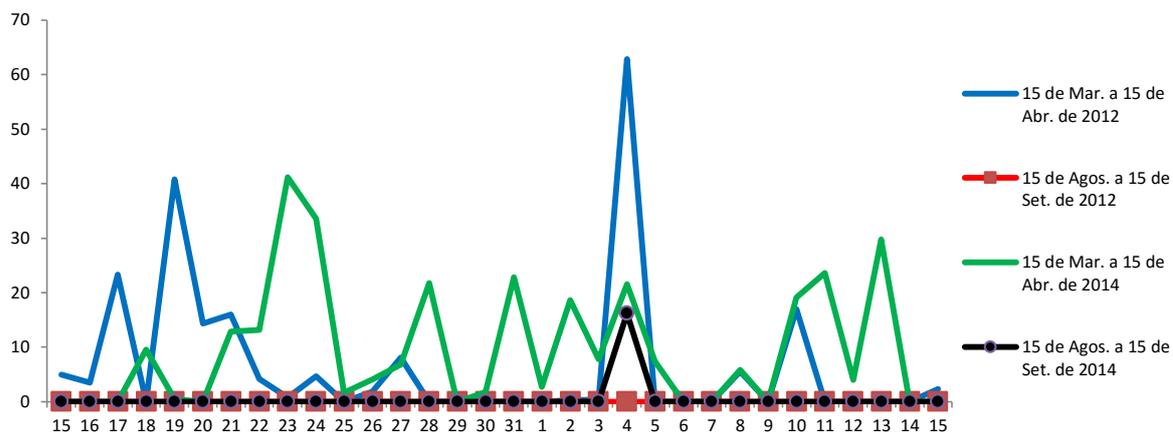
¹⁸³Goedert, W.J.; *J. Soil Scien.* **1983**, *34*, 405.

¹⁸⁴Ivanauskas, N.M.; Monteiro, R.; Rodrigues, R. R.; *Acta Amaz.* **2008**, *38*, 387.

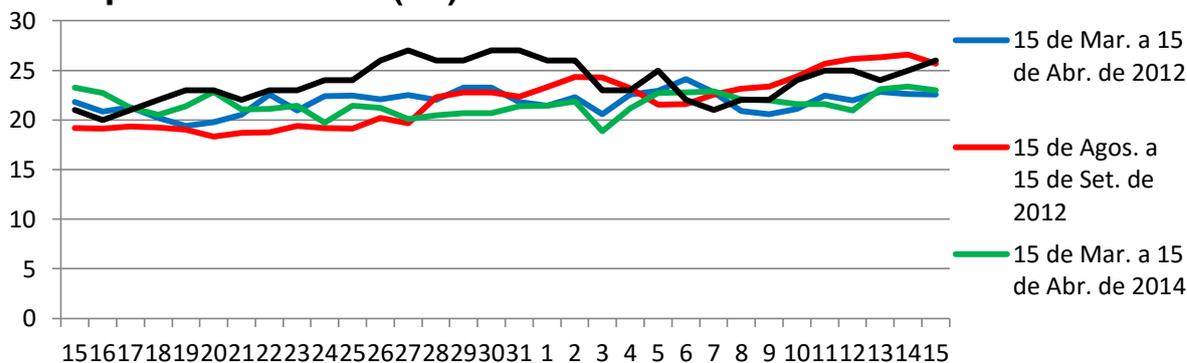
¹⁸⁵Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 374.

DF foi estimada por Wolf^{186,187} ao verificar que o efeito pode durar até 8 dias (períodos curtos) e ocorrer até 3 vezes durante um ano, afetando severamente a vegetação.

Índice Pluviométrico (mm) do Distrito Federal



Temperatura média (°C) do Distrito Federal



Umidade Relativa do ar (%) do Distrito Federal

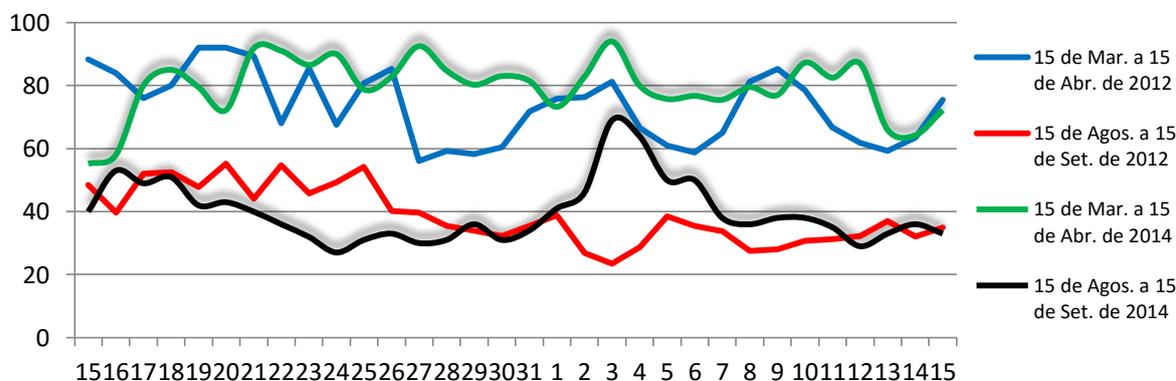


Figura 21. Dados históricos de sazonalidade do DF nos períodos de coleta (INMET).¹⁷⁷

¹⁸⁶Lopes, A.S.; Guilherme, L.A.G.; *Solos do Cerrado: Manejo da Fertilidade para a Produção Agropecuária*, 2ª Ed., São Paulo, ANDA, Boletim Técnico nº5, 1994.

¹⁸⁷Wolf, J.M.; *Pesq. Agropec. Bras.*, 1977, 12, 141.

4.2. Análise das composições químicas dos OE das folhas de *Eugenia* nos anos de 2012 e 2014 (PC e PS)

4.2.1. Análise da composição química dos OE por CG-EM

Os cromatogramas das análises (páginas 145 a 156) foram replicados e os dados gerais das amostras e dos 126 compostos voláteis distintos identificados nas três espécies de *Eugenia* encontram-se sumarizados na Tabela 6.

No ano 2012, em ambos os períodos, foram identificados nas três espécies um total de 68 compostos distintos. Os dados globais mostram que o perfil químico dos óleos obtidos em ambas as estações do ano variou no quantitativo de monoterpenos e sesquiterpenos cíclicos, sendo que nos OE de EDY-PC e ELA-PS predominou a fração sesquiterpênica, enquanto que para ELU (PC e PS) a fração monoterpênica foi majoritária. Outro dado importante refere-se à fração sesquiterpênica oxigenada que foi superior à fração monoterpênica de EDY-PS e ELA-PS, já para ELA-PC o resultado foi próximo ao encontrado para fração monoterpênica e para ELU-PC o percentual de sesquiterpenos oxigenados mostrou ser aproximado ao da fração sesquiterpênica. Os compostos que aparecem em todos os OE analisados das três espécies, em todos os períodos, foram o β -cariofileno dentre os sesquiterpenos, limoneno e β -pineno dentre os monoterpenos, não sendo observado nenhum nas duas outras classes relatadas.

Tabela 6. Constituintes químicos identificados nos OE das folhas das espécies de *Eugenia* colhidas nos anos de 2012 e 2014 (PC e PS).

ANO			2012						2014					
ESPÉCIE			EDY		ELU		ELA		EDY		ELU		ELA	
Período			PC	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PS
COMPOSTOS	IR ^a	IR ^b	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP	% ± DP
3Z-Hexenol	845	850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8±0,0	-
Santolina trieno	894	906	-	8,9±0,1	-	8,4±0,0	7,1±0,0	-	-	-	-	-	-	-
Artemisia trieno	928	923	-	-	-	-	-	-	-	2,1±0,1	-	-	-	-
α-Thujeno	930	924	-	1,0±0,1	-	-	-	-	-	-	6,2±0,0	-	0,9±0,1	-
Cumeno	931	924	-	0,6±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Pineno ^c	932	932	3,0±0,0	-	12,9±0,1	12,5±0,1	2,0±0,0	1,1±0,1	2,4±0,0	-	-	6,1±0,1	2,6±0,1	1,0±0,0
Sabineno	977	969	-	1,2±0,1	-	-	3,0±0,0	-	-	-	-	-	-	-
β-Pineno ^c	978	979	2,3±0,1	0,5±0,0	24,0±0,1	24,3±0,1	5,9±0,0	4,9±0,1	2,7±0,1	2,7±0,1	11,0±0,1	9,6±0,0	2,1±0,0	1,2±0,0
Mirceno	988	988	1,6±0,0	-	0,7±0,0	-	-	-	2,0±0,1	2,6±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	0,9±0,1	4,2±0,0
Mesitileno	993	994	-	0,7±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	1006	1002	-	-	-	-	0,7±0,1	1,0±0,1	-	-	-	-	0,6±0,0	0,3±0,1
ρ-Cimeno ^c	1021	1020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7±0,0	-
o-Cimeno	1023	1020	-	-	-	-	-	1,2±0,1	-	-	-	-	-	-
Limoneno ^c	1025	1024	0,8±0,0	1,2±0,0	1,9±0,0	3,0±0,1	5,4±0,0	8,3±0,0	1,1±0,1	0,9±0,1	-	2,1±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1
Silvestreno	1025	1025	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7±0,0	-	-	-
1,8-Cineol	1028	1026	-	-	-	-	-	-	0,3±0,1	0,5±0,1	-	-	1,2±0,0	-
(Z)-β-Ocimeno	1033	1032	-	-	-	-	-	-	0,9±0,1	0,7±0,0	-	-	-	0,7±0,0
(E)-β-Ocimeno	1044	1044	1,7±0,1	-	-	-	1,6±0,1	0,9±0,0	2,5±0,1	3,3±0,0	1,1±0,1	-	0,8±0,1	1,1±0,1
γ-Terpineno	1055	1054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1±0,0	-
Terpinoleno ^c	1098	1086	-	-	-	-	-	-	1,6±0,1	-	0,8±0,0	-	1,3±0,1	-
Linalol	1099	1095	-	1,4±0,0	-	-	-	-	-	1,6±0,0	-	-	1,4±0,1	0,7±0,0
Sabineno hidratado	1100	1098	1,3±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Borneol	1165	1165	-	-	-	-	-	-	0,7±0,0	-	-	-	-	-

Terpinen-4-ol	1177	1174	-	-	-	-	-	-	-	0,5±0,1	-	0,9±0,0	1,1±0,0	1,6±0,1	0,7±0,1
α-Terpineol ^c	1193	1186	-	-	-	3,0±0,0	-	-	-	-	0,9±0,1	3,2±0,1	3,0±0,1	0,9±0,1	-
Dihidrocarveol	1194	1193	1,2±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Terpineol	1195	1199	-	0,9±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myrtenol	1197	1194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8±0,0	-	-
Geranial	1255	1264	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6±0,1	-
δ-Elemeno	1332	1335	-	-	1,4±0,0	2,2±0,0	3,3±0,1	1,8±0,1	-	-	-	1,6±0,0	2,0±0,1	0,6±0,0	0,4±0,0
(E)-Dimetoxi-citral	1341	1338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2±0,0	-
α-Cubebeno	1365	1345	-	1,0±0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,7±0,1	-	-	0,6±0,0
Ciclosativene	1372	1369	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1±0,1	-	-	-	-
α-Ylangeno	1373	1373	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9±0,0	-	-	-
Isoledene	1373	1374	-	-	-	-	-	-	-	1,6±0,0	-	-	-	-	-
α-Copaeno	1375	1374	14,1±0,1	12,7±0,0	0,6±0,0	-	1,3±0,0	2,5±0,0	-	-	8,9±0,0	0,9±0,1	2,3±0,1	1,0±0,0	2,2±0,0
β-Cubebeno	1384	1387	-	-	-	-	-	-	-	10,8±0,0	-	-	-	-	-
β-Bourboneno	1386	1387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7±0,1
β-Elemeno	1386	1389	-	-	0,7±0,1	3,2±0,1	1,2±0,0	2,4±0,1	-	-	-	0,9±0,1	-	1,6±0,1	0,8±0,0
β-Cariofileno ^c	1420	1417	32,1±0,1	10,5±0,0	7,2±0,0	8,6±0,1	9,1±0,0	9,5±0,1	24,4±0,1	22,0±0,1	8,0±0,1	8,1±0,0	6,0±0,1	8,8±0,1	8,8±0,1
β-Gurjuneno	1426	1431	-	-	-	-	1,1±0,0	1,2±0,0	-	-	-	0,9±0,1	-	0,6±0,1	1,2±0,0
γ-Elemeno	1426	1434	-	-	3,8±0,1	5,5±0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,9±0,1	0,4±0,0
α-Guaieno	1433	1437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3±0,1	-	-	-
Aromadendreno ^c	1433	1439	5,3±0,1	-	0,8±0,0	2,0±0,1	1,5±0,0	1,8±0,0	-	-	-	-	2,5±0,1	1,6±0,1	2,2±0,0
6,9-Guaiadiene	1451	1442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1±0,0	1,3±0,1	-	-
α-Himachaleno	1451	1449	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3±0,0	0,8±0,1
α-Humuleno ^c	1450	1452	-	3,6±0,0	1,2±0,0	3,5±0,0	1,3±0,0	1,6±0,0	5,0±0,1	4,5±0,1	1,2±0,0	-	-	2,9±0,1	2,3±0,1
β-Santaleno	1450	1457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1±0,1	-	-
Allo-aromadendreno	1452	1458	-	-	1,3±0,0	1,5±0,0	-	2,9±0,0	-	-	-	-	-	2,7±0,0	4,0±0,1
9- <i>epi</i> -(E)-Cariofileno	1454	1464	-	-	-	-	2,4±0,0	-	-	-	1,7±0,1	1,9±0,0	1,8±0,0	-	-
Dauca-5,8-dieno	1459	1471	1,0±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Gurjuneno	1470	1475	-	1,1±0,1	1,7±0,0	-	-	-	-	1,9±0,1	-	-	-	-	-
(E)-cadina-1(6),4-dieno	1470	1475	-	1,1±0,1	3,5±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

γ -muuroлено	1471	1478	-	-	1,0 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0	-	0,8 \pm 0,0	-	1,6 \pm 0,1	-	3,6 \pm 0,1	-	1,0 \pm 0,0
Amorfen-4,7(11)-dieno	1471	1479	-	-	-	-	-	-	1,6 \pm 0,0	-	-	-	-	-
α -Amorfen	1475	1483	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5 \pm 0,1	-	-
D Germacreno	1477	1484	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5 \pm 0,1	-	3,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,0
β -Selineno	1481	1489	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,0	-	-	-	-
δ -Selineno	1483	1492	-	-	0,8 \pm 0,0	-	-	-	-	-	0,9 \pm 0,1	-	-	-
(Z)- β -Guaieno	1485	1492	1,0 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -Amorfen	1486	1495	-	0,9 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viridifloreno	1486	1496	-	-	-	-	-	-	-	0,4 \pm 0,1	-	3,3 \pm 0,1	-	-
Valenceno ^c	1488	1496	-	-	-	-	1,7 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0	-	-	-	-	-	0,9 \pm 0,0
Biciclogermacreno	1490	1500	-	-	2,0 \pm 0,0	-	15,0 \pm 0,1	14,0 \pm 0,1	-	-	6,3 \pm 0,0	-	13,5 \pm 0,0	9,3 \pm 0,0
α -Muuroлено	1494	1500	-	-	0,8 \pm 0,0	-	0,8 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,0	-	-
(E)- β -Guaieno	1505	1502	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,1	-	-	-	-
α -Bulnesene	1505	1509	-	-	-	-	-	-	0,9 \pm 0,0	-	-	-	-	-
δ -Amorfen	1509	1511	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1
γ -Cadineno	1509	1513	1,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	-	1,1 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
δ -Cadineno	1518	1522	23,3 \pm 0,1	6,9 \pm 0,0	1,7 \pm 0,0	-	4,0 \pm 0,0	5,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1
Zonareno	1533	1528	-	-	-	-	-	-	-	13,8 \pm 0,0	-	-	-	-
γ -Cupreneno	1533	1532	-	-	-	-	-	-	15,9 \pm 0,0	-	-	-	-	-
α -Cadineno	1535	1537	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,0	-	-	-	-
α -Calacoreno	1537	1544	1,6 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1	-	-	-	-	0,6 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1	-	-	-	-
B Germacreno	1553	1559	-	-	0,6 \pm 0,0	-	4,7 \pm 0,0	3,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	-	6,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	-
(E)-Nerolidol	1556	1561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2 \pm 0,1	-
β -Calacoreno	1557	1564	1,8 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palustrol	1559	1567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1
Cariofilenil álcool	1571	1570	0,4 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryolan-8-ol	1572	1571	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	-	-	-	-
Espatulenol	1572	1577	-	-	5,7 \pm 0,0	-	8,2 \pm 0,1	11,0 \pm 0,0	-	-	-	5,5 \pm 0,1	6,8 \pm 0,1	12,9 \pm 0,1
Óxido de cariofileno	1576	1582	-	25,2 \pm 0,1	2,9 \pm 0,0	-	1,4 \pm 0,1	2,2 \pm 0,0	-	7,5 \pm 0,0	-	-	-	-
Globulol	1580	1590	-	-	4,9 \pm 0,1	-	2,7 \pm 0,0	2,9 \pm 0,1	-	-	1,1 \pm 0,1	4,8 \pm 0,0	-	-

β -Copaen-4- α -ol	1587	1590	-	-	-	-	1,0 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-
Viridiflorol	1590	1592	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5 \pm 0,0	3,7 \pm 0,1	5,1 \pm 0,0	10,2 \pm 0,0
Carotol	1590	1594	-	-	1,9 \pm 0,0	-	-	1,0 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-
Cubeban-11-ol	1591	1595	-	-	1,5 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longiborneol (=Juniperol)	1596	1599	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1 \pm 0,1	-	-	-
Rosifoliol	1596	1600	-	-	1,0 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	1,8 \pm 0,0	-	-
Guaiol	1598	1600	1,2 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-	4,3 \pm 0,1	-	3,7 \pm 0,1	-
Khusimone	1598	1604	0,6 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -Eudesmol	1603	1607	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3 \pm 0,0	-	2,0 \pm 0,0	-
Epóxido de humuleno II	1603	1608	-	5,0 \pm 0,1	-	-	-	-	5,5 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0	-	-	-	-
β -Atlantol	1619	1608	-	-	-	3,8 \pm 0,1	-	-	1,5 \pm 0,0	-	-	-	-	-
β -Biotol	1619	1612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8 \pm 0,0
Isolongifolan-7- α -ol	1619	1618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5 \pm 0,0
Junenol	1620	1618	-	-	-	-	-	-	-	1,3 \pm 0,1	-	-	-	-
<i>trans</i> -Isolongifolanona	1620	1625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6 \pm 0,1
1- <i>epi</i> -Cubenol	1621	1627	-	-	-	-	2,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-
Eremoligenol	1621	1629	-	-	1,0 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -Eudesmol	1623	1630	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9 \pm 0,1	1,8 \pm 0,0	-	-
Muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1624	1630	1,2 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	-	-	-	1,5 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	-	-	-	-
α -Acorenol	1624	1632	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8 \pm 0,0
<i>epi</i> - α -Cadinol	1627	1638	0,3 \pm 0,0	-	1,1 \pm 0,0	-	1,5 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
1,7-di <i>epi</i> - α -Cedrenal	1627	1639	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6 \pm 0,0
Epóxido de <i>allo</i> -aromadendrene	1627	1639	-	-	-	2,1 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>epi</i> - α -Muurolol	1637	1640	-	-	1,4 \pm 0,1	-	1,2 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
α -Muurolol (torreiol)	1639	1644	-	-	0,9 \pm 0,0	-	-	1,8 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
Cubenol	1639	1645	0,2 \pm 0,0	-	-	1,5 \pm 0,0	-	-	2,5 \pm 0,1	-	-	1,2 \pm 0,1	-	-
Agarospinol	1648	1646	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5 \pm 0,0	-
Cedr-8(15)-em-9- α -ol	1650	1650	-	-	-	-	-	-	-	0,8 \pm 0,0	-	-	-	3,5 \pm 0,0
α -Cadinol	1650	1652	-	-	2,8 \pm 0,0	3,8 \pm 0,1	3,3 \pm 0,0	-	-	3,7 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1

(Z)-Calamenen-10-ol	1651	1660	0,7±0,0	2,2±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7- <i>epi</i> - α -Eudesmol	1654	1662	-	-	-	-	-	-	-	0,8±0,1	-	2,1±0,1	-	0,8±0,0
Intermedeol	1659	1665	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3±0,0	-
(E)-Calamenen-10-ol	1660	1668	0,6±0,1	2,6±0,1	-	-	-	-	0,4±0,1	-	-	-	-	-
14-Hidróxi-9- <i>epi</i> -(E)-cariofileno	1664	1668	-	1,3±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>epi</i> -Zizanono	1666	1668	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0±0,1	-	-
Mustakone	1676	1675	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5±0,1
Khusinol	1683	1679	-	-	-	-	-	-	-	1,8±0,1	-	-	-	-
Acorenone	1689	1692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0±0,1	0,5±0,1	-
Eudesm-7(11)-em-4-ol	1690	1700	-	-	-	-	-	-	-	0,5±0,0	-	-	0,5±0,0	-
10- <i>nor</i> -Calamenen-10-one	1693	1702	-	1,0±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -(Z)-Curcumen-12-ol	1731	1728	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1±0,1	-
Vetiselinenol	1737	1730	-	1,0±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9±0,0	-
Monoterpenos			9,4±0,2	14,1±0,4	39,5±0,2	48,2±0,3	25,7±0,2	17,4±0,4	13,2±0,7	12,4±0,4	24,9±0,3	19,8±0,3	13,8±0,7	10,2±0,3
Monoterpenos oxigenados			2,5±0,1	2,3±0,1	0,0±0,0	3,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,5±0,2	3,4±0,2	4,1±0,1	4,9±0,1	6,5±0,4	1,4±0,1
Sesquiterpenos			81,7±0,5	40,4±0,4	29,6±0,4	31,5±0,4	48,5±0,3	52,3±0,7	65,5±0,5	59,5±1,0	45,3±1,1	37,4±1,0	46,8±0,9	43,5±0,7
Sesquiterpenos oxigenados			5,2±0,3	39,6±0,5	25,1±0,4	11,2±0,2	21,4±0,4	28,3±0,5	13,4±0,4	21,2±0,6	20,9±0,5	30,0±0,6	29,1±0,5	39,2±0,5
Total			98,8±1,1	96,4±1,4	94,2±1,0	93,9±0,9	95,6±0,9	98,0±1,6	93,6±1,8	96,5±2,2	95,1±2,0	92,1±2,0	96,2±2,5	94,3±1,6

^aIR = Índice de Retenção calculados com base nos tempos de retenção em comparação com uma série de *n*-alcanos; ^bIR = Índice de Retenção da literatura¹⁷⁰.; IR: Índice de retenção calculado a partir dos tempos de retenção da série de *n*-alcanos em coluna capilar DB-5; ^cidentificação confirmada adicionalmente por co-injeção com padrões autênticos; DP = desvio padrão; EDY = *E. dysenterica*; ELU = *E. lutescens*; ELA = *E. langsdorffii*.

Para os OE obtidos no ano de 2014, em ambas as estações, foi identificado um total de 95 compostos diferentes, distribuídos nas três espécies. A análise do perfil químico dos OE mostrou uma maior predominância dos compostos sesquiterpênicos, seguido dos sesquiterpenos oxigenados, dos monoterpênicos e por fim dos monoterpênicos oxigenados. O OE de ELA/PC exibiu maior teor de sesquiterpenos ($46,8 \pm 0,9\%$) em comparação as demais espécies e períodos, já o maior teor em monoterpênicos foi observado para ELU/PC ($24,9 \pm 0,3\%$), enquanto que ELA/PS apresentou maior teor em sesquiterpenos oxigenados ($39,2 \pm 0,5\%$) dentre os OE obtidos em 2014. Ressalta-se que a fração dos compostos monoterpênicos oxigenados foi muito pequena no ano e a espécie que se destacou em relação a estes compostos foi ELA/PC com $6,5 \pm 0,4\%$.

Na Figura 22 encontram-se as estruturas dos terpenos identificados como de maior relevância percentual ($\geq 5\%$), designados como majoritários, com destaque para o β -cariofileno que foi encontrado nos OE das três espécies com elevado percentual em todas as fases de coleta.

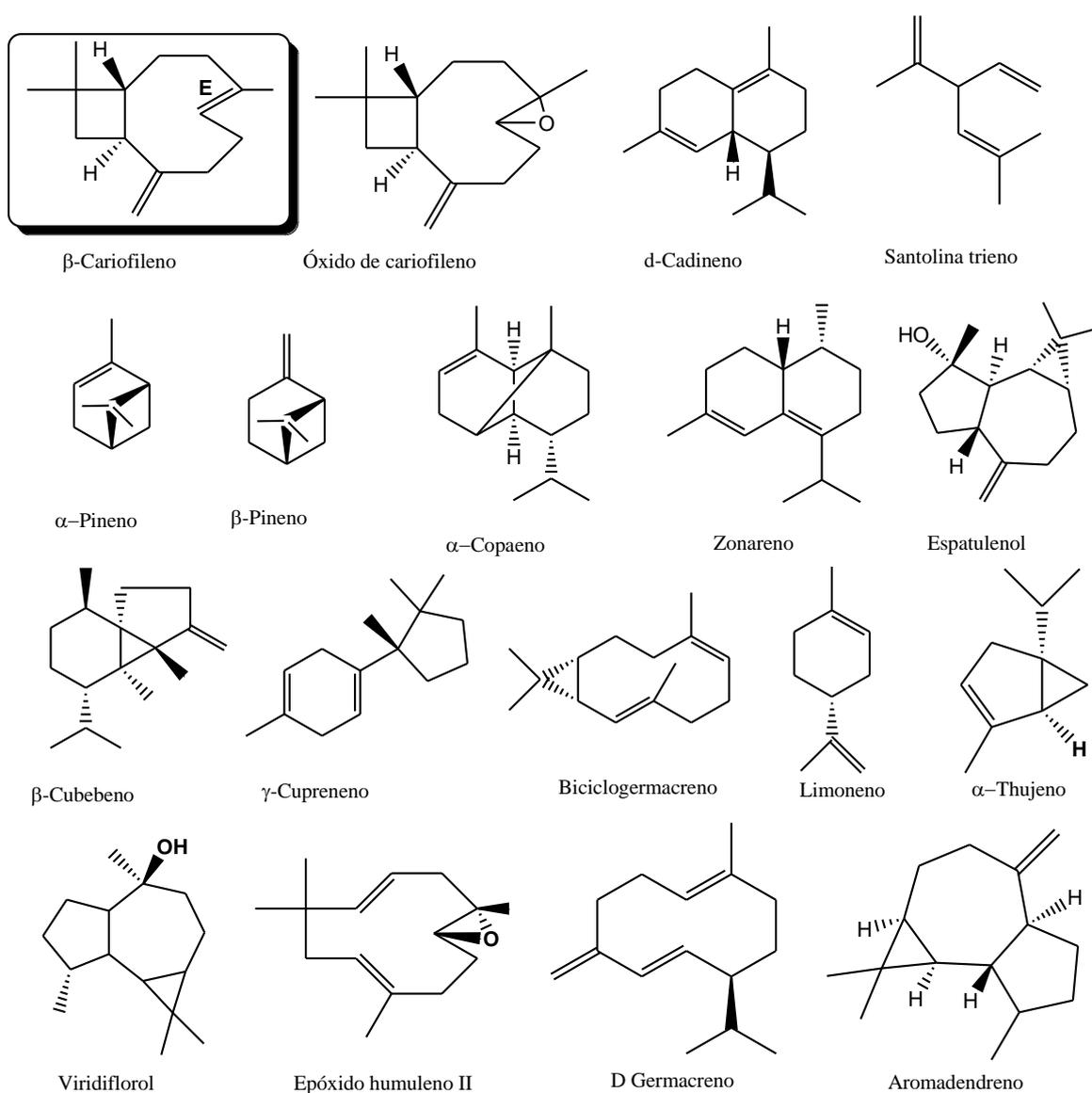


Figura 22. Terpenos majoritários encontrados nos OE das folhas das espécies de *Eugenia*.

4.2.2. Análise estatística dos resultados empregando a técnica PCA

Com os dados descritos na Tabela 6 (página 60), foi realizado um tratamento estatístico por Análise de Componentes Principais (PCA) para construção de modelos estatísticos multivariados, no intuito de reduzir a dimensão dos dados através da criação de indicadores capazes de representar todos os compostos identificados. Esses indicadores ou componentes principais permitem identificar a correlação existente entre os compostos, portanto verificar como se posiciona as amostras (espécies/ano/período) a partir da relação entre eles e possibilitar conclusões interessantes sobre a interatividade dos compostos nos OE estudados.

A Tabela 7 correlaciona o número de compostos ao número de vezes que os compostos apareceram nas amostras (sendo n=12, o quantitativo de amostra analisadas), de onde se pode inferir que, para construção de modelos estatísticos, 56 compostos apareceram apenas uma vez, 21 compostos apareceram duas vezes e 14 compostos apareceram três vezes.

Tabela 7. Correlação entre número de compostos e número de repetições nas amostras.

Número repetições	Número de Compostos
1 vez	56
2 vezes	21
3 vezes	14
4 vezes	8
5 vezes	8
6 vezes	3
7 vezes	3
8 vezes	5
9 vezes	1
10 vezes	2
11 vezes	2
12 vezes	2

Inicialmente foi feita um estudo de **PCA** que considerou todos os compostos. Nessa análise esperava-se que as duas primeiras componentes (número de repetições 1 e 2 vezes dos dados na Tabela 6 (página 60)), fossem capazes de explicar pelo menos 50% da variação dos dados, porém, a variância explicada pelas duas componentes foi de apenas 28,75%.

Então, optou-se por excluir todos os componentes que apareceram apenas uma vez na amostra de dados buscando alcançar um modelo com 50% de variância explicada e onde os compostos que estão no mesmo quadrante (parte superior) são positivamente correlacionados

entre si e negativamente correlatos com os compostos do quadrante oposto (parte inferior). Os resultados da análise com os compostos que apareceram mais de uma vez nas amostras, denominado de **PCA-1**, encontram-se exposto na Figura 23. Neste gráfico observa-se que os compostos que apresentaram maiores relevância estatística nos OE do ano de 2012 foram: (*E*)-calamenen-10-ol; (*Z*)-calamenen-10-ol; muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol; santolina trieno; sabineno; carotol; valenceno; 1-*epi*-cubenol; α -muurolol (torreiol); limoneno; *epi*- α -muurolol; *epi*- α -cadinol e γ -cadineno. Já os OE coletados no ano de 2014 foram: 1,8-cineol; terpinoleno; α -himachaleno; α -cadinol; palustrol; α -truleno; δ -amorfenol; γ -eudesmol; 6,9-guaiadiene; α -terpineol; guaiol; mirceno; 5-*epi*-7-*epi*- α -eudesmol; D-germacreno; viridiflorol e terpinen-4-ol. Isso indica que estatisticamente houve variações nas composições químicas dos OE causados possivelmente pelos efeitos decorrentes da sazonalidade.

Ao se analisar o resultado individual de cada espécie pelo **PCA-1**, tem-se que a espécie EDY (independente do ano ou período de coleta) apresenta valores mais relevantes estatisticamente para os compostos epóxido de humuleno II, β -cariofileno, α -copaeno, α -calacoreno, óxido de cariofileno, γ -gurjuneno, (*E*)-calamenen-10-ol, (*Z*)-calamenen-10-ol e muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol. Com relação às espécies ELU e ELA, não foi possível observar um agrupamento global claro nas amostragens, porém, observou-se um agrupamento com base nos anos de coleta. Para os OE do ano de 2014, as espécies ELU e ELA apresentaram valores mais relevantes para os compostos 6,9-guaiadiene, α -terpineol, guaiol, 5-*epi*-7-*epi*- α -eudesmol, D-germacreno, viridiflorol e terpinen-4-ol, enquanto que no ano de 2012 as espécies ELU e ELA apresentaram valores mais altos de α -felandreno, sabineno, carotol, valenceno, 1-*epi*-cubenol, α -muurolol (torreiol), limoneno, *epi*- α -muurolol, *epi*- α -cadinol e γ -cadineno. Nesse modelo, mesmo excluindo-se os compostos que apareceram apenas uma vez na amostra, a variância explicada pelas duas componentes foi de 34,28%.

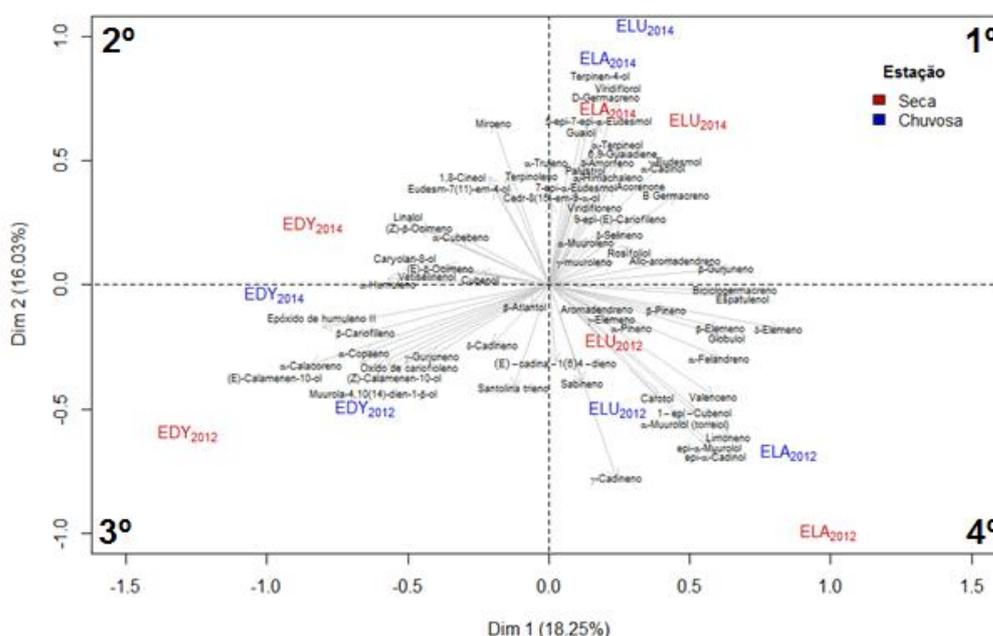


Figura 23. Gráfico do **PCA-1** com os compostos que apareceram mais de uma vez nas amostras.

Como a variância encontrada na análise anterior foi de apenas 34,28%, fez-se necessário uma nova análise que denominamos de **PCA-2** (Figura 24), onde se levou em consideração os compostos que apareceram mais de duas vezes nas amostragens. Ainda assim, a variância explicada pelas duas componentes foi de 39,03%.

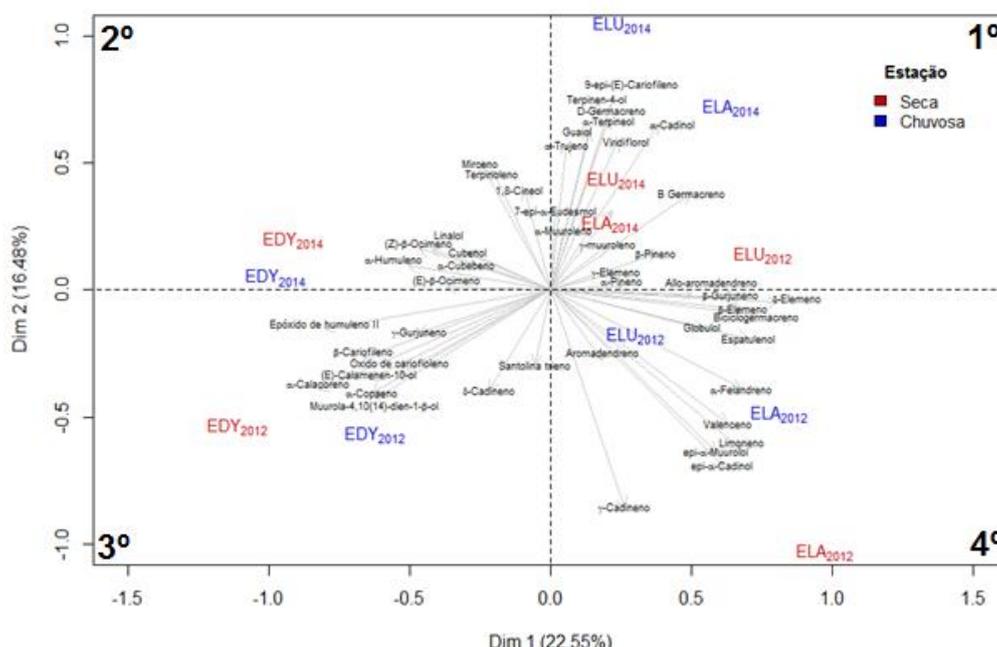


Figura 24. Gráfico do **PCA-2** com os compostos que apareceram mais de duas vezes nas amostras.

Com a intenção de um melhor refinamento dos dados, foi feita uma nova análise designada como **PCA-3**, considerando os compostos que apareceram mais de três vezes nas amostragens e o resultado foi expresso na Figura 25. Neste modelo, observa-se que para a espécie EDY, os compostos com valores mais relevantes estatisticamente foram: δ-cadineno, muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol, α-copaeno, (E)-β-ocimeno, α-calacoreno, β-cariofileno, linalol, óxido de cariofileno e α-humuleno; para a espécie ELA, foram: α-felandreno; bicyclogermacreno; β-gurjuneno; epi-α-cadinol; espatulenol; limoneno; *allo*-aromadendreno e B germacreno. Por sua vez, na espécie ELU os compostos γ-elemento, α-pineno, α-terpineol, β-pineno e γ-muroleno foram encontrados em maior concentração percentual. Outro fato importante foi que ao excluir os compostos que apareceram uma, duas e três vezes na amostra, a variância explicada pelas duas componentes atingiu valor de 50% que é próximo ao desejado.

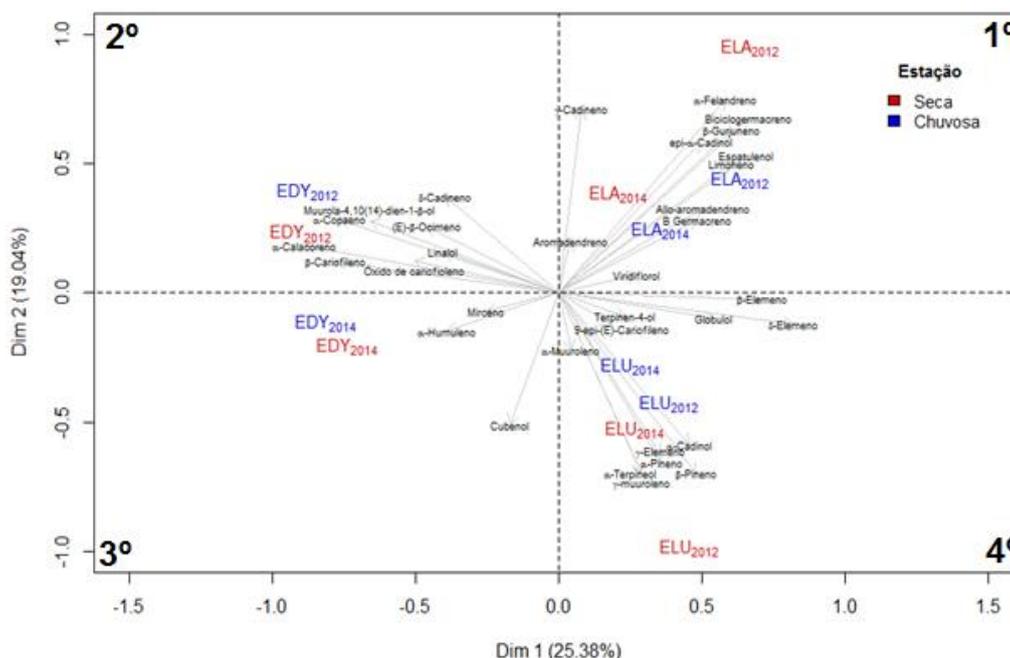


Figura 25. Gráfico do **PCA-3** com os compostos que apareceram mais de três vezes nas amostras.

Igualmente, observa-se na Figura 25 que os compostos do primeiro quadrante (α -felandreno, bicycloterpeno, β -gurjuneno, *epi*- α -cadinol, espatulenol, limoneno, dentre outros) foram correlacionados positivamente entre si, logo, quanto maior a presença percentual de um desses compostos em uma amostra de OE por espécie/ano/período, maior será a tendência de estarem presentes os demais compostos correlatos nesta amostragem de OE (espécie/ano/período). Estes compostos do primeiro quadrante foram negativamente correlacionados com os compostos do terceiro quadrante (α -humuleno, mirceno e cubenol), logo, quanto maior a presença desses compostos em uma amostragem de OE (espécie/ano/período), menor a tendência de estarem presentes os demais compostos não correlatos.

Para os compostos do segundo quadrante (δ -cadineno, muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol, α -copaeno, (E)- β -ocimeno, α -calacoreno, β -cariofileno, dentre outros) relacionam-se positivamente entre si (correlatos) nesta amostragem de OE (espécie/ano/período). Estes compostos foram negativamente correlacionados (não correlatos) com os compostos do quarto quadrante (α -cadinol, γ -elemeno, α -pineno, α -terpineol, α -pineno, γ -muuroloeno, dentre outros), portanto, quanto maior a presença dos compostos do segundo quadrante na amostra de OE (espécies/ano/estação) menor tende a ser a presença dos compostos do quarto quadrante na amostragem de OE (espécies/ano/estação).

Além da correlação entre os compostos, pode-se verificar como ocorre o posicionamento dos compostos nas amostragens (espécies/ano/estação). A espécie EDY apresentou valores mais altos dos compostos δ -cadineno, muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol, α -copaeno, (E)- β -ocimeno, α -calacoreno, β -cariofileno, linalol, óxido de cariofileno e α -humuleno, enquanto que a espécie ELA apresentou valores mais altos dos compostos α -felandreno, bicycloterpeno, β -gurjuneno, *epi*- α -

cardinol, espatulenol, limoneno, *allo*-aromadendreno e B germacreno. A espécie ELU, por sua vez, apresentou valores mais altos dos compostos α -cardinol, γ -elemento, α -pineno, α -terpineol, β -pineno e γ -muuroleno.

4.2.3. Composição química dos OE das folhas de *E. dysenterica* (EDY)

A análise cromatográfica dos OE das folhas de EDY obtidos nos anos de 2012 e 2014, em ambos as estações, permitiu a identificação de 70 compostos voláteis, sendo que 24 compostos foram encontrados em PC/2012, representando cerca de $98,8 \pm 1,1\%$ do óleo; 27 em PS/2012 ($96,4 \pm 1,4\%$); 28 em PC/2014 ($93,6 \pm 1,8\%$) e 33 em PS/2014 ($96,5 \pm 2,2\%$). Do total de compostos identificados na espécie, 12 integram a fração monoterpênica, 08 a fração monoterpênica oxigenada; 29 a fração sesquiterpênica e 21 a fração sesquiterpênica oxigenada, de ocorrência variável entre os dois períodos e os dois anos deste estudo (Tabela 6, página 60).

O perfil químico dos óleos das folhas de EDY caracterizou-se por alto percentual da fração sesquiterpênica não oxigenada, perfazendo $81,7 \pm 0,5\%$ (PC/2012), $65,5 \pm 0,5\%$ (PC/2014), $40,4 \pm 0,4\%$ (PS/2012) e $59,5 \pm 1,0\%$ (PS/2014), a exceção do OE obtido em PS/2012 onde não houve diferença significativa entre os percentuais de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Em ambas as épocas nos dois anos analisados, o percentual da fração monoterpênica foi maior que o da monoterpênica oxigenada (Figura 26). Estes resultados estão em acordo com os reportados por Duarte e colaboradores,¹⁶⁰ que realizaram estudos de variação sazonal do OE das folhas de plantas da mesma espécie com doze anos de idade cultivadas a partir de sementes selvagens no bioma cerrado, mas no estado de Goiás, nos municípios de Senador Canedo ($16^{\circ}42'47.1''S$ $49^{\circ}06'08,6''W$) e Campo Alegre de Goiás ($17^{\circ}38'02.7''S$ $47^{\circ}46'14.0''W$).

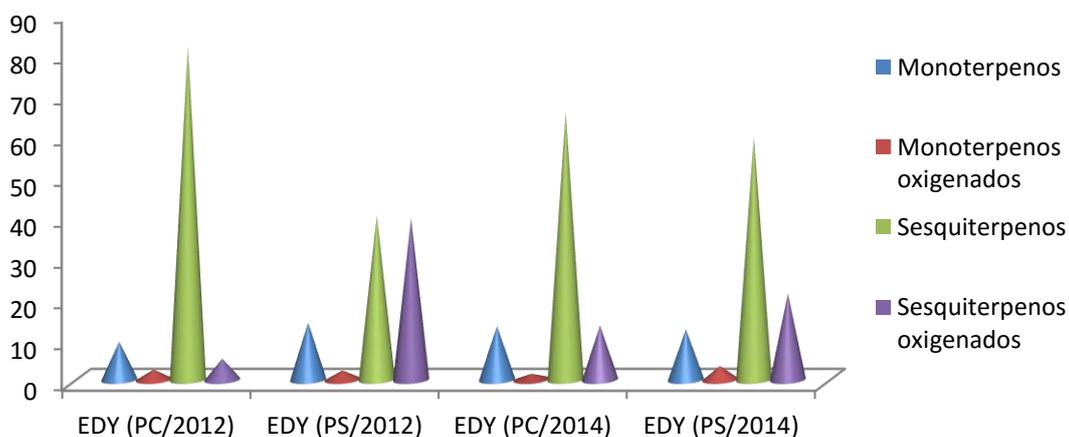


Figura 26. Amostragem das frações terpênicas nos OE de EDY em 2012 e 2014 (PC e PS).

Apenas cinco terpenos (β -pineno, limoneno, β -cariofileno, δ -cadineno e muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol) foram encontrados concomitantemente nos OE de EDY (Figura 27). Os constituintes encontrados como majoritários em diferentes épocas foram: β -cariofileno, com destaque para PC/2012 ($32,1 \pm 0,1\%$), seguido por óxido de cariofileno, δ -cadineno, cujas estruturas encontram-se mostradas na Figura 22 (página 65).

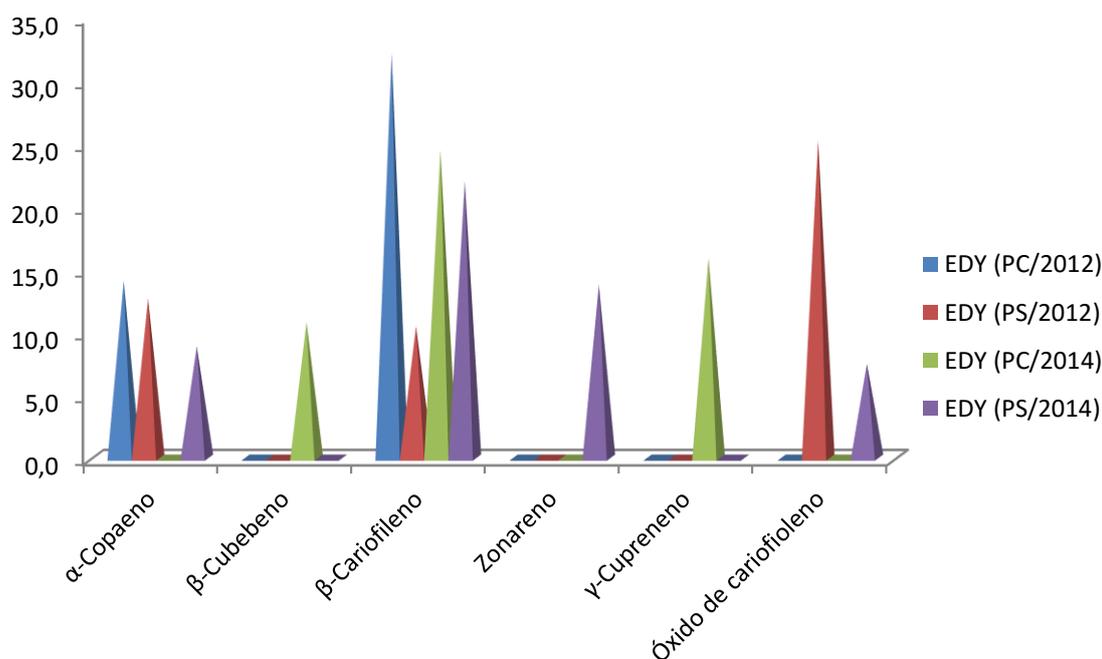


Figura 27. Percentual relativo dos compostos principais dos OE de EDY em 2012 e 2014 (PC/PS).

O teor elevado de óxido de cariofileno em PS/2012 ($25,2 \pm 0,1\%$) pode ser justificado em função de possível oxidação natural do β -cariofileno ou mesmo durante o processo de manipulação para obtenção do OE, tendo em vista a elevada redução do teor deste no período em questão. Duarte e colaboradores¹⁶⁰ concluíram que o quimiotipo encontrado no OE da espécie é o β -cariofileno, independentemente da época do ano (seca ou chuvosa).

4.2.4. Composição química dos OE das folhas de *E. lutescens* (ELU)

A análise dos OE obtidos das folhas de ELU nos dois períodos dos anos de 2012 e 2014 permitiu a identificação de um total de 60 compostos voláteis, 31 destes identificados em PC/2012, representando $94,2 \pm 1,0\%$ do óleo; 17 em PS/2012 ($93,9 \pm 0,9\%$); 32 em PC/2014 ($95,1 \pm 2,0\%$) e 30 em PS/2014 ($92,1 \pm 2,0\%$). Da totalidade dos compostos identificados, 08 são pertencentes à fração monoterpênica, 03 monoterpênica oxigenada, 27 sesquiterpênica e 22 da fração sesquiterpênica oxigenada (Tabela 6, página 60).

Como demonstrado na Figura 28, o perfil químico predominante de ELU no OE de 2012 caracterizou-se por elevado percentual de terpenos não oxigenados, alcançando o patamar em monoterpenos de $39,5 \pm 0,2\%$ em PC e $48,2 \pm 0,3\%$ em PS, seguido de perto pelos sesquiterpenos com $29,6 \pm 0,4\%$ em PC e $31,5 \pm 0,4\%$ em PS. A fração sesquiterpênica oxigenada destacou-se com $25,1 \pm 0,4\%$ (PC/2012) e de $11,2 \pm 0,2\%$ (PS/2012). Para os OE obtidos em ambos os períodos de 2014, o perfil químico predominante foi o sesquiterpênico, com $45,3 \pm 1,1\%$ no PC e $37,4 \pm 1,0\%$ no PS, sendo que a fração monoterpênica foi predominante apenas para os OE de ambos os períodos de 2012. Nos acessos realizados a fração monoterpênica oxigenadas dos OE do ano de 2012, foi encontrada em baixos teores: $3,0 \pm 0,0\%$ (PS) e não sendo detectada em PC.

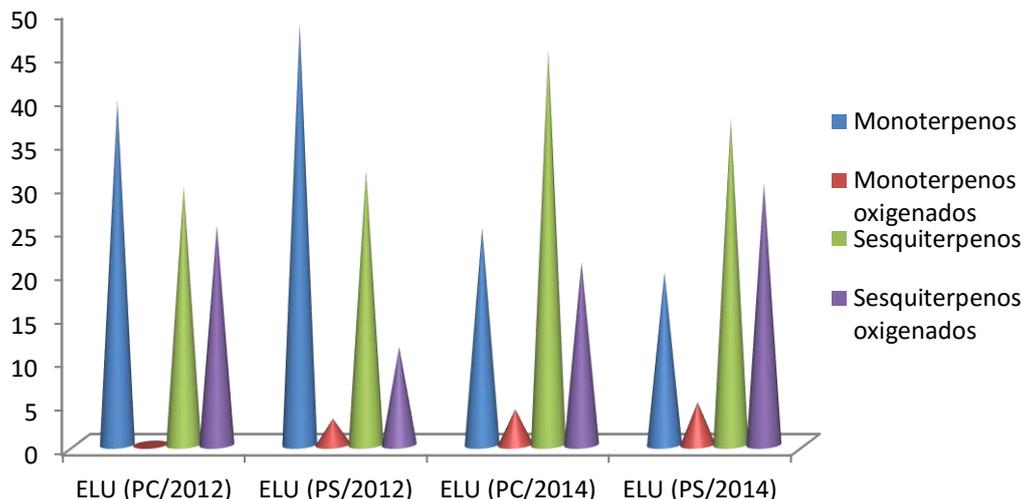


Figura 28. Amostragem das frações terpênicas dos OE de ELU obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS).

Os OE obtidos em 2014 mostraram que o perfil químico predominante foi a sesquiterpênica, sendo de $45,3 \pm 1,1\%$ para ELU/PC e $37,4 \pm 1,0\%$ para ELU/PS, a fração monoterpênica chegou a patamares de $24,9 \pm 0,3\%$ (ELU/PC) e $19,8 \pm 0,3\%$ (ELU/PS), a fração monoterpênica oxigenada foi observada em $4,1 \pm 0,1\%$ para ELU/PC e de $4,9 \pm 0,1\%$ para ELU/PS e a fração

sesquiterpênica oxigenada fora observada em percentuais de $20,9 \pm 0,5\%$ para ELU/PC e $30,0 \pm 0,6\%$ para ELU/PS.

Do total de terpenos identificados em ELU, apenas quatro foram encontrados simultaneamente nos OE analisados de ambos os períodos e anos (β -pineno, δ -elemeno, β -cariofileno e α -cadinol). As estruturas de alguns destes terpenos encontram-se na Figura 22 (página 65). Os percentuais referentes aos compostos presentes em todos os acessos não sofreram variação considerável, exceto o β -pineno que apresentou elevados percentuais nos OE obtidos em 2012 e percentuais moderados nos OE de 2014 (Figura 29).

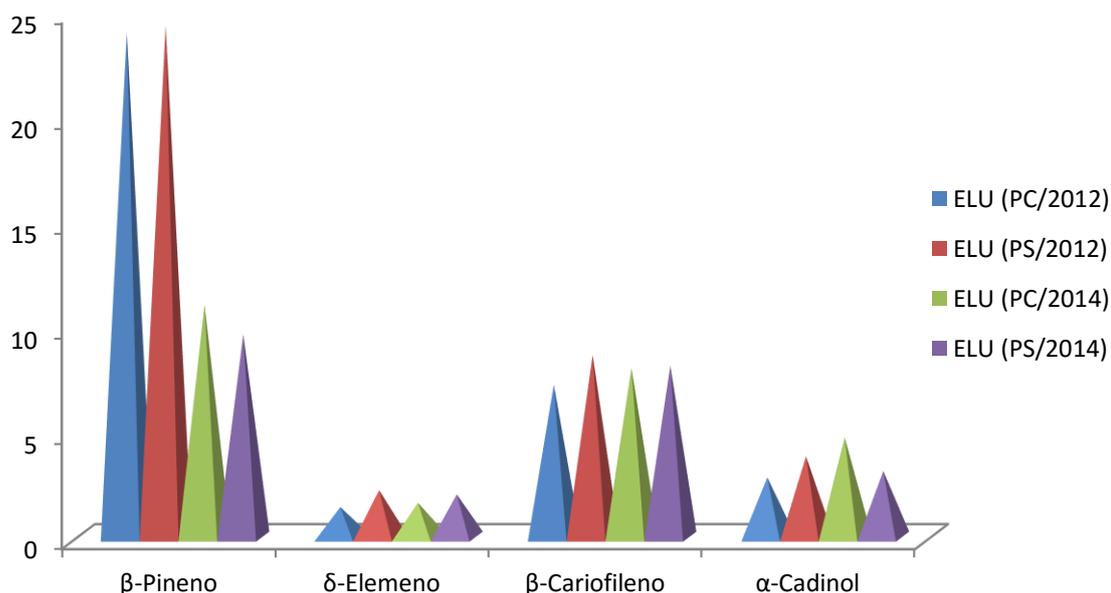


Figura 29. Percentual relativo dos compostos principais dos OE de ELU em 2012 e 2014 (PC/PS).

Os compostos identificados como majoritários ($\geq 5\%$) (Tabela 6, página 60) nos OE das folhas de ELU foram, dentre os monoterpenos: santolina trieno, identificado apenas em PS/2012 ($8,4 \pm 0,0\%$); α -thujeno, identificado apenas em PC/2014 ($6,2 \pm 0,0\%$); α -pineno, sobressaindo o PC/2012 ($2,9 \pm 0,1\%$) e PS/2012 ($12,5 \pm 0,1\%$) e o β -pineno, sobressaindo PS/2012 ($24,0 \pm 0,1\%$) e PC/2012 ($11,0 \pm 0,1\%$).

Dentre os sesquiterpenos: β -cariofileno, sobressaindo o PS/2012 ($8,6 \pm 0,1\%$) e PS/2014 ($8,1 \pm 0,1\%$); γ -elemeno em PS/2012 ($5,5 \pm 0,1\%$); γ -muuroleno em PS/2012 ($5,0 \pm 0,0\%$); D germacreno em PC/2014 ($6,5 \pm 0,1\%$); biciclogermacreno em PC/2014 ($6,3 \pm 0,0\%$); δ -Cadineno em PS/2014 ($6,2 \pm 0,1\%$); B germacreno em PC/2014 ($6,8 \pm 0,1\%$). Dentre os sesquiterpenos oxigenados: somente o espatulenol em PC/2012 ($5,7 \pm 0,0\%$) e PS/2014 ($5,5 \pm 0,1\%$), não sendo identificado nenhum dentre os monoterpenos oxigenados. As estruturas desses terpenos encontram-se na Figura 22 (página 65).

Os constituintes principais identificados no óleo de ELU, também foram reportados como majoritários nos óleos das folhas de outras espécies de *Eugenia*, tais como: *E. umbelliflora* (α -pinene, \bar{x} = 28,8% e β -pinene, \bar{x} = 29,1%);¹⁸⁸ *E. rotundifolia* (α -pinene, \bar{x} = 24,7% e β -pinene, \bar{x} = 23,5%, β -cariofileno, \bar{x} = 7,6%),¹⁸⁹ e *E. pyriformis* (β -pinene, 0,4 – 25,7%).¹⁹⁰

4.2.5. Composição química dos OE das folhas de *E. langsdorffii* (ELA)

A composição química dos OE obtidos das folhas da espécie ELA em ambos os períodos de 2012 e 2014, obtido via CG-EM, permitiu a identificação de 73 compostos, sendo que 29 destes compostos foram encontrados no OE de ELA (PC/2012), representando $95,6 \pm 0,9\%$, 30 compostos para ELA (PS/2012) ($98,0 \pm 1,6\%$), 45 compostos para ELA (PC/2014) ($96,2 \pm 2,5\%$) e 39 compostos para ELA (PS/2014) ($94,3 \pm 1,6\%$). Ainda sobre a totalidade de compostos, 14 destes pertencem à fração monoterpênica, 06 a fração monoterpênica oxigenada, 22 compostos a fração sesquiterpênica e 31 compostos a fração sesquiterpênica oxigenada, onde dos 73 compostos identificados apenas 15 foram encontrados concomitantemente em todos os OE da espécie ELA estudados (Tabela 6, página 60)

O perfil químico predominante nos OE da espécie ELA foi sesquiterpênico, sendo que em PS/2014 foi observada estão dentro da mesma margem de variação nos percentuais das frações sesquiterpênica e sesquiterpênica oxigenada (Figura 30), podendo esta última ser resultado da oxidação natural ou até mesmo da oxidação de algumas moléculas da fração principal durante o processamento de obtenção das amostras de OE.

¹⁸⁸ Apel, M. A.; Limberger, R. P.; Sobral, M.; Ntalani, H.; Verin, P.; Menut, C.; Bessiere, J. M.; Henriques, A. T.; *J. Essent. Oil Res.* **2002**, *14*, 259

¹⁸⁹ Defaveri, A. C. A.; Sato, A.; Borré, L. B.; Aguiar, D. L. M.; San-Gil, R. A. S.; Arruda, R. C. O.; Riehl, C. A. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1531.

¹⁹⁰ Stefanello, M. E. A.; Wisniewski-Junior, A.; Simionatto, E. L.; Cervi, A. C.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, *28*, 449.

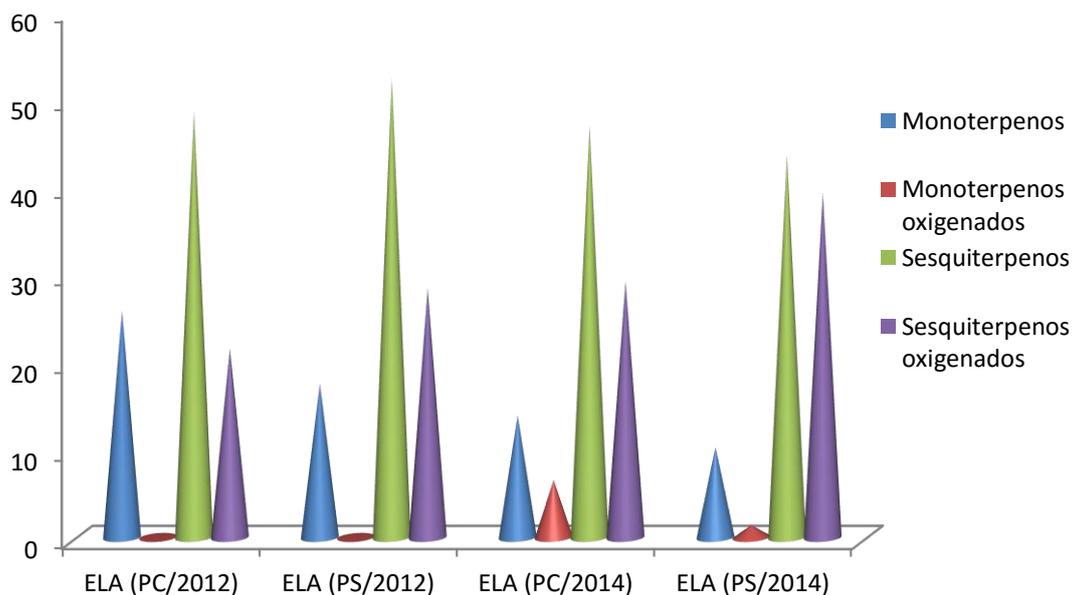


Figura 30. Amostragem das frações terpênicas dos OE de ELA obtidos em 2012 e 2014 (PC e PS).

Em relação aos compostos principais identificados como teor $\geq 5\%$ (majoritários) (Tabela 6, página 60) nos OE das folhas de ELA foram, dentre os monoterpênicos: santolina trieno em PC/2012 ($7,1 \pm 0,0\%$); β -pineno em PC/2012 ($5,9 \pm 0,0\%$) e limoneno, sobressaindo em PC/2012 ($5,4 \pm 0,0\%$) e PS/2012 ($8,3 \pm 0,0\%$). Dentre os sesquiterpênicos: β -cariofileno, sobressaindo em PS/2012 ($9,5 \pm 0,1\%$) e PC/2012 ($9,1 \pm 0,0\%$); biciclogermacreno, sobressaindo em PC/2012 ($15,0 \pm 0,1\%$) e PS/2012 ($14,0 \pm 0,1\%$); δ -cadineno em PS/2012 ($5,8 \pm 0,1\%$) e B germacreno em PC/2014 ($8,7 \pm 0,1\%$). Dentre os sesquiterpênicos oxigenados: espatulenol, sobressaindo em PS/2014 ($12,9 \pm 0,1\%$) e PC/2012 ($8,2 \pm 0,1\%$) e viridiflorol apenas em PS/2014 ($10,2 \pm 0,0\%$) e PC/2014 ($5,1 \pm 0,0\%$), para os monoterpênicos oxigenados não foi identificado nenhum composto com o referido percentual relevante como majoritário.

A Figura 31 mostra percentual relativo dos constituintes principais dos OE de ELA em ambos os períodos de 2012 e 2014.

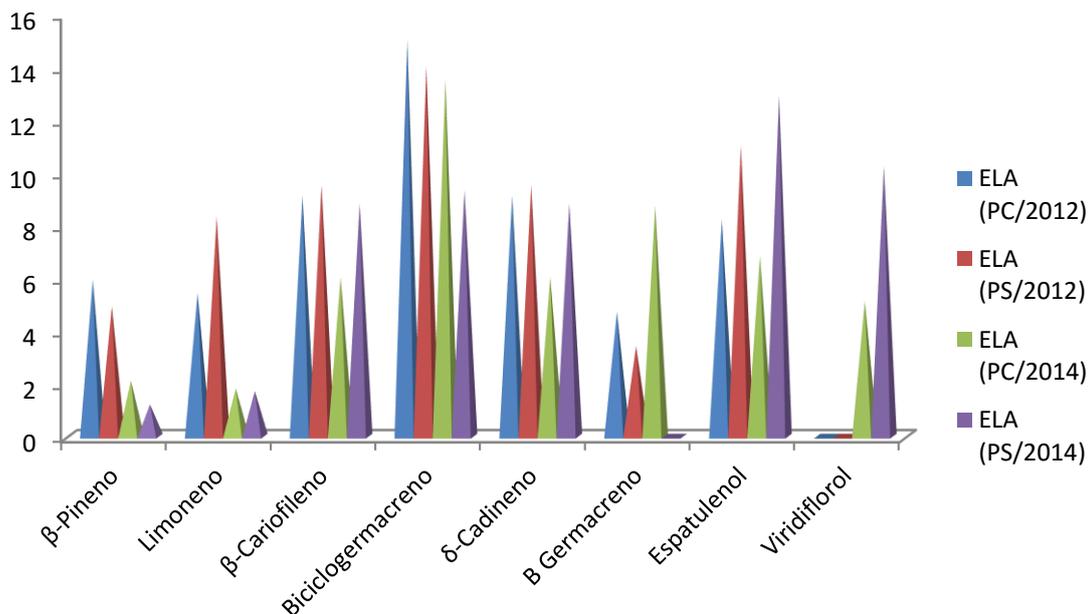


Figura 31. Percentual relativo dos componentes principais dos OE de ELA em 2012 e 2014 (PC/PS).

Esses dados evidenciam grande variabilidade na composição química dos OE de ELA coletados no PC e PS, nos respectivos anos. Em estudo químico prévio realizado em nosso grupo de pesquisa com o OE de planta da mesma população coletada na estação chuvosa foi reportado serem os sesquiterpenos como classe química dominante. No entanto, a composição química diferiu da apresentada nesse estudo, inclusive quanto aos compostos majoritários: *epi*-longipinanol ($13,6 \pm 0,4$) e γ -eudesmol ($12,3 \pm 0,2$).¹⁶⁵

4.2.6. Estudo dos compostos volatilizados das folhas das espécies do gênero *Eugenia* estudadas em PC e PS do ano de 2014

Para avaliar se durante o processo de manipulação das folhas para obtenção do OE das espécies em estudo poderia estar ocorrendo evasão de voláteis foi conduzido um experimento onde as folhas frescas foram coletadas em sacos aluminizados, conforme descrito no capítulo materiais e métodos (página 42 a 44). Os compostos volatilizados foram identificados por espectrometria de massa, índice de retenção e alguns também por co-injeção de padrões autênticos.

Nos vapores das amostras coletadas em ambas as estações do ano 2014, foram identificados um total de 22 compostos (Tabela 8), dos quais 07 encontrados nos vapores de EDY (PS), 02 em EDY (PC) 11 em ELU (PS), 02 em ELU (PC), 09 em ELA (PS) e 04 em ELA (PC).

Nas análises realizadas com os vapores colhidos em PS/2014 das folhas de EDY, os monoterpenos oxigenados acetato de linalila ($23,4 \pm 0,1\%$), α -acetato de terpenila ($23,4 \pm 0,1\%$) e o sesquiterpeno oxigenado *trans*-acetato de mirtanol ($12,4 \pm 0,1\%$) foram identificados como sendo os constituintes principais da fração de volatilizados. Surpreendentemente, nas várias análises realizadas com vapores de EDY (PC) não foram encontrados qualquer vestígio de substâncias volatilizadas. Nos vapores de ELU foram identificados como majoritários em PS os sesquiterpenos Khusimone ($35,5 \pm 0,1\%$) e α -copaeno ($31,3 \pm 0,2\%$). Já em PC, foram apenas os monoterpenos β -pineno ($55,15 \pm 0,2\%$) e α -thujeno ($44,9 \pm 0,1\%$). Para ELA foram identificados como constituintes mais volatilizados das folhas coletadas em PS os monoterpenos acetato de linalila ($46,1 \pm 0,1\%$) e o linalol ($39,5 \pm 0,1\%$), enquanto que nas folhas coletadas em PC predominaram os sesquiterpenos β -cariofileno ($87,6 \pm 0,1\%$) e α -humuleno ($8,8 \pm 0,1\%$). A Figura 32 mostra a estrutura química destes compostos identificados.

Tabela 8. Constituintes químicos identificados nos vapores das folhas das espécies de *Eugenia* coletadas em ambas estações de 2014.

ESPÉCIE			EDY		ELU		ELA	
Período			PC	PS	PC	PS	PC	PS
COMPOSTOS	IR ^a	IR ^b	% ± DP					
α-Thujeno	929	924	36,2±0,1	-	44,9±0,1	-	-	-
α-Pineno ^c	930	932	-	-	-	3,6±0,0	-	3,2±0,1
β-Pineno ^c	974	974	62,7±0,2	-	55,2±0,2	4,7±0,1	-	3,5±0,0
Mirceno	987	988	-	-	-	-	-	1,4±0,0
Limoneno ^c	1025	1024	-	-	-	1,4±0,0	-	0,9±0,0
(Z)-β-Ocimeno	1043	1032	-	-	-	-	-	0,6±0,0
Linalol	1098	1095	-	0,3±0,0	-	-	-	39,5±0,1
Acetato de linalila	1257	1254	-	47,0±0,1	-	-	-	46,1±0,1
neiso-3-Acetato de thujanila	1269	1281	-	1,6±0,0	-	-	-	-
α-Acetato de terpenila	1354	1346	-	23,4±0,1	-	-	-	2,2±0,0
α-Copaeno	1381	1374	-	5,9±0,1	-	31,3±0,2	-	2,7±0,0
Acetato de geranila	1384	1379	-	8,7±0,1	-	-	-	-
trans-Acetato de mirtanol	1389	1385	-	12,4±0,1	-	-	-	-
β-Cariofileno ^c	1427	1417	-	-	-	11,6±0,1	87,6±0,1	-
Acetato de <i>p</i> -ment-1-en-9-ol	1431	1421	-	-	-	-	-	-
Butanoato de linalol	1449	1421	-	-	-	-	-	-

α -Humuleno ^c	1462	1452	-	-	-	2,7 \pm 0,0	8,8 \pm 0,1	-
D Germacreno	1486	1489	-	-	-	0,5 \pm 0,0	-	-
α -Muuroleno	1511	1500	-	-	-	0,5 \pm 0,1	-	-
δ -Cadineno	1535	1522	-	-	-	2,2 \pm 0,1	-	-
Khusimono	1597	1604	-	-	-	35,5 \pm 0,1	-	-
2,(7Z)-Bisaboladien-4-ol	1625	1618	-	-	-	5,9 \pm 0,0	-	-
Monoterpenos			98,9 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,3	9,7 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	9,6 \pm 0,1
Monoterpenos oxigenados			0,0 \pm 0,0	93,4 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	35,5 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	87,8 \pm 0,2
Sesquiterpenos			0,0 \pm 0,0	5,9 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	48,8 \pm 0,5	96,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,0
Sesquiterpenos oxigenados			0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	5,9 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
TOTAL			98,9 \pm 0,3	99,1 \pm 0,5	100,0 \pm 0,3	99,9 \pm 0,7	96,4 \pm 0,2	99,9 \pm 0,3

^aIR = Índice de retenção calculado com base nos tempos de retenção em comparação com uma série de *n*-alcanos; ^bIR = Índice de retenção da literatura; ^cidentificação confirmada adicionalmente por co-injeção com padrões autênticos; DP = desvio padrão; EDY = *E. dysenterica*; ELU = *E. lutescens*; ELA = *E. langsdorffii*.

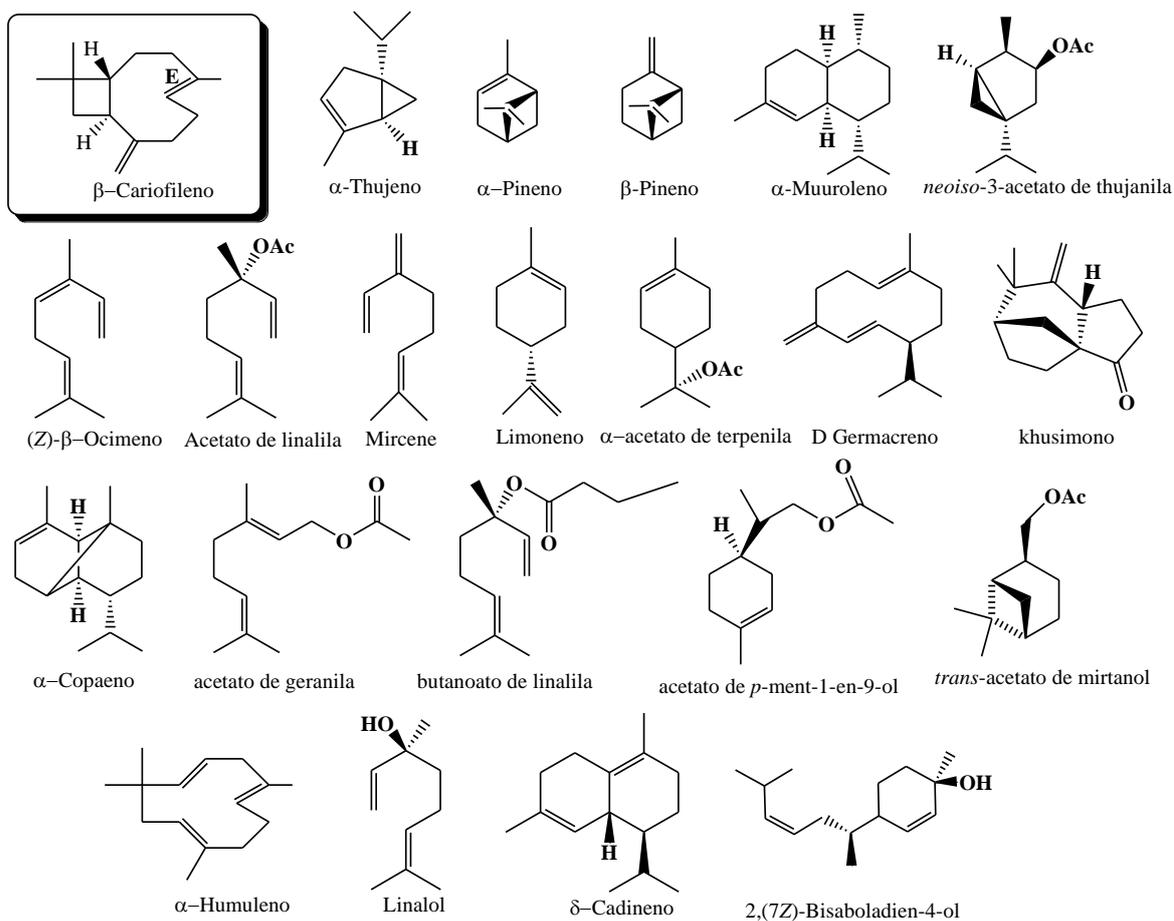


Figura 32. Terpenos encontrados nos vapores das folhas das espécies de *Eugenia* em 2014 (PC e PS).

De acordo com os dados obtidos, constituintes monoterpênicos foram os que mais volatilizaram nas amostragens analisadas, seguido pelos sesquiterpenos. A maior incidência em termos de diversidade química e percentual de compostos volatilizados ocorreu em PS, onde se observa altas temperaturas e baixa umidade relativa. Nos OE investigados não foram encontrados terpenos acetilados, ao contrário do vapor das folhas que exibiram elevados percentuais, possivelmente, devido serem estes e.g. compostos mais voláteis que os correspondentes não acetilados.

Com base no acima exposto, conclui-se que as perdas por volatilização durante o processamento das amostras para obtenção dos OE podem promover alterações na composição química e os rendimentos destes, por mascarar a existência ou diminuir o percentual de alguns terpenos, afetando também a atividade biológica dos OE. Fato que enseja uma maior atenção durante a etapa de colheita, processamento da amostra biológica para extração dos OE bem como quanto à manipulação e armazenamento do próprio OE.

4.3. Investigação da toxicidade dos OE das espécies de *Eugenia*, contra o *T. urticae* (ácaro rajado)

Os ensaios de toxicidade (fumigação e fecundidade) dos OE das três espécies de *Eugenia* contra o ácaro rajado (*Tratranychus urticae*) foram realizados no laboratório de entomologia da UFRPE, apenas para as amostras obtidas em 2012 (PC e PS) devido à logística, tempo e a dinâmica do laboratório supracitado. Os detalhes experimentais encontram-se descritos no capítulo material e métodos (páginas 45 a 47).

4.3.1. Toxicidade dos OE de *Eugenia* por fumigação

A Tabela 9 mostra os parâmetros estatísticos e os valores das CL_{50} dos óleos das espécies do gênero *Eugenia* estudadas. Os coeficientes angulares, identificado como grau de liberdade (GL), observados na Tabela 9 referem-se às inclinações das curvas de concentração-resposta dos OE e servem de indicativo para o grau de homogeneidade da população, ou seja, quanto maior seu valor, maior a homogeneidade da população de ácaros no experimento. Nesse aspecto, os experimentos feitos com as populações de ácaros submetidas aos OE das obtidos das folhas das três espécies de *Eugenia* foram homogêneos. Ahmad e colaboradores,¹⁹¹ sugerem que valores de coeficiente angulares inferiores a 2 é um indicativo de heterogeneidade das populações na experimentação.

¹⁹¹Ahmad, M.; Arif, M. I.; Ahmad, Z.; *J. Econ. Entomol.* **1995**, *88*, 771.

Tabela 9. Parâmetros dos ensaios e toxicidade fumigante dos óleos essenciais de *Eugenia* obtidos em 2012 (PC e PS) contra *T. urticae*.

Amostra	Estação	N	GL	χ^2	Inclinação \pm EP	CL ₅₀ ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar)	RT ₅₀
ELA	PC	628	4	3,59	4,24 \pm 0,43	3,34 (3,01-3,64)	934,64 (207,23-4215,39)
	PS	623	4	4,10	3,43 \pm 0,30	1,58 (1,33-1,83)	441,89 (104,87-1861,99)
ELU	PC	627	4	3,23	4,12 \pm 0,43	3,66 (3,31-3,98)	1023,68 (225,71-4642,80)
	PS	617	4	3,64	5,52 \pm 0,66	2,50 (2,28-2,69)	700,82 (155,47-3159,21)
EDY	PC	537	3	3,18	6,61 \pm 0,75	2,45 (2,12-2,71)	687,66 (154,29-3064,85)
	PS	628	4	3,92	2,82 \pm 0,26	2,64 (2,27-2,99)	739,68 (168,99-3237,55)
Eugenol *	-	540	3	1,52	0,85 \pm 0,08	4 x 10 ⁻³ (2x10 ⁻³ -5x10 ⁻³)	-

n = Número de ácaros/dose; GL= Grau de liberdade; IC = Intervalo de confiança; χ^2 = chi-quadrado (P>0,05); RT = Razão de toxicidade, calculada pelo método de Robertson & Preisler;¹⁷⁵ EP = Erro padrão da média; *Eugenol (controle positivo); EDY = *E. dysenterica*; ELU = *E. lutescens*; ELA = *E. langsdorffii*.

Os dados de toxicidade por fumigação dos OE obtidos em 2012 (PC e PS) sobre o ácaro rajado são apresentados na Tabela 9. Com base nas estimativas CL_{50} para os óleos tem-se que ELA-PS ($CL_{50} = 1,58 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar) foi o mais tóxico sobre o ácaro rajado, seguido do ELU-PS ($CL_{50} = 2,50 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar). ELU-PS, EDY (PC e PS) apresentaram toxicidade similar sobre o ácaro rajado, pois para estas espécies foi observada uma sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50} estimadas. ELA-PS apresentou-se cerca de 2,11 vezes mais tóxico que ELA-PC ($CL_{50} = 3,34 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar). ELU-PS apresentou uma $CL_{50} = 2,50 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar, mostrando ser este cerca de 1,46 vezes mais tóxico do ELU-PC ($CL_{50} = 3,66 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar). Dentre espécies testadas, apenas a toxicidade dos OE de ELU não diferiram significativamente entre si nas duas estações (PC e PS). Nenhum dos OE se mostrou mais tóxico que o controle positivo, eugenol ($CL_{50} = 4 \times 10^{-3} \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar).

Comparando a toxicidade relativa entre os óleos, o OE da espécie *E. langsdorffii* coletada em PS apresentou maior toxicidade por fumigação dentre os OE investigados. A ordem de toxicidade foi: ELA (PS) foi cerca de 2,32 vezes mais tóxico do que ELU-PC; 2,11 vezes mais tóxico que ELA-PC; 1,67 vezes mais tóxica do que EDY-PS; 1,58 mais tóxica do que ELU-PS; 1,55 vezes mais tóxico do que EDY (PC).

A toxicidade sobre o ácaro rajado do óleo ELA-PS em comparação com o reportado por Moraes e colaboradores¹⁶⁵ para uma amostra de óleo da mesma espécie e local de acesso, mas no coletado em PC, o óleo coletado no PS foi 1,13 vezes mais tóxico do que o coletado no PC, sugerindo que o efeito sazonal interfere na propriedade acaricida e que a melhor época para a coleta desse óleo para combater o ácaro rajado é na estação seca, mesmo sendo evidenciado a ocorrência de perdas de terpenos voláteis no pós-colheita.

Com base nos resultados aqui obtidos, de forma geral, os vapores dos OE se mostraram tóxicos para *T. urticae* (ácaro rajado) e variaram entre as espécies testadas e também com a época de coleta. As variações observadas na atividade fumigante sobre o ácaro rajado, podem ser resultante da variação qualitativa ou quantitativa da composição química dos óleos, o que é condizente com resultados reportados na literatura para outros óleos sobre a mesma praga.^{192,193}

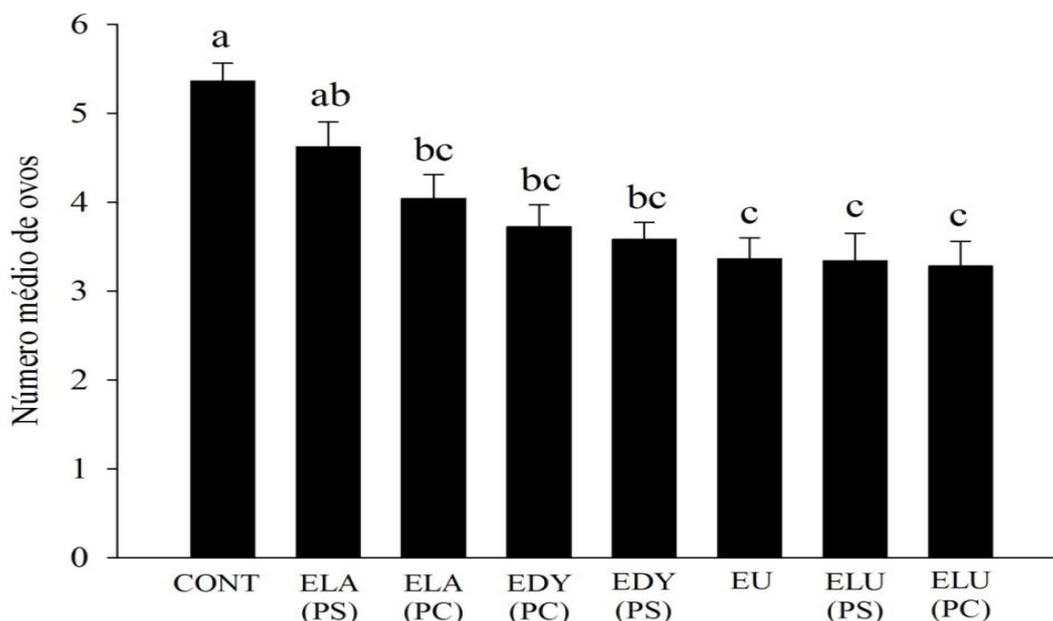
4.3.2. Ação inibitória da fecundidade (deterrência) dos OE de *Eugenia*

Nos experimentos de toxicidade por fumigação com os OE das espécies de *Eugenia* coletados em PC e PS no ano de 2012, foi observado uma diminuição significativa do número de ovos depositados por ácaros rajado com o aumento da concentração de óleo em comparação ao controle, sugerindo que os óleos, além de atuarem na mortalidade, também interfere na oviposição dos ácaros.

¹⁹²Çalmaşur, Ö.; Aslan İ.; Şahin, F.; *Industrial Crops Produc.* **2006**, 23, 140.

¹⁹³Neves, I.A.; da Camara, C.A.G.; Oliveira, J.C.S.; de Almeida, A.V.; *J. Essent. Oil Res.* **2011**, 23, 23.

Para confirmar se a redução no número de ovos era atribuída à ação dos óleos ou devido à morte dos ácaros, experimentos adicionais foram realizados utilizando o método de fumigação ajustado (onde a concentração utilizada foi a encontrada na CL₂₅), para comparar a ação desses óleos na fecundidade do ácaro rajado. O número médio de ovos depositados por fêmea de *T. urticae* após 24h de exposição aos óleos de EDY, ELU e ELA coletados no PC e PS são apresentadas na Figura 33.



Nota: O valor plotado na vertical significa o número de ovos por *T. urticae* fêmea quando submetido a vapores de óleos essenciais *Eugenia* após 24 horas de exposição; CONT = controle; EU = Eugenol (controle positivo); Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); EDY = *E. dysenterica*; ELU = *E. lutescens*; ELA = *E. langsdorffii*.

Figura 33. Toxicidade por fumigação dos OEs de *Eugenia* obtidos em 2012 (PC e PS).

Os óleos de ELU (coletados em ambas as estações) atuaram no mesmo nível do eugenol (controle positivo) na fecundidade do ácaro, produzindo uma redução significativamente maior em números de ovos quando comparado com os óleos de EDY coletados em ambos os períodos e ELA-PC. O óleo de ELA-PS, praticamente não afetou a fecundidade dos ácaros.

Esses dados corroboram com os obtidos nos experimentos anteriores de fumigação e sugerem que os vapores dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia* atuaram também como na redução da oviposição dos ácaros. Esta habilidade em reduzir a fecundidade em *T. urticae* foi

reportada na atividade dos óleos das folhas de *Protium bahianum*¹⁹⁴ e *P. heptaphyllum*¹⁹⁵ por meio de bioensaios de fumigação, mas não houve indicação de redução na fecundidade proveniente da ação dos óleos ou da mortalidade dos ácaros.

Os resultados do teste de fecundidade com o ácaro rajado sugerem que os OE de EDY (PC e PS), ELU (PC e PS) e ELA (PC), atuaram por inibição da fecundidade do *T. urticae*. As diferenças nos níveis de toxicidade e no potencial deterrente de oviposição podem ser justificadas pelas diferenças qualitativas e quantitativas na composição química entre os óleos investigados, sugerindo que a melhor época para coleta desse óleo para uso no controle do ácaro rajado é no PS, estação em que também foram observados os maiores rendimentos percentuais de óleos essenciais nas espécies investigadas.

4.4. Obtenção e caracterização do β -cariofileno para uso como matéria-prima nas modificações químicas

De acordo com estudos de determinação da composição química sazonal (Tabela 6, página 60), o β -cariofileno foi identificado como um dos compostos majoritários e comum às três espécies de *Eugenia* acessadas. Assim, foram realizadas várias tentativas de isolamento β -cariofileno *in natura* a partir do OE de EDY, espécie que apresentou maior rendimento em termo de OE e maiores percentuais relativos ao composto alvo no óleo, visando a sua utilização para realização das modificações químicas pretendidas.

Inicialmente, optou-se por empregar a técnica de destilação à pressão reduzida, porém, em função dos parâmetros operacionais da bomba de vácuo disponível no laboratório, foi necessário elevar consideravelmente a temperatura, fazendo com que as frações do destilado se apresentassem como misturas complexas de terpenos (análises por CCD e CG-EM), sendo que em nenhuma delas o β -cariofileno foi encontrado com pureza satisfatória.

A técnica de cromatografia em coluna clássica, utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 e como eluente hexano também foi testada e, igualmente, mostrou-se ineficiente, pois a pureza (via CG-EM) do composto almejado não foi satisfatória. Fato possível de se entender dada a presença de outros compostos típicos quimicamente relacionados na mistura original.

Baseado na presença das ligações duplas na estrutura do β -cariofileno e na propriedade bastante conhecida do íon prata (aceptor de elétrons π) de complexar com alcenos (doadores de

¹⁹⁴Pontes, W.J.T.; Oliveira, J.C.S.; da Camara, C.A.G.; Gondim-Júnior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Schwartz, M.O.E.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 838.

¹⁹⁵Pontes, W.J.T.; Silva, J.M.O.; da Camara, C.A.G.; Gondim-Júnior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Schwartz, M.O.E.; *Essential Oil Reser.* **2010**, *22*, 279.

elétrons π) em melhorar a eficiência das separações cromatográficas,¹⁹⁶ devido ao complexo formado ficar mais retido na coluna cromatográfica, eluindo posteriormente aos compostos que não apresentam elétrons π , decidiu-se pelo o uso de nitrato de prata associado à sílica-gel como suporte cromatográfico. Assim sendo, procedeu-se “dopagem” da sílica com nitrato de prata comercial, conforme descrito na literatura^{197,198} e, na sequência, o óleo foi cromatografado em coluna dopada e a análise da fração contendo o β -cariofileno isolado por esta metodologia exibiu pureza de aproximadamente 75% por CG-EM, comparando-se os espectros em diversos pontos do pico (página 163).

Assim, as tentativas de isolamento do β -cariofileno *in natura* mostraram-se inviáveis, devido às questões de ordem prática, ou seja, pureza relativamente baixa da fração isolada, necessidade de uma quantidade razoável de amostra para as transformações pretendidas e em relação à quantidade de nitrato de prata necessária para uso nas separações cromatográficas.

Com o intuito de se obter o β -cariofileno com maior pureza e em quantidade suficiente para produção dos novos derivados, já que as tentativas de isolamento do OE de EDY foram descartadas, optou-se por adquiri-lo de fonte comercial. Deste modo, o produto (-)-*trans*-cariofileno (β -cariofileno) com $\geq 98,5\%$ de pureza foi adquirido da Sigma-Aldrich e com a finalidade de se avaliar a equivalência entre β -cariofileno isolado e o padrão comercial, foram realizadas análises por CG-EM da fração isolada do OE de EDY (PS/2012), pura e co-injetada com o composto comercial, e do composto comercial puro. As correlações avaliadas nos cromatogramas e espectros de massas dos picos (pureza de pico) revelaram que o composto comercial exibiu as mesmas características analíticas do composto extraído do OE (páginas 163 a 166).

Adicionalmente, procedeu-se uma análise comparativa preliminar do RMN ^1H (Página 171) da fração isolada do OE de *E. dysenterica* (PS/2012) com o RMN ^1H do β -cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich), por meio da qual se verificou perfil semelhante em termos de deslocamentos químicos e formato dos sinais, em todas as regiões dos espectros. A Figura 34 mostra o perfil dos sinais nos RMN ^1H do β -cariofileno *in natura* (A) e do β -cariofileno Sigma-Aldrich 98,5%, com destaque para as regiões diagnósticas dos hidrogênios olefínicos, sendo um duplo duplete em torno de 5,30 ppm referente ao H5 (dupla endocíclica) e dois simpletos com deslocamentos químicos em torno 4,90 e 4,80 ppm relativos aos hidrogênios H15 e H15' (dupla exocíclica).

¹⁹⁶Williams, C.M.; Mander, L.N.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 425.

¹⁹⁷Silva, C.M.; Bolzan, A.A.; Mallmann, C.A.; Pozzatti, P.; Alves, S.H.; Heinsmann, B.M.; *Braz. J. Pharmacog.* **2010**, *20*, 87.

¹⁹⁸Andreão, P.S.S.; Giacomini, A.; Stumbo, A.M.; Waldman, W.R.; Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* **2010**, *33*, 212.

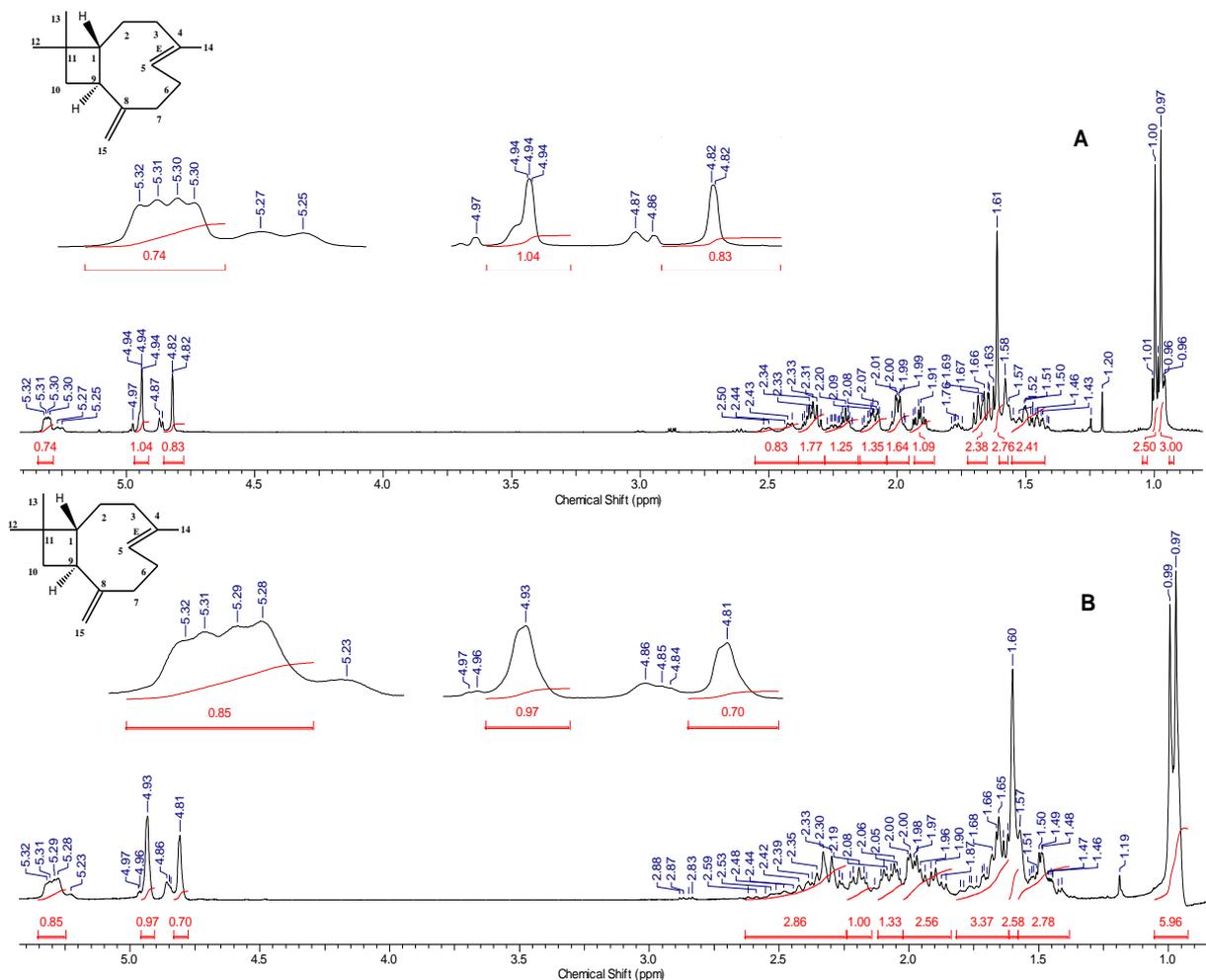


Figura 34. Comparação dos espectros de RMN ¹H do β-cariofileno 98,5% (A - 600 MHz, CDCl₃) com o do β-cariofileno isolado do OE de *E. dysenterica* (B - 300 MHz, CDCl₃).

O β-cariofileno comercial, designado como matéria-prima neste estudo de modificações químicas, foi analisado por espectroscopia de IV (página 167) onde, se observou apenas absorções em frequências características de alcanos e alenos, como esperado para o composto em questão. Uma análise preliminar dos espectros de RMN ¹H e ¹³C da matéria-prima permitiu visualizar a duplicação de quase todos os sinais, porém com intensidades bastante diferenciadas, sugerindo a presença de um contaminante com estrutura similar ao β-cariofileno.

A literatura relata detalhadamente a existência de várias conformações para o β-cariofileno e compostos correlatos.^{199,200} Estudos de modelagem molecular (MM1) do β-cariofileno conduzidos por Shirahama e colaboradores¹⁹⁹ indicaram a coexistência de uma mistura de quatro

¹⁹⁹Shirahama, H.; Osawa, E.; Chabra, B.R.; Shimokawa T.; Yokono T.; Kanaiwa T.; Amiya T.; Matsumoto, T.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1527.

²⁰⁰Clericuzio, M.; Alagona, G.; Ghio, C.; Toma, L.; *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6910.

conformêros de baixa energia ($\alpha\beta$, $\beta\alpha$, $\beta\beta$ e $\alpha\alpha$) distinguíveis em função das orientações relativas da dupla exocíclica C13-C8 e a porção vinílica C5-C4, em que o primeiro β (ou α) mostra a direção do grupo exometileno (para baixo ou para cima do plano molecular médio, respectivamente) e o segundo da metila (Figura 35). Ainda de acordo com os autores, as análises de RMN ^{13}C do β -cariofileno mostraram que, à temperatura ambiente, alguns sinais são acompanhados por picos menores que coalescem a 120 °C devido às mudanças conformacionais. Experimentos de RMN ^{13}C no modo desacoplado revelaram ser a população de Boltzmann relativa para os dois conformêros majoritários de 76:24 $\beta\alpha$: $\beta\beta$ (à temperatura ambiente), valores que mostraram excelente concordância com os dados teóricos. A barreira de interconversão calculada para as conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ foi 16,25 Kcal.mol $^{-1}$, assim os percentuais encontrados correspondem na verdade a dois equilíbrios, $\beta\alpha$ - $\alpha\alpha(\beta\alpha)$ e $\beta\beta$ - $\alpha\alpha(\beta\beta)$, uma vez que a energia de interconversão em cada equilíbrio é muito pequena, envolvendo apenas a movimentação do grupo exometileno.

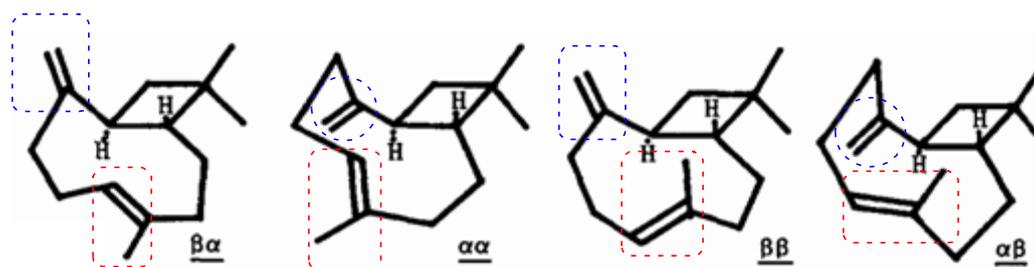
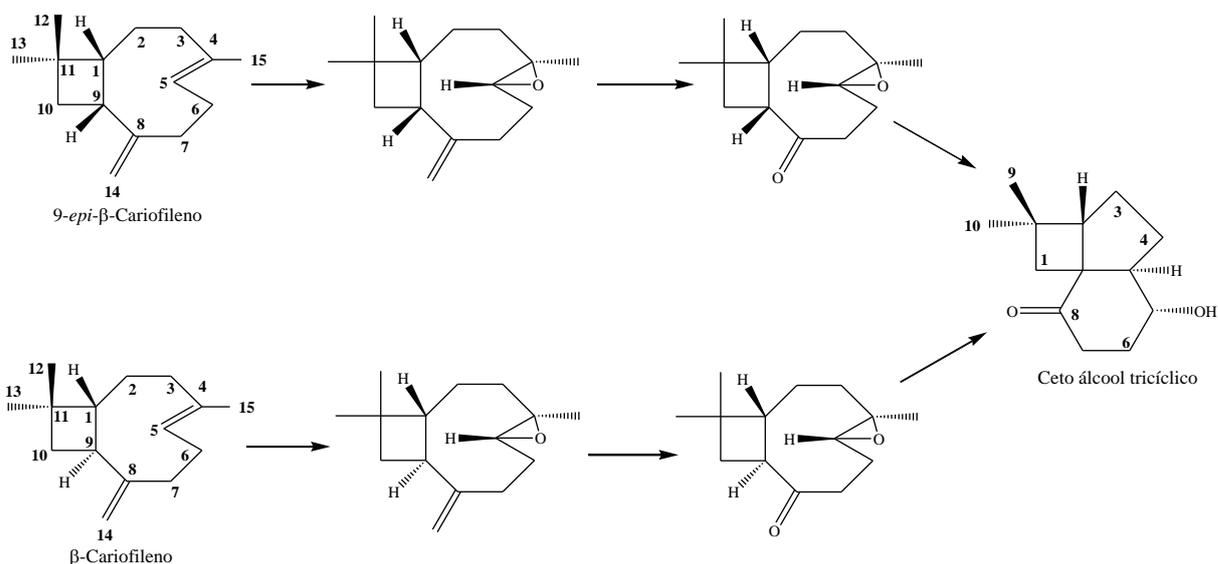


Figura 35. Conformêros de baixa energia de β -cariofileno com base em estudos de modelagem molecular [adaptada da ref. 199].

Hinkley e colaboradores²⁰¹ chegaram a conclusões semelhantes ao estudarem a estereoquímica relativa do sesquiterpeno 9-epi- β -cariofileno, isolado das folhas de *Dacrydium cupressinum*, por técnicas de RMN uni e bidimensionais (COSY e LRHETCOR) e experimentos NOE. De acordo com os autores, os resultados dos estudos de modelagem molecular (MM2) conduzidos com o 9-epi- β -cariofileno e β -cariofileno indicaram que as conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ predominam em solução, em concordância com os dados experimentais. No entanto, as populações previstas (50: 50) não coincidiram com os dados RMN ^{13}C com o mesmo grau de previsto anteriormente para o β -cariofileno por MM1.²⁰¹ A configuração absoluta do 9-epi- β -cariofileno foi confirmada por procedimentos sintéticos envolvendo a conversão de ambos, 9-epi- β -cariofileno e β -cariofileno, no cetoálcool tricíclico (conhecido) via os correspondentes epóxidos 9-epi-kubusono e kubusono (Esquema 5).

²⁰¹ Hinkley, S.F.R.; Perry, N.B.; Weavers, R.T.; *Phytochem.* **1994**, 35, 1489.



Esquema 5. Conversão de 9-*epi*- β -cariofileno e β -cariofileno no cetoálcool tricíclico [adaptada da ref. 201].

Barrero e colaboradores²⁰² realizaram estudos de RMN ^1H de alta resolução e análises de mecânica molecular (SYBYL) com 14-hidróxi- β -cariofileno e compostos correlatos. Para o β -cariofileno, os estudos teóricos indicaram a coexistência de duas conformações predominantes ($\beta\alpha$ e $\beta\beta$) em estreitas proporções relativas. Com bases nas deduções da integral RMN ^1H e ^{13}C , a 25 °C os percentuais de $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ na mistura dos dois confômeros foram de 82 e 18%, respectivamente (Figura 36). Os sinais de RMN foram assinalados com base na similaridade encontrada entre a intensidade relativa de cada sinal e a proporção relativa encontrada por mecânica molecular. No RMN ^{13}C os sinais correspondentes à conformação $\beta\alpha$ são notavelmente mais intensos.

²⁰² Barrero, A.F.; Molina, J.; Oltra, J.E.; Altarejos, J.; Barragán, A.; Lara, A.; Segura, M.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3813.

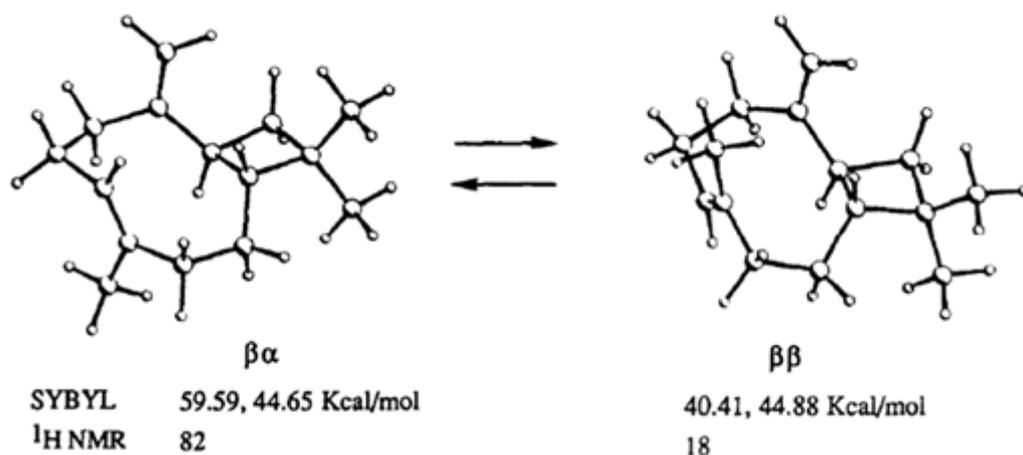


Figura 36. Equilíbrio entre as conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do β -cariofileno e dados da análise conformacional dos isômeros do referido composto [adaptada da ref. 202].

Ainda de acordo com Barrero e colaboradores,²⁰² o espectro de RMN ^1H de alta resolução nas regiões olefínicas evidenciou que na conformação $\beta\alpha$ os hidrogênios do grupo metilênico exocíclico são mais desblindados do que os correspondentes em $\beta\beta$, enquanto o contrário foi observado para H-5 que se apresenta como duplo duplete mais blindado em $\beta\alpha$ e duplete largo mais desblindado em $\beta\beta$. A Figura 37 mostra a comparação entre os dados de RMN ^1H da região diagnóstica dos hidrogênios olefínicos das conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ descritas na literatura²⁰² com a região olefínica do espectro de RMN ^1H do β -cariofileno do presente estudo, onde é possível visualizar uma grande similaridade, inclusive quanto à proporção relativa dos conformêros majoritários.

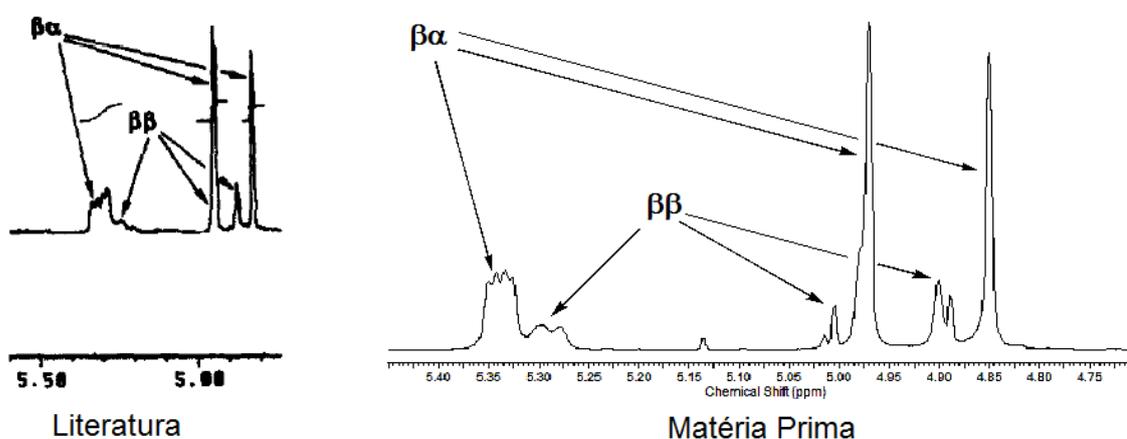


Figura 37. Comparação entre as regiões olefínicas do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da matéria prima e os dados das conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ reportados na literatura (600 MHz, CDCl_3).²⁰²

A despeito do número vasto de investigações teóricas e resultados experimentais relativos às conformações mais estáveis do β -cariofileno, Clericuzio e colaboradores²⁰⁰ conduziram estudos das conformações moleculares do β -cariofileno visando conciliar as interpretações conflitantes ainda existentes. Após os cálculos com duas abordagens diferentes métodos ab initio (6-31G*/HF e MP2) e de densidade funcional (B3LYP/6-31G*) que avaliam as estabilidades termodinâmicas, estes concluíram ser a geometria da conformação $\alpha\alpha$ a mais estável, em conformidade com as medidas de RMN a baixa temperatura. Os autores arrazoam que os dados conflitantes foram devidos a interpretações errôneas dos resultados experimentais ou aos métodos de cálculo empregados (modelo semi empírico AM1) uma vez que estes focaram nas conformações ciclononano desprezando a torção do anel ciclobutano (Figura 38), indispensável na previsão da conformação $\alpha\alpha$ como a geometria de energia mínima.

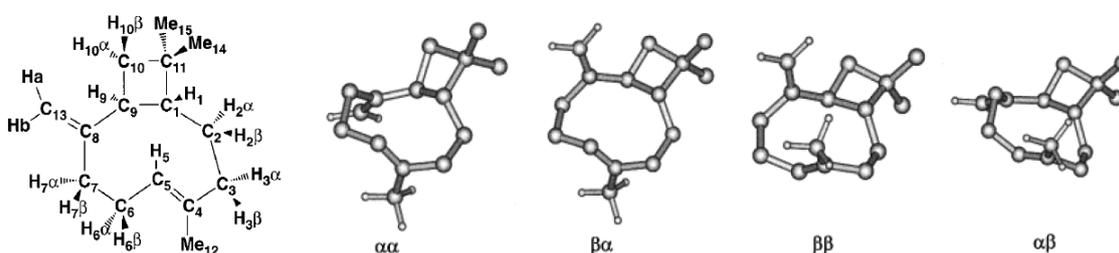


Figura 38. Estruturas do β -cariofileno e das quatro conformações consideradas por Clericuzio e colaboradores (todos os hidrogênios dos anéis e os pertencentes aos C12 e C13 foram removidos).²⁰⁰

As Tabelas 10 e 11 mostram a comparação entre os dados de RMN obtidos (RMN ^1H , página 168 RMN ^{13}C , página 169) do β -cariofileno 98,5% com os relatados na literatura, onde é possível observar a existência de ambos os confôrmeros e a grande similaridade em termos dos valores de deslocamentos e padrão de acoplamento. Adicionalmente, foram registrados os sinais referentes ao óxido de cariofileno, um contaminante do β -cariofileno comercial, também encontrado em menor proporção na fração isolada de *E. dysenterica*.

Tabela 10. Comparação dos dados de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do β-carifoleno 98,5% com dados da literatura.^{200,202,203}

Nº H	β-Carifoleno 98,5% (Sigma-Aldrich)			Dados da literatura				
	β-Carifoleno ^a		Óxido de carifoleno ^b	β-Carifoleno ^c		β-Carifoleno ^d		β-Carifoleno ^e
	βα	ββ		βα	ββ	βα	ββ	
1	1,70-1,64, m	-	1,79-1,75, m	-	-	1,62	1,48	1,65-1,75, m
2'	-	-	-	-	-	1,44	1,57	-
2	1,55-1,43, m	-	-	-	-	1,26	1,35	1,47-1,53, m
3'	-	-	-	-	-	1,83	2,33	1,85-1,95, m
3	2,02-1,97; m	-	-	-	-	1,96	1,36	2,07-2,13, m
5	5,31, dd (<i>J</i> = 9,8, 4,5 Hz)	5,25, d (<i>J</i> = 11 Hz)	2,87, dd (<i>J</i> = 10,6, 4,4 Hz)	5,30, dd (<i>J</i> = 10,3, 4,5 Hz)	5,26, d (<i>J</i> = 12 Hz)	5,56	5,41	5,27-5,34, m
6'	2,18-2,17, m	-	-	-	-	2,19	1,91	1,98-2,04, m
6	2,37-2,30, m	-	-	-	-	1,81	2,3	2,30-2,37, m
7'	1,91, td (<i>J</i> = 12,3, 12,3, 4,8 Hz)	-	-	1,91, dt (<i>J</i> = 11,9, 5,3 Hz)	-	1,54	2,3	1,98-2,04, m
7	2,37-2,30, m	-	-	-	-	2,26	1,69	2,18-2,22, m
9	2,52-2,41, m	-	2,64-2,59, m	-	-	1,87	1,89	2,27-2,33, m
10'	1,70-1,64, m	-	-	-	-	1,62	1,69	1,60-1,70, m
10	2,02-1,97, m	-	-	-	-	1,81	1,65	-
12	1,00, s	0,99, s	-	1,00, s	0,97, s	0,97	0,97	0,97, m
13	0,97, s	0,97-0,96, m	-	0,97, s	0,96, s	1,04	1	1,00, m
14	1,61, s	1,58-1,57, m	-	1,61, d (<i>J</i> = 1,1 Hz)	1,58, s	1,62	1,52	1,61, m
15'	4,82, s	4,97, s (bl)	-	4,82, d (<i>J</i> = 1,7 Hz)	4,87, s (bl)	5,17	5,1	4,82, s (bl)
15	4,94, s	4,87, s (bl)	-	4,94, d (<i>J</i> = 1,7 Hz)	4,94, s (bl)	5,24	5,14	4,94, s (bl)

^aProduto comercial (matéria prima para as modificações químicas).

^bÓxido de carifoleno, contaminante do produto comercial.

^cβ-Carifoleno natural isolado de *J. oxycedrus* (300 MHz, CDCl₃) [ref. 202].

^dDados da análise estatística computacional dos confômeros do β-carifoleno [ref. 200].

^eβ-Carifoleno natural obtido por doação, não informado a fonte (400 MHz, CDCl₃) [ref. 203].

Tabela 11. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do β -carifoleno 98,5% com dados da literatura.^{200,202,203}

Nº C	β -Carifoleno 98,5% (Sigma-Aldrich)			Dados da literatura				
	β -carifoleno ^a		Óxido de cariofileno ^b	β -carifoleno ^c		β -carifoleno ^d		β -carifoleno
B α	$\beta\beta$	B α		$\beta\beta$	B α	$\beta\beta$		
1	53,6	55,9	50,7	53,7	56,0	49,4	48,2	53,6
2	28,4	29,8	29,8	28,4	29,8	28,2	29,5	29,4
3	40,0	34,8	39,8	40,1	34,9	35,7	30,7	39,9
4	135,5	135,0	59,8	135,6	135,1	133,4	135,7	135,2
5	124,3	124,5	63,7	124,4	124,6	125,1	124,2	124,4
6	29,3	31,3	30,2	29,5	31,5	25,4	27,9	28,4
7	34,8	39,8	29,8	34,9	39,9	35,9	37,1	34,9
8	154,7	155,0	151,8	154,8	155,2	151,5	151,9	154,5
9	48,5	49,3	48,7	48,6	49,5	41,9	43,4	48,5
10	40,3	42,6	42,6	40,4	42,7	35,5	37,5	40,4
11	33,0	34,0	-	33,1	33,1	26,8	27,4	32,7
12	22,6	21,6	21,9	22,7	22,0	22,5	21,4	22,6
13	30,1	29,9	29,8	30,2	29,9	28,1	27,9	30,1
14	16,3	17,0	22,0	16,4	16,4	15,8	21,5	16,3
15	111,6	110,8	112,7	111,7	110,9	112,5	112,4	111,7

^aProduto comercial (matéria prima para as modificações químicas).

^bÓxido de carifoleno, contaminante do produto comercial.

^c β -Carifoleno natural isolado de *J. oxycedrus* (75 MHz, CDCl_3) [ref. 202].

^dDados da análise estatística computacional dos confôrmeros do β -carifoleno [ref. 200].

^e β -Carifoleno natural obtido por doação, não informado a fonte (100 MHz, CDCl_3) [ref. 203].

No espectro de RMN ^1H do β -cariofileno 98,5% (página 168) foram observados na região olefínica dois simpletos com deslocamentos químicos em $\delta = 4,82$ e $4,94$ ppm, correspondentes aos hidrogênios H15' e H15 ligados ao grupo metilênico da dupla exocíclica, e em $\delta = 5,31$ ppm um duplo duplete com $J_{\text{H}5-\text{H}6'} = 9,8$ Hz e $J_{\text{H}5-\text{H}6} = 4,5$ Hz, referente a H5 da dupla endocíclica que acopla com ambos H6 vicinais (ressaltados na expansão da Figura 39). Em $\delta = 1,91$ ppm encontra-se um tripleto de duplete corresponde ao H7', devido ao acoplamento vicinal com os hidrogênios H6 e H6', resultando em um tripleto ($J_{\text{H}7'-\text{H}6} = 12,3$ e $J_{\text{H}7'-\text{H}6'} = 12,3$ Hz), e geminal, com o H7 ($J_{\text{H}7-\text{H}7} = 4,8$ Hz) dando um duplete. Nota-se que o hidrogênio H7' está mais blindado em relação ao H7 ($\delta = 2,34$ ppm), possivelmente, por está no cone de proteção da dupla ligação entre os carbonos C8-C15. Este efeito também é observado quando comparados os deslocamentos químicos dos hidrogênios H3 ($\delta = 2,13$ - $2,07$ ppm - desblindado) e H3' ($\delta = 2,02$ - $1,97$ ppm - blindado). O sinal em $\delta = 2,52$ - $2,41$ e $1,70$ - $1,64$ ppm, na forma de dois multipletos, são referentes a H9 e H1, respectivamente, onde a desblindagem de H9 se dá pela presença da dupla exocíclica em C8-C15. Por fim, os sinais em $\delta = 1,61$, $0,99$ e $0,97$ ppm, referentes às três metilas 14, 12 e 13 respectivamente.

²⁰³ Rocha, K.A.S.; Rodrigues, N.V.S.; Kozhevnikov, I.V.; Gusevskaya, E.V.; *Appl. Catal. A-Gen.* **2010**, *374*, 87.

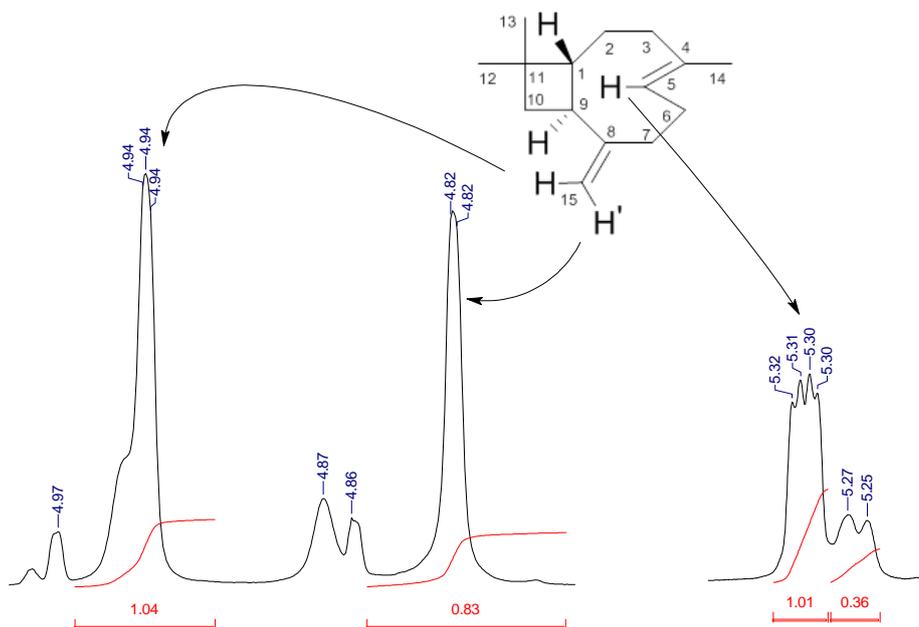


Figura 39. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) na região diagnóstica dos hidrogênios olefínicos.

No espectro de RMN ^{13}C (página 169) os picos com deslocamentos químicos em $\delta = 154,7$, $124,3$, $135,5$ e $111,6$ ppm referem-se aos carbonos C8, C4, C5 e C15, respectivamente, que se encontram desblindados por estarem diretamente conectados às ligações duplas endocíclica (C4-C5) e exocíclica (C8-C15). Em relação aos carbonos C8 e C4, ambos quaternários, observa-se que C4 encontra-se um pouco mais blindado devido ao efeito indutivo positivo ocasionado pela metila sobre C4. O sinal em $\delta = 48,5$ e $53,6$ ppm são referentes a C9 e C1, respectivamente, já os sinais em $\delta = 30,1$, $22,6$ e $16,3$ ppm referem-se às três metilas 13, 12 e 14, respectivamente. A Figura 40 mostra uma expansão do espectro de RMN ^{13}C na região diagnóstica dos carbonos olefínicos, evidenciando as conformeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$.

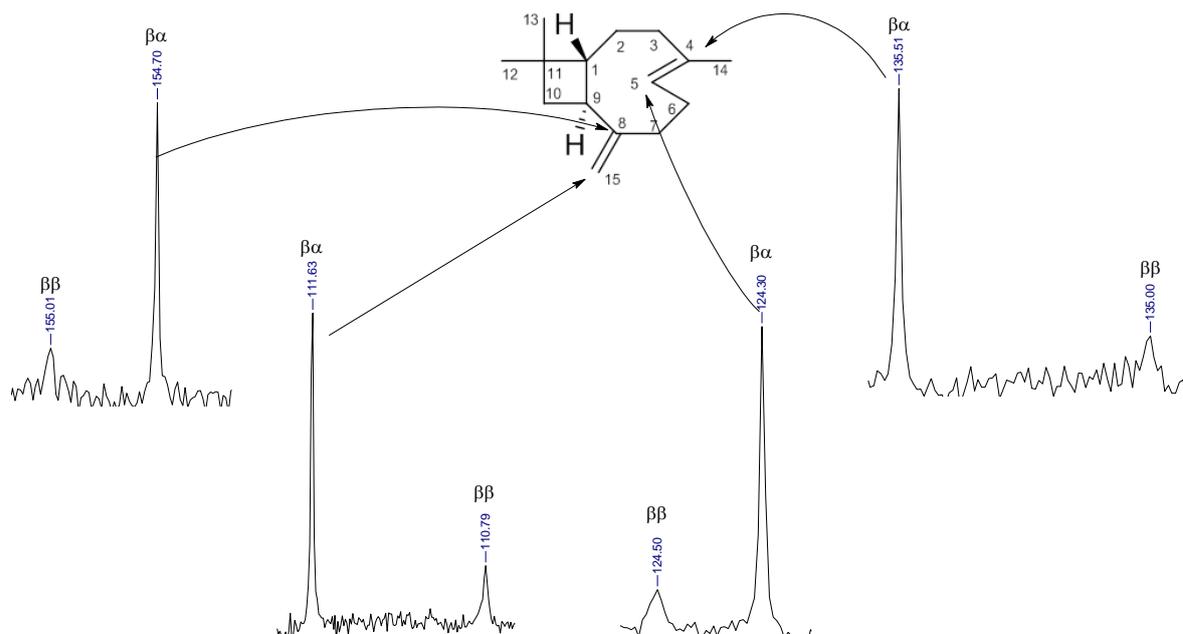


Figura 40. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) na região diagnóstica dos carbonos olefínicos.

O espectro de massa (página 165) do β -cariofileno 98,5% apresentou um pico de íon molecular com m/z 204 $[\text{M}]^{+\bullet}$, um pico com m/z 189 $[\text{M}^{+\bullet} - \text{CH}_3]$, devido à eliminação do grupo metila (C14) formando um carbocátion terciário. Partindo deste, novas fragmentações são observadas, como o sinal de $m/z = 147$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}^{+\bullet}$), que pode ser originado através da clivagem das ligações C2-C3 e C5-C6, eliminando uma molécula neutra, propano (C_3H_6 de $m/z = 42$) ou o fragmento com $m/z = 133$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}^{+\bullet}$) por eliminação de um fragmento neutro, isobutileno (C_4H_8 , $m/z = 56$). A Figura 41 mostra o espectro de massas do β -cariofileno e uma proposta parcial de fragmentação.

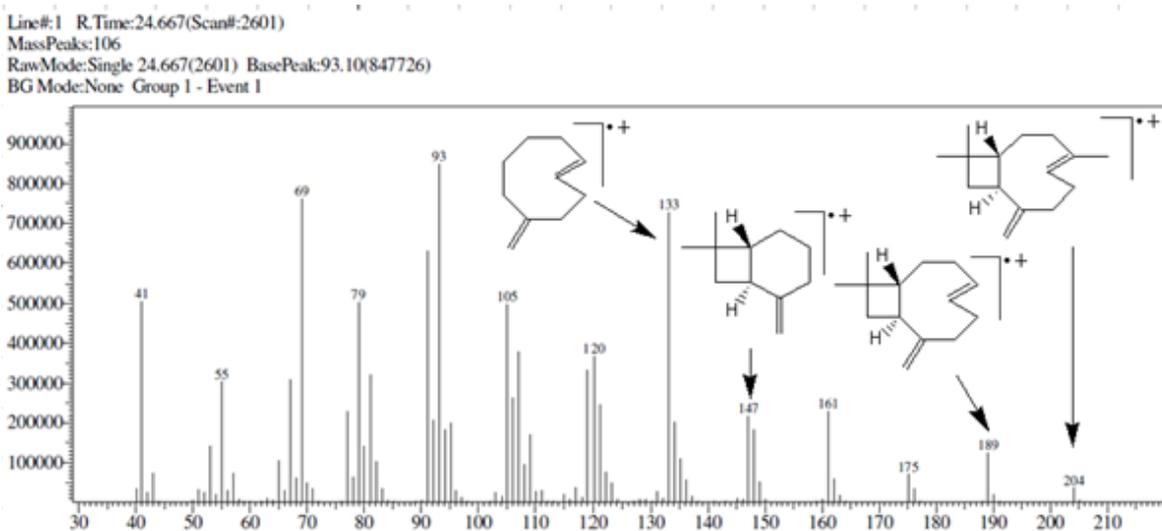


Figura 41. Espectro de massas do β -cariofileno e proposta estrutural para alguns fragmentos.

Os dados espectrométricos descritos para o β -cariofileno 98,5%, além de servirem para certificação da matéria-prima, foram de grande utilidade na caracterização dos produtos gerados a partir das modificações químicas descritas na próxima seção.

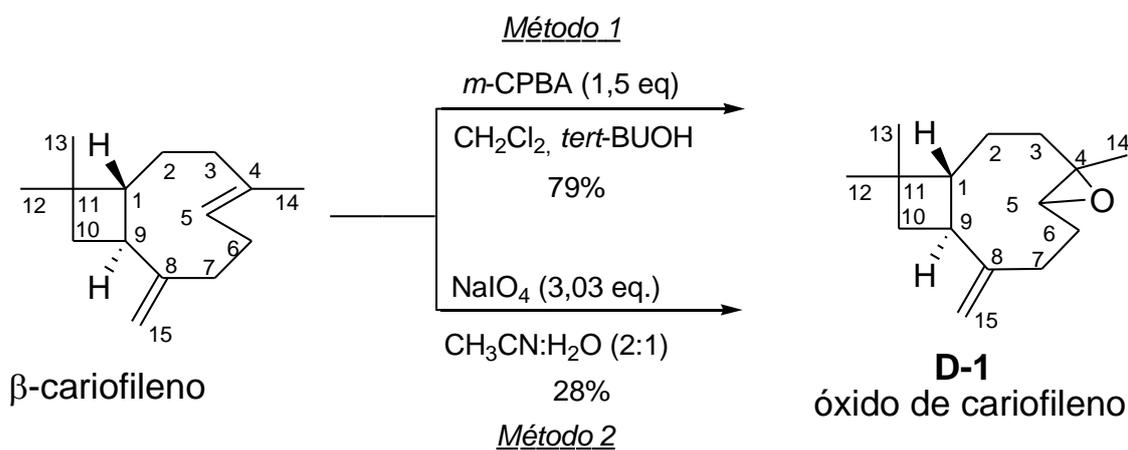
4.5. Preparação dos derivados do β -cariofileno

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa agregação de valor a substâncias encontradas em abundância em fontes naturais, o β -cariofileno constituinte de maior percentual nos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* foi eleito para realização de modificações químicas objetivando a descoberta de derivados com possíveis atividades biológicas, em especial, atividade acaricida. Desta forma, empregou-se alguns procedimentos sintéticos clássicos (epoxidação; dihidroxilação; acetilação e ozonólise) para obtenção de cinco derivados (**D-1** a **D-5**) do β -cariofileno, conforme descrito a seguir.

4.5.1. Preparação do óxido de cariofileno (**D-1**)

Para obtenção do **D-1**, conhecido como óxido de cariofileno, foram testadas duas variantes de metodologias clássicas de epoxidação: reação com ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) e álcool *tert*-butílico em diclorometano (**Método 1**) e reação com periodato de sódio em acetonitrila-água (**Método 2**). As reações foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação convencional e, após elaboração usual seguida de purificação por cromatografia recheada com

sílica gel 60 (hexano:AcOEt 7:3), o produto esperado foi obtido na forma de um óleo levemente amarelado com 79% de rendimento pelo **Método 1**, e apenas 28% quando usado o **Método 2** (Esquema 6). O acompanhamento do progresso de ambas as reações foi feito por CCD (hexano:AcOEt 7:3). No caso da reação com *m*-CPBA, verificou-se que a reação ocorreu de forma lenta, pois ao final de 10 h de reação a matéria-prima ainda não havia sido totalmente consumida. A evidência preliminar da formação do produto esperado foi o aparecimento de uma mancha roxa (vanilina sulfúrica) com $R_f = 0,55$, menor do que o R_f da matéria-prima ($R_f = 0,70$), significando um aumento na polaridade devido à introdução do átomo de oxigênio.



Esquema 6. Epoxidação do β -cariofileno por duas variantes de metodologias clássicas.

A comprovação da formação de **D-1** foi realizada através das técnicas espectroscópicas (CG-EM, IV e RMN ¹H e ¹³C) e a análise por CG mostrou um constituinte predominante com área relativa maior que 89%. Os dados espectrométricos evidenciam que a epoxidação ocorreu apenas na dupla endocíclica e a existência vários sinais duplicados com diferentes intensidades. Esta última observação sugere que a presença dos dois confômeros na matéria possibilitou o ataque do agente oxidante e a inserção do oxigênio em ambas as faces da dupla ligação, gerando uma mistura diastereoisomérica de epóxidos, designados por $\beta\alpha$ e $\beta\beta$, em analogia a denominação de Barrero e colaboradores²⁰⁹ que ao realizarem procedimento semelhante observaram a formação de dois epóxidos diastereoméricos. De acordo com os pesquisadores, a oxidação da conformação $\beta\alpha$ gerou o $\beta\alpha$ -epóxido e da $\beta\beta$ gerou o $\beta\beta$ -epóxido com a razão $\beta\alpha/\beta\beta$ (81%/19%), diretamente proporcional às conformações de partida. Neste estudo também observamos algo semelhante na mistura formada, onde o epóxido $\beta\alpha$ apresentou teor proporcional ao confômero majoritário existente no β -cariofileno de partida.

Como veremos adiante, os dados de IV, RMN ¹H e CG-EM das amostras de **D-1** provenientes do **Método 1** e **2** utilizados para epoxidação β -cariofileno exibiram grande

similaridade (páginas 172 a 178), não sendo possível a comparação dos espectros de RMN ^{13}C , devido a quantidade insuficiente de amostra de **D-1** (**Método 2**) para análise por esta técnica. Assim, discutiremos nesta seção especialmente os dados do **D-1** obtido pelo **Método 1**.

Os espectros de IV de **D-1** (página 172 e 176) mostram que ambos possuem uma banda em 1627 cm^{-1} referente à deformação axial C=C da ligação dupla evidenciando a manutenção da exocíclica. O grupo epóxido foi caracterizado pela presença da banda dupla em 1383 cm^{-1} , relativa ao estiramento axial do grupo C-O-C, e a banda de deformação axial simétrica de C-O-C em 1071 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H de **D-1** (página 173 e 177) evidencia um duplete de duplete em $\delta = 2,87$ ppm correspondente ao hidrogênio H5 acoplado com H6 e H6' ($J_{\text{H5-H6}'} = 10,5$ e $J_{\text{H5-H6}} = 4,2$ Hz), diferenciadas em função dos ângulos de torção entre os átomos de hidrogênio. O hidrogênio H6 absorveu em $\delta = 2,25$ ppm como um duplo duplete de triplete, onde o acoplamento vicinal com H7 e H7' gera um triplete ($J_{\text{H6-H7}} = 8,3$ e $J_{\text{H6-H7}'} = 8,3\text{ Hz}$) e os acoplamentos geminal com H6' ($J_{\text{H6-H6}'} = 4,3\text{ Hz}$) e vicinal com H5 ($J_{\text{H6-H5}} = 12,5$ Hz) gerou um duplo duplete. (Figura 42). Na Figura 42 também se evidencia a existência de dois isômeros, em conformidade com o descrito na literatura.^{199,200} Neste espectro são encontrados ainda dois simpletos com deslocamentos químicos em $\delta = 4,98$ e $4,86$ ppm, correspondentes aos hidrogênios H15 e H15' da olefina exometilênica, respectivamente, confirmando que a epoxidação ocorreu na dupla endocíclica. O hidrogênio H9 apresenta-se como um pseudo-quarteto (quarteto aparente) em $\delta = 2,61$ ppm devido a acoplar com H1, H10' e H10 ($J_{\text{H9-H1}} = 8,80$, $J_{\text{H9-H10}} = 9,90$ e $J_{\text{H9-H10}'} = 18,34$ Hz), sendo por isso assinalado como um multiplete. Os três simpletos com deslocamentos químicos em $\delta = 0,99$, $1,01$ e $1,20$ ppm correspondem aos sinais das metilas 12, 13 e 14, respectivamente. A Figura 42 mostra uma expansão do espectro de RMN de ^1H na região diagnóstica de **D-1**, evidenciando os sinais dos hidrogênios H5, H6, H7, H7', H3 e H9 bem como a existência de dois isômeros, em conformidade com o descrito na literatura.

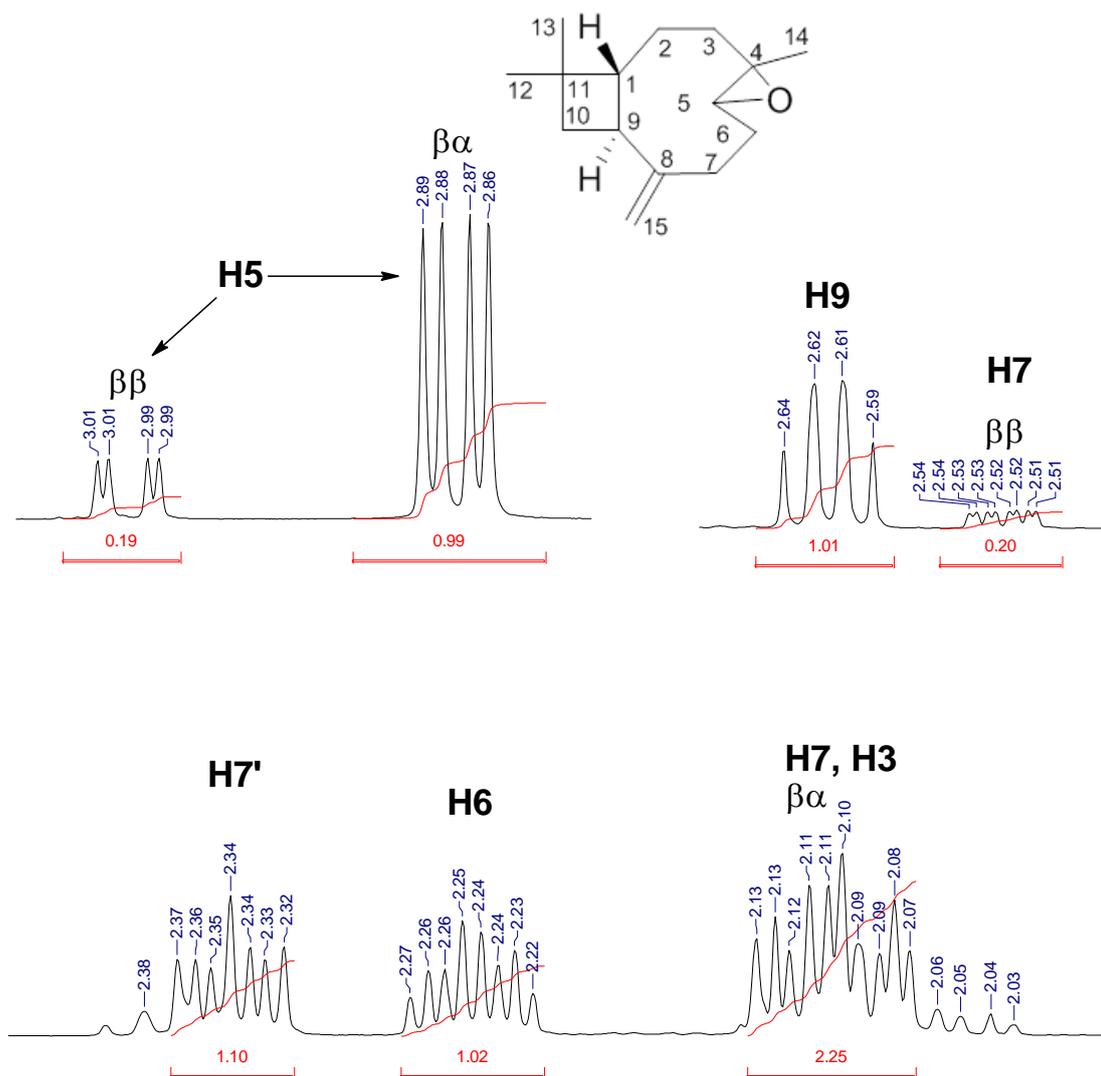


Figura 42. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) na região diagnóstica de **D-1**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **D-1** (página 174) os deslocamentos químicos observados para os carbonos C4 ($\delta = 59,8$ ppm) e C5 ($\delta = 63,7$ ppm) confirmam a ligação destes ao átomo de oxigênio (anel oxirano). Os sinais com deslocamentos químicos em $\delta = 151,9$ e $112,8$ ppm correspondem aos carbonos C8 e C15, respectivamente, evidenciando que a dupla ligação foi preservada. Os sinais com deslocamentos químicos em $\delta = 50,8$, $48,8$ e $34,0$ ppm foram atribuídos aos carbonos metínicos C1 e C9 e ao carbono quaternário C11, respectivamente. Os carbonos metilênicos C2, C3, C6, C7 e C10 apresentaram deslocamentos químicos em $\delta = 27,2$, $39,2$, $30,2$, $29,9$ e $39,8$ ppm, respectivamente. As metilas C12, C13 e C14 apresentaram deslocamentos químicos em $\delta = 21,6$, $29,8$ e $17,0$ ppm, respectivamente.

As tabelas abaixo correlacionam os dados de RMN de ^1H (Tabela 12) e ^{13}C (Tabela 13) de **D-1**, com os dados da literatura para os isômeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$. Os dados de **D-1** evidenciam a existência de dois isômeros e, conforme ressaltado acima, nomeados de $\beta\alpha$ - e $\beta\beta$ -óxido de cariofileno, em analogia a literatura.

Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de **D-1** (isômeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$) com os dados encontrados na literatura para óxido de cariofileno.^{202,204,205}

Nº H	Dados do derivado 1 (D-1)				Dados da literatura			
	Óxido de cariofileno ^a		Óxido de cariofileno ^b		Óxido de cariofileno ^c		Óxido de cariofileno ^d	Óxido de cariofileno
	$\beta\alpha$	$\beta\beta$	$\beta\alpha$	$\beta\beta$	$\beta\alpha$	$\beta\beta$		
1	1,81-1,73, m	-	1,79-1,72, m	-	1,74, t, bl	-	1,77, t ($J = 9,8$ Hz)	1,73, t ($J = 9,8$ Hz)
2'	1,46-1,39, m	-	1,49-1,25, m	-	-	-	1,45, m	1,38 - 1,41, m
2	1,72-1,65, m	-	1,69-1,55, m	-	-	-	1,67, m	1,58 - 1,61, m
3'	0,97-0,94, m	-	0,95-0,89, m	-	-	-	0,97, ddd ($J = 13,2, 5, 5$ Hz)	0,95, m
3	2,10, ddt ($J = 16,3, 12,6, 3,9, 3,9$ Hz)	-	2,15-2,04, m	-	-	-	2,10, ddd ($J = 13,2, 5, 5$ Hz)	2,04 - 2,11, m
5	2,87, dd ($J = 10,5, 4,2$ Hz)	2,99, dd ($J = 11,3, 2,6$ Hz)	2,90-2,83, m	-	1,86, dd	2,98, dd	2,88, dd ($J = 10,6, 4,2$ Hz)	2,85, dd ($J = 10,7, 4,2$ Hz)
6'	1,38-1,30, m	-	1,49-1,25, m	-	-	-	1,32, m	1,25 - 1,33, m
6	2,25, ddt ($J = 12,5, 8,3, 4,3, 4,3$ Hz)	-	2,39-2,20, m	-	-	-	2,24, m	2,20 - 2,24, m
7'	2,34, ddd ($J = 12,9, 8,2, 4,6$ Hz)	-	2,39-2,20, m	-	-	-	2,34, m	2,28 - 2,32, m
7	2,10, ddt ($J = 16,3, 12,6, 3,9, 3,9$ Hz)	2,52, ddd ($J = 12,8, 2,2, 2,6$ Hz)	2,15-2,04, m	-	-	2,50, ddd	2,10, m	2,04 - 2,11, m
9	2,64-2,59, m	-	2,66-2,58, m	-	2,58, ddd	-	2,62, q ($J = 9,3$ Hz)	2,58, q ($J = 9,5$ Hz)
10'	1,72-1,65, m	1,84, dd ($J = 8,0, 2,6$ Hz)	1,69-1,55, m	-	1,67, dd	1,84, dd	1,65, m	1,58 - 1,61, m
10	-	-	1,69-1,55, m	-	1,59, t	-	1,69, m	1,62 - 1,67, m
12	1,01, s	0,96, s	1,00, m	0,91, s, bl	1,00, s	1,00, s	1,08, s	0,97, s
13	0,99, s	0,97, s	0,99, s	0,97, s, bl	0,98, s	0,96, s	0,99, s	0,95, s
14	1,20, s	1,25, s	1,20, s	1,18, s	1,20, s	1,26, s	1,20, s	1,17, s
15'	4,86, s	4,98, s	4,85, s	4,84, s, bl	4,84, d	4,97, s	4,86, s	4,83, s
15	4,98, s	5,10, s	4,97, s	4,96, s, bl	4,95, d	5,09, s	4,98, s	4,95, s

^aÓxido de cariofileno preparado pelo **Método 1**.

^cÓxido de cariofileno natural isolado de *J. oxycedrus* (300 MHz, CDCl_3) [ref. 202].

^eÓxido de cariofileno isolado de *Piper marginatum* Jacq. (500 MHz, CDCl_3) [ref. 205].

^bÓxido de cariofileno preparado pelo **Método 2**.

^dÓxido de cariofileno isolado de *S. palmensis* (500 MHz, CDCl_3) [ref. 204].

Tabela 13. Comparação dos dados de RMN ^{13}C de **D-1** (isômeros $\beta\alpha$ e $\beta\beta$) com os dados encontrados na literatura para óxido de cariofileno.^{202, 204,205}

Nº C	Dados do derivado 1 (D-1)		Dados da literatura			
	Óxido de cariofileno ^a		Óxido de cariofileno ^b		Óxido de cariofileno ^c	Óxido de cariofileno ^d
	$\beta\alpha$	$\beta\beta$	$\beta\alpha$	$\beta\beta$		
1	50,8	53,9	50,8	54	50,7	50,6
2	27,2	27,7	27,3	27,8	27,1	27,2
3	39,2	36,3	39,3	36,4	39,1	39,2
4	59,8	60,9	59,9	61	59,8	59,9
5	63,7	61,0	63,8	61,1	63,7	63,8
6	30,2	29,6	30,3	30,3	30,1	29,9
7	29,8	36,6	29,9	36,7	29,7	29,7
8	151,9	-	151,9	152,8	151,8	151,9
9	48,8	47,1	48,8	47,2	48,7	48,8
10	39,8	42,3	39,9	42,4	39,7	39,8
11	34,0	33,0	34,1	33,1	33,9	34,1
12	21,6	21,7	21,7	21,7	21,5	21,7
13	29,9	29,9	30	30	29,8	29,8
14	17,0	22,6	17,1	22,7	16,9	17
15	112,8	112,1	112,9	112,3	112,7	112,8

^aÓxido de cariofileno preparado pelo **Método 1**.

^bÓxido de cariofileno natural isolado de *J. oxycedrus* (75 MHz, CDCl₃) [ref. 202].

^cÓxido de cariofileno isolado de *S. palmensis* (100 MHz, CDCl₃) [ref. 204].

^dÓxido de cariofileno isolado de *Piper marginatum* Jacq. (50 MHz, CDCl₃) [ref. 205].

D-1 apresentou pureza maior que 90% (CG) e sua identidade foi confirmada por CG-EM. A análise dos espectros de massa de **D-1** (páginas 175 e 178) evidenciou, independente do método de obtenção da amostra, a presença do íon molecular $[\text{M}]^{+\bullet}$ com m/z 220, correspondendo a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$. A formação do fragmento com $m/z = 205$ $[\text{M}^{+\bullet} - \text{CH}_3]$ deveu-se à perda da metila ligada ao carbono C4 (na posição β ao heteroátomo), formando um carbocátion terciário. Partindo do íon/radical $m/z = 205$, outra possível fragmentação pode ocorrer com a clivagem do ciclo butano com eliminação do isobutileno (neutro) de $m/z = 56$ com formação do íon/radical de $m/z = 149$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}^{+\bullet}$). A Figura 43 apresenta o espectro de massa de **D-1** (óxido de cariofileno) e descreve uma proposição estrutural para os fragmentos gerados nas clivagens iniciais.

²⁰⁴ Reina, M.; Nold, M.; Santana, O.; Orihuela, J.C.; González-Coloma, A; *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 448.

²⁰⁵ Chaves, M.C.O.; Santos, B.V.O; *Fitoterapia* **2002**, 73, 547.

Line#:1 R.Time:31.850(Scan#:3463)
 MassPeaks:144
 RawMode:Averaged 31.842-31.858(3462-3464) BasePeak:79.05(1559062)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

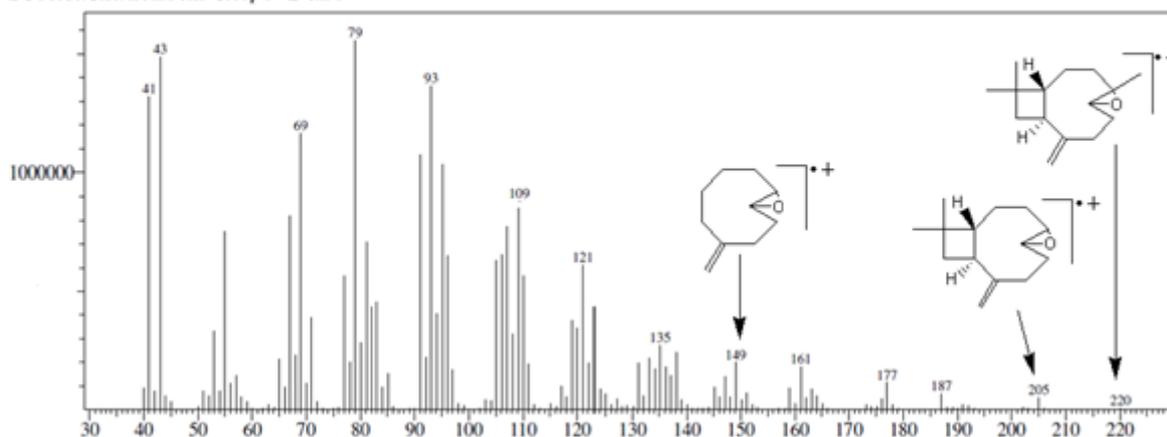


Figura 43. Espectro de massas do D-1 e proposta estrutural para alguns fragmentos.

4.5.2. Preparação do derivado 2 (D-2)

Na preparação de dióis vicinais do β -cariofileno, optou-se pela reação de di-hidroilação assimétrica de Sharpless,²⁰⁶ empregando metodologia que vem sendo explorada atualmente no nosso grupo de pesquisa. De forma geral, a di-hidroilação enantioselectiva de dióis vicinais *cis* na(s) olefina(s) é promovida pelo uso de tetróxido de ósmio presente em misturas reacionais conhecidas como “AD-mix” (Asymmetric Dihydroxylation mixtures), que atuam como catalisadores assimétricos e cuja formulação comercial é:

- i) um ligante quiral que pode ser o (DHQD)₂PHAL, um aduto ftalazina-diidroquinina presente no AD-mix- α , ou o (DHQD)₂PHAL, um aduto ftalazina-diidroquinidina presente no AD-mix- β (Figura 44);

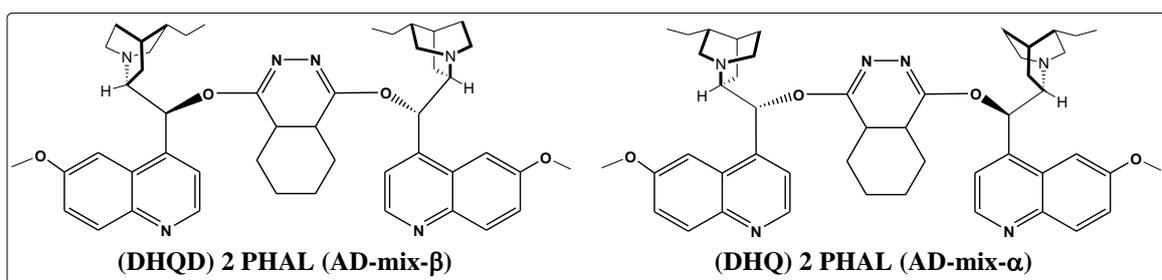


Figura 44. Estrutura química dos ligantes quirais presentes no β e α -Ad-mix [adaptado ref. 206].

²⁰⁶ Sharpless, K.B.; Amberg, W.; Bennani, Y.L.; Crispino, G.A.; Hartung, J.; Jeong, K.S.; Kwong, H.L.; Morikawa, K.; Wang, Z.M.; Xu, D.; Zhang, X.L.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768.

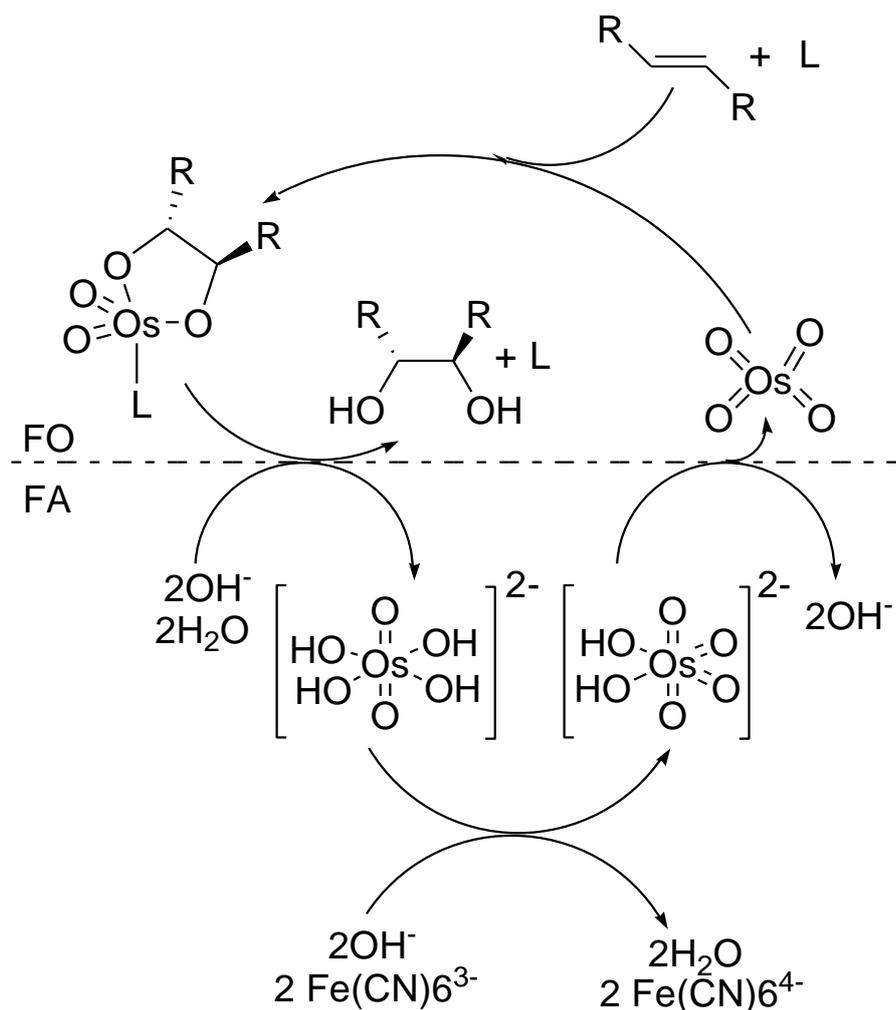
ii) carbonato de potássio, utilizado como aditivo para acelerar a reação de hidrólise do osmato, em substituição a este pode ser utilizado o metilsulfonamida;

iii) ferrocianato de potássio, utilizado como agente reoxidante;

iv) osmiato de potássio di-hidratado (catalisador), uma fonte não volátil de tetróxido de ósmio.

Este modelo de reação tem uma condução muito facilitada, pois todos os reagentes utilizados são sólidos, ambos (osmiato e ligante quirais) são usados em quantidades catalíticas e o meio é bifásico (orgânico e água). Em relação aos resultados, a configuração absoluta do diol é previsível e os rendimentos considerados ótimos, até mesmo quanto à proporcionalidade de excesso enantiomérico.

Do ponto de vista do mecanismo, nesta versão assimétrica de di-hidroxilação a osmiação ocorre totalmente na fase orgânica, onde também transcorre a hidrólise do éster monoglicolado de ósmio (IV) e a liberação do íon ósmio (IV) para a fase aquosa, que se reoxida para um novo ciclo, ficando o diol formado e o ligante quiral na fase orgânica. A etapa de indução assimétrica ainda é controversa e dois caminhos prováveis são propostos: um envolvendo uma cicloadição [2+2], com posterior expansão do metalociclo, e o outro via cicloadição [3+2] concertada. A hipótese de que ambos os mecanismos operem conjuntamente na indução assimétrica também tem sido ventilada (Figura 45).



Legenda: L = ligante quiral; R = substituintes do alceno; FO = fase orgânica; FA = fase aquosa;

Figura 45. Ciclo catalítico da di-hidroxição com AD-mix [adaptado da ref. 207].

A configuração do produto pode ser predita com base em modelo minemônico, pelo qual a seletividade enantiofacial da reação é resultante da existência de diferentes barreiras estéreas em cada face. Considerando que neste modelo o quadrante nordeste (NW) da olefina se encontra relativamente mais livre (substituinte pequeno), o quadrante sudeste (SW) torna-se uma área especialmente atraente para acomodar substituintes aromáticos ou, na ausência destes, grupos alifáticos volumosos. Uma olefina posicionada de acordo com estas restrições será atacada na face superior (face β), no caso de derivados com ligante dihidroquinidina (DHQD), ou na face inferior (face α), em se tratando de derivados com ligante dihidroquinina (DHQ), Figura 46 (esquerda). A configuração estrutural de um éster monoglicolado de osmium (IV) é mostrada na Figura 46 (direita) onde se observa que o setor noroeste (NW) da olefina encontra-se mais livre

²⁰⁷ Kolb, H.C.; VanNieuwenhze, M.S.; Sharpless, K.B.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.

(menos substituído) e o setor sudoeste (SW) passa a ser uma região com grande atratividade em acomodar grupos volumosos (ex.: grupos aromáticos). Portanto, um composto olefínico que obedeça estas restrições terá sua face superior (face β) atacada, por exemplo, pelo ligante DHQD (dihidroquinidina), e em sua face inferior (face α), pelo ligante DHQ (diidroquinina).

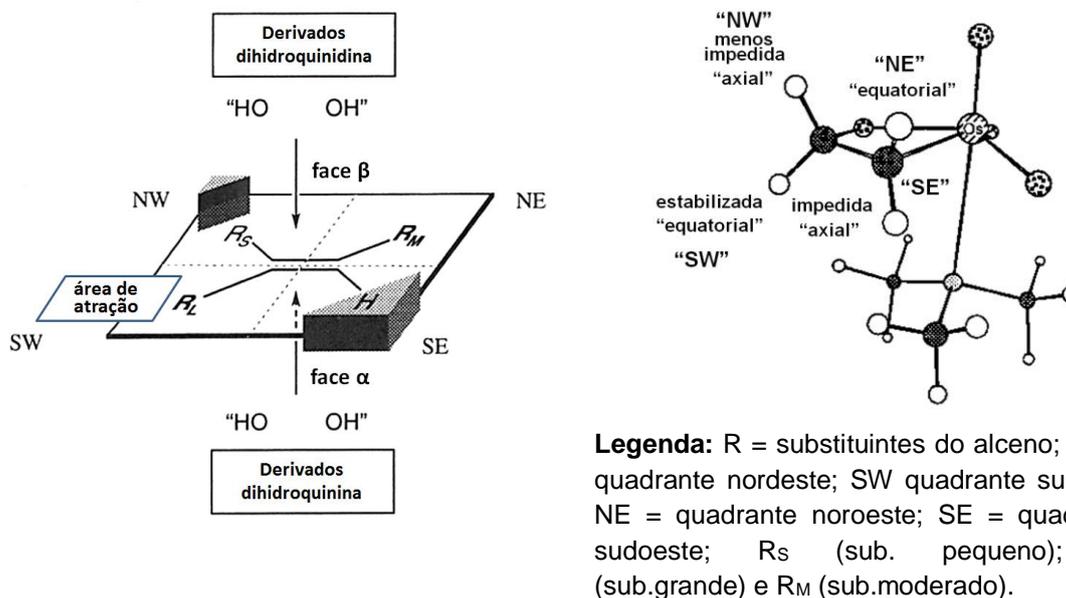
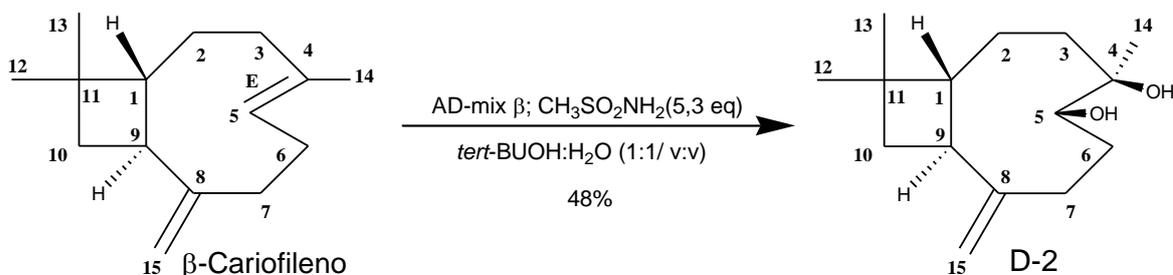


Figura 46. Modelo minemônico para a seletividade enantiofacial (esquerda) e configuração estrutural de um éster monoglicolado de osmium (direita), [adaptado da ref. 207].

Para se obter o **D-2** conduziu-se a reação do β -cariofileno com AD-mix- β (ligante (DHQD)2PHAL) em uma solução de álcool *t*-butílico/H₂O (1:1), sob agitação a temperatura ambiente (Esquema 7). Verificou-se que a reação ocorreu de forma lenta, onde ao final de 7 dias a matéria-prima ainda não havia sido totalmente consumida. O acompanhamento por CCD (hexano:AcOEt 6:4), revelou o aparecimento de uma mancha de coloração rosa, quando em contato com vanilina sulfúrica com R_f = 0,47, muito menor do que o R_f da matéria-prima utilizada (R_f = 0,65), podendo isto ser explicado pelo aumento de polaridade resultante da introdução dos dois grupos hidroxilas. Depois de elaboração usual, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna (silicagel, gradiente hexano \rightarrow AcOEt), sendo obtido um óleo levemente amarelado com rendimento de 48%, caracterizado como o 4,5-dihidróxi-cariofil-8(15)-eno (4,11,11-trimetil-8-etilenobicyclo[7.2.0]undecano-4,5-diol).



Esquema 7. Formação de **D-2** via de di-hidroilação de Sharpless.

O espectro de IV de **D-2** (página 179) possibilitou observar o aparecimento de uma banda intensa em 3406 cm^{-1} que se refere ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas. De forma geral, os espectros os de RMN ^1H e ^{13}C (páginas 180 e 181) de **D-2** ficaram bem homogêneos, sugerindo a pureza do produto, e apresentaram grande semelhança com os dados descritos na literatura para o $4\alpha,5\beta$ -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno.^{208,209}

No espectro de RMN ^1H de **D-2** foi observado a formação do produto de di-hidroilação *cis* na dupla ligação endocíclica (C4-C5), evidenciado pelo desaparecimento do sinal em $\delta = 5,31$ ppm, duplo duplete referente ao H5 do β -cariofileno, e o surgimento de um tripleto com deslocamento químico em $\delta = 3,59$ ppm correspondente ao H5 carbinólico. Por outro lado, foi observado a manutenção dos sinais com deslocamento químico de $\delta = 4,94$ e $4,92$ ppm, que se referem aos hidrogênios 15' e 15, respectivamente, evidenciando que não houve reação na dupla exocíclica (C8-C15), fato que pode ser explicado com base na menor reatividade da dupla terminal devido a uma possível combinação de efeitos eletrostáticos e conformacionais, ou seja, a conformação molecular adotada pela matéria prima deixou estes carbonos estericamente impedidos. O multiplete em $\delta = 2,39$ - $2,35$ ppm foi atribuído ao H9, seu aspecto de um “falso-quarteto” (com padrão $\sim 1:2:2:1$) resulta possivelmente da sobreposição de sinais decorrentes dos acoplamentos H9-H10' (duplete) e H9-H10 (duplete), pois estes apresentam ângulos de torção diferentes, e do acoplamento com o H1 (duplete). Em torno dessa região sobressai-se o aparecimento de dois sinais na forma simpletos largos com deslocamentos químicos em $\delta = 2,24$ e $2,47$ ppm (Figura 47), referentes as duas hidroxilas confirmam a dihidroilação da matéria-prima, onde a hidroxila mais blindada possivelmente refere-se a C4 quaternário por causa do efeito indutivo positivo decorrente da proximidade com a metila (C14). O sinal em $\delta = 2,43$ ppm, que aparece como um duplo duplete de duplete (ddd), foi atribuído ao H7 que acopla simultaneamente com H7' ($J_{\text{H7-H7}'} = 4,4 \text{ Hz}$), H6' ($J_{\text{H7-H6}'} = 14,0 \text{ Hz}$) e H6 ($J_{\text{H7-H6}} = 9,4 \text{ Hz}$), originando três dupletos. Já para o hidrogênio H7', foi atribuído o sinal em $\delta = 2,07$ ppm com formato de um duplo duplete de tripleto, por este acoplar geminal com H7 ($J_{\text{H7'-H7}} = 3,3 \text{ Hz}$) dando um dos dupletos, um tripleto relativo ao acoplamento com H6/H6' ($J_{\text{H7'-H6}} = 8,4 \text{ Hz}$) e o outro duplete possivelmente devido ao

²⁰⁸ Collado, I, G.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B.; Macias-Sanchez, A.J.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1965.

²⁰⁹ Lee, K.H.; Choi, S.U.; Lee, K.R.; *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 280.

acoplamento a longa distância com H5 ($J_{H7-H5} = 12,9$ Hz). Uma possível explicação para os deslocamentos químicos diferenciados entre H7' e H7, é o fato de H7' estar no cone de proteção da dupla ligação C8-C15 (blindado) e H7 no cone desproteção (desblindado). Ainda foram observados os três simpletos com deslocamento químico em $\delta = 1,00, 0,98, 1,14$ ppm, atribuídos aos hidrogênios das metilas 12, 13 e 14, respectivamente.

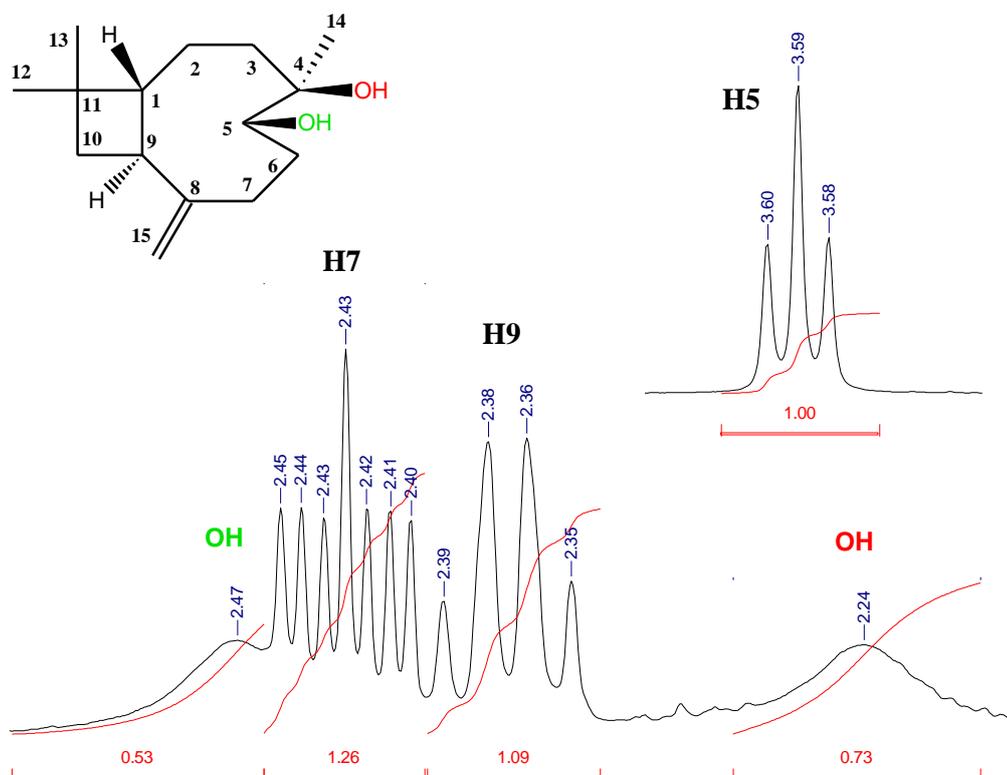


Figura 47. Ampliação da região diagnóstica do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de **D-2**, com destaque para as duas hidroxilas.

No RMN ^{13}C e DEPT (páginas 181 e 182) verificou-se o aparecimento de dois sinais em $\delta = 73,3$ e $75,1$ ppm, atribuídos, respectivamente, aos carbonos ligados às hidroxilas C5 e C4, que caracterizam a formação do **D-2**. Os sinais com deslocamentos químicos em $\delta = 110,4$ e $151,8$ ppm foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C15 e C8, confirmando a manutenção da dupla ligação exocíclica. A análise do espectro de HSQC (página 183), com auxílio do espectro de HMBC (página 184) permitiu confirmar o assinalamento inequívoco dos carbonos metilênicos (C2, C3, C6, C7 e C10) e dos hidrogênios correlacionados (H2, H2', H3, H3', H6, H6', H7, H7', H10 e H10'), como evidenciado na ampliação mostrada na Figura 48.

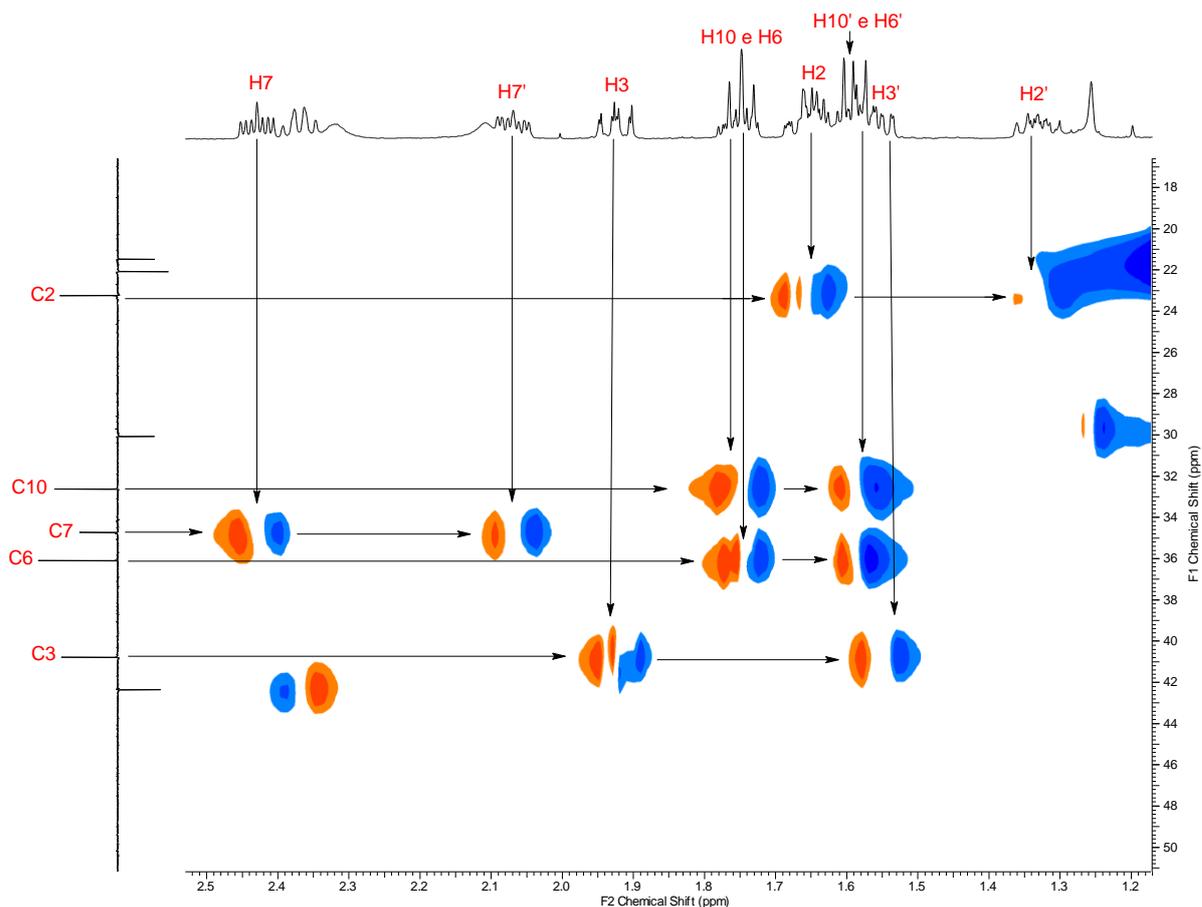


Figura 48. Ampliação do espectro de HSQC (RMN ^1H em 600 MHz, DEPT em 135 MHz, CDCl_3) de **D-2** na região dos grupos metilênicos.

Na Tabela 14 são apresentados os dados de deslocamentos químicos e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado **2**, comparados com os dados descritos na literatura para o $4\alpha,5\beta$ -dihidróxi-cariofil-8(15)-eno.^{208,209}

Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) assinalados para **D-2** com dados da literatura para o 4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno.^{208,209}

N	Derivado 2 (D-2) ^a		4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno ^b		4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno ^c	
	δ_{H} ppm, mult. (J)	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult. (J)	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm, mult. (J)	δ_{C} ppm
1	1,69-1,62, m	57,0	1,62, ddd (J = 10,0, 10,0, 3,2 Hz)	57,0	1,78, t (J = 10,0 Hz)	49,6
2'	1,36-1,30, m	-	1,31, m	-	1,45, t (J = 13,0 Hz)	-
2	1,69-1,62, m	23,2	1,67, m	23,2	2,12, tt (J = 13,0, 5,0 Hz)	29,9
3'	1,53-1,61, m	-	1,53, dd (J = 8,0, 15,0 Hz)	-	1,15, m	-
3	1,95-1,90, m	40,8	1,91, ddd (J = 15,0, 11,3, 1,5 Hz)	40,8	1,62-1,73, m	30,1
4	-	75,1	-	75,1	-	80,8
5	3,59, t (J = 5,5 Hz)	73,3	3,57, t (J = 5,3, 5,3 Hz)	73,3	2,89, dd (J = 10,0, 3,5 Hz)	85,4
6'	1,61-1,53, m	-	1,60, m	-	1,32, m	-
6	1,78-1,72, m	36,1	1,72, m	36,1	2,26, ddd (J = 13,0, 8,0, 5,0 Hz)	31,5
7'	2,07, ddt (J = 3,3, 8,4, 8,4, 12,9 Hz)	-	2,05, ddd (J = 13,2, 3,6, 8,9 Hz)	-	2,12, t (J = 13,0, 5,0 Hz)	-
7	2,43, ddd (J = 14,0, 9,4, 4,4 Hz)	34,7	2,41, ddd (J = 13,2, 4,4, 9,2 Hz)	34,7	2,36, td (J = 8,0, 5,0 Hz)	36,4
8	-	151,8	-	151,8	-	140,3
9	2,37 (q, 1 H, J = 9,57 Hz)	42,3	2,35, q (J = 10,0, 10,0, 10,0 Hz)	42,3	2,63, dd (J = 18,0, 10,0 Hz)	46
10'	1,61-1,53, m	-	1,58, dd (J = 10,4, 8,0 Hz)	-	1,62-1,73, m	-
10	1,78-1,72, m	32,5	1,73, t (J = 10,4, 10,4 Hz)	32,6	-	13,3
11	-	34,1	-	34,1	-	34,8
12	1,00, s	30,0	0,98, s	30,1	1,03, s	21,3
13	0,98, s	22,0	0,96, s	22,1	1,00, s	26,7
14	1,14, s	21,4	1,12, s	21,5	1,22, s	26,3
15'	4,94, s	-	4,92, s	-	4,88, s, bl	-
15	4,92, s	110,4	4,90, s	110,4	4,99, s, bl	122,9
OH	2,24, s, bl	-	2,27, s, bl	-	-	-
OH	2,47, s, bl	-	-	-	-	-

^aProduto obtido via di-hidroxilação de Sharpless do β -cariofileno 98,5%,

^b4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno isolado de *J. oxycedrus* (RMN ^1H = 400 MHz e RMN ^{13}C = 50 MHz, CDCl_3) [ref. 208].

^c4 α ,5 β -dihidroxi-cariofil-8(15)-eno isolado de *S. palmensis* (RMN ^1H = 500 MHz e RMN ^{13}C = 125MHz, CDCl_3) [ref. 209].

No presente estudo não foi conduzido qualquer tratamento empírico para determinação da configuração absoluta dos dois centros assimétricos formados na reação. No entanto, com base na seletividade enantiofacial da reação e no modelo minemônico descritos acima, a configuração do produto pode ser predita. A Figura 49 mostra a estrutura em perspectiva de **D-2** na conformação mais estável com a provável esterequímica dos centros assimétricos gerados na reação de dihidroxilação assimétrica. A conformação da estrutura *gauche* pode explicar o posicionamento das duas hidroxilas, as quais se posicionam o mais próximo possível do ângulo de 45°, condição que proporciona uma maior estabilidade devido às ligações de hidrogênios de ocorrência mútua. Com isso, a configuração esperada para os dois centros assimétricos formados é “*R*” para C4 e “*S*” para C5.

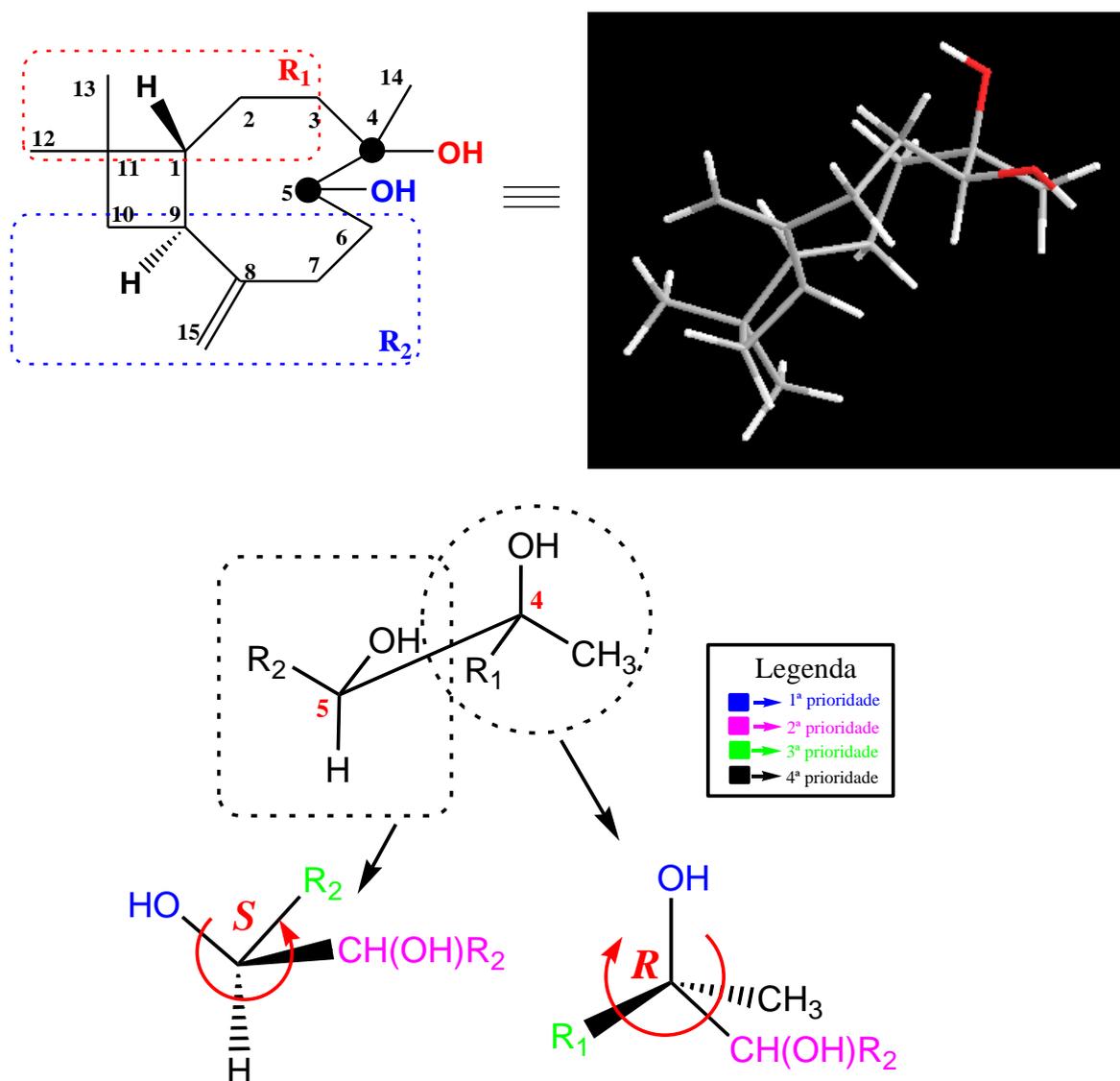
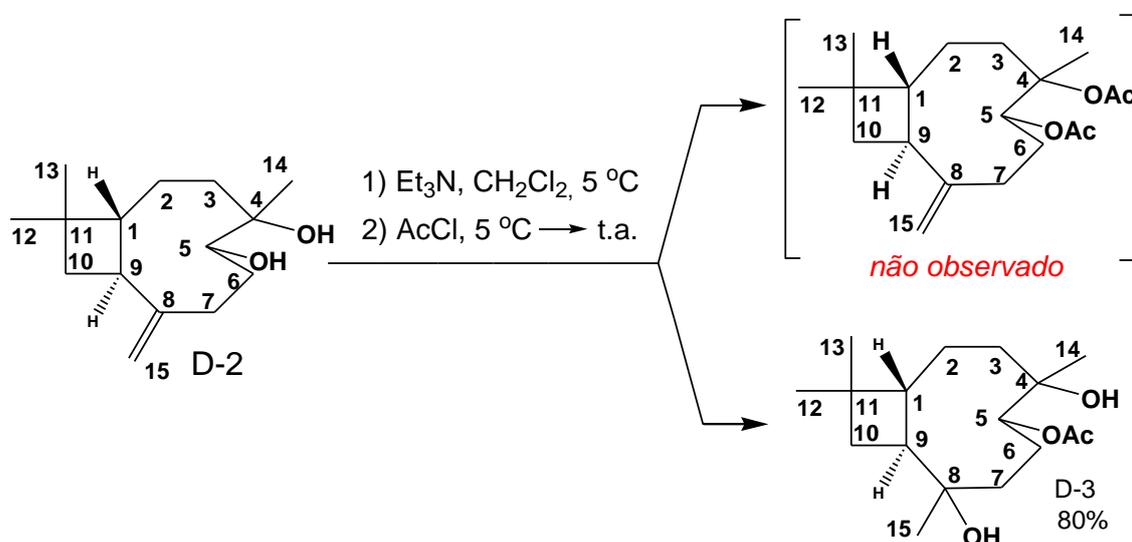


Figura 49. Estrutura em perspectiva de **D-2** na conformação mais estável (superior) e projeção no eixo C5-C4 (inferior) com a provável esterequímica dos centros assimétricos gerados.

4.5.3. Preparação do derivado 3 (D-3)

Como mostrado no Esquema 8, para obtenção do derivado diacetilado, o diol (**D-2**) foi tratado com trietilamina anidra e cloreto de acetila (recém destilado) em diclorometano anidro, sob agitação a $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, depois à temperatura ambiente. Em primeiro momento observou-se a evolução de um gás e liberação de calor. A reação foi acompanhada por CCD (hexano:AcOEt 7:3) e ao final de 24 horas, verificou-se o total desaparecimento da mancha do material de partida ($R_f = 0,48$) e o aparecimento de uma mancha com $R_f = 0,57$, significando uma diminuição na polaridade devido à introdução do(s) grupo(s) acetato(s). Após a elaboração usual, o produto foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel, hexano:AcOEt 7:3) fornecendo um óleo de coloração amarelada. Apesar dos espectros de RMN ^1H (página 186) e ^{13}C (página 187) evidenciarem a presença de grupo acetato, uma análise mais refinada dos dados comprovou a inserção de um único grupo acetila. Outro dado surpreendente foi o desaparecimento dos sinais característicos da dupla ligação exocíclica (C8-C15). A intenção inicial seria obter o produto diacetilado, no entanto, as análises espectrométricas confirmaram tratar-se do acetato de 4,8-dihidroxi-cariof-5-il (acetato 2,6-dihidroxi-2,6,10,10-tetrametilbiciclo[7.2.0]undecan-5-il), designado neste estudo como sendo **D-3**.



Esquema 8. Reação de obtenção do **D-3** via acetilação com cloreto de acetila.

A formação do **D-3** foi inequivocamente confirmada pelo uso da combinação de técnicas espectrométricas: CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT, HSQC e HMBC, sendo a pureza determinada por CG.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo o DEPT (página 188), forneceram dados suficientes para assinalamento dos hidrogênios e carbonos nas posições 1, 5 e 9, com destaque para a metila do grupo acetila (C17) que aparece como um simpleto em $\delta = 2,03\text{ ppm}$ (Figura 50).

O dupletto de dupletto em $\delta = 4,64$ ppm foi atribuído ao hidrogênio H5 que acopla com H6' ($J_{H3-H6'} = 11,6$ Hz) e H6 ($J_{H3-H6} = 5,0$ Hz), este núcleo sofreu um deslocamento para uma posição mais desblindada em relação ao correspondente no precursor ($\delta = 3,59$ ppm; Tabela 14, página 109) devido ao efeito eletrônico do grupo acetato. Já o sinal em $\delta = 2,08$ ppm, que aparece na forma de um duplo dupletto de dupletto (ddd), refere-se ao H1 que acopla, concomitantemente, com o H2 ($J_{H1-H2} = 6,2$ Hz), H9 ($J_{H1-H9} = 10,5$ Hz) e H2' ($J_{H1-H2'} = 11,8$ Hz), encontrando-se mais blindado do que H9 ($\delta = 2,57$ - $2,52$ ppm, multipletto). A desblindagem de H9 é devida ao efeito indutivo de retirada de densidade eletrônica da hidroxila nas adjacências (C8-OH).

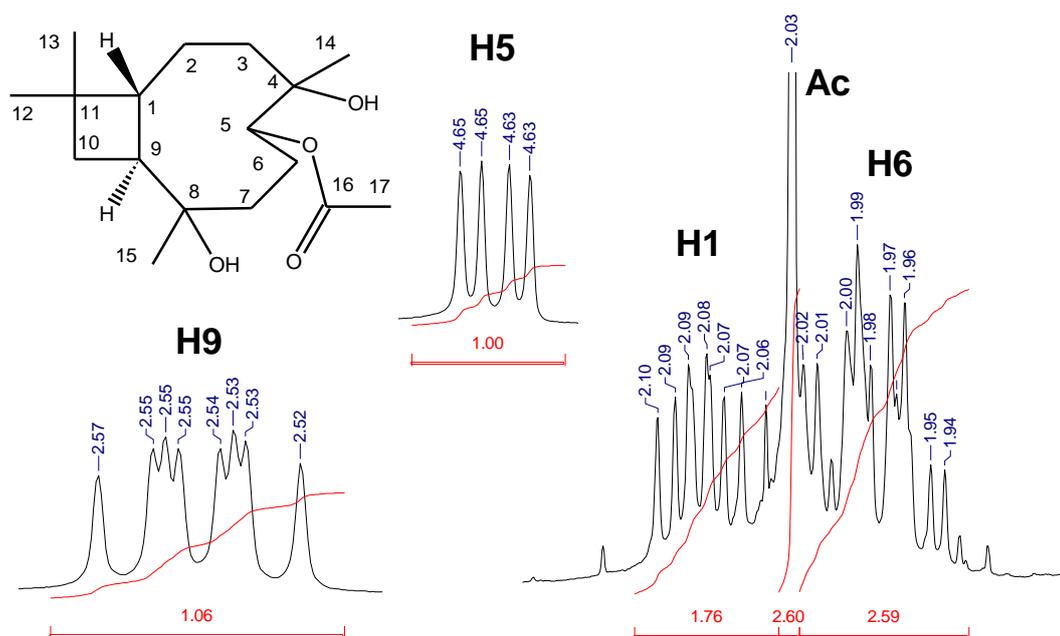


Figura 50. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de **D-3** evidenciando as regiões diagnósticas de H1, H5, H9 e a metila do grupo acetila.

Pelas análises dos espectros de RMN ^{13}C , incluindo o experimento DEPT, o sinal em $\delta = 75,3$ ppm foi atribuído ao carbono C4, semelhante ao encontrado no material de partida ($\delta = 75,1$ ppm; Tabela 14, página 109), de onde se conclui que não houve acetilação da hidroxila a ele ligada. O sinal do carbono C5 aparece em $\delta = 77,0$ ppm, pois a entrada do grupo acetila na hidroxila alílica secundária provocou uma desblindagem maior do que a hidroxila livre, comparado ao sinal de C5 do precursor ($\delta = 73,3$ ppm; Tabela 14, página 109). Um fato intrigante foi o desaparecimento dos sinais da dupla exocíclica (C8-C15) e o aparecimento de dois novos sinais, uma metila em $\delta = 26,0$ e um carbono carbinólico em $\delta = 73,0$ ppm. Uma explicação plausível para o surgimento de ambos os sinais foi a ocorrência de uma reação de hidratação catalisada por HCl na dupla exocíclica (C8-C15), durante o procedimento de elaboração gerando um novo álcool terciário (Figura 51).

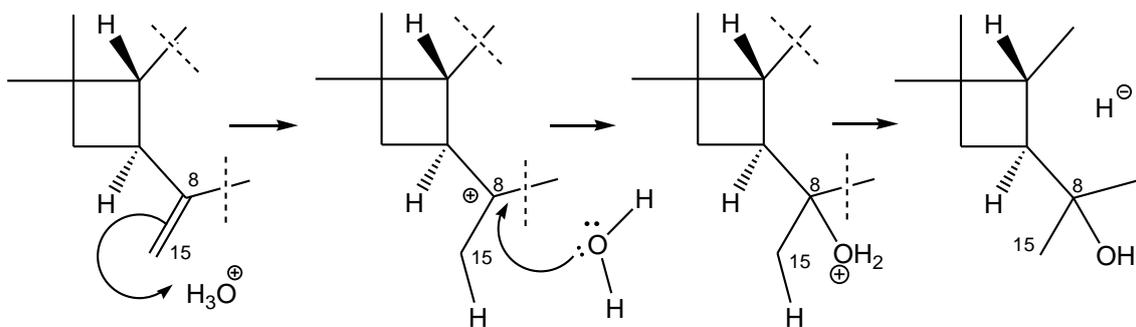


Figura 51. Mecanismo da reação de hidratação da dupla exocíclica.

Para assinalar os demais sinais de carbonos e hidrogênios e confirmar a estrutura do **D-3**, fez-se necessário a utilização das técnicas HSQC (correlação de acoplamento direto dos hidrogênios com respectivos carbonos) e HMBC (correlação de acoplamento a longa distância entre os hidrogênios). A Tabela 15 mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios de todos os grupos metilênicos do **D-3**, assinalados com base nos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , experimento DEPT e de correlação heteronuclear HSQC e HMBC.

Tabela 15. Assinalamento dos hidrogênios dos grupos metilênicos com base nas correlações de HMBC e HSQC.

Nº H	δ ppm, mult. (J)	Carbonos com quem acopla (δ ppm)
H6'	1,84, dtd, 1 H(J = 13,1, 4,9, 4,9, 2,8 Hz)	C3 (35,2); C8 (73,0) e C5 (77,0)
H6	2,01-1,94, m, 1H	C10 (18,5); C15 (27,1); C3 (35,2); C1 (42,5) e C5 (77,0)
H3 e H3'	1,70-1,63, m, 2H	C13 (21,3); C14 (26,0); C9 (36,3) e C1 (42,5)
H7	1,59, dd, 1H(J = 4,8, 2,6 Hz)	C17 (21,3); C3 (35,2) e C9 (36,3)
H7'	1,57, dd, 1H(J = 4,8, 2,9 Hz)	C17 (21,3); C3 (35,2) e C9 (36,3)
H10 e H10'	1,45-1,41, m, 2H	C13 (21,3); C2 (30,3); C3 (35,2) e C1 (42,5)
H2	1,34-1,33, m, 1H	C10 (18,5); C13 (21,3); C12 (30,5); C3 (35,2) e C1 (42,5)
H2'	1,33-1,31, m, 1H	C10 (18,5); C15 (27,1); C1 (42,5) e C3 (35,2)

O espectro de HSQC (página 189) possibilitou concluir que os sinais em $\delta = 21,3, 21,3, 26,0, 27,1$ e $30,5$ ppm estão respectiva e diretamente correlacionados às metilas C13, C17, C14, C15 e C12. O sinal em $\delta = 170,5$ ppm não exibiu correlação direta com qualquer hidrogênio, sendo referenciado como C16, muito desblindado por ser um carbono carbonílico (sp^2) ligado a um elemento bastante eletronegativo. O sinal em $\delta = 77,0$ ppm foi assinalado como sendo o carbono metínico desblindado (C5), ligado ao grupo acetato (retirador de elétrons) e, por fim, os sinais em $\delta = 42,5$ e $36,3$ ppm foram correlacionados ao C1 e C9, respectivamente. O espectro de HMBC (página 190) em conjunto com os dados HSQC (página 189) possibilitaram o assinalamento dos grupos metilênicos em $\delta = 1,94-2,01$ ppm (H6); $\delta = 1,84$ ppm (H6'); $\delta = 1,63-1,70$ ppm (H3 e H3'); $\delta = 1,59$ ppm (H7); $\delta = 1,57$ ppm (H7'); $\delta = 1,41-1,46$ ppm (H10 e H10'); $\delta = 1,34-1,33$ ppm (H2) e $\delta = 1,31-1,33$ ppm (H2'), confirmando o posicionamento dos hidrogênios e seus respectivos carbonos (Figura 52).

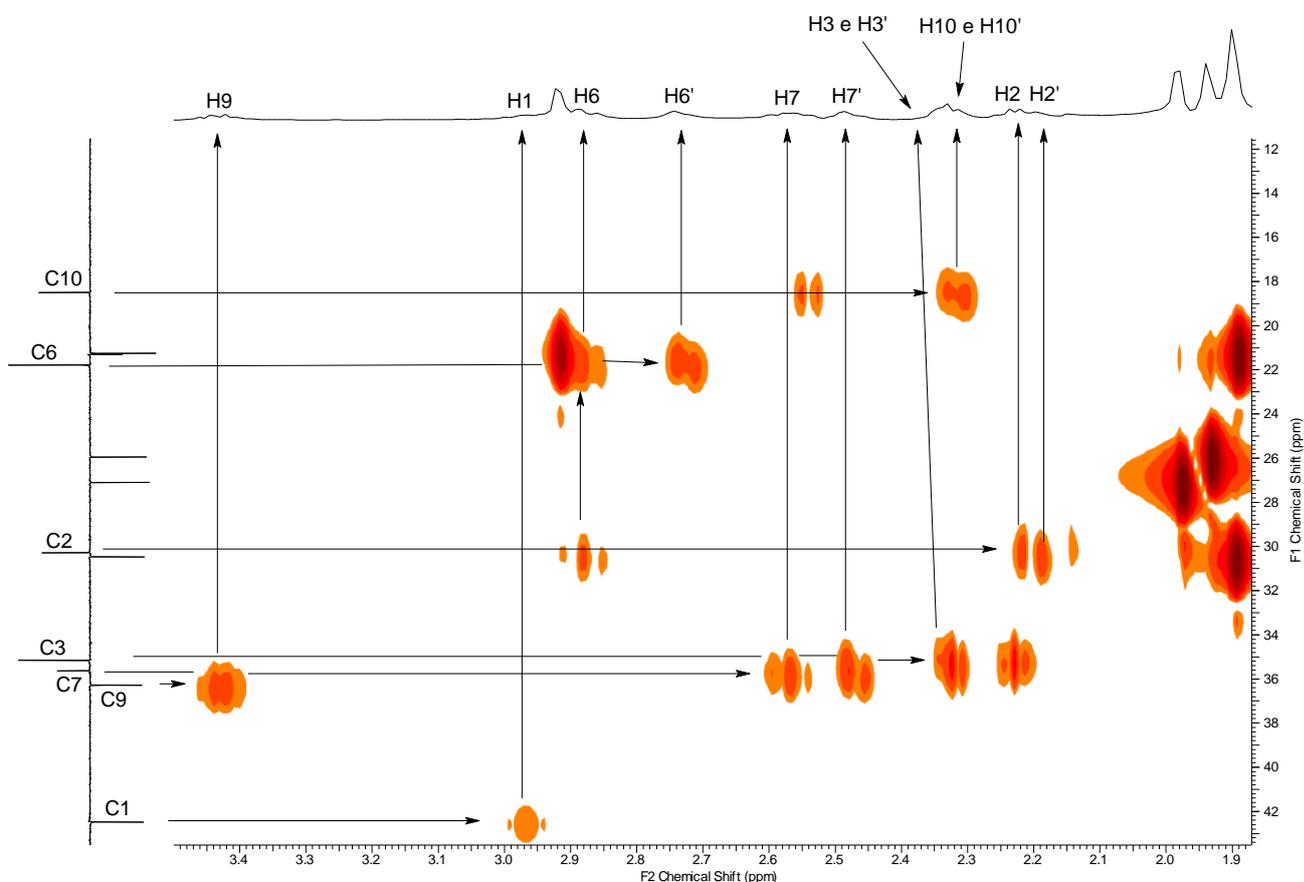


Figura 52. Expansão do espectro de HSQC (RMN $^1H = 600$ MHz e DEPT = 135 MHz, $CDCl_3$) na região diagnóstica dos grupos metilênicos do **D-3**.

Na Tabela 16 são apresentados todos os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **D-3**, assinalados conforme descrito acima.

Tabela 16. Dados do RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de **D-3**.

Nº	δ_{H} ppm , mult. (J)	δ_{C} ppm
1	2,08, ddd, ($J = 11,8, 10,5, 6,2$ Hz), 1H	42,5
2'	1,33-1,31, m, 1H	18,5
2	1,34-1,33, m, 1H	
3'	1,45-1,4, m, 2H	30,3
3		
4	-	75,3
5	4,64, dd ($J = 11,6, 5$ Hz), 1H	77,0
6'	1,84, dtd ($J = 13,1, 4,9, 4,9, 2,8$ Hz), 1 H	35,7
6		
7'	1,70-1,63, m, 2H	35,2
7		
8	-	73,0
9	2,57-2,52, m, 1H	36,3
10'	1,57, dd ($J = 4,8, 2,9$ Hz), 1H	21,8
10	1,59, dd ($J = 4,8, 2,6$ Hz), 1H	
11	-	34,4
12	1,00, s, 3H	30,5
13	1,00, s, 3H	21,3
14	1,09, s, 3H	26,0
15	1,04, s, 3H	27,1
16	-	170,5
17	2,03, s, 3H	21,3

No espectro de massas de **D-3** (página 191) não foi observado o pico do íon molecular $[\text{M}]^{+\bullet}$ com $m/z = 298$, mas o fragmento com $m/z = 280$ equivalente a $[\text{M}^{+\bullet} - \text{H}_2\text{O}]$, possivelmente devido a desidratação do álcool terciário em C8 e formação de dupla ligação em C8-C15. O fragmento com $m/z = 280$ poderá também sofrer clivagem na ligação C14-C4, perdendo o grupo metila e formando um íon/radical com $m/z = 265$, como também poderá sofrer clivagem da ligação C16-oxigênio, gerando um fragmento com $m/z = 237$. Observa-se ainda que o pico de maior intensidade, pico base, é o íon/radical acílium ($m/z = 43$), o que evidencia a presença e facilidade clivagem do grupo acila. A Figura 53 apresenta o espectro de massas do **D-3** e descreve uma proposta de fragmentação estrutural nas clivagens iniciais.

Line#:1 R.Time:37.542(Scan#:4146)

MassPeaks:164

RawMode:Averaged 37.533-37.550(4145-4147) BasePeak:42.95(940022)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

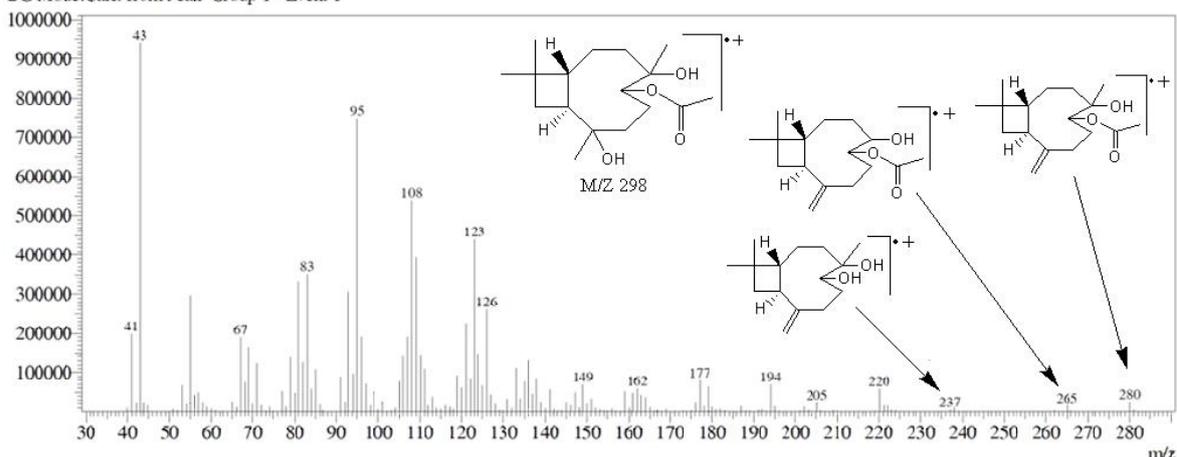
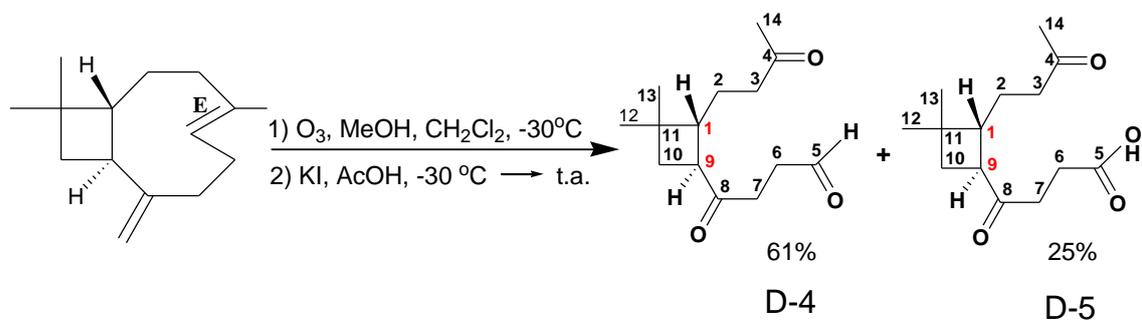


Figura 53. Espectro de massas do D-1 e proposta estrutural para alguns fragmentos.

4.5.4. Preparação dos derivados 4 e 5 (D-4 e D-5).

Dentre os oxidantes seletivos, ozônio é o mais utilizado para clivar ligações duplas carbono-carbono, um processo que é amplamente utilizado na academia e na indústria.

Neste estudo a ozonólise do β -cariofileno foi executada a uma temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, borbulhando-se ozônio em fluxo contínuo na solução deste terpeno em diclorometano/metanol (1:1). A reação foi relativamente rápida, após 2 h a matéria-prima havia sido totalmente consumida (CCD, hexano:AcOEt 9:1) quando então, a mistura reacional foi tratada com iodeto de potássio-ácido acético. Após o tratamento redutivo, foram observadas duas mancha de coloração roxa, quando em contato com vanilina sulfúrica com R_f 's = 46 e 42, menores do que o R_f do β -cariofileno (R_f = 76), indicando um aumento na polaridade devido à esperada introdução de átomos de oxigênio no terpeno de partida. Após a elaboração usual, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna gerando dois derivados com rendimento de 61% (D-4, menos polar) e 25% (D-5, mais polar), na forma de óleo, os quais foram posteriormente caracterizados por técnicas espectrométricas como sendo 4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanal e ácido 4-(3,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclobutil)-4-oxobutanóico, respectivamente (Esquema 9). Registra-se que durante o processamento ocorreu rápida decomposição desse material, pois, quando em contato com o ar atmosférico sofreu um escurecimento, sugerindo que o grupo aldeído presente inicialmente na estrutura do produto oxidou-se a grupo ácido carboxílico.



Esquema 9. Reação de ozonólise do β-cariofileno e obtenção de **D-4** e **D-5**.

Em 1975, Criegee propôs que a ozonólise inicia-se com a inserção do ozônio à olefina, via uma cicloadição 1,3 concertada, formando um molozonídeo (instável). Por uma cicloreversão do molozonídeo gera-se um *zwitterion* (ou óxido de carbonila) e um composto carbonílico que se recombinam por uma nova cicloadição, gerando o ozonídeo (um espécie de rearranjo) (Figura 54). Anos depois, Geletneky e Berger²¹⁰ revisitaram propostas mecanísticas para ozonólise usando espectrometria de RMN com oxigênio marcado (¹⁷O), concluindo que o mecanismo de Criegee era coerente com as evidências de RMN. Recentemente, Oliveira e Wosch²¹¹ publicaram uma interessante revisão sobre a química do ozônio e ozonólise, onde foram citadas várias ideias e suposições relacionadas, destacando como foi desenvolvido racional do processo de ozonólise e as conclusões emanadas em um momento com instrumentação limitada.

²¹⁰Geletneky, C.; Berger, S.; *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 13, 1625.

²¹¹Oliveira, A.R.M.; Wosch, C.L.; *Quím. Nova* **2012**, 35, 1482.

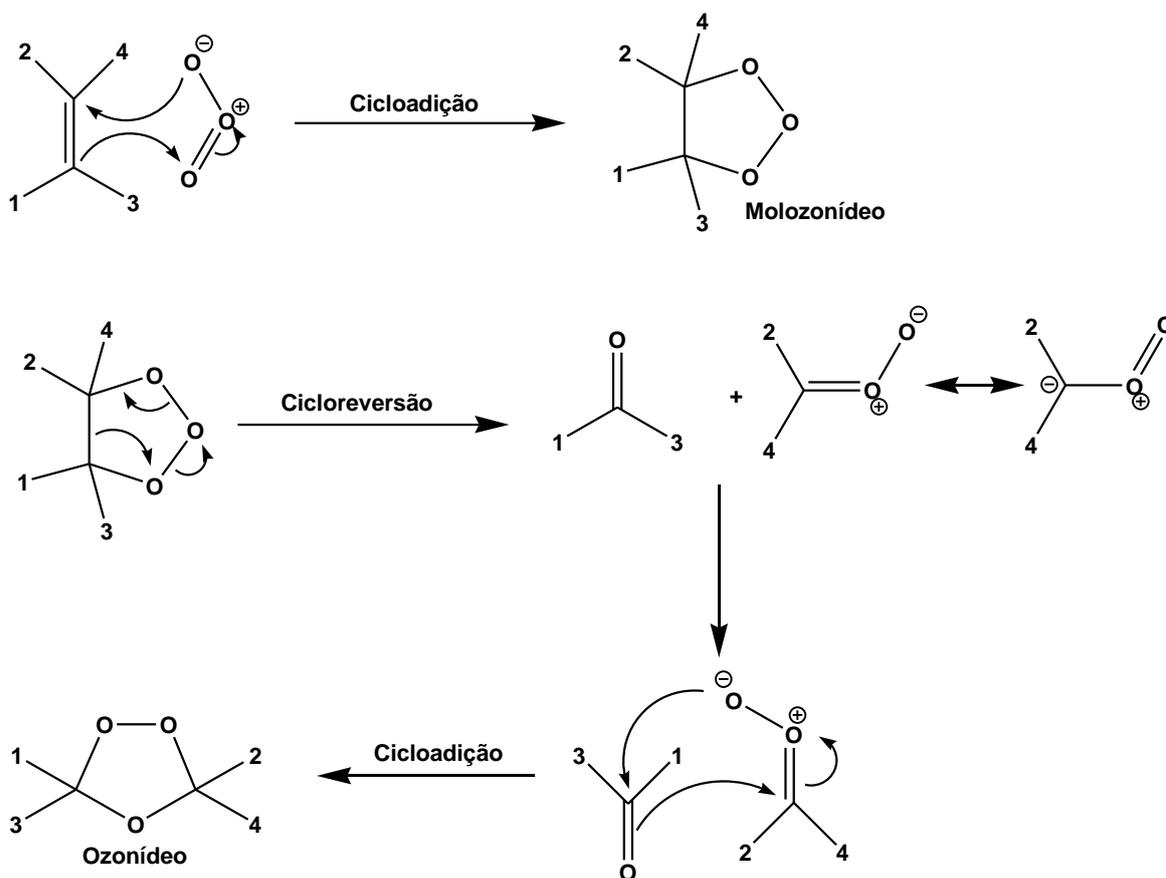


Figura 54. Mecanismo da ozonólise proposta por Criegee.²¹²

Na Figura 55 encontra-se mostrada uma proposta mecanística para formação dos derivados **D-4** e **D-5**, em conformidade com o descrito por Criegee.²¹⁹ Inicialmente, ocorre a ação do ozônio sobre as ligações duplas do β -cariofileno, gerando um molozonídeo instável (**I**) que se rearranja para formar o ozonídeo (**II**). Este último decompõe-se em presença do redutor (clivagem redutiva), dando origem a uma cetona na dupla exocíclica (C8-C15), enquanto que a dupla ligação endocíclica (C4-C5) forma uma cetona e um aldeído, como em **D-4**. A obtenção do cetó-ácido **D-5** por ser explicada pela rápida oxidação do grupo aldeído, possivelmente pelo ar atmosférico, durante a manipulação posterior.

²¹² Criegee, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 745.

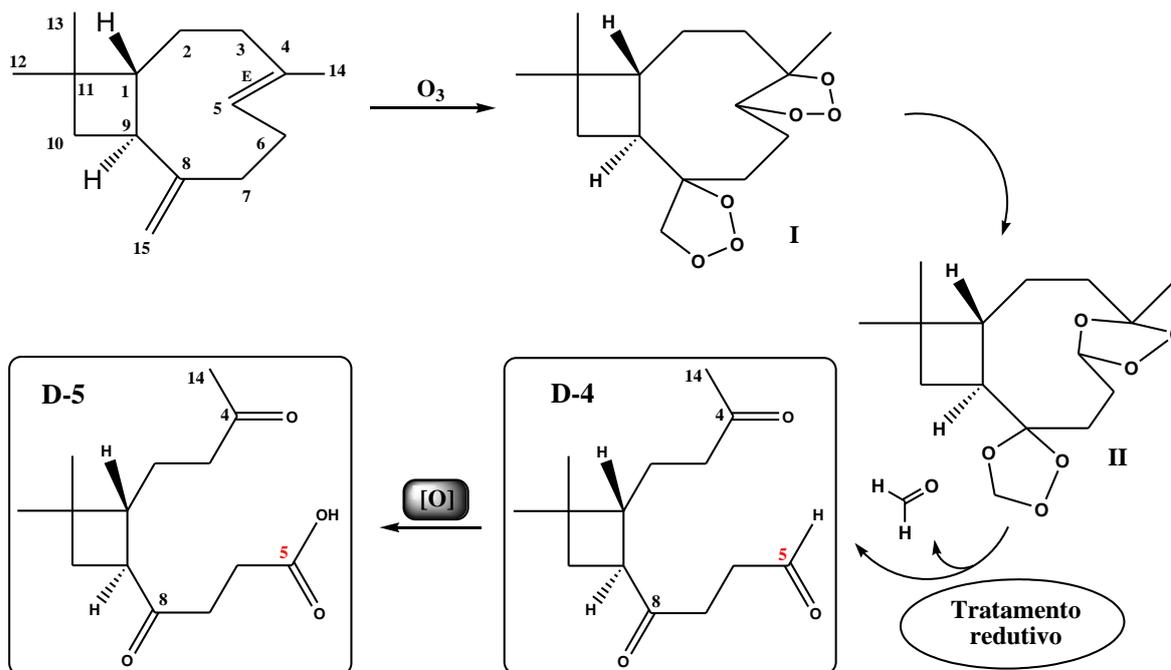


Figura 55. Proposta de mecanismo para a formação D-4 e D-5 via ozonólise do β-cariofileno.

Considerando que a emissão natural de compostos biogênicos orgânicos voláteis excedem largamente as emissões antropogênicas, desempenhando um papel importante na atmosfera, e que sesquiterpenos (C₁₅H₂₄) exibem elevada reatividade para ozônio e grande potencial para formação de aerossol, Winterhalter e colaboradores²¹³ conduziram estudo em fase gasosa entre β-cariofileno e ozônio, sob diferentes condições experimentais, e concluíram que a velocidade da reação sobre a dupla endocíclica (ozonólise de primeira geração) é aproximadamente 100 vezes maior do que a reação sobre a dupla exocíclica (ozonólise de segunda geração). Ainda de acordo com os pesquisadores, embora a ozonólise dos produtos de primeira geração seja mais lenta do que a do β-cariofileno, aquela é ainda mais rápida do que a ozonólise dos monoterpenos.²²⁰ Em trabalho teórico subsequente, via cálculo das taxas de coeficientes térmicos por TST variacional, o mesmo grupo encontrou que a dupla endocíclica é mais reativa e que a adição de ozônio à dupla exocíclica desempenha um papel menor, com rendimento < 5%, em concordância com os dados experimentais.²¹⁴

No presente estudo, não foi analisada a reatividade diferenciada das duplas do β-cariofileno, pois foi realizada ozonólise exaustiva para justamente se obter somente o produto de

²¹³Winterhalter, R.; Herrmann, F.; Kanawati, B.; Nguyen, T.L.; Peeters, J.; Vereecken, L.; Moortgat, G.K.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4152.

²¹⁴Nguyen, T.L.; Winterhalter, R.; Moortgat, G.; Kanawati, B.; Peeters, J.; Vereecken, L.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4173.

segunda geração A formação dos derivados **4 (D-4)** e **5 (D-5)** foi comprovada por técnicas usuais de caracterização estrutural (IV, RMN ^1H e ^{13}C).

No espectro de IV de **D-4** (página 192) foi possível observar, na região de aproximadamente 2700 cm^{-1} , uma das bandas fracas que indicam estiramento da ligação C-H de aldeído (ressonância de *Fermi*), e uma banda fina e intensa em 1707 cm^{-1} característica do estiramento axial da C=O de grupo cetona e aldeído (Figura 56A). Outra banda importante aparece em 1366 cm^{-1} , relacionada à vibração do estiramento C-H que acopla com a primeira harmônica da vibração de dobramento do C-H do aldeído sendo de média intensidade. Por outro lado, no espectro de IV do **D-5** (página 197) foi possível observar uma banda larga e com intensidade discreta na faixa de 2800 a 3500 cm^{-1} relativa ao estiramento axial do grupo O-H e outra banda em 1708 cm^{-1} , uma banda fina característica do estiramento axial da C=O (Figura 56B), podendo está relacionada às funções cetona e ácido carboxílico, pois ambas coexistem na estrutura de **D-5**. Observou-se ainda um sinal fraco em 1364 cm^{-1} referente à deformação no plano da ligação C-OH e um sinal médio em 1265 cm^{-1} relativo ao estiramento axial da ligação C-O.

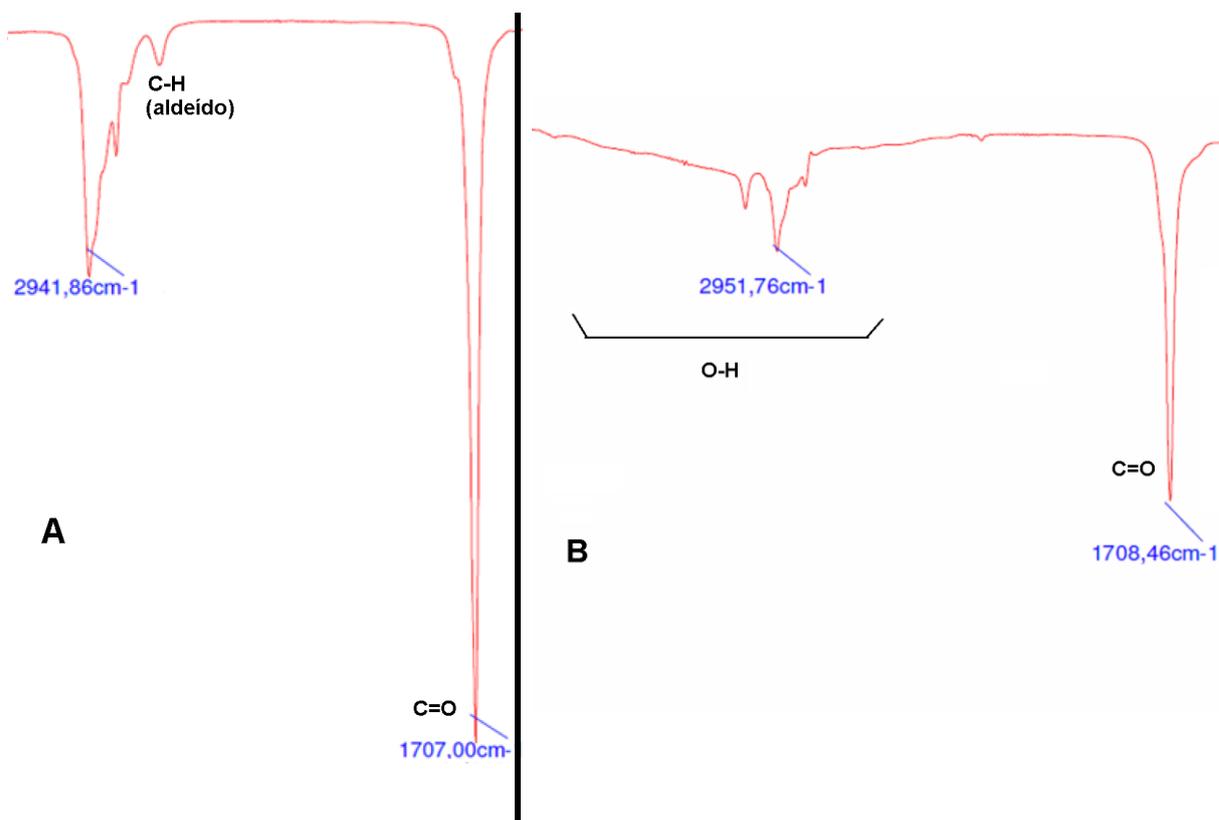


Figura 56. Região diagnóstica do espectro de IV (ATR) de **D-4** (A) e **D-5** (B).

No espectro de RMN ^1H (página 193) de **D-4** foi observado um simpleto em $\delta = 9,8$ ppm, referente ao hidrogênio H5 (C-H) do aldeído resultante da reação de clivagem oxidativa da dupla endocíclica, três multipletos em $\delta = 2,76-2,73$, $2,72-2,61$ e $2,41-2,32$ ppm, referentes aos grupos metilênicos H7/H7', H6/H6' e H3/H3'. Estes sinais se encontram mais desblindados do que os sinais referentes aos mesmos hidrogênios no β -cariofileno (Tabela 10, página 92) em decorrência da proximidade com as carbonilas de cetona (C8 e C4) em **D-4** (Figura 57). Este mesmo efeito de desblindagem em relação ao β -cariofileno de partida foi observado para os hidrogênios H14 ($\delta = 2,11$ ppm) e para H9 ($\delta = 2,83$ ppm).

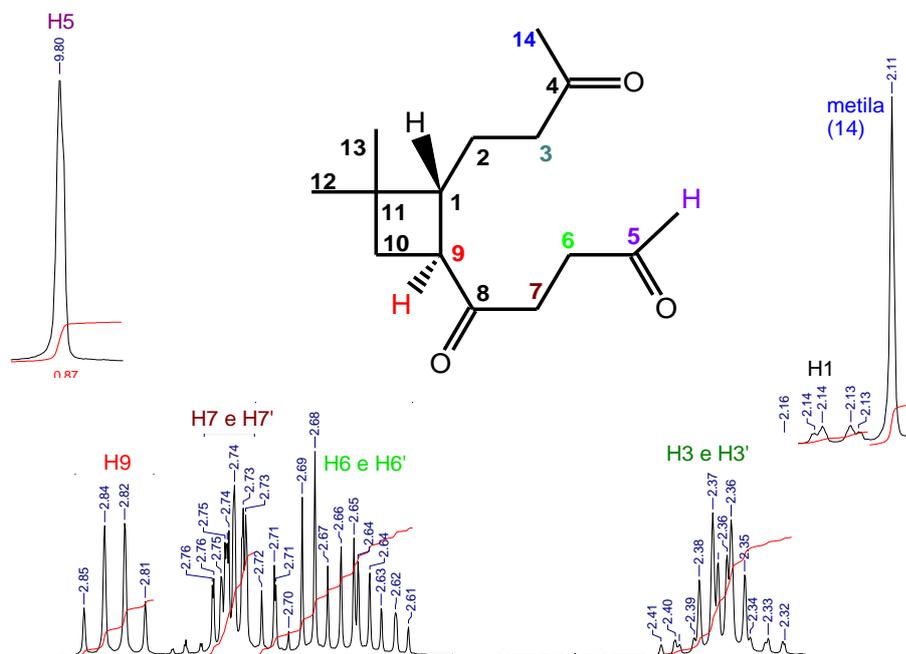


Figura 57. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) nas regiões diagnósticas de **D-4**.

No espectro de RMN ^1H de **D-5**, foi observada uma grande similaridade com os sinais observados para **D-4** (Figura 58), exceto pelo desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio do grupo aldeído. Uma possível explicação para isso seria a ocorrência de modificação do grupo aldeído (muito reativo), por exemplo, via uma reação de oxidação que possibilitou a formação do **D-5**.

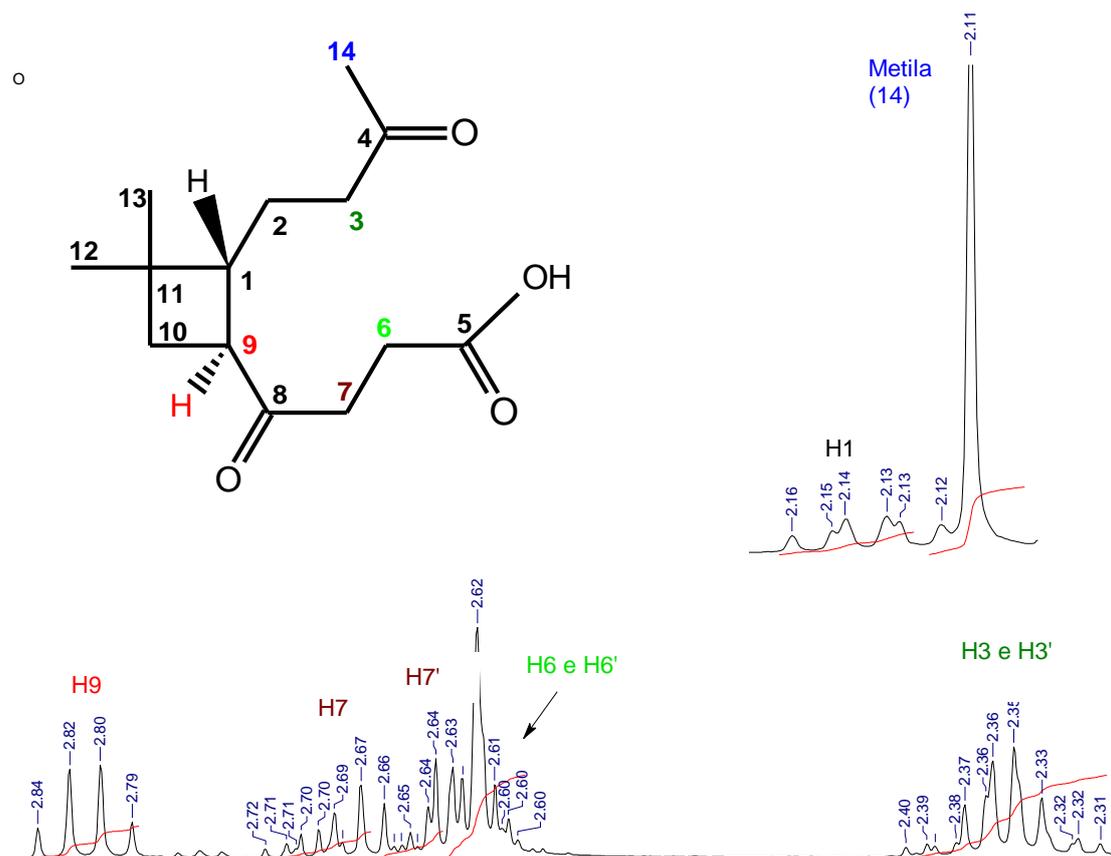


Figura 58. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) nas regiões diagnósticas de **D-5**.

De forma geral, os espectros de RMN ^{13}C de **D-4** (página 194) e **D-5** (página 199) também exibiram grande semelhança. Um dado que despertou a atenção foi a mudança de deslocamento químico de C5, de $\delta = 200,4$ ppm em **D-4** para $\delta = 177,9$ ppm em **D-5**, confirmando assim a geração do grupo carboxila pela oxidação do grupo aldeído. Os sinais em $\delta = 208,7$ (C4) e 209,8 ppm (C8) para **D-4** e em $\delta = 209,0$ (C4) e 210,0 ppm (C8) para **D-5**, são referentes aos carbonos carbonílicos das cetonas formadas mediante a clivagem oxidativa das duplas endo (C8-C15) e exocíclica (C8-C15) da matéria-prima (Figura 59).

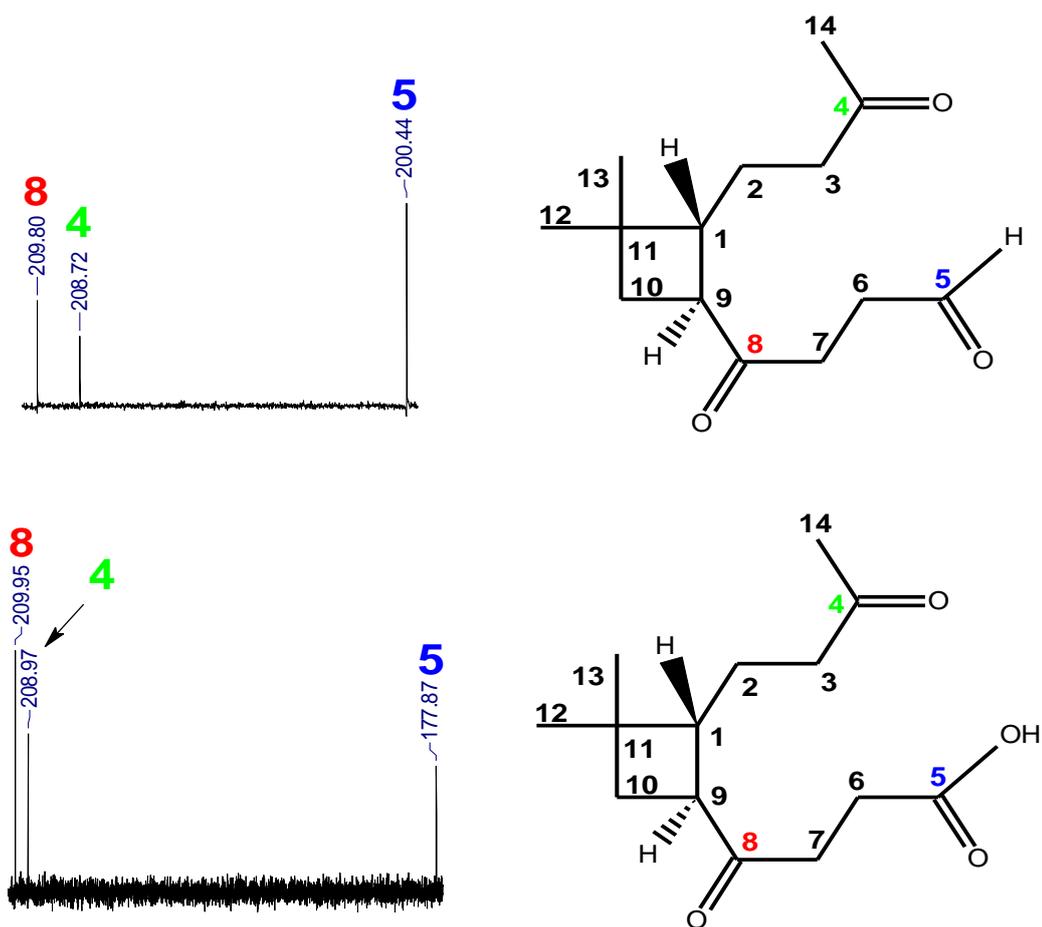


Figura 59. Comparação das regiões de carbonilas/carboxila do espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de **D-4** e **D-5**.

Na Tabela 17 são mostrados os dados de RMN ^1H de **D-4** e **D-5** comparados com os dados da literatura.^{215,216}

²¹⁵ Parshintsev, J.; Nurmi, J.; Kilpeläinen, I.; Hartonen, K.; Kulmala, M.; Riekkola, M.L.; *Anal Bioanal Chem.* **2008**, 390, 913.

²¹⁶ Eijck, A.V.; Opatz, T.; Taraborrelli, D.; Sander, R.; Hoffmann, T.; *Atmos. Environ.* **2013**, 80, 122.

Tabela 17. Comparação dos dados de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do **D-4** e **D-5** com dados da literatura.^{215,216}

Nº H	Derivado 4 (D-4) ^a	Aldeído β-nocariofilônico ^b	Derivado 5 (D-5) ^a	Ácido β-nocariofilônico ^c
1	2,16-2,13, m	2,1, m	2,16-2,13, m	2,17-2,11, m
2'	1,64-1,57, m	1,6, m	1,62-1,56, m	1,66-1,56, m
2	1,68-1,64, m		1,67-1,62, m	
3'	2,41-2,32, m	2,34, m	2,40-2,31, m	2,39-2,28, m
3				
5	9,80, s	9,8, s	-	-
6'	2,72-2,61, m	2,64, m	2,63-2,60, m	2,73-2,54, m
6				
7'	2,76-2,73, m	2,70, m	2,66-2,64, m	2,73-2,54, m
7			2,72-2,67, m	
9	2,83, q (<i>J</i> = 9,5 Hz)	2,8, q	2,81, q (<i>J</i> = 9,5 Hz)	2,81, q (<i>J</i> = 9,3 Hz)
10'	1,74, t (<i>J</i> = 10,1, 10,1 Hz)	1,72, t	1,73, t (<i>J</i> = 10,3, 10,3 Hz)	1,76-1,68, m
10	1,90-1,87, m	1,85, t	1,89-1,86, m	1,90-1,82, m
12	1,06, s	1,01, s	1,06, s	1,06-1,01, m
13	1,05, s	1,02, s	1,04, s	
14	2,11, s	2,05, s	2,11, s	2,10, s

^aProduto obtido via ozonólise do β-cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich), seguida de tratamento redutivo.

^bAldeído β-nocariofilon obtido via ozonólise do β-cariofileno ≥80% (Sigma-Aldrich), seguida de tratamento redutivo com iodeto de potássio (500 MHz, CDCl₃) [ref. 215].

^cÁcido β-nocariofilon obtido via ozonólise do β-cariofileno ≥80% (Sigma-Aldrich), (400 MHz, CDCl₃) [ref. 216].

Os dados de RMN ¹³C do aldeído β-nocariofilônico não foram encontrados na literatura, por esse motivo, na Tabela 18 são mostrados os dados de RMN ¹³C de **D-4** e **D-5**, comparados com os dados da literatura para o ácido β-nocariofilônico.²¹⁶

Tabela 18. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do **D-4** e **D-5** com dados da literatura.²¹⁶

Carbonos	Derivado 4 (D-4) ^a	Derivado 5 (D-5) ^a	Ácido β -nocariofilônico ^b
1	45,8	45,8	45,8
2	23,8	23,7	23,7
3	41,5	41,6	41,6
4	208,7	209,0	208,9
5	200,4	177,9	177,8
6	37,4	34,9	34,9
7	32,8	27,6	27,6
8	209,8	210,0	210,0
9	46,7	46,7	46,7
10	36,7	36,7	36,7
11	33,9	33,9	33,9
12	30,1	30,0	30,1
13	22,4	22,4	22,4
14	29,9	29,9	29,9

^aProduto obtido via ozonólise do β -cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich), seguida de tratamento redutivo.

^bÁcido β -nocariofilon obtido via ozonólise do β -cariofileno $\geq 80\%$ (Sigma-Aldrich), (100 MHz, CDCl_3) [ref. 216].

4.6. Toxicidade por fumigação dos derivados gerados por modificação química do β -cariofileno.

Foram realizados ensaios de toxicidade com a matéria-prima, para se estimar a concentração letal média (CL_{50}) (Tabela 19). No entanto, a mesma estimativa não pode ser feita para os derivados, pois, para alguns deles, não havia quantidade suficiente de amostra para os ensaios. Assim, a concentração da matéria-prima que eliminou 95% de *T. urticae* nos experimentos (CL_{95}) foi estimada, exibindo um valor igual a $2,8 \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar. Com essa concentração, procedeu-se os testes de fumigação no intuito de observar os efeitos da atividade dos derivados contra *T. urticae* em comparação aos da matéria-prima.

Tabela 19. Toxicidade por fumigação do composto β -cariofileno sobre *T. urticae*.

Amostra	N	GL	χ^2	Inclinação \pm EP	CL ₅₀ ($\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar) (IC 95%)	RT ₅₀ (IC 95%)
β -Cariofileno	720	5	7,67	0,79 \pm 0,049	4,7 x 10 ⁻² (2,4x10 ⁻² - 8,5x10 ⁻²)	12,50 (2,96-52,80)
<i>Eugenol</i> *	540	3	1,52	0,85 \pm 0,08	4 x 10 ⁻³ (2x10 ⁻³ -5x10 ⁻³)	-

n = Número de ácaros/dose; GL= Grau de liberdade; IC = Intervalo de confiança; χ^2 = chi-quadrado (P>0,05); RT = Razão de toxicidade, calculada pelo método de Robertson & Preisler;¹⁷⁵ EP = Erro padrão da média; (*) Eugenol = como controle positivo.

A Figura 60 mostra os resultados obtidos por meio dos testes de fumigação com os derivados **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, utilizando a mesma concentração estimada para a CL₉₅ do β -cariofileno, onde se observou êxito de 97,78 \pm 1,11% na mortalidade do *T. urticae*. Os resultados da ação fumigante dos derivados não foram satisfatórias, pois, o melhor resultado obtido foi para o derivado **2**, com 5,71 \pm 1,20 % de êxito na mortalidade do *T. urticae*, seguido dos derivados: **1** (5,56 \pm 1,11%), **4** (4,44 \pm 1,11%) , **3** (3,37 \pm 0,04%) e por fim o **5** (1,15 \pm 1,15%). Portanto, conclui-se que a ação fumigante da matéria-prima (β -cariofileno) é muito superior a dos derivados gerados, ainda que estes apresentem alguma ação fumigante contra o *T. urticae*.

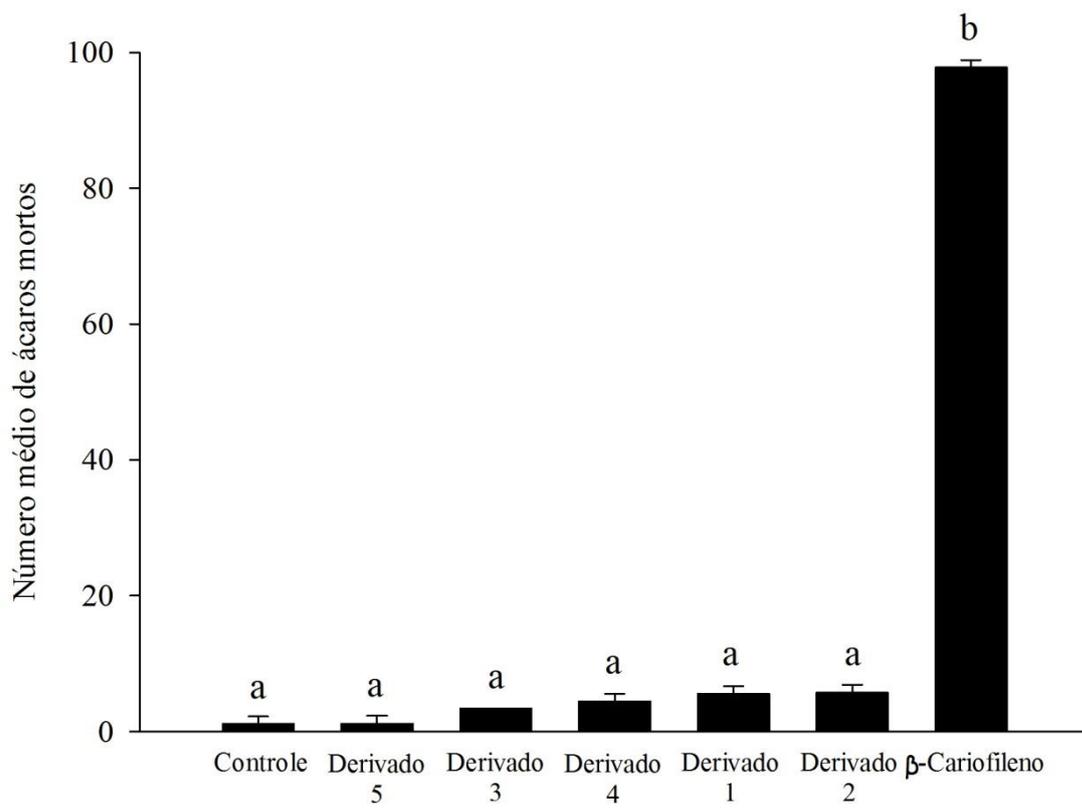


Figura 60. Resultados obtidos nos testes de fumigação dos derivados e do β -cariofileno na concentração estimada na CL_{95} .

Conclusões e Perspectivas

5. Conclusões e Perspectivas

Análises por CG-EM da composição química dos OE das folhas de *E. dysenterica*, *E. lutescens* e *E. langsdorffii*, coletados nos períodos chuvoso (PC) e seco (PS) dos anos de 2012 e 2014, revelou que além de fatores genéticos, as condições geomorfológicas e climáticas influenciam na produção, acúmulo e variabilidade química dos OE.

Variações sazonais sobre os OE das espécies foram mais relacionadas à diversidade química. O estudo mostrou que a fração sesquiterpênica determinou o quimiotipo de *E. dysenterica*, *E. lutescens* e *E. langsdorffii*, independente do período/ano de coleta, exceto para os OE de *E. lutescens* obtidos em PC e PS de 2012, onde predominou a fração monoterpênica. Dentre os compostos majoritários, o β -cariofileno apresentou-se comum a todos os óleos analisados.

Os OE das três espécies obtidos em ambos os períodos do ano de 2012 foram eficazes contra a fêmea adulta de *T. urticae*. De acordo com os testes biológicos utilizados neste estudo com OE, a ordem de toxicidade foi ELA/PS > EDY/PC > ELU/PS > EDY/PS, ELA/PC > ELU/PC. Os bioensaios demonstraram que houve ação causada por seus vapores e toxicidade por penetração via respiratória (fumigação) bem como uma diminuição na oviposição e fecundidade dos ovos depositados pela fêmea do ácaro.

Para o β -cariofileno, que pode ser considerado um marcador químico dessas espécies, foi estimada a concentração letal média ($CL_{50} = 4,7 \times 10^{-2} \mu\text{L.L}^{-1}$ de ar) contra *T. urticae* e, com o intuito de melhorar sua atividade acaricida, foram realizadas diversos procedimentos sintéticos que originou os derivados: óxido de cariofileno; 4,5-dihidroxi-cariofil-8(15)-eno; acetato de 4,8-dihidroxi-cariof-5-il; β -nocariofilon aldeído e ácido β -nocariofilônico, todos caracterizados por CG-EM, IV, RMN ^1H e ^{13}C , inclusive o β -cariofileno. A atividade acaricida destes derivados contra *T. urticae* foi testada somente na concentração estimada para CL_{95} do β -cariofileno, sendo que o β -nocariofilon aldeído exibiu o melhor resultado.

Além da determinação da composição química sazonal dos OE das folhas das três espécies de *Eugenia*, este trabalho tem como pontos importantes ser o primeiro registro da composição química dos OE de *E. lutescens* e da atividade acaricida dos OE de *E. dysenterica*, *E. lutescens* e dos derivados o β -cariofileno. Adicionalmente, este estudo mostrou que dentre as amostras testadas, os óleos de *E. langsdorffii* coletados no PS mostrou melhor propriedade de acaricida, sugerindo que a melhor época para coletar este óleo para uso no controle do ácaro é no PS, período em que também apresentou maior rendimento.

Os resultados obtidos sugerem que os OE das espécies de *Eugenia* estudadas podem ser utilizados como acaricidas. No entanto, o uso destes óleos como ingredientes ativos em uma

formulação de acaricida requer investigações para maximizar seu potencial contra o ácaro, avaliar sua seletividade a inimigos naturais, evitar seus efeitos possível toxicidade em mamíferos e ponderar o custo benefício da sua utilização.

Em relação aos derivados formados por modificação química do β -cariofileno, conclui-se que para melhor avaliar suas atividades acaricidas faz-se necessário proceder novas análises com outras metodologias, como por exemplo contato residual, haja visto que a volatilização destes diminuiu, comparada ao β -cariofileno usado como matéria prima.

Bibliografia

Bibliografia

Bibliografia

1. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>, acessado em dezembro de 2015.
2. Rates, S.M.K.; *Toxicon* **2001**, 39, 603.
3. Mariante, A.S.; Sampaio, M.J.A.; Inglis, M.C.V.; *Informe Nacional sobre a Situação dos Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura do Brasil*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Brasília, DF, 2008.
4. Coutinho, M.L.; *Acta Bot. Bras.* **2006**, 20, 13.
5. Figueiró, A.S.; *Rev. Geonorte* **2012**, 4,57.
6. Clements, F.E.; Shelford, V.E.; *Bio-ecology*, J. Wiley, New York, EUA, 1939.
7. <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>, acessado de setembro de 2015.
8. Sano, E.E.; Rosa, R.; Brito, J.L.S.; Ferreira, L.G.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2008**, 43, 153.
9. Klink, C. A.; Machado, R. B. A.; *Megadiversidade* **2005**, 1, 147.
10. Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T.; Silva Júnior, M.C.; Rezende, A.V.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E.; Fagg, C.W.; In: Cerrado: Ecologia e Flora; Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J.F., (eds) - Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2008, vol. 2 , cap. 15.
11. Bessa, N.G.F.; Borges, J.C.M.; Beserra, F.P.; Carvalho, R.H.A.; Pereira, M.A.B.; Fagundes, R.; Campos, S.L.; Ribeiro, L.U.; Quirino, M.S.; Chagas Junior, A.F.; Alves, A.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2013**, 15, 692.
12. <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, acessado em setembro de 2013.
13. Roesler, R.; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Holanda, R.B.; Sousa, C.A.S.; Pastore, G.M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, 27, 53.
14. Coutinho, L.M.; Em Eugen Warming e o Cerrado Brasileiro: um Século Depois, Klein, A.L. (org); Editora Unesp, São Paulo, SP, 2002.
15. Martins, E.S.; Reatto, A.; Carvalho Junior, O.A.; Guimarães, R.A.; *Evolução Geomorfológica do Distrito Federal*, Embrapa, Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, 2004.
16. Mota, F.O.B.; Oliveira, J.B.; *R. Bras. Ci. Solo* **1999**, 23, 799.
17. Lopes, R.J.; *Rev. Pesquisa Fapesp* **2008**, 151, 53.
18. <http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portugues/CLVNFerrico.htm>, acessado em setembro de 2015.
19. <http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portugues/CLVAmarelo.htm>, acessado em setembro de 2015.
20. Castro, A.A.J.F.; Martins, F.R.; Tamashiro, J.Y.; Shepherd, G.J.; *Ann. Missouri. Bot. Gard.* **1999**, 86, 192

21. Coutinho, L.M.; *Rev. Brasil. Bot.* **1978**, *1*, 17.
22. Ribeiro, J.F.; Walter, B.M.T; *Fitofisionimias do bioma do cerrado: os biomas do Brasil*. Em: *Cerrado: ambiente e flora*, Embrapa, Planaltina, DF, pág. 89-116, 1998.
23. Felfili, J.M.; Nogueira, P.E.; Silva Júnior, M.C.S.; Marimon, B.S.; Delitti, W.B.C.; *Acta Botânica Brasileira* **2002**, *16*, 103.
24. Furtado, R.F.; Lima, M.G.A.; Andrade Neto, M.; Bezerra, J.N.S.; Silva, M.G.V.; *Neotrop Entomol.* **2005**, *34*, 843.
25. Wannas, W.A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M.B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M.E.; Marzouk, B.; *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1362.
26. Mendes, S.S.; Bomfim, R.R.; Jesus, H.C.R.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Estevam, C.S.; Antonioli, A.R.; Thomazzi, S.M.; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *129*, 391.
27. Carmo, E.S.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 362.
28. da Silva, S.L.; Chaar, J.S.; Figueiredo, P.M.S.; Yano, T.; *Acta Amaz.* **2008**, *38*, 107.
29. Mann, R.S.; Kaufman, P.E.; *Mini-Rev. Org. Chem.* **2012**, *9*, 185.
30. Coutinho, R. L. B. C.; Oliveira, J. V.; Gondim Junior, M. G. C.; Câmara, C. A. G.; *Ciênc. Agrotec.* **2011**, *35*, 172.
31. Ketoh, G.K.; Koumaglo, H.K.; Glitho, I.A.; *J. Stored Produc. Resea.* **2005**, *41*, 363.
32. Corrêa, J.C.R.; Salgado, H.R.N.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2011**, *13*, 500.
33. Novaes, P.; Molinillo, J.M.G.; Varela, R.M.; Macías, F.A.; *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 839.
34. Prates, H.T.; Santos, J.P.; *Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados*, Em: Lorini, I.; Miike, L.H.; Scussel, V.M. (Ed.). *Armazenagem de Grãos*, Campinas: IBG, 2002, cap. 7.3, p. 443-461.
35. Knaak, N.; Fiuza, L.M.; *Neotropical. Biol. Conserv.* **2010**, *5*, 120.
36. <http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>, acessado em setembro de 2015.
37. Neto, P.A.S.P.; Caetano, L.C.; *Plantas medicinais do popular ao científico*, edufal, UFAL, Maceió, AL, 2005.
38. Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G.; *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., (eds); American Society of Plant Physiologists, Califórnia, EUA, 2009, cap. 24, pág. 1250-1318.
39. Pichersky, E.; Noei, J.P.; Dudareva, N.; *Science* **2006**, *311*, 808.
40. García, A.A.; Carril, E.P.U.; *Rev. Reduca (Biolog.)* **2009**, *2*, 119.
41. González, L.S.; Vargas, M.; Martínez, C.G.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; *Food Eng. Rev.* **2011**, *3*, 1.
42. Maffei, M.E.; *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*, 612.

43. Nerio, L.S.; Verbel, J.O.; Stashenko, E.; *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 372.
44. Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Ortoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Gavin, C.L., Adams, T.B.; *Food and Chem. Toxicology*, **2005**, *43*, 345.
45. Morais, L.A.S.; *Horticultura Brasileira*, **2009**, *27*, 4050.
46. Dzubak,P; Hajduch,M.; Vydra, D.; Hustova,A.; Kvasnica,M.; Biedermann, D.; *Nat. Prod. Rep.* **2006**; *23*, 394.
47. Wink, M.; *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. In: *Annual Plant Reviews*, vol. 2, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK,1999
48. Rattan, R. S.; *Crop. Protec.* **2010**, *29*, 913.
49. Dewick,P.M.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd, 2ª Ed.,Chichester, UK, 2002.
50. Goto, T.; Takahashi, N.; Hirai, S.; Kawada, T.; *PPAR Resea.* **2010**, 2010,1
51. Withers, S.T.; Keasling, J.D.; *Applied Microbiol. Biotechn.* **2007**, *73*, 980.
52. Bizzo, H.R.; Hovell, A.M. C.; Rezende, C.M.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 588.
53. Santos, A.S.; Alves, S.M.; Figueiredo, F.J.C.; Rocha Neto, O.G.; *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratórios*, Comunicado Técnico, Embrapa, Belém, Pará, 2004.
54. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.
55. Borsato, A.V.; Doni-Filho, L.; Côcco, L.C.; Paglia, E.C.; *Semina: Ciências Agrárias* **2008**, *29*, 129.
56. Koketsu, M.; Gonçalves, S.L.; *Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor*, Embrapa- CTAA, Rio de Janeiro, RJ, 1991.
57. Chassagnez, A.L.M.; Corrêa, N.C.F.; Meireles, M.A.A.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1997**, *17*, 399.
58. Silveira, J.C.; Busato, N.V.; Costa, A.O.S.; Costa Junior, E.F.; *Enciclopédia Biosfera/Centro Científico Conhecer* **2012**, *8*, 2038.
59. Vitti, A.M.S.; Brito, J.O.; *Óleo Essencial de Eucalipto*, Documentos Florestais, Nº17, USP, São Paulo , SP, 2003.
60. da Silva, D.D.; Chierice, G.O.; Galhiane, M.S.; Chaar, J.S.; Mouchrek-Filho, V.E.; *Quím. Nova* **2003**, *26*, 461.
61. Luz, J.M.Q.; Morais, T.P.S.; Blank, A.F.; Sodr e, A.C.B.; Oliveira, G.S.; *Hortic. Bras.* **2009**, *27*, 349.
62. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 374.
63. Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R.; *Food Chem.* **2005**, *91*, 621.

64. Penuelas, J.; Munne-Bosch, S.; *Trends Plant Scienc.* **2005**, *10*, 166.
65. Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P.; *J. Stored Prod. Res.* **2003**, *39*, 21.
66. Beckel, H.S., Lorini, I.; Lazzari, S.M.N.; *Rev. Bras. Entomol.* **2006**, *50*, 110.
67. Abbassy, M.A.; Abdelgaleil, S.A.M.; Rabie, R.Y.A.; *Entomol. Exp. Appl.* **2009**, *131*, 225.
68. Ipek, E.; Zeytinoglu, H.; Okay, S.; Tuylu, B.A.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; *Food Chem.* **2005**, *93*, 551.
69. Santana-Rios, G.; Orner, G.A.; Amantana, A.; Provost, C.; Wu, S.Y.; Dashwood, R.H.; *Mutat. Res.* **2001**, *495*, 61.
70. Cal, K.; *Planta Med.* **2006**, *72*, 311.
71. Savelev, S.; Okello, E.; Perry, N.S.L.; Wilkins, R.M.; Perry, E.K.; *Pharmacol. Biochem. Be.* **2003**, *75*, 661.
72. Thacker, J. R. M.; *An introduction to Arthropod Pest Control*, 1^a Ed., Cambridge University Press: London, UK, 2002.
73. Ware, G.W.; Whitacre, D.M.; *The Pesticide Book - History of Pesticides*, 6th Ed.; Meister Publication, 2004, pág. 335. Em: Jardim, I.C.S.; Andrade, J.A.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 996.
74. Tunaz, H.; Uygun, N.; *Turk J. Agric For.* **2004**, *28*, 377.
75. Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; da Costa, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 159.
76. Júnior, C. V.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 390.
77. Nasuti, C.; Cantalamessa, F.; Falcioni, G.; Gabbianelli, R.; *Toxicology* **2003**, *191*, 233.
78. Spencer, C.I.; Yuill, K. H.; Borg, J.J.; Hancox, J.C.; Kozlowski, R.Z.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 1067.
79. Chen, Z.M.; Wang, Y.H.; *J. Chromatgr. A* **1996**, *754*, 367.
80. Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G.R.; *Alim. Nutr. Araraguara* **2007**, *18*, 339.
81. Ho, S.H.; Wang, J.; Sim, K.Y.; Ee, G.C.L.; Imiyabir, Z.; Yap, K. F.; Shaari, K.; Goh, S. *Phytochem.* **2003**, *62*, 1121.
82. Martens, S.; Mithöfer, A.; *Phytochem.* **2005**, *66*, 2399.
83. Williams, R.J.; Spencer, J.P.E.; Evans, C.R.; *Free Radical Bio. Med.* **2004**, *36*, 838.
84. Roberts, M.F.; Wink, M.; *Alkaloids – Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, Plenum Press, New York and London, 1998.
85. Evans, W.C.; *Trease Evans Farmacognesia*, 13th ed., interamericana, Mc Graw Hill, México, 1991.

86. Kokate, C.K.; Purohit, A.P.; Gokhale, S.B.; *Pharmacognosy*, 42th ed.; Nirali Prakashan, New Delhi, India, 2008.
87. Zacharia, J. T.; *Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, INTECH open Access Publisher, 2011.
88. Raymond-Delpch, V.; Matsuda, K.; Sattelle, B. M.; Rauh, J. J.; Sattelle, D. B.; *Invert. Neurosci.* **2005**, *5*, 119.
89. Sato, M.E.; da Silva, M.Z.; Cangani, K.G.; Raga, A.; *Bragantia* **2007**, *66*, 89.
90. Sato, M.E.; Silva, M. da; Raga, A.; Souza, M.F.; *Neotrop. Entomol.* **2005**, *34*, 991
91. Esteves Filho, A.B.; Oliveira, J.V.; Matos, C.H.C.; *Rev. Bras. Ciênc. Agrar.* **2013**, *8*, 583.
92. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em agosto de 2015.
93. Isman, M.B., *Crop Protection* **2000**, *19*, 603.
94. Ootani, M.A.; Aguiar, R.W.; Ramos, A.C.C.; Brito, D.R.; Da Silva, J.B.; Cajazeira, J.P.; *J. Biotechnol. Biodiversit.* **2013**, *4*, 162.
95. Lima, H.R.P.; Kaplan, M.A.C.; Cruz, A.V.M.; *Floresta e Ambiente*, **2003**, *10*, 71.
96. Tripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R.; *J. Pharm. Phytother.* **2009**, *1*, 52.
97. Chagas, A.C.S.; Passos, W.M.; Prates, H.T.; Leite, R.C.; Furlong, J.; Fortes, I.C.P.; *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, **2002**, *39*, 247.
98. Nukenine, E.N.; Adler, C.; Reichmuth, C.; *J. Appl. Entomol.* **2010**, *134*, 132.
99. Paes, J.L.; Faroni, L.R.D'A.; Dhingra, O.D.; Cecon, P.R.; Silva, T.A.; *Crop Prot.* **2012**, *34*, 56.
100. Lima, H.R.P.; Kaplan, M.A.C.; Cruz, A.V.M.; *Floresta e Ambiente*, **2003**, *10*, 71.
101. Tripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R.; *J. Pharm. Phytother.* **2009**, *1*, 52.
102. Enan, E.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **2001**, *130*, 325.
103. Kostyukovsky, M.; Rafaeli, A.; Gileadi, C.; Demchenko, N.; Shaaya, E.; *Pest Manag. Sci.* **2002**, *58*, 1101.
104. Vieira, M.R.; Sacramento, L.V.S.; Furlan, L.O.; Figueira, J.C.; Rocha, A.B.O.; *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu* **2006**, *8*, 210.
105. Baylac, S.; Racine, P.; *Int. J. Aromather.* **2003**, *13*, 138.
106. Lourens, A.C.; Reddy, D.; Baser, K.H.; Viljoen, A.M.; Van Vuuren, S.F.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 253.
107. Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 204.

108. Cascon ,V.; Gilbert, B.; *Phytochem.* **2000**, *55*, 773.
109. Sabulal, B.; Dan, M.; Anil, J.A.; Kurup, R.; Pradeep, N.S.; Valsamma, R.K.; Varughese, G.; *Phytochem.* **2006**, *67*, 2469.
110. Corey, E.J.; Mitra, R.B.; Uda, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 485.
111. Larionov, O.V.; Corey, E.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2954.
112. Moraes, G.J.; Flechtmann, C.H.W.; *Manual de Acarologia: Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil*, Holos: Ribeirão Preto, Brasil, 2008.
113. Quintela, E.D.; *Manual de Identificação dos Insetos e Invertebrados: Pragas do Feijoeiro*, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2002.
114. http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/acaro-do-morangueiro_2805.html, acessado em setembro de 2015.
115. Souza Filho, M.F.; Suplicy Filho, N.; Sato, M.E.; Takematsu, A.P.; *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília **1994**, *29*, 1187.
116. Gallo, D.; Nakano O.; Neto, S. S.; Carvalho, R. P. L.; De Baptista, G. C.; Filho, E. B.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C.; *Entomologia Agrícola*. FEALQ: Piracicaba, 2002.
117. http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/acaro-rajado_126.html, acessado em setembro de 2015.
118. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/pragas.htm>, acessado em setembro de 2015.
119. Peixoto, M.F.; Barbosa, R.V.; Oliveira, R.R.C.; Fernandes, P.M.; Costa, R.B.; *Biosci. J. Uberlândia* **2009**, *25*, 24.
120. Kato, W.Y.; Motta, R.; Raizer, A.J.; Silva, J.M.; Takaoka, M.; Mariconi, F.A.M.; *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"* **1985**, *42*, 599.
121. Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Nava, D.E.; Garcia, M.S.; *Bioecologia, monitoramento e controle do ácaro-rajado com o emprego da azadiractina e ácaros predadores na cultura do morangueiro*, Circular Técnica 83, Embrapa, Bento Gonçalves, RS, 2010.
122. Silva, M.A., Parra, J.R.P.; Chiavegato, L.G.; *Pesqu. Agropecu. Bras.* **1985**, *20*, 7.
123. Guimarães, J.A.; Michereff Filho, M.; Graciano, F.A.M.; Junqueira, A.M.R.; Setti de Liz, R.; *Ácaros Predadores no Manejo do Ácaro Rajado em Morangueiro no Distrito Federal*, Comunicado Técnico, Embrapa , Brasília, DF, 2010.
124. Machi, A.R.; Araújo, R.V.; Morais, G.J.; Arthur, V.; *Bol. San. Veg. Plagas* **2012**, *38*, 17.
125. Lima, M.E.L., Cordeiro, I.; Young, M.C.M.; Sobra, M.E.G.; Moreno, P. R. H.; *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 589.
126. Landrum, L.R.; Kawasaki, M.L.; *Brittonia* **1997**, *49*, 508.
127. Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, L.P.C.; *Rev. Bras. Bot.* **2006**, *29*,509.
128. Arantes, A.A.; Monteiro, R.; *Lundiana* **2002**, *3*, 111.

129. Guilherme, F.A.G.; Morellato, L.P.C.; Assis, M.A.; *Rev. Bras. Bot.* **2004**, *27*, 725.
130. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>, acessado em dezembro de 2015.
131. Myers, N; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J.; *Nature* **2000**, *403*, 853.
132. Lorenço, A.R.; Barbosa, M.R.V.; *Rodriguésia* **2012**, *63*, 373.
133. Cruz, A.V.M.; Kaplan, M.A.C.; *Floresta e Ambiente* **2004**, *11*, 47.
134. Hagerman, A.E.; Riedl, K.M.; Jones, G.A.; Sovik, K.N.; Ritchard, N.T.; Hartzfeld, P.W.; Riechel, T.L.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1887.
135. França, H.S.; Kuster, R.M.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 1103.
136. Braga, R. *Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará*, 2ª Ed., UFC, Fortaleza, Brasil, 1960.
137. Matos, F.J.A.; *Farmácias Vivas*, 3ª Ed., EUFC, Fortaleza, Brasil, 1988.
138. Corrêa, P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, Brasil, 1984.
139. Doran, J. C.; Caruhapattana, B.; Namsavat, S.; *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 627.
140. Guenther, E.; *The Essential Oils*; 4º vol., Ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, EUA, 1952.
141. Roulier, G. *Les Huiles Essentielles Pour Votre Santé*; Éditions Dangles, St-Jean-de-Braye, France, 1990.
142. Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; Alencar, J.W.; Machado, M.I.L.; Teixeira, L.L.; *Quím. Industrial* **1989**, *2*, 60.
143. Limberger, P.R.; Sobral, M.; Henriques, A.T.; Menut, C.; Bessière, J.M.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 916.
144. Vallilo, M.I.; Lamardo, L.C.; Gaberlotti, M.L.; De Oliveira E.; Moreno, P.R.H.; *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 805.
145. Auricchio, T.; Bacchi, M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2003**, *62*, 55.
146. de Oliveira, R.N.; Dias, I.J.M.; Câmara, C.A.G., *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 39.
147. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>, acessado em setembro de 2015.
148. Lunardi, I.; Peixoto, J.L.B.; da Silva, C.C.; Shuquel, I.T.A.; Basso, E.A.; Vidotti, G.J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 180.
149. Carvalho Júnior, A.R.; Gomes, G.E.; Ferreira, R.O.; de Carvalho M. G.; *Quím. Nova* **2014**, *37*, 477.

150. Stefanello, M.E.A.; Pascoal, A.C.R.F.; Salvador, M.J.; *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 73.
151. Alcântara, J.M.; Yamaguchi, K.K.L.; Silva, J.R.A.; Veiga Junior, V.F.; *Acta Amazonica* **2010**, *40*, 567.
152. Fiuza, T.S.; Rezende, M.H.; Sabóia-Morais, S.M.T.; Bara, M.T.F.; Tresvenzol, L.M.F.; de Paula, J.R.; *Rev. Eletrônica de Farmácia* **2008**, *V*, 1.
153. Silva, R.S.M.; Chaves, L.J.; Naves, R.V.; *Ver. Bras. Frutic.* **2001**, *23*, 330.
154. Sousa, J.S.I.; Peixoto, A.M.; de Toledo, F.F.; Reichardt, K.; *Enciclopédia Agrícola Brasileira*, Vol. 2 C-D, Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998, pág. 59.
155. <http://cidadaoecologicobrasiliense.files.wordpress.com/2011/05/lei-df-14783-93-tombamento-de-espc3a9cies-de-c3a1rvores-do-df.pdf>, acessado em setembro de 2015.
156. Santos, P.R.G.; Cardoso, L.M.; Bedetti, S.F.; Hamacek, F.R.; Moreira, A.V.B.; Martino, H.S.D.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2012**, *71*, 281.
157. Cardoso, L.M.; Martino, H.S.D.; Moreira, A.V.B.; Ribeiro, S.M.R.; Sant'ana, H.M.P., *Food Res Int.* **2011**, *44*, 2151.
158. Mazuti-Silva, S.M.; Gasca-Silva, C. A.; Fonseca-Bazzo, Y.M.; Magalhães, P.O.; Silveira, D.; *Infarma – Ciênc. Farm.* **2015**, *27*, 49.
159. <https://www.petitgastro.com.br/gastronomia-brasileira-ingredientes-tipicos-tucupi-jambu-e-cagaita/>, acessado em setembro de 2015.
160. Duarte, A.R.; Naves, R.R.; Santos, S.C.; Seraphin, J.C.; Ferri, P.H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 967.
161. <http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/5858.htm>, acessado em setembro de 2015.
162. Spínola, C.M.; Bechara, F.C.; Barretto, K.D.; *Rev. Bras. Biociên.* **2007**, *5*, 378.
163. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>, acessado em setembro de 2015.
164. Martius, K.F.P.V.; Eichler, A.W.; Endlicher, I.L.; Fenzl, E.; Mary, B.; Oldenburg, R.; Urban, I.; *Flora Brasiliensis – Enumeratio Plantarum, in Brasilia Hactenus Detectarum*, vol. 14, Part. 1, Monachii et Lipsiae, R. Oldenburg, 1840-1906, Cap. 7, pág. 568-569,
165. de Moraes, M.M.; Camara, C.A.G.; Dos Santos, M.L.; Fagg, C.W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1647.
166. Martius, K.F.P.V.; Eichler, A.W.; Endlicher, I.L.; Fenzl, E.; Mary, B.; Oldenburg, R.; Urban, I.; *Flora Brasiliensis – Enumeratio Plantarum. Em: Brasilia Hactenus Detectarum*, vol. 14, Part. 1, Monachii et Lipsiae, R. Oldenburg, 1840-1906, Cap. 7, pág. 308.
167. <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/10782741264>, acessado em setembro de 2015.
168. <http://www.colecionandofrutas.org/eugenialutescens.htm>, acessado em setembro de 2015.
169. Van Den Dool, E.; Kratz, P.A.; *J. of Chromatogr. Scienc.* **1963**, *11*, 463.

170. Adams, R.P.; *Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, EUA, 1995.
171. Pontes, W.J.T.;Oliveira, J.C.S.; Câmara, C.A.G.; Lopes, A.C.H.R.; Godim Junior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Barros, R.; Schwartz, M.O.E.; *Acta Amazonica* **2007**, 37, 103.
172. Mingoti, S.A.; *Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: Uma Abordagem Aplicada*, UFMG, Belo Horizonte, MG, 2007.
173. Leora, *POLO-PC: An user's guide to Probit or Logit analysis*, LeOra Software, Berkely, CA, 1987.
174. Robertson, J. L.; Preisler, H. K.; *Pesticide Bioassays with Arthropods*, CRC Press: California, 1992.
175. SAS Institute. SAS, *User's Guide: Statistics, Version 9.0*, 7th Ed., SAS Institute, Cary, NC, 2002.
176. Armarego, W.L.F.; Perrin, D.D.; *Purification of laboratory chemicals*. 4ª Ed. 2000.
177. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), em <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>, acessado em Setembro de 2014.
178. de Oliveira, A.R.M.F.; Jezler, C.N.; Oliveira, R.A.; Costa, L.C.B.; *Rev. Ceres* **2012**, 59, 241.
179. Srivastava, R.K.; Singh, A.K.; Kalra, A.; Tomar, V.K.S.; Bansal, R.P.; Patra, D.D.; Chand, S.; Naqvi, A.A.; Sharma, S.; Kumar, S.; *Ind. Crop. Prod.* **2002**, 15, 189.
180. El-Sawi, S.A.; Mohamed, M.A.; *Food Chem.* **2002**, 77, 75.
181. Campos, P. M.; Lacerda, M. P. C.; Da Silva, C. L.; De Sá, M. A. C.; De Sousa, D. M. G.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2010**, 45, 306.
182. Santos, R.F.; Carlesso, R.; *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* **1998**, 2, 287.
183. Goedert, W.J.; *J. Soil Scien.* **1983**, 34, 405.
184. Ivanauskas, N.M.; Monteiro, R.; Rodrigues, R. R.; *Acta Amaz.* **2008**, 38, 387.
185. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.; *Quím. Nova* **2007**, 30, 374.
186. Lopes, A.S.; Guilherme, L.A.G.; *Solos do Cerrado: Manejo da Fertilidade para a Produção Agropecuária*, 2ª Ed., São Paulo, ANDA, Boletim Técnico nº5, 1994.
187. Wolf, J.M.; *Pesq. Agropec. Bras.*, **1977**, 12, 141.
188. Apel, M. A.; Limberger, R. P.; Sobral, M.; Ntalani, H.; Verin, P.; Menut, C.; Bessiere, J. M.; Henriques, A. T.; *J. Essent. Oil Res.* **2002**, 14, 259
189. Defaveri, A. C. A.; Sato, A.; Borré, L. B.; Aguiar, D. L. M.; San-Gil, R. A. S.; Arruda, R. C. O.; Riehl, C. A. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 1531.
190. Stefanello, M. E. A.; Wisniewski-Junior, A.; Simionatto, E. L.; Cervi, A. C.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, 28, 449.

191. Ahmad, M.; Arif, M. I.; Ahmad, Z.; *J. Econ. Entomol.* **1995**, *88*, 771.
192. Çalmaşur, Ö; Aslan İ.; Şahin, F.; *Industrial Crops Produc.* **2006**, *23*, 140.
193. Neves, I.A.; da Camara, C.A.G.; Oliveira, J.C.S.; de Almeida, A.V.; *J. Essent. Oil Res.* **2011**, *23*, 23.
194. Pontes, W.J.T.; Oliveira, J.C.S.; da Camara, C.A.G.; Gondim-Júnior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Schwartz, M.O.E.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 838.
195. Pontes, W.J.T.; Silva, J.M.O.; da Camara, C.A.G.; Gondim-Júnior, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Schwartz, M.O.E.; *Essential Oil Reser.* **2010**, *22*, 279.
196. Williams, C.M.; Mander, L.N.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 425.
197. Silva, C.M.; Bolzan, A.A.; Mallmann, C.A.; Pozzatti, P.; Alves, S.H.; Heinsmann, B.M.; *Braz. J. Pharmacog.* **2010**, *20*, 87.
198. Andreão, P.S.S.; Giacomini, A.; Stumbo, A.M.; Waldman, W.R.; Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* **2010**, *33*, 212.
199. Shirahama, H.; Osawa, E., Chabra, B.R.; Shimokawa T.; Yokono T.; Kanaiwa T.; Amiya T.; Matsumoto, T.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1527.
200. Clericuzio, M.; Alagona, G.; Ghio, C.; Toma, L.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6910.
201. Hinkley, S.F.R.; Perry, N.B.; Weavers, R.T.; *Phytochem.* **1994**, *35*, 1489.
202. Barrero, A.F.; Molina, J.; Oltra, J.E.; Altarejos, J.; Barragán, A.; Lara, A.; Segura, M.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3813.
203. Rocha, K.A.S.; Rodrigues, N.V.S.; Kozhevnikov, I.V.; Gusevskaya, E.V.; *Appl. Catal. A-Gen.* **2010**, *374*, 87.
204. Reina, M.; Nold, M.; Santana, O.; Orihuela, J.C.; González-Coloma, A; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 448.
205. Chaves, M.C.O.; Santos, B.V.O; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 547.
206. Sharpless, K.B.; Amberg, W.; Bennani, Y.L.; Crispino, G.A.; Hartung, J.; Jeong, K.S.; Kwong, H.L.; Morikawa, K.; Wang, Z.M.; Xu, D.; Zhang, X.L.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768
207. Kolb, H.C.; VanNieuwenhze, M.S.; Sharpless, K.B.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
208. Collado, I, G.; Hanson, J.R.; Hitchcock, P.B.; Macías-Sanchez, A.J.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1965.
209. Lee, K.H.; Choi, S.U.; Lee, K.R.; *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 280.
210. Geletneky, C.; Berger, S.; *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *13*, 1625.
211. Oliveira, A.R.M.; Wosch, C.L.; *Quím. Nova* **2012**, *35*, 1482.
212. Criegee, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 745.

213. Winterhalter, R.; Herrmann, F.; Kanawati, B.; Nguyen, T.L.; Peeters, J.; Vereecken, L.; Moortgat, G.K.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4152.
214. Nguyen, T.L.; Winterhalter, R.; Moortgat, G.; Kanawati, B.; Peeters, J.; Vereecken, L.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4173.
215. Parshintsev, J; Nurmi, J.; Kilpeläinen, I.; Hartonen, K.; Kulmala, M.; Riekkola, M.L.; *Anal Bioanal Chem.* **2008**, *390*, 913.
216. Eijck, A.V.; Opatz, T.; Taraborrelli, D.; Sander, R.; Hoffmann, T.; *Atmos. Environ.* **2013**, *80*, 122.

Anexos



Anexo 1. Laudo da análise de solo feita pela empresa Nativa LTDA do mix dos solos onde se encontram as espécies de *Eugenia* deste estudo.



NATIVA LABORATÓRIO DE ANÁLISES AGRÍCOLAS LTDA -ME
 Avenida Lagoa Feia, Nº. 380, 1º Andar - Formosinha.
 CEP: 73.813.370 - Formosa/GO
 Fone/Fax: (61) 3642-3097 / (61) 9666-7259
 www.nativaagricola.com.br - e-mail: rafael@nativaagricola.com.br

Laudo de Análise de Solo

Solicitante: PAULO HENRIQUE SILVA RIBEIRO	Data: 23/04/2014
Proprietário: PAULO HENRIQUE SILVA RIBEIRO	Telefone:
Propriedade: FAZ. NÃO INFORMADA	Convênio:
Município: PLANALTINA - DF	Laudo Nº: 429/2014
Amostra: AMOSTRA 01	Cultura: null

Resultados da Análise Química:

pH CaCl ₂ 1 : 2,5	P resina	P meh ⁻¹ mg dm ⁻³	K	S	K	Ca	Mg	Al	H + Al	M.O. dag kg ⁻¹
4,9	6,38	1,28	146	9	0,37	1,06	0,34	0,20	5,60	3,6

SB	t	T	V %	m	Relação entre bases:				Relação entre bases e T (%):					
					Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/T	Mg/T	K/T	H+Al/T	Ca+Mg/T	Ca+Mg/K/T
1,77	1,97	7,40	23,9	10,2	3,1	2,9	0,9	3,8	14,3	4,6	5,0	75,7	18,9	23,9

B	Cu	Fe	Mn	Zn
0,08	1,46	84	10,1	1,11

Extratores:

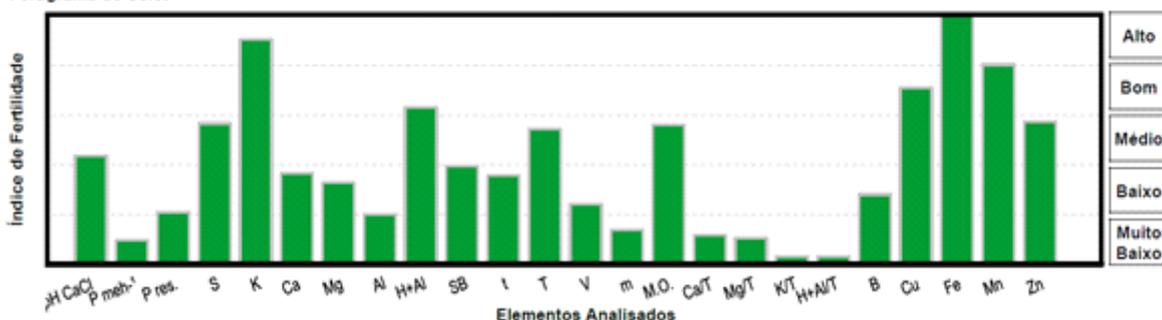
ns = Não Solicitado | SB = Soma de Bases | t = CTC Efetiva | T = CTC pH 7,0
 V = Sat. Base | m = Sat. Alumínio | pH CaCl₂ 2H₂O 0,01 mol L⁻¹;
 P,K,Na = [HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹];
 S-SO₄²⁻ = [Fosfato Monobásico Cálcio 0,01 mol L⁻¹];
 Ca,Mg,Al = [KCL 1 mol L⁻¹]; H+Al = [Solução Tampão SMP a pH 7,5];
 B = [BaCl₂ 2H₂O 0,125% à quente];
 Cu,Fe,Mn,Zn = [DTPA 0,005 mol L⁻¹] + TEA 0,1 mol⁻¹ + CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ a pH 7,3;
 Si = [CaCl₂ 2H₂O 0,01 mol⁻¹];
 cmolc dm⁻³ x 10 = mmolc dm⁻³, mg dm⁻³ = ppm, dag kg⁻¹ = %;
 Gráfico de P meh -1 depende da análise granulométrica (vide tabela abaixo).

Resultados da Análise Textura:

Areia	Silte	Argila
181	152	667

Textura Muito Argilosa

Fertigrama do Solo:

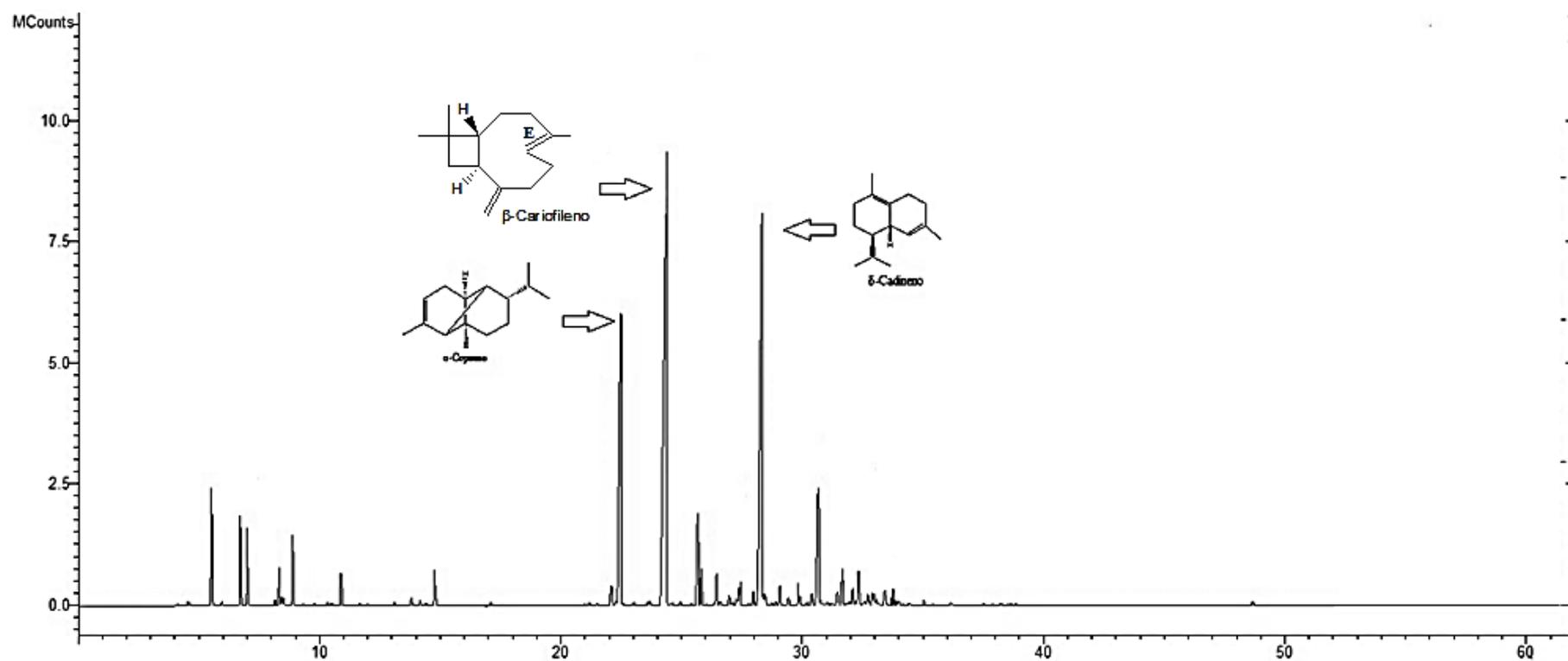


Observações:

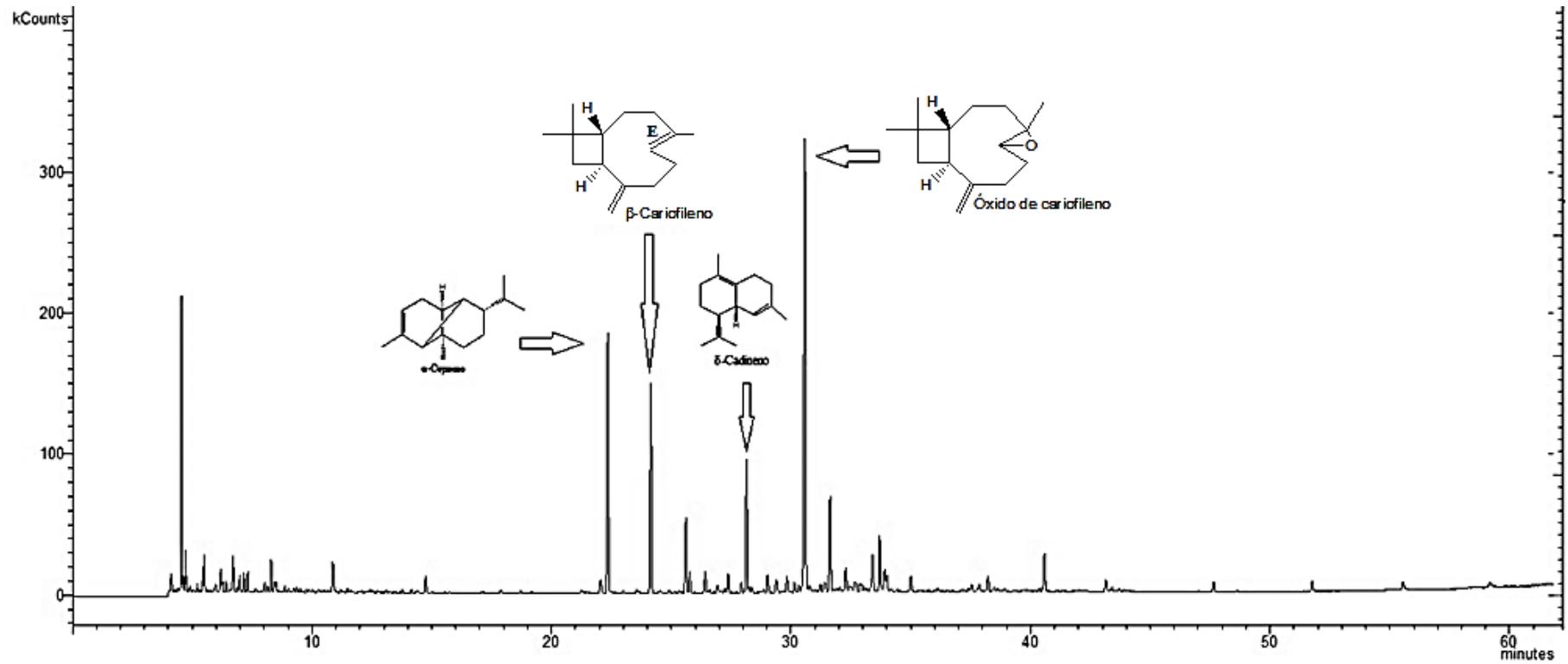
Gráfico de P meh -1 depende da análise granulométrica (vide tabela acima).
 A interpretação de Al, H+Al, m e H+Al/T lê-se Alto e Muito Alto no lugar de Bom e Muito Bom.
 Fertigrama apresentado como mera sugestão ilustrativa.
 O laboratório não responsabiliza por interpretações dos resultados das análises.
 Este laudo não tem fins jurídicos.

Edilton Silva da Mota
 Responsável Técnico
 CRQ: 12400195

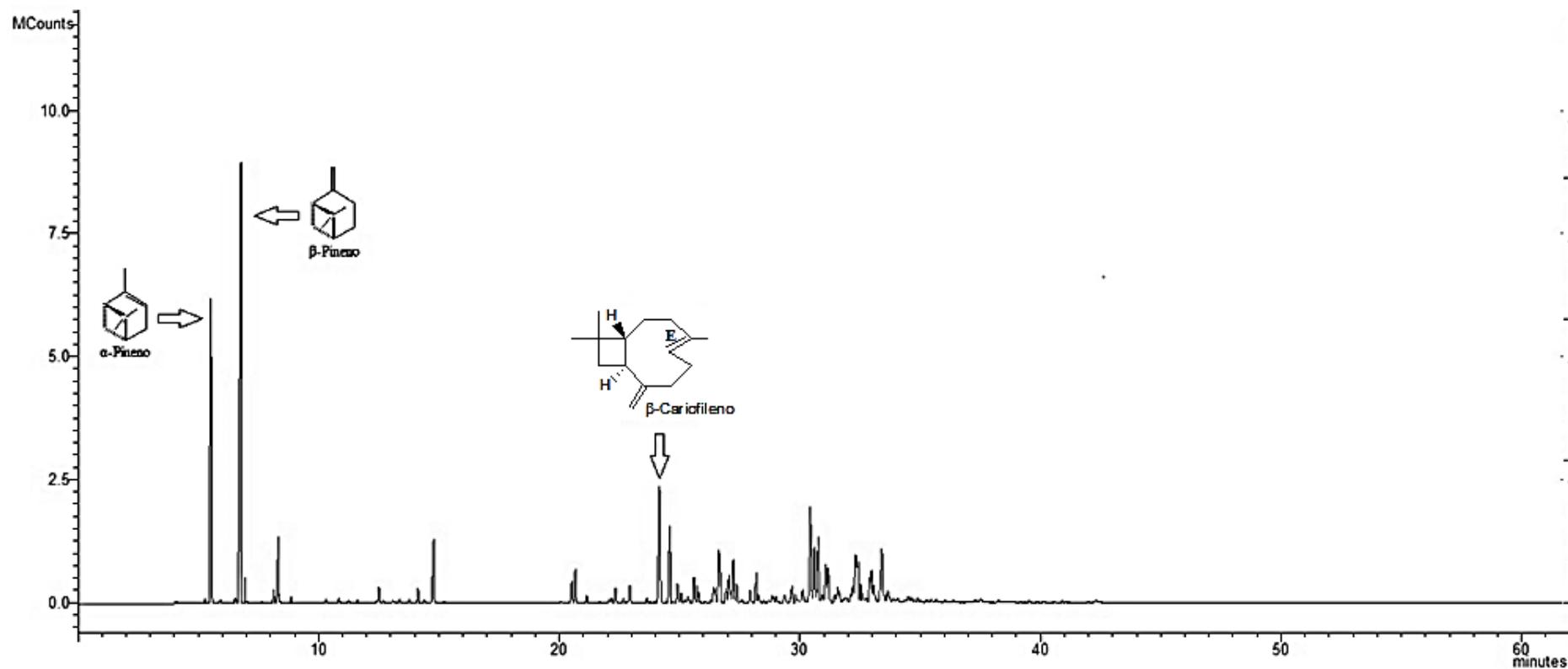
Anexo 2. Perfil cromatográfico (dados resumidos da técnica, CG-EM) do OE das folhas de *E. dysenterica* (PC/2012).



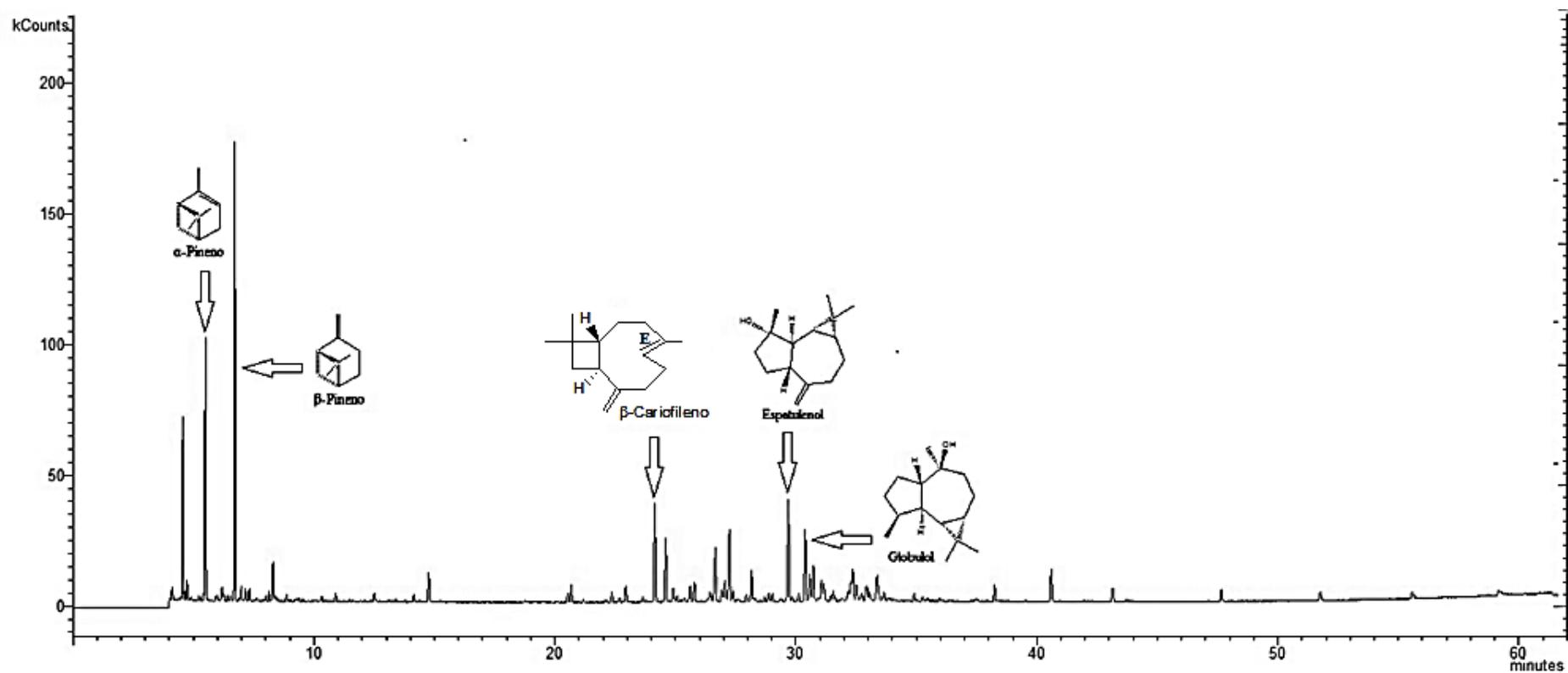
Anexo 3. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. dysenterica* (PS/2012).



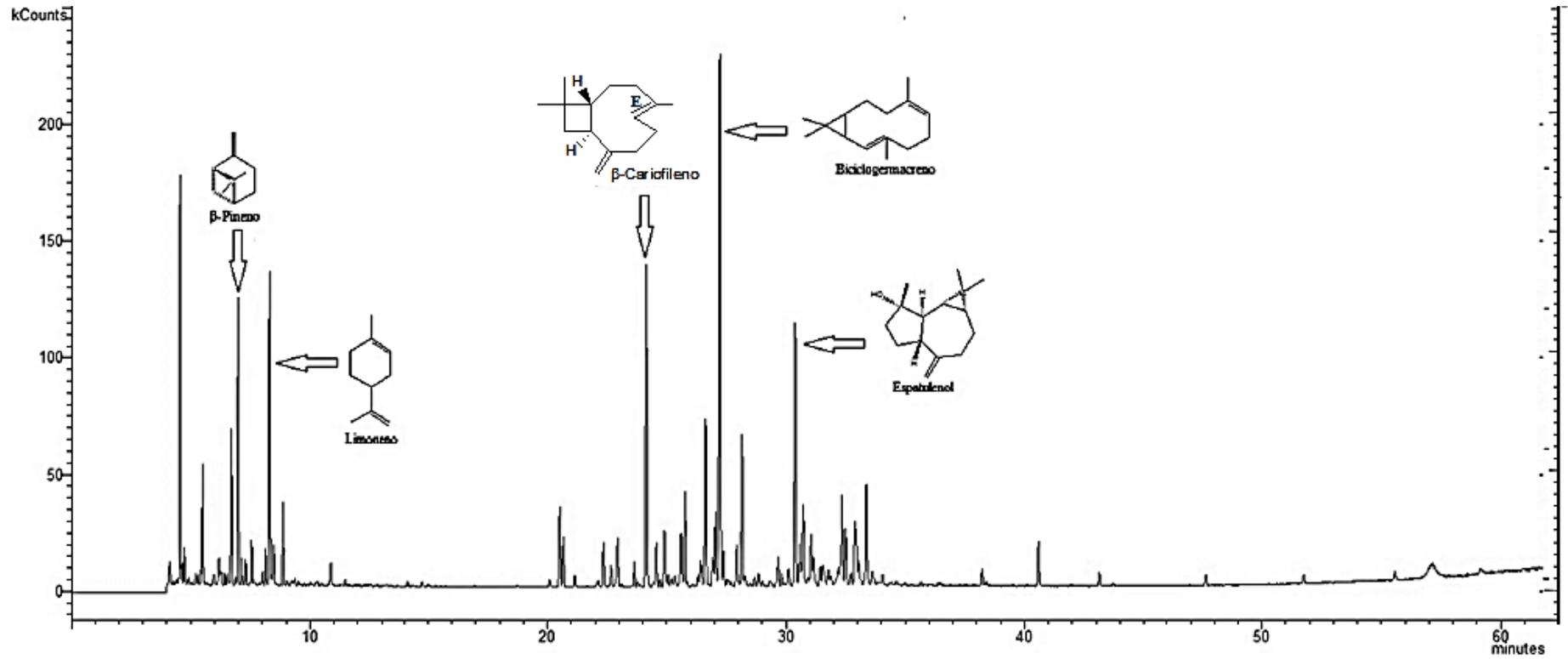
Anexo 4. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. lutescens* (PC/2012).



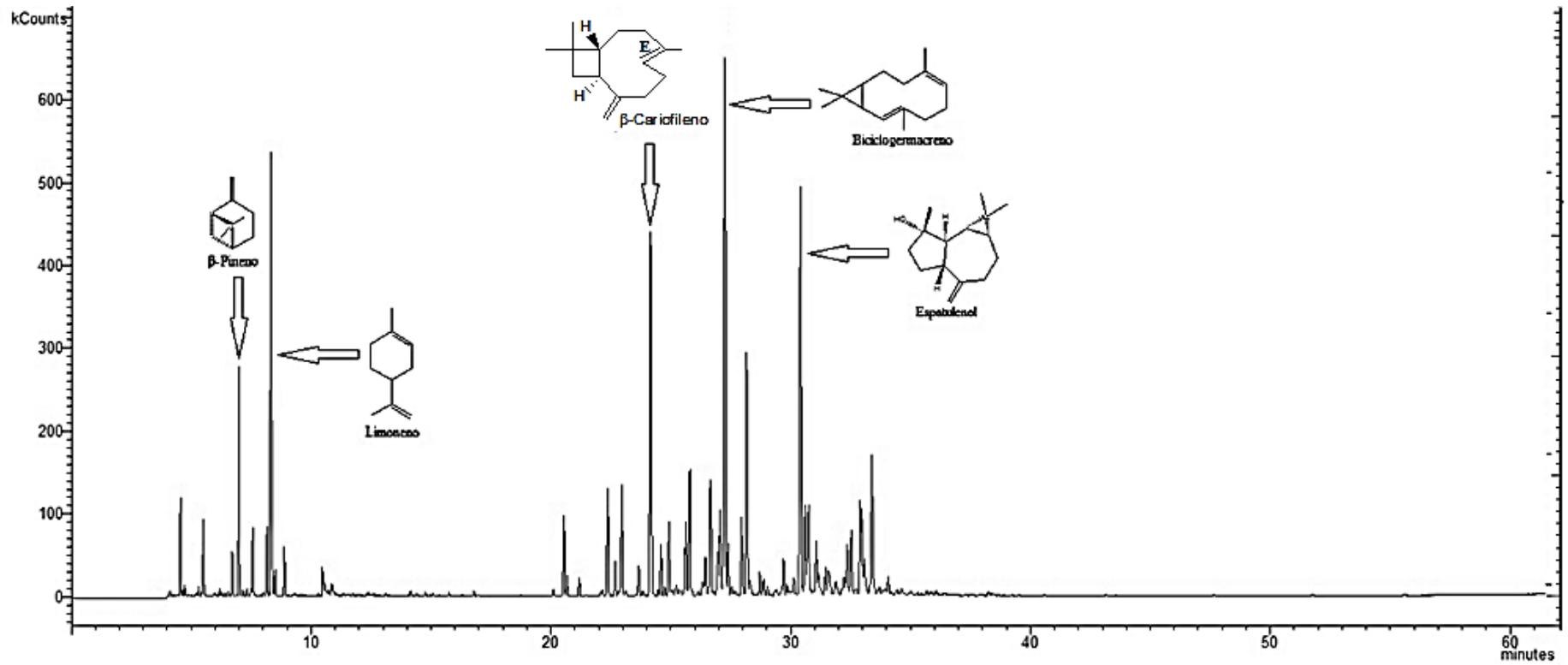
Anexo 5. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. lutescens* (PS/2012).



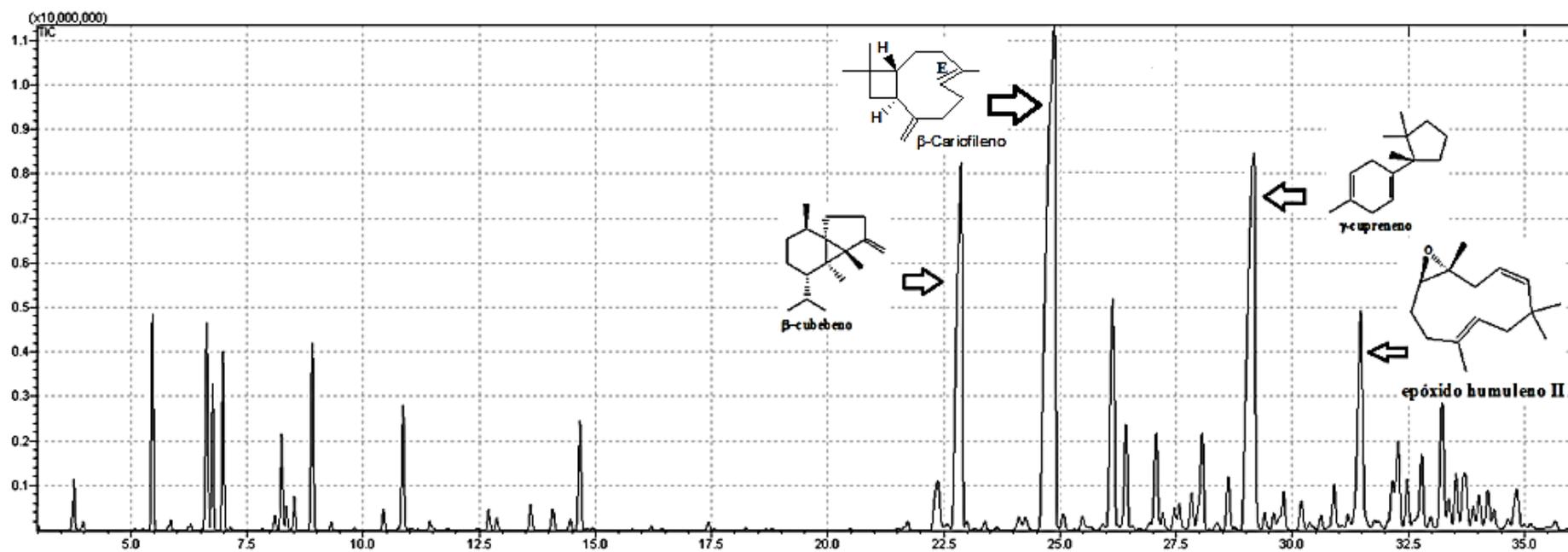
Anexo 6. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. langsdorffii* (PC/2012).



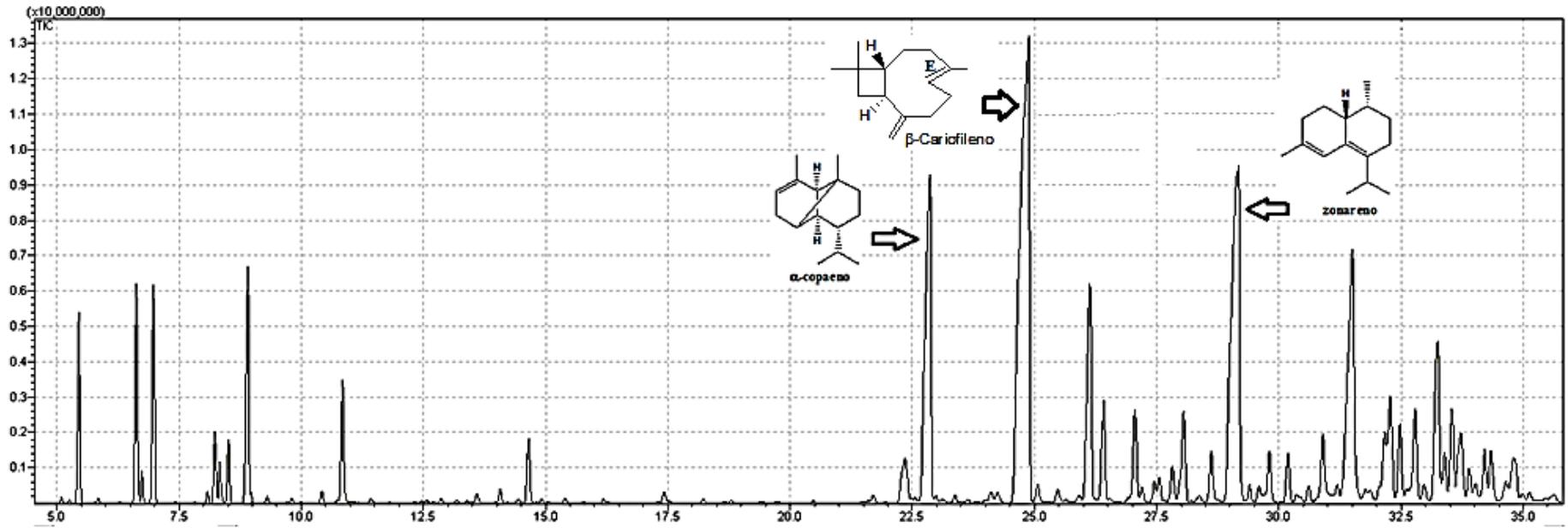
Anexo 7. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. langsdorffii* (PS/2012).



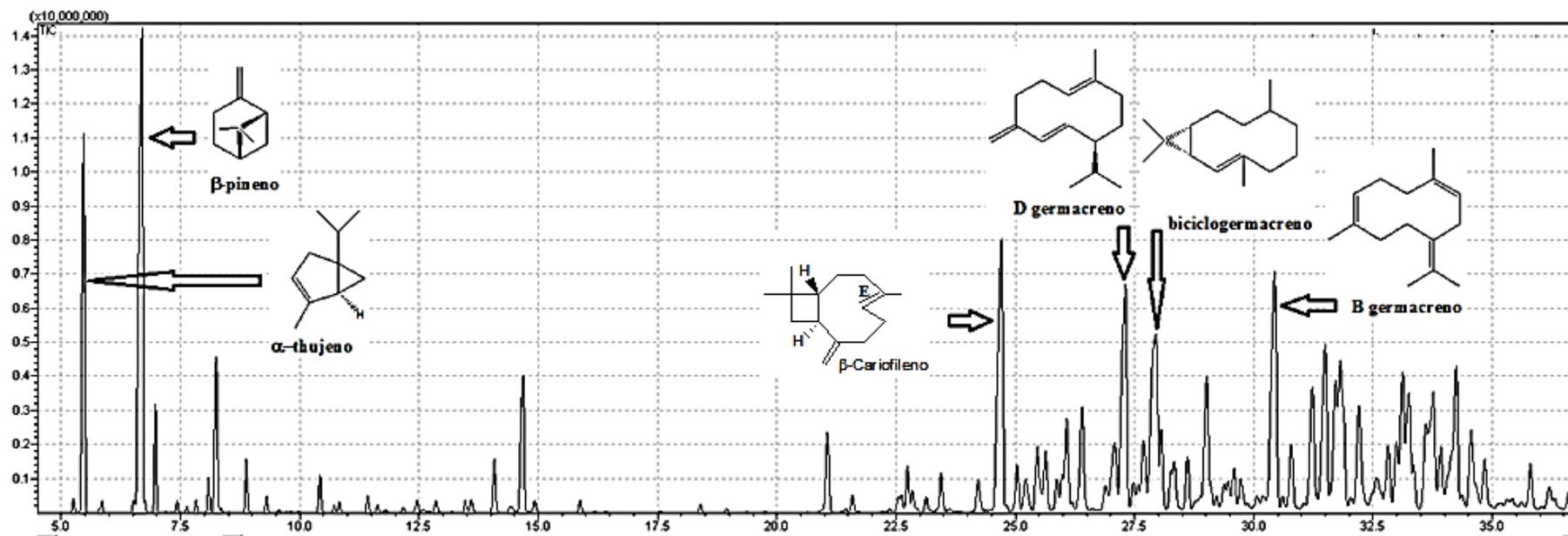
Anexo 8. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. dysenterica* (PC/2014)



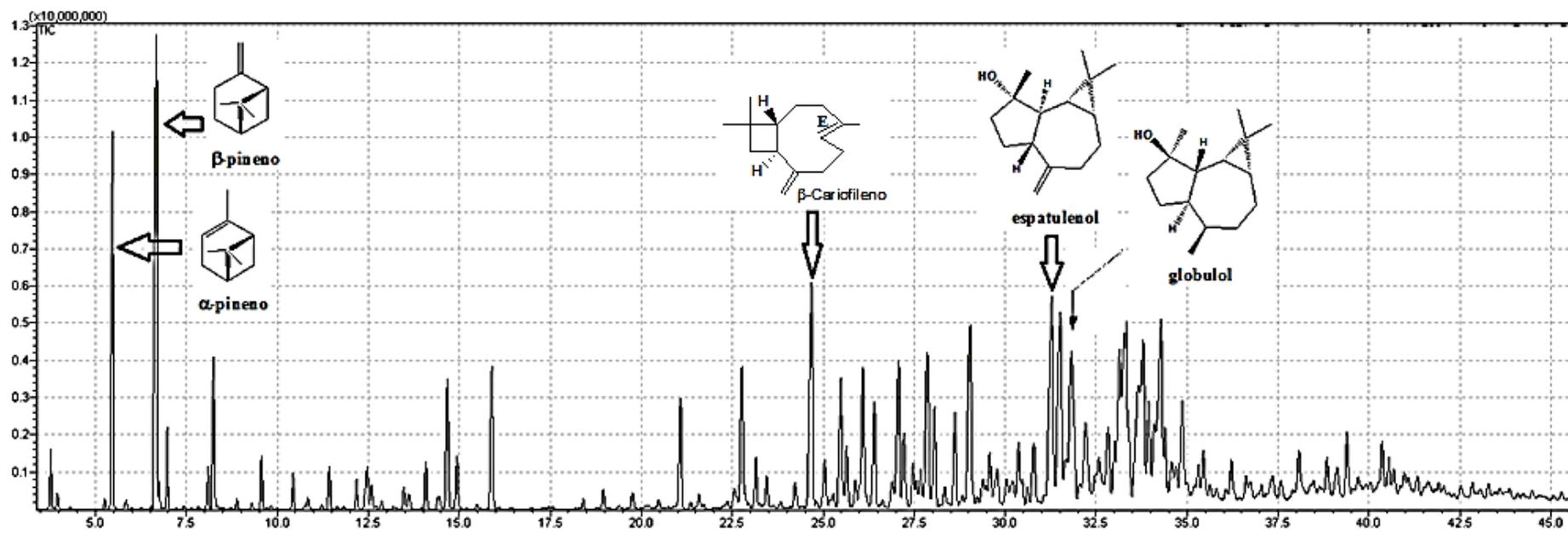
Anexo 9. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. dysenterica* (PS/2014).



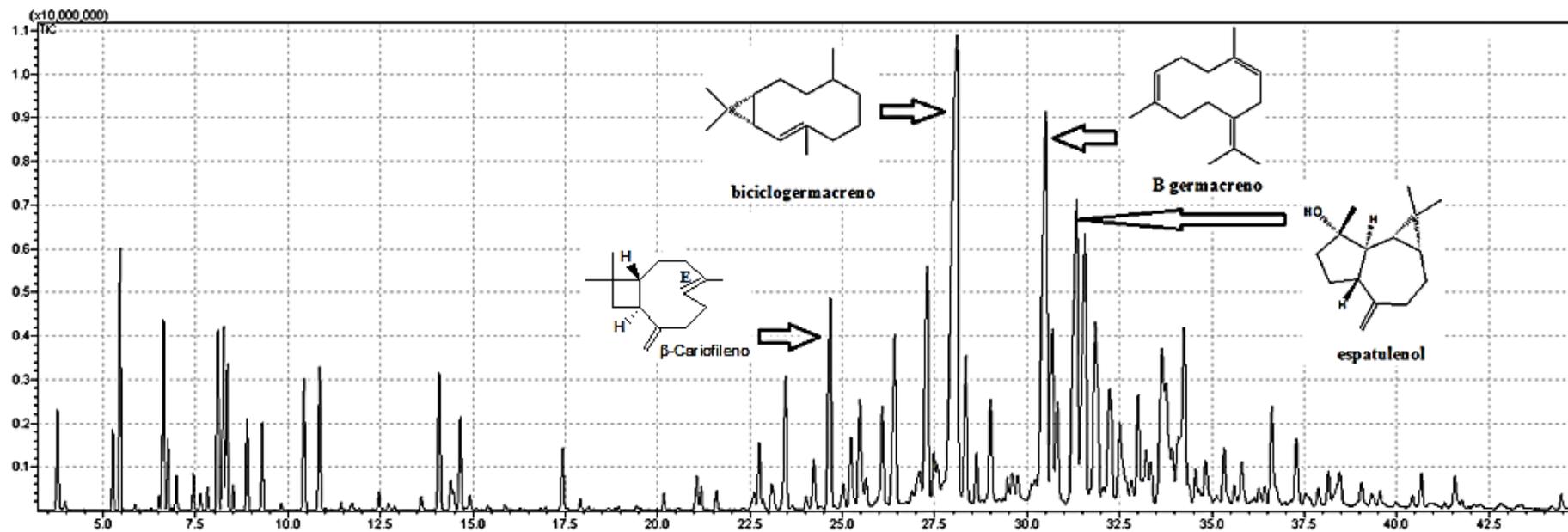
Anexo 10. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. lutescens* (PC/2014).



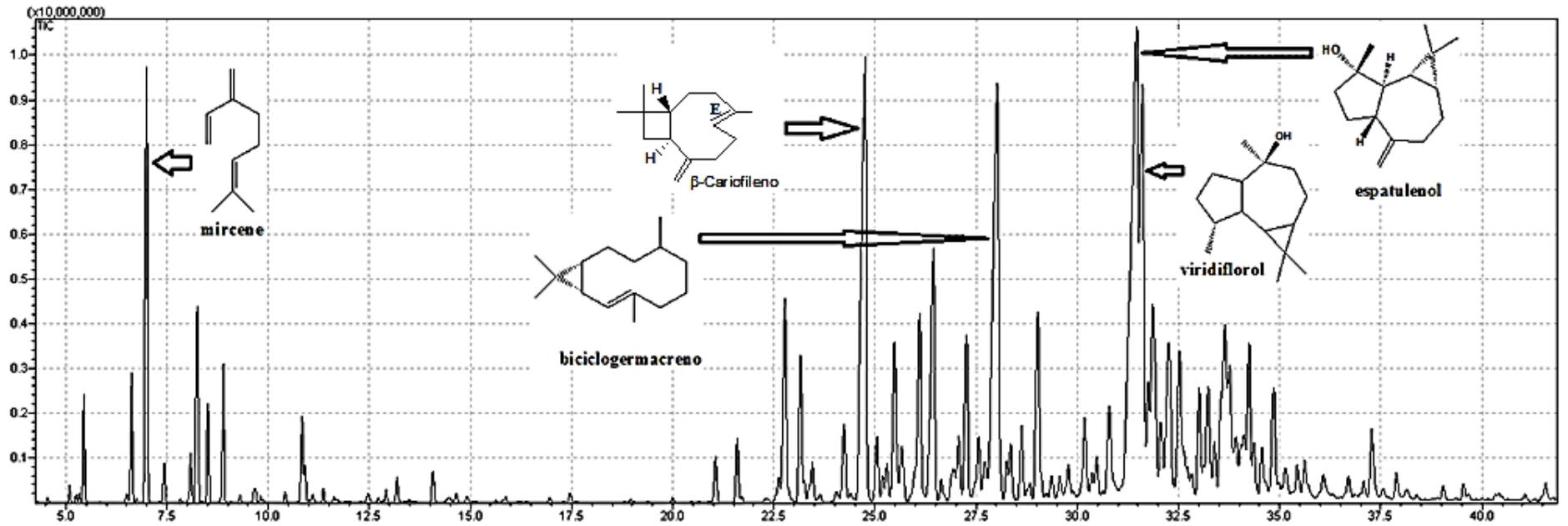
Anexo 11. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. lutescens* (PS/2014).



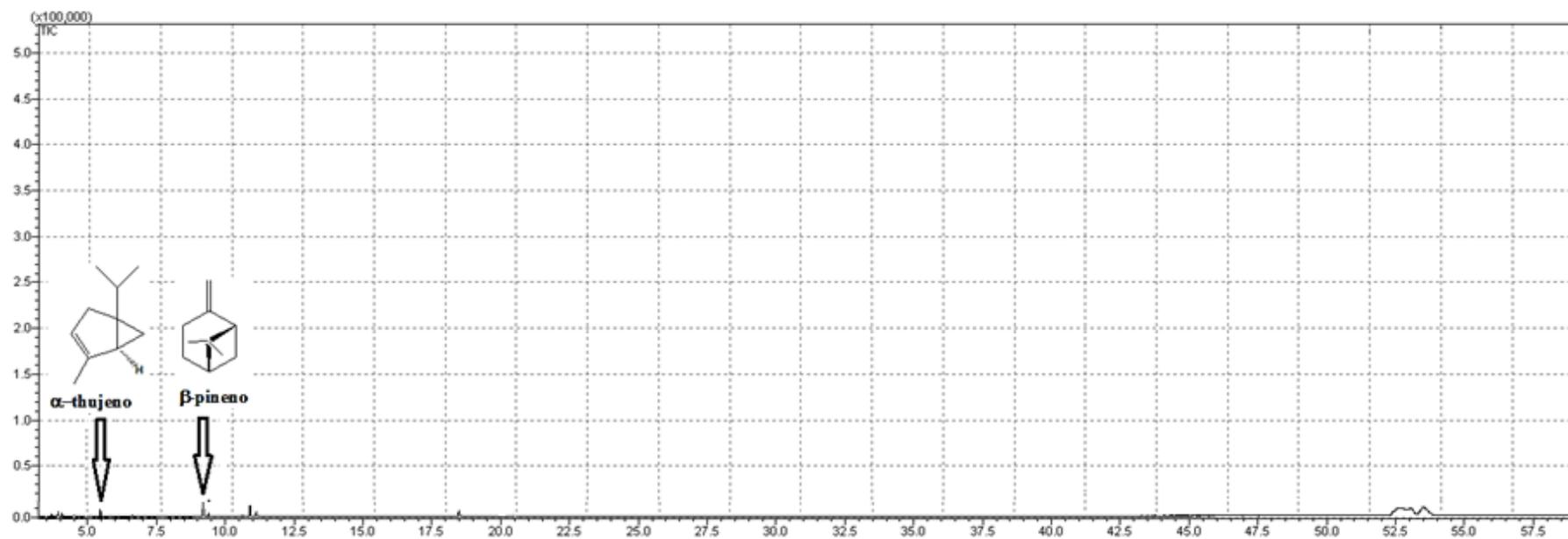
Anexo 12. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. langsdorffii* (PC/2014).



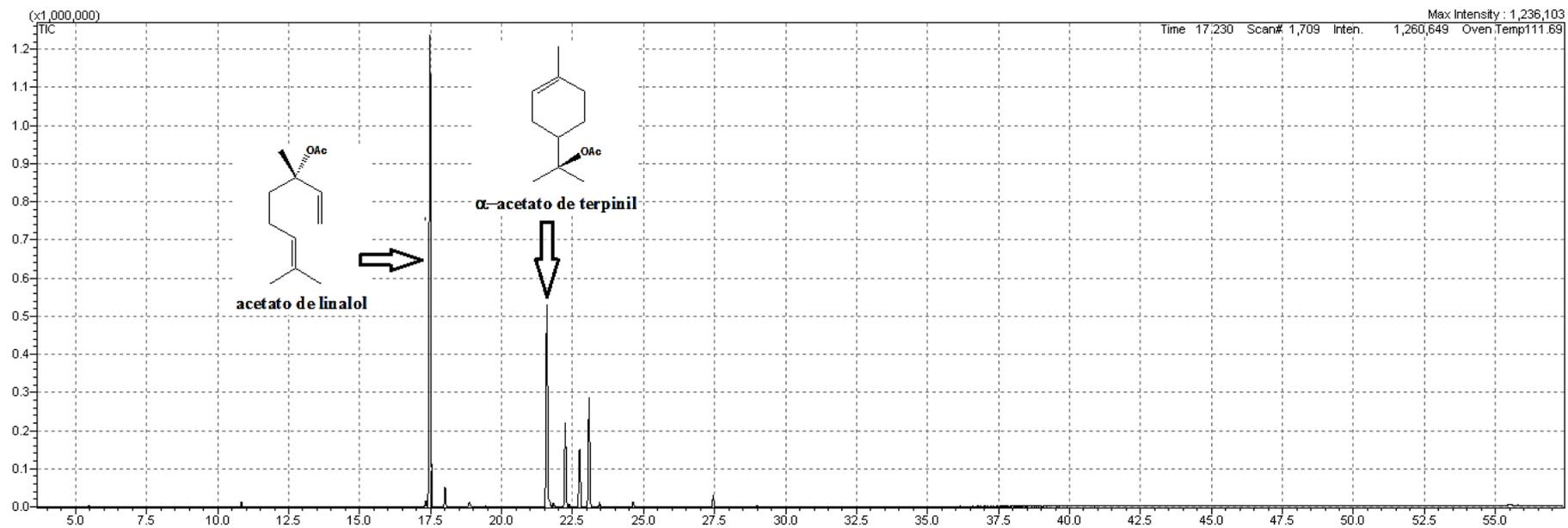
Anexo 13. Perfil cromatográfico (dados da técnica) do OE das folhas de *E. langsdorffii* (PS/2014).



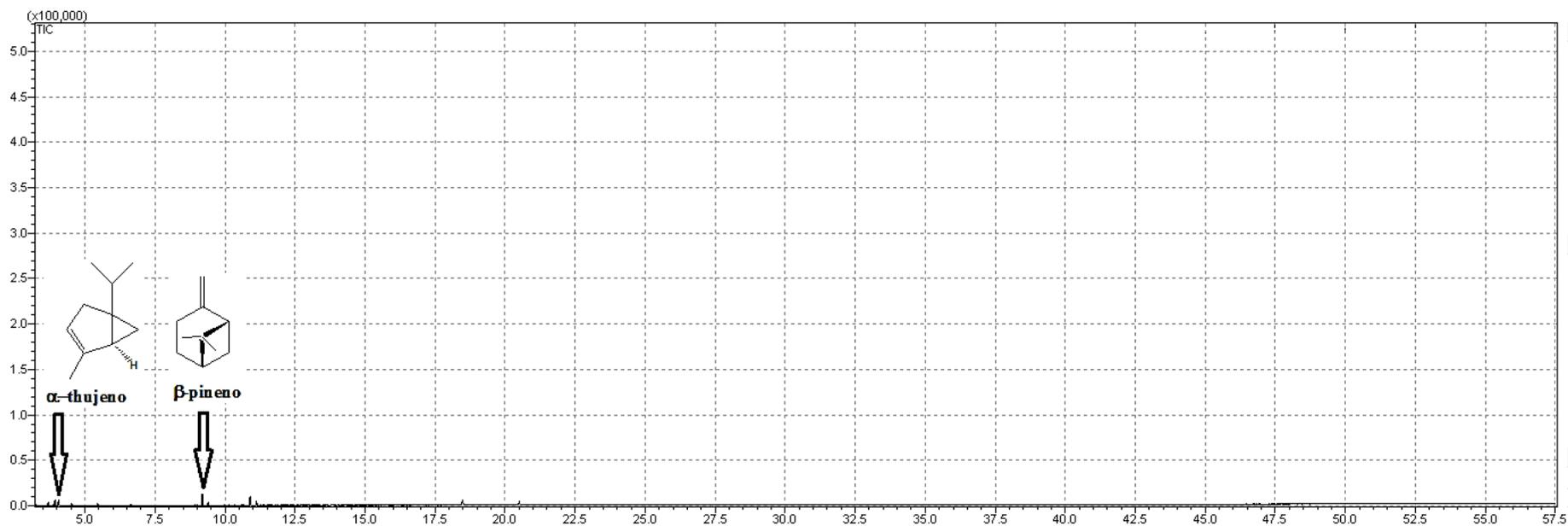
Anexo 14. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.dysenterica* (PC/2014).



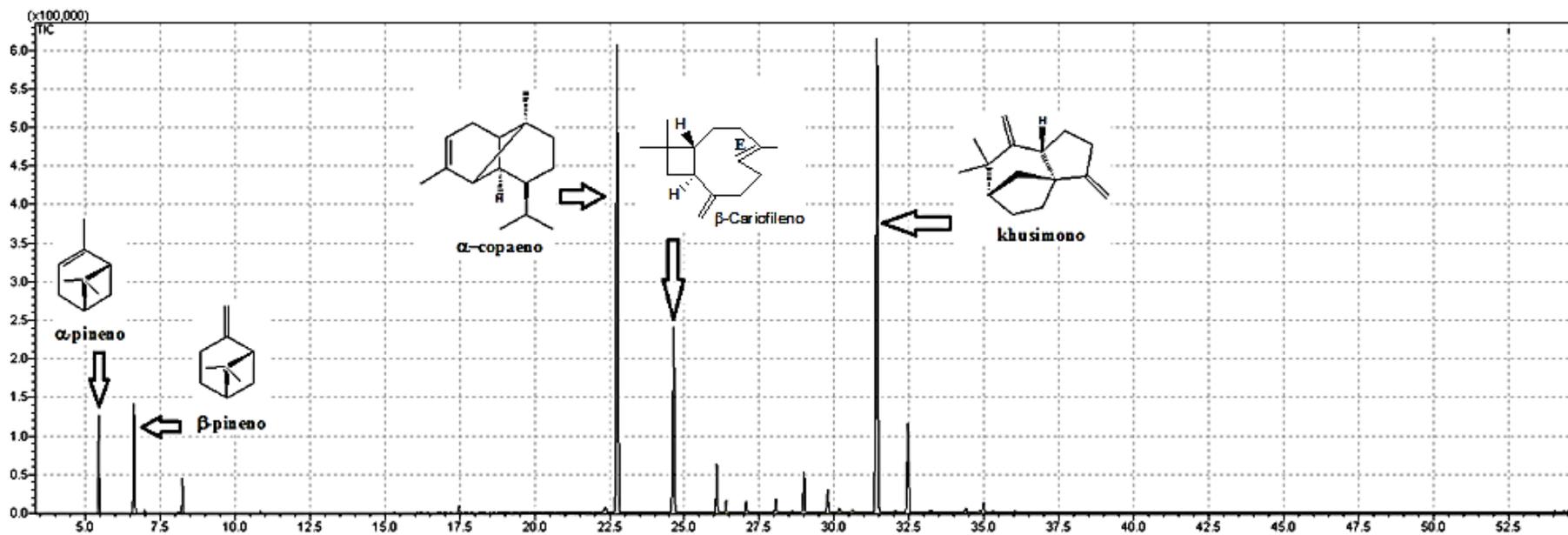
Anexo 15. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.dysenterica* (PS/2014).



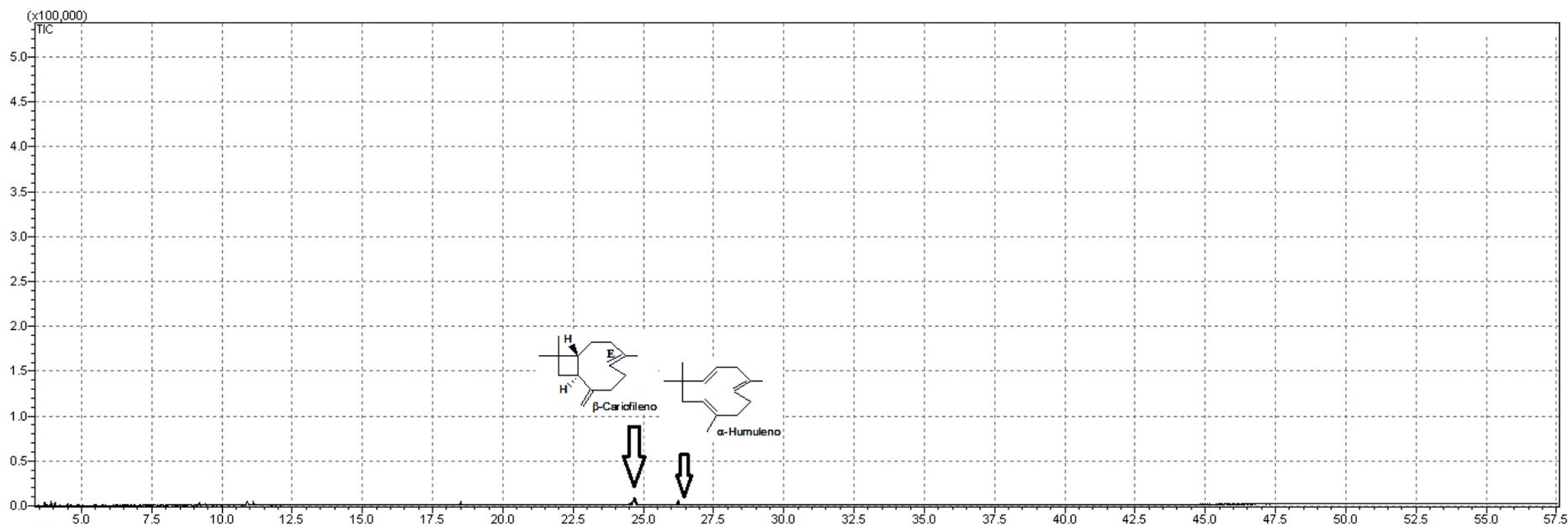
Anexo 16. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.lutescens* (PC/2014).



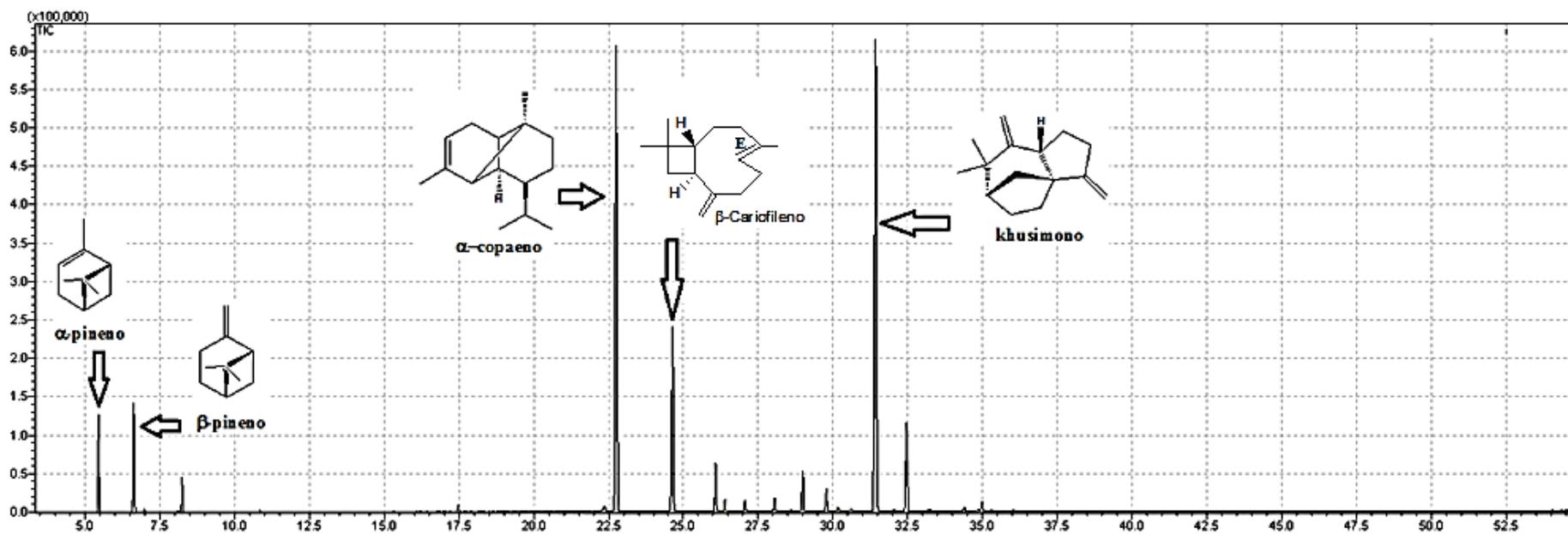
Anexo 17. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.lutescens* (PS/2014).



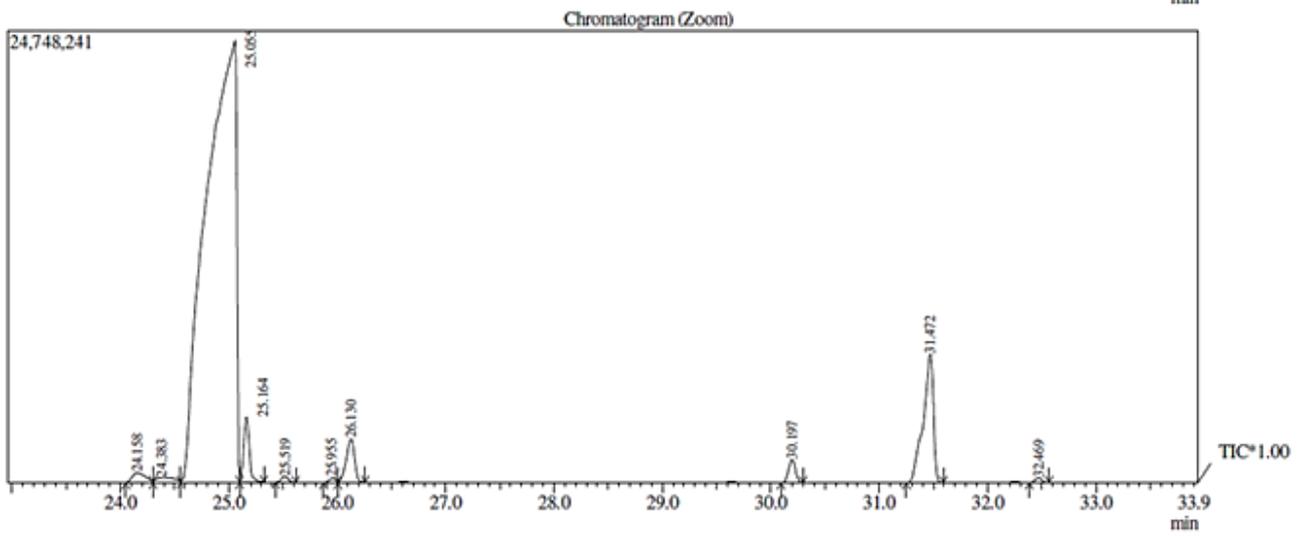
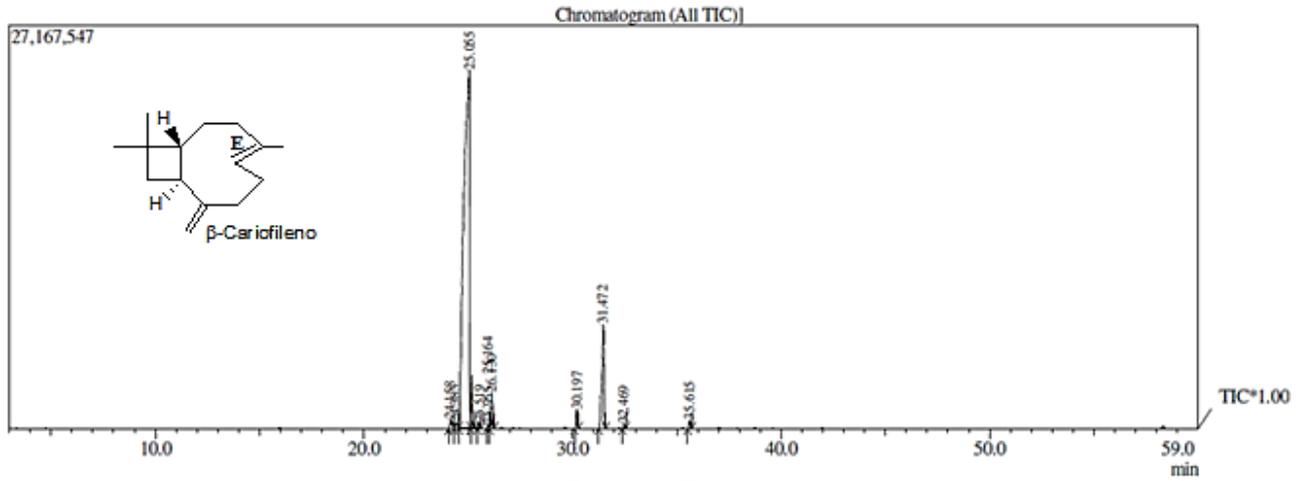
Anexo 18. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.langsdorffii* (PC/2014).



Anexo 19. Perfil cromatográfico (dados da técnica) dos vapores das folhas de *E.langsdorffii* (PS/2014).

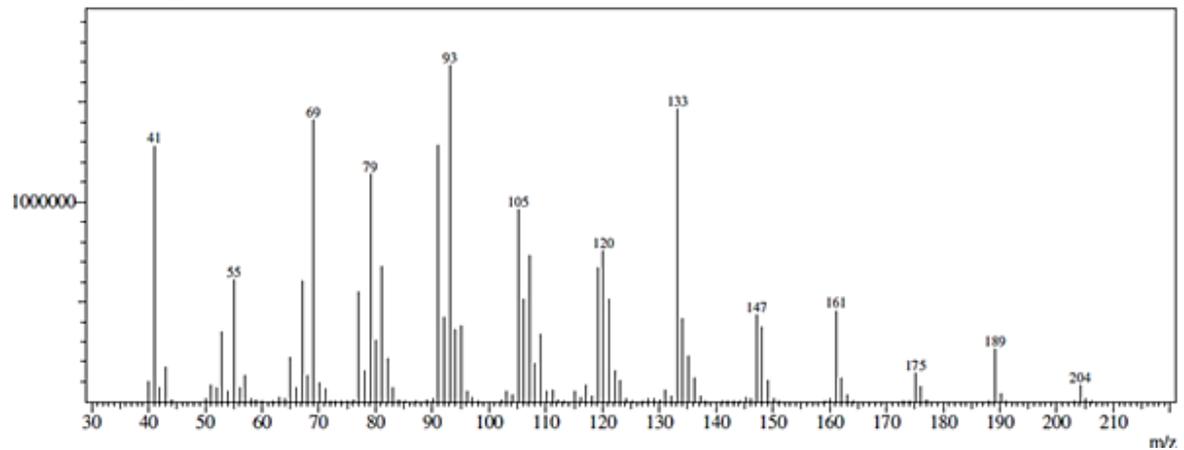


Anexo 20. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do β -cariofileno *in natura*, extraído das folhas de *E. dysenterica* (PS/2012).

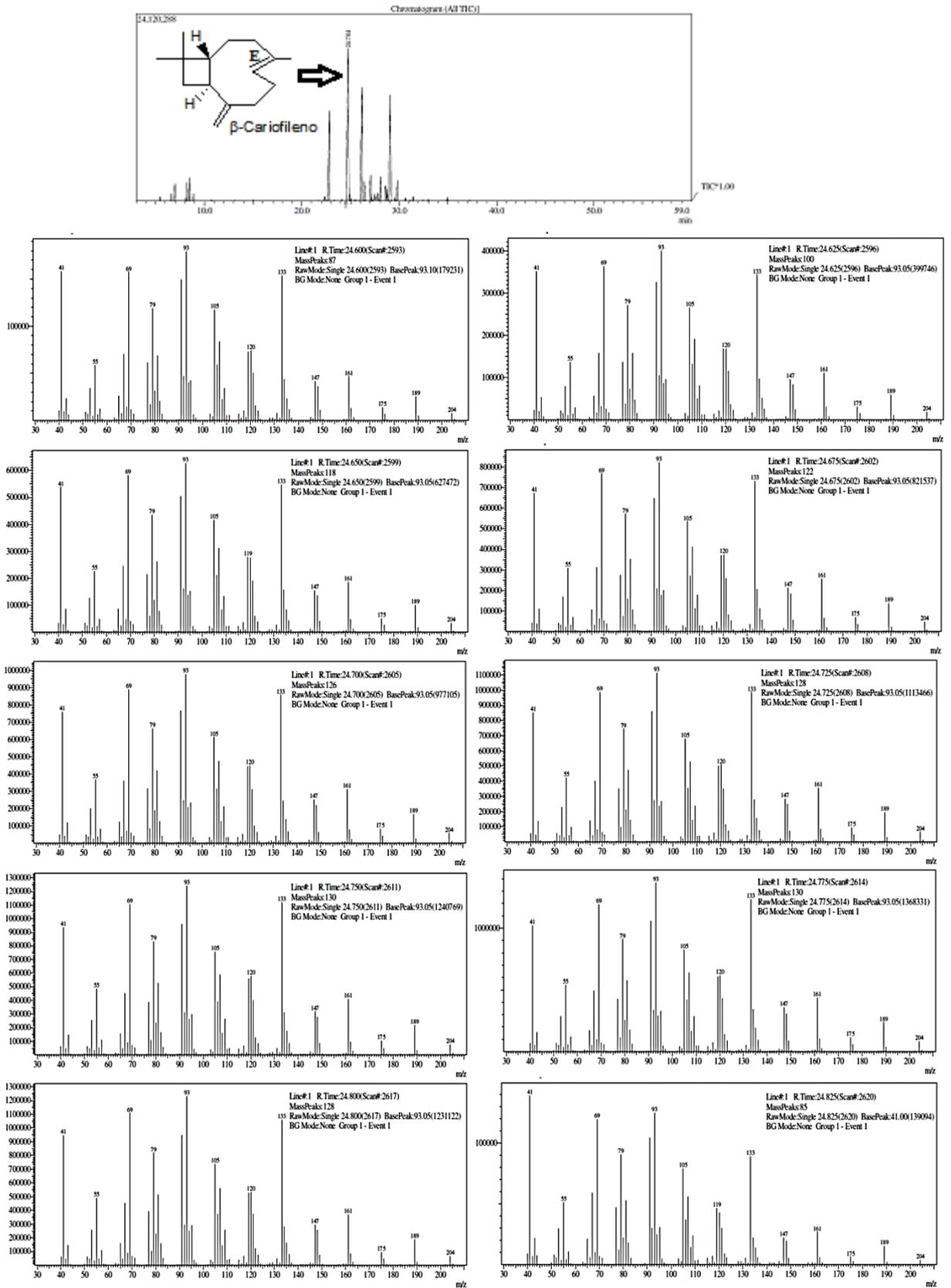


Spectrum

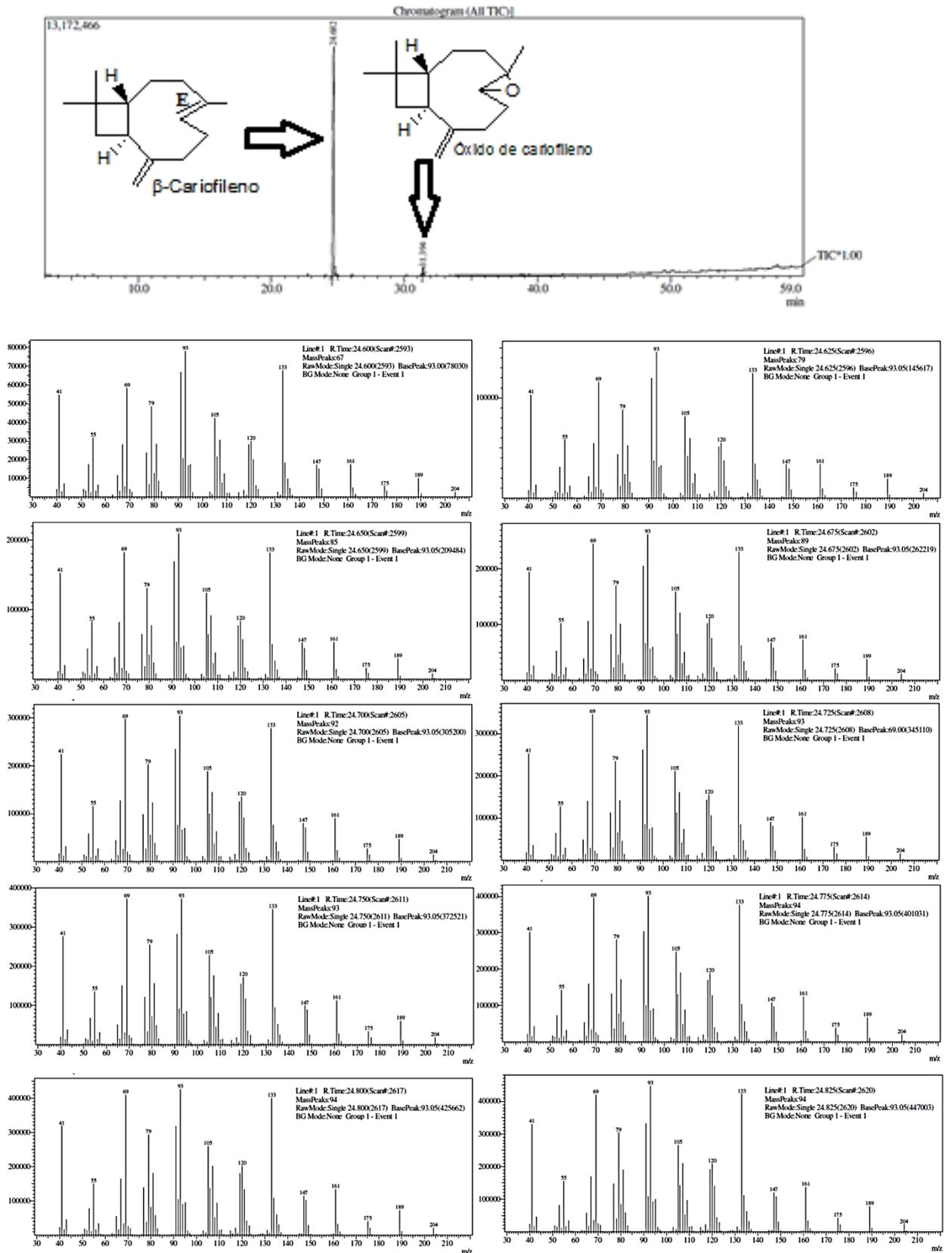
Line#:1 R.Time:25.008(Scan#:2642)
 MassPeaks:116
 RawMode:Single 25.008(2642) BasePeak:93.10(1682337)
 BG Mode:None Group 1 - Event 1



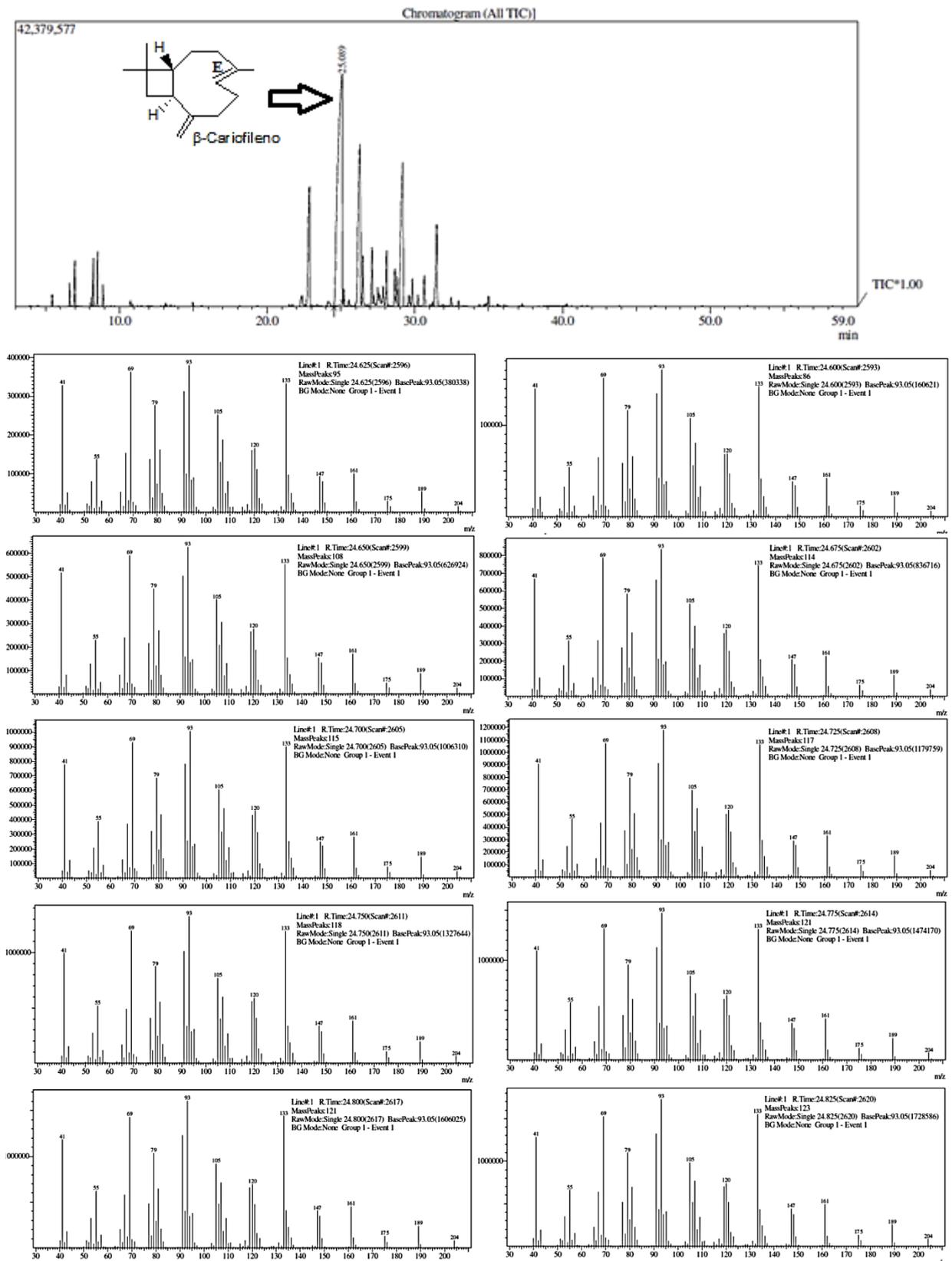
Anexo 21. Cromatograma e comparação dos espectros de massas (dados da técnica) em diversos pontos do pico do β -cariofileno extraído de *E. dysenterica*.



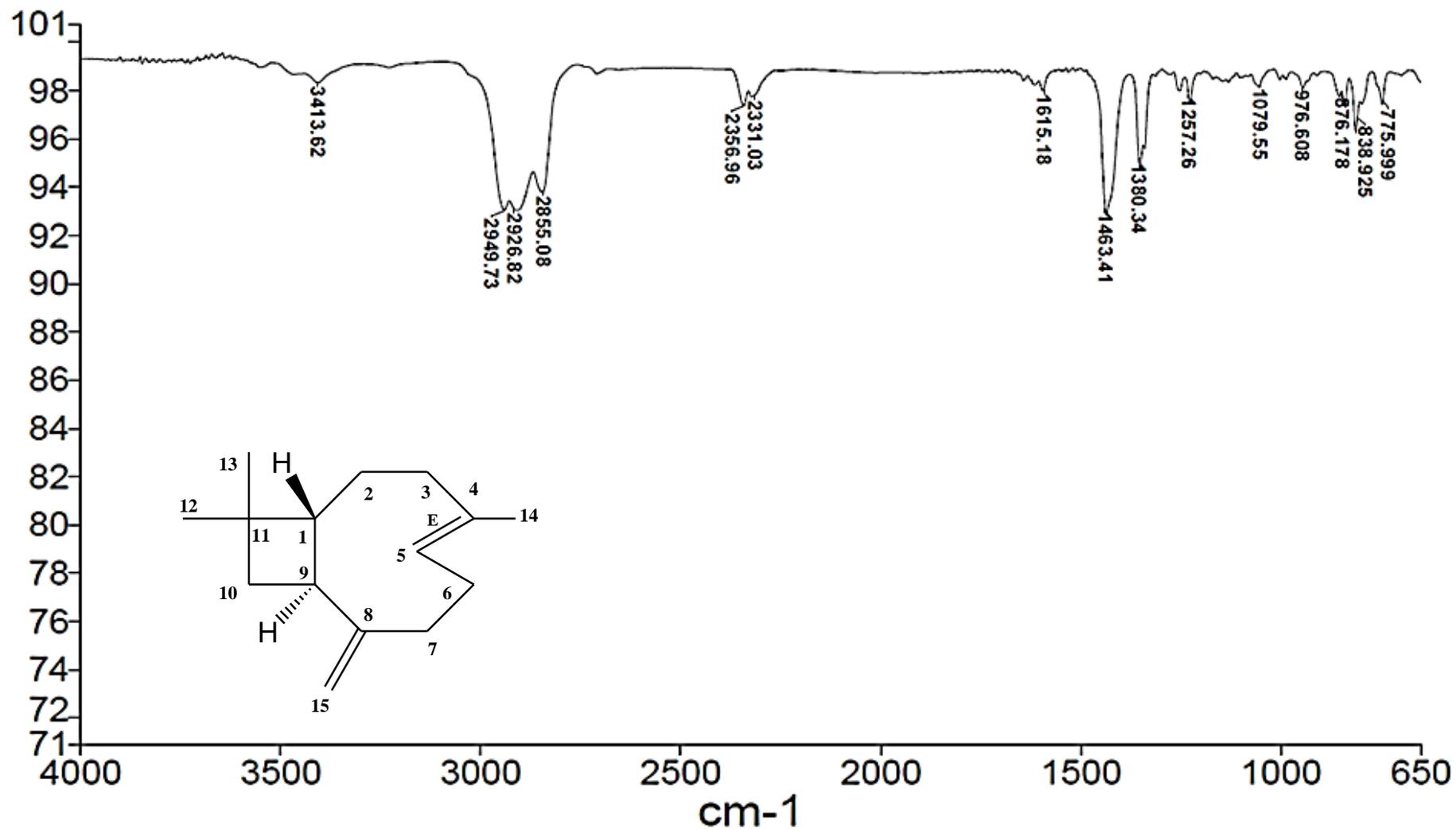
Anexo 22. Cromatograma e comparação dos espectros de massas (dados da técnica) em diversos pontos do pico do β -cariofileno 98% (Sigma-Aldrich).



Anexo 23. Cromatograma e comparação dos espectros de massas (dados da técnica) em diversos pontos do pico do β -cariofileno *in natura*/co-injetado com β -cariofileno 98% (Sigma-Aldrich).

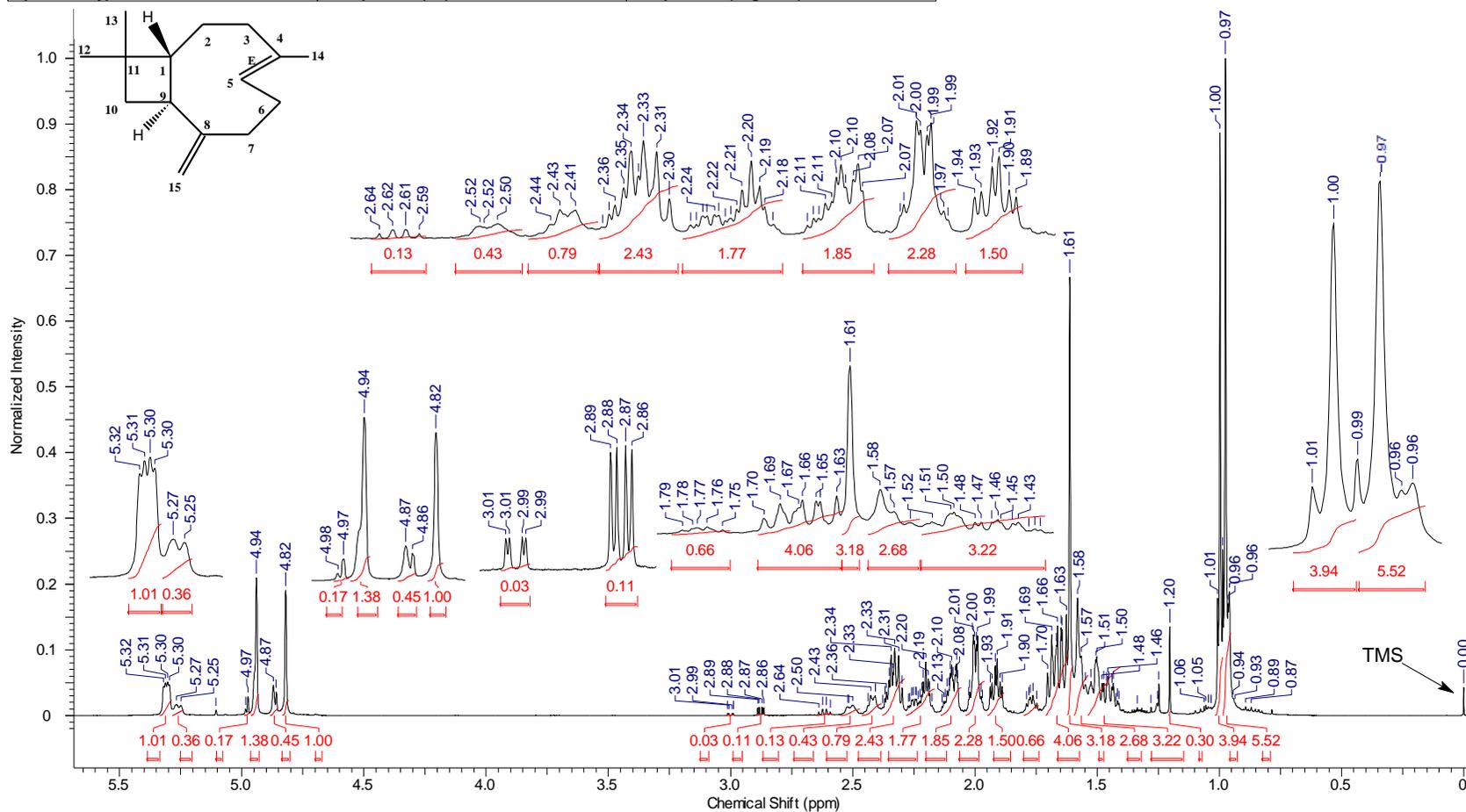


Anexo 24. Espectro de IV (ATR) do β -cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich).



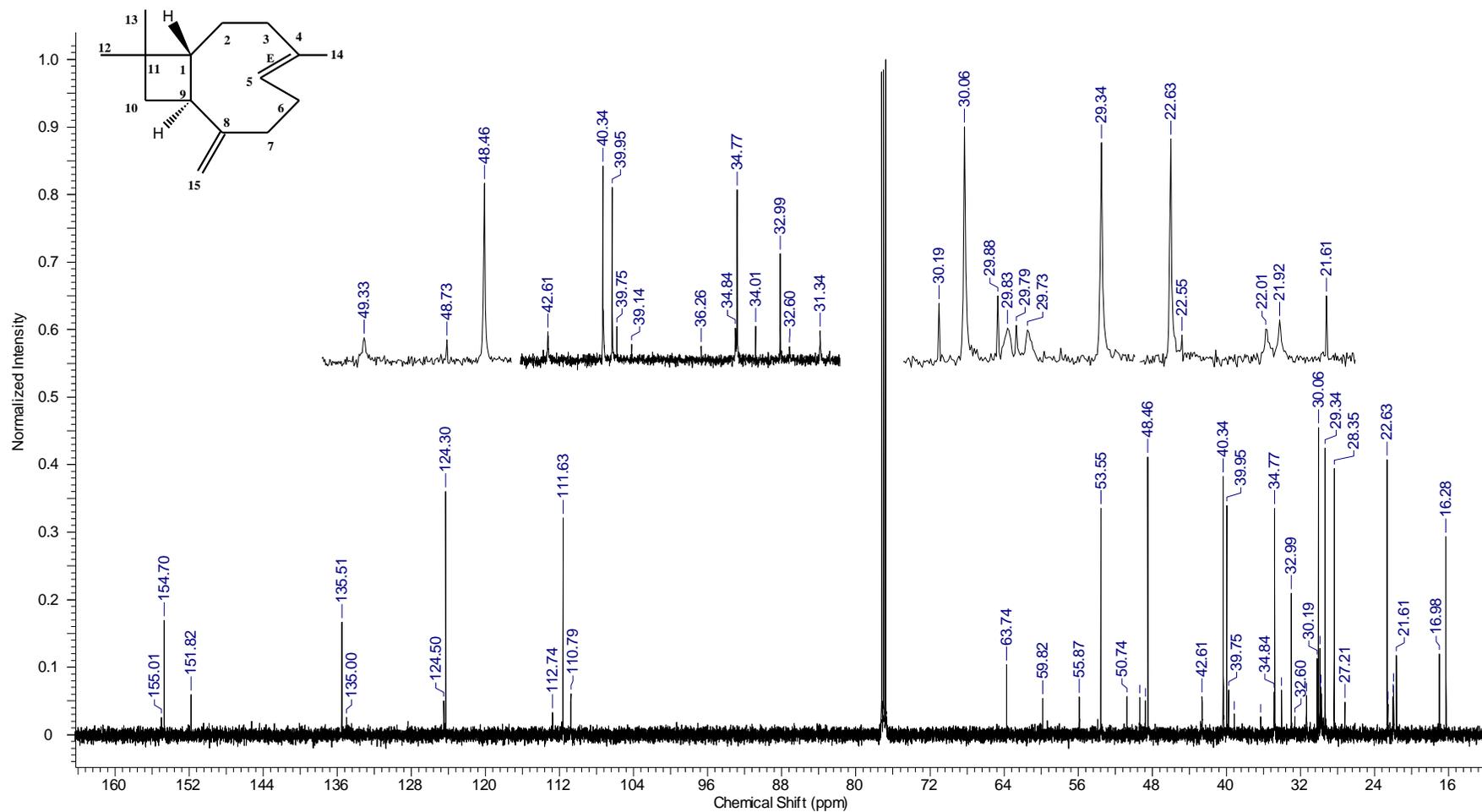
Anexo 25. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do β-cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich).

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	padrão β-cariofileno	Date	-----
Date Stamp	-----				
File Name	β-cariofileno com 98,5% de pureza			Frequency (MHz)	600.17
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d	Receiver Gain	31.21
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12018.86	Spectrum Offset (Hz)	3688.3352
		Temperature (degree C)	25.150		



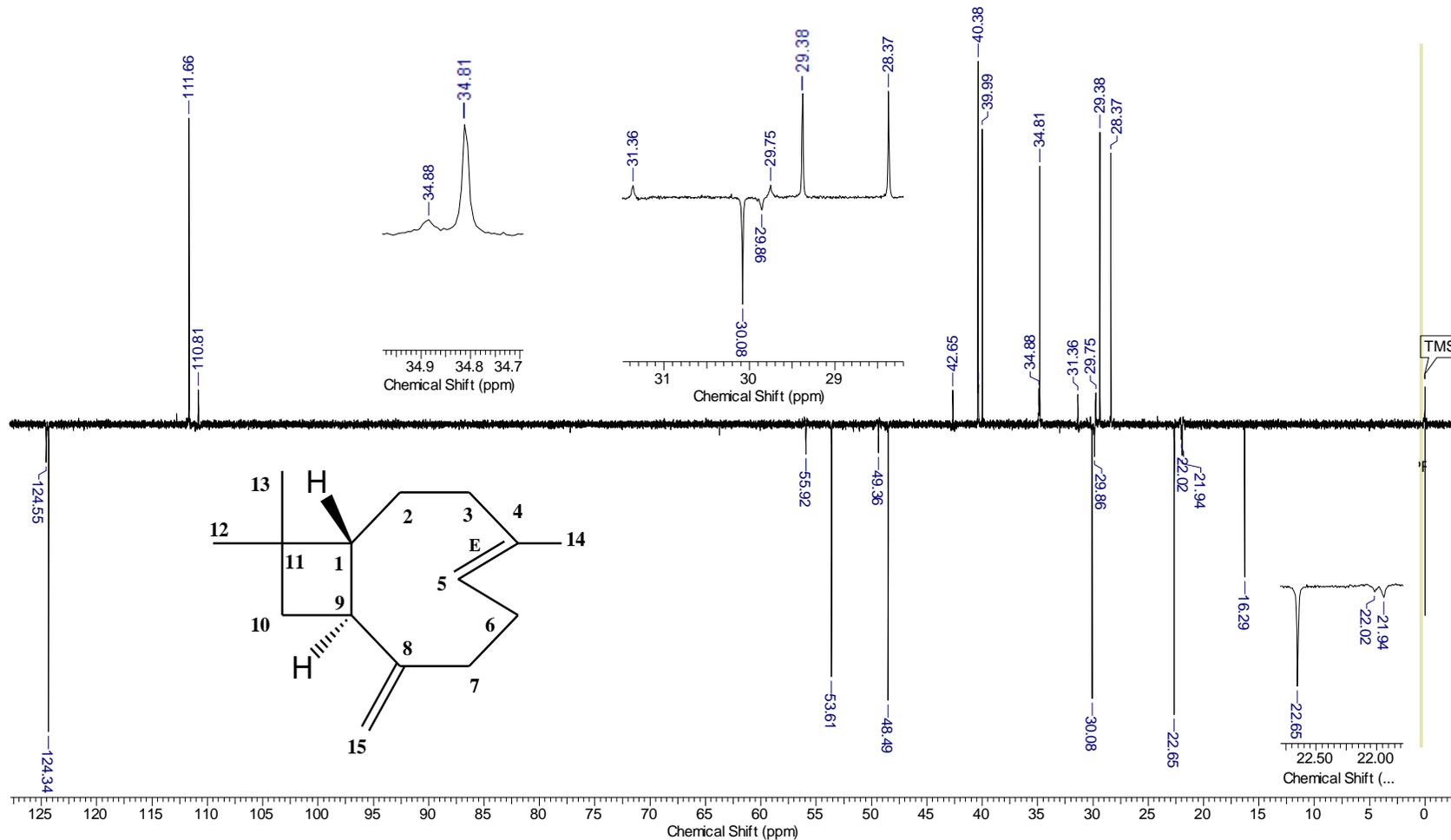
Anexo 26. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do β-cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich).

Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	padrão β-cariofileno	Date	-----
Date Stamp	-----				
File Name	β-cariofileno com 98,5% de pureza			Frequency (MHz)	150.91
Nucleus	13C	Number of Transients	256	Origin	spect
Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	15085.9795
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	36056.59	Temperature (degree C)	25.136



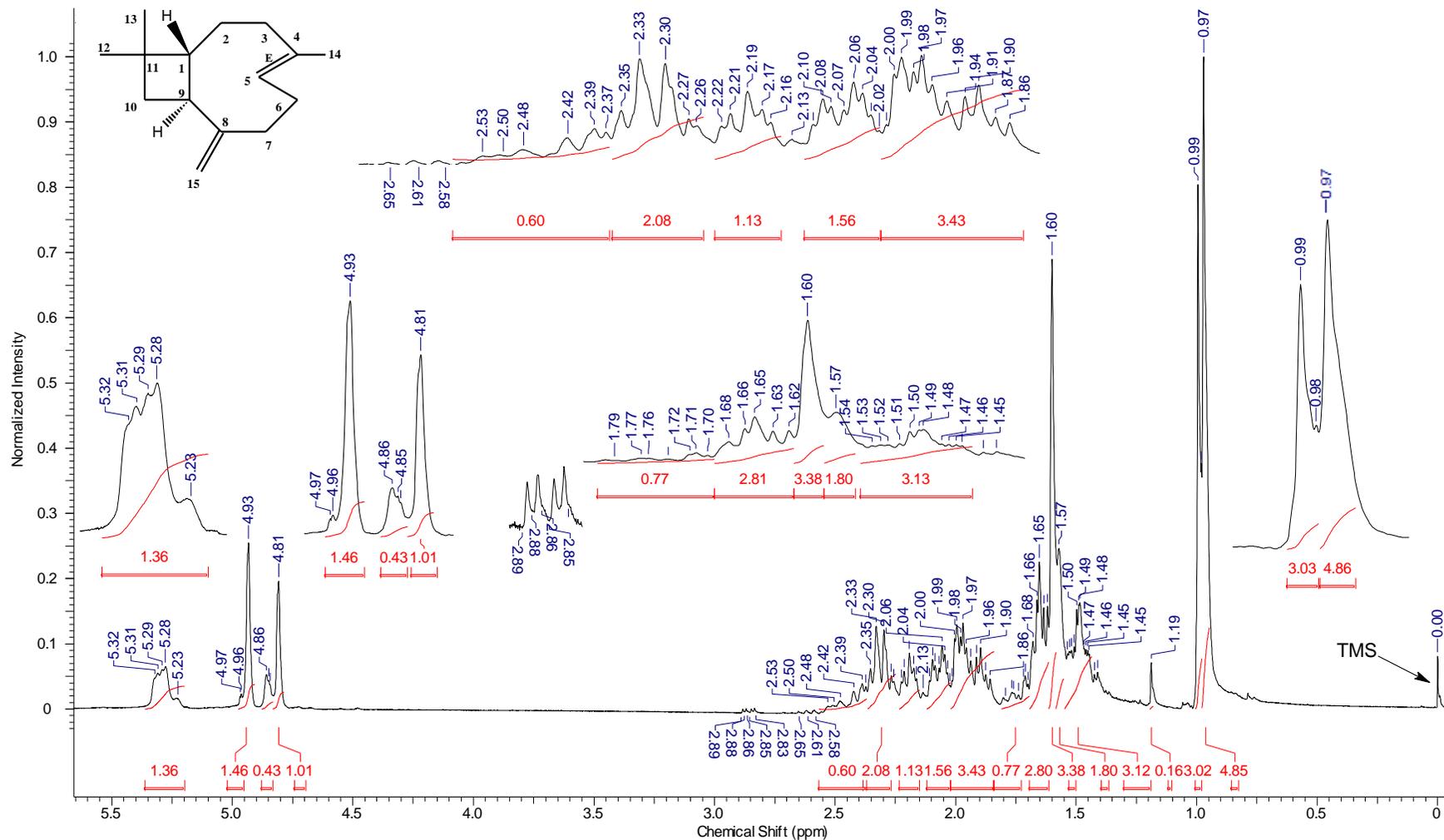
Anexo 27. Espectro DEPT (135 MHz, CDCl₃) do β-cariofileno 98,5% (Sigma-Aldrich).

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	Espectro de DEPT do padrão β-cariofileno		Date	-----	
Date Stamp	-----	File Name	padrão β-cariofileno				
Frequency (MHz)	150.91	Nucleus	13C	Number of Transients	2048	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	deptsp135
Receiver Gain	105.05	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	12072.3135	Spectrum Type	DEPT135	Sweep Width (Hz)	29761.00	Temperature (degree C)	28.258

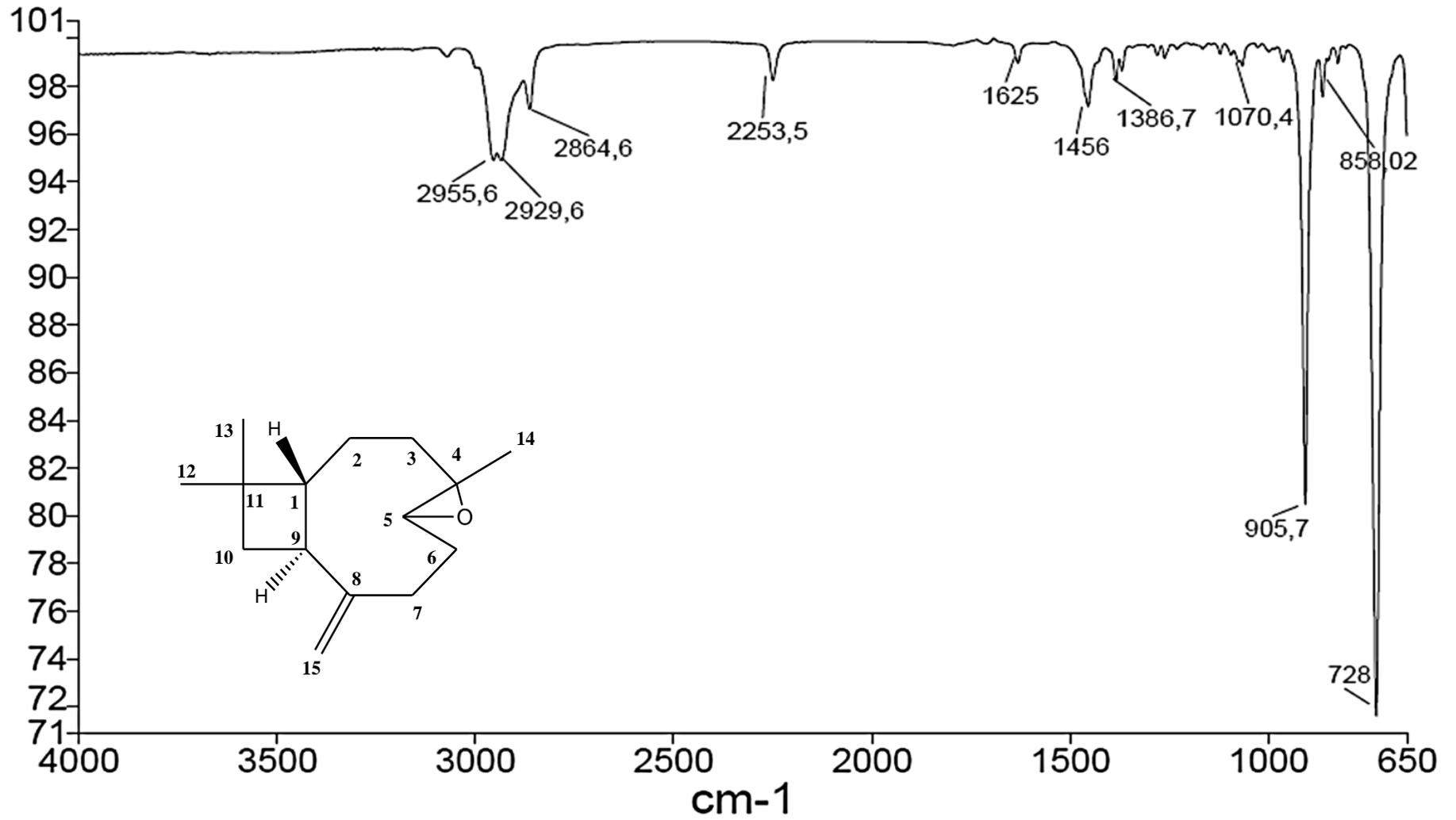


Anexo 28. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do β-cariofileno *in natura* (obtido do OE de *E. dysenterica* - PS/2012).

Acquisition Time (sec)	3.3327	Comment	β-cariofileno isolada de <i>E. dysenterica</i> (PS/2012)		Date	-----	
Date Stamp	-----	File Name	β-cariofileno <i>in natura</i>		Frequency (MHz)	300.07	
Nucleus	1H	Number of Transients	8	Original Points Count	12001	Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d		Spectrum Offset (Hz)	1490.3975	
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	3601.01	Temperature (degree C)	25.000		

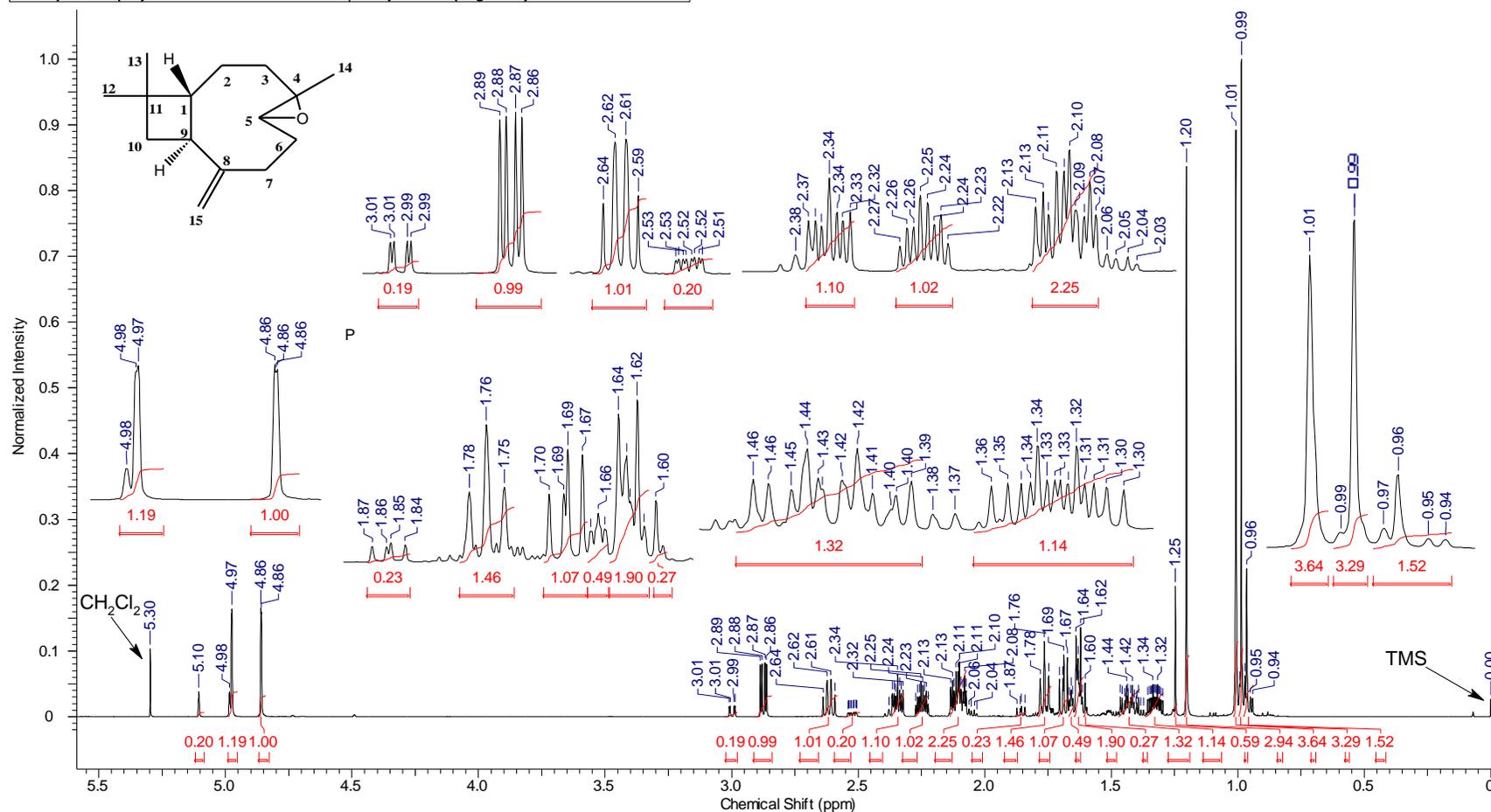


Anexo 29. Espectro de IV (ATR) do derivado 1 (Método 1).



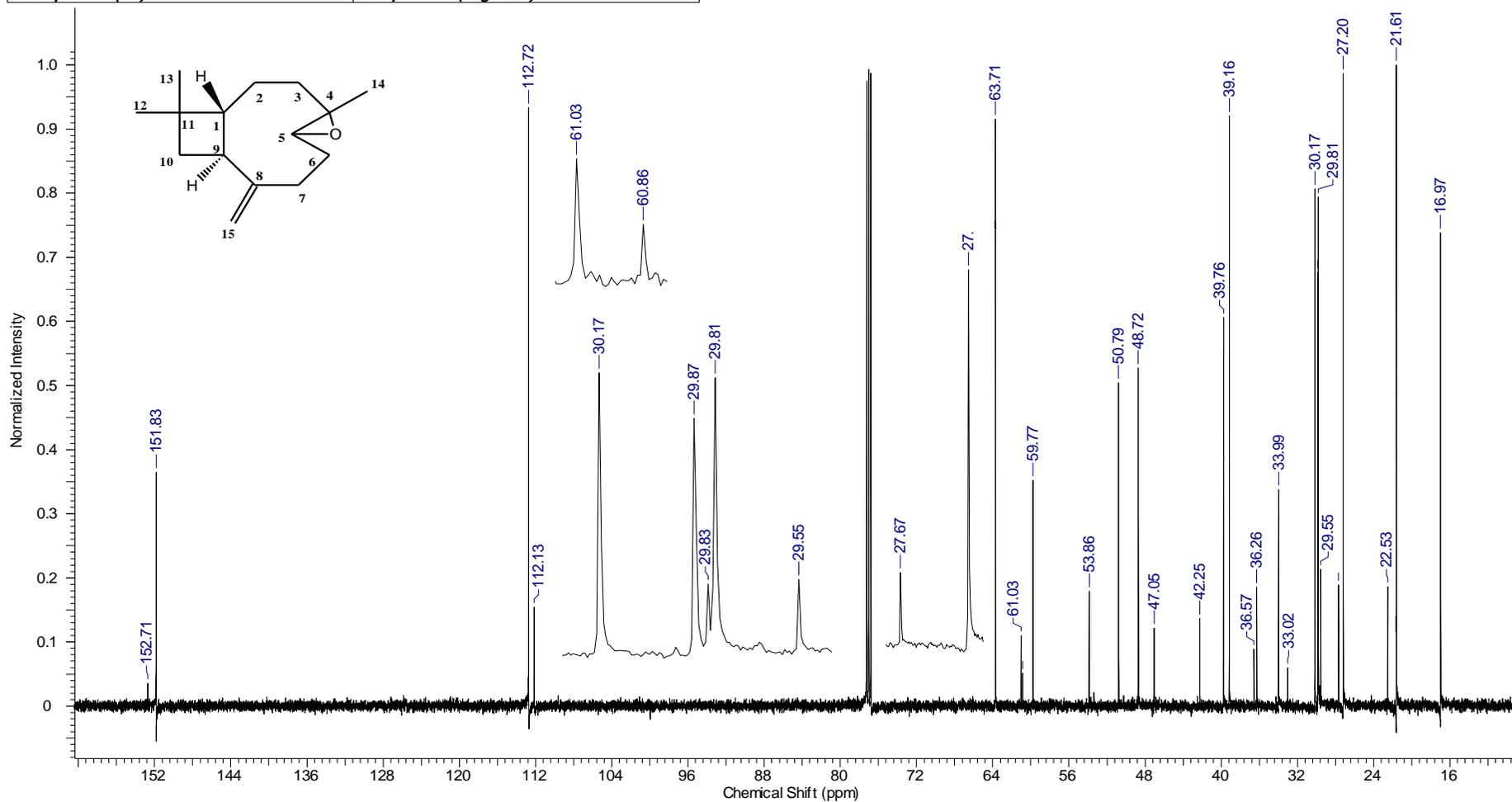
Anexo 30. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do derivado 1 (Método 1).

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	Derivado 1		
Date	-----	Date Stamp	-----		
File Name	Derivado 1 obtido via método 1			Frequency (MHz)	600.17
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Origin	spect
Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d	Receiver Gain	43.02
Sweep Width (Hz)	12018.86	Temperature (degree C)	28.155	Spectrum Offset (Hz)	3692.7368
				Spectrum Type	STANDARD

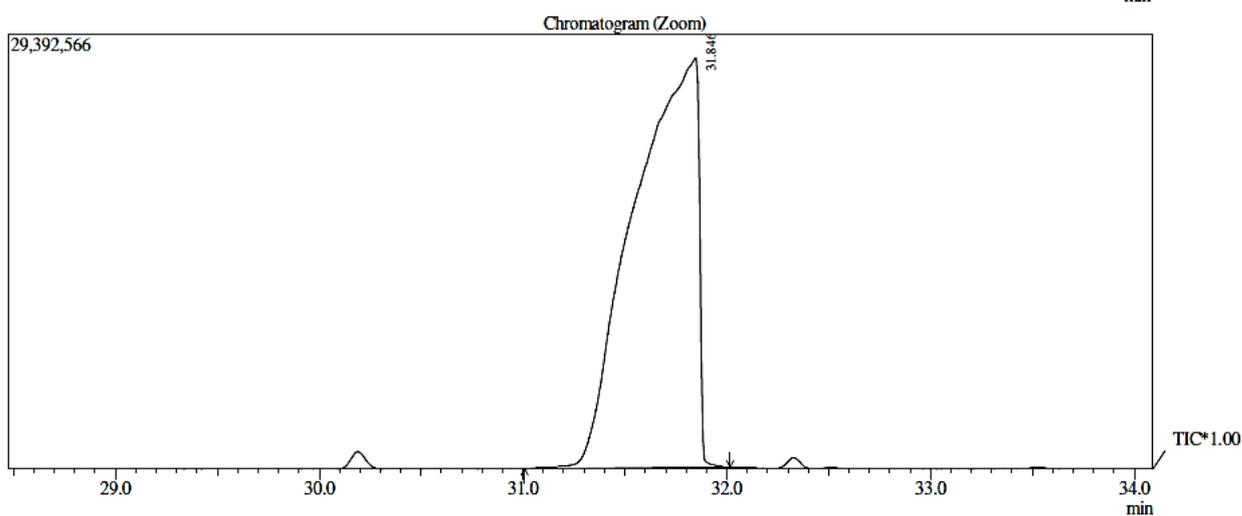
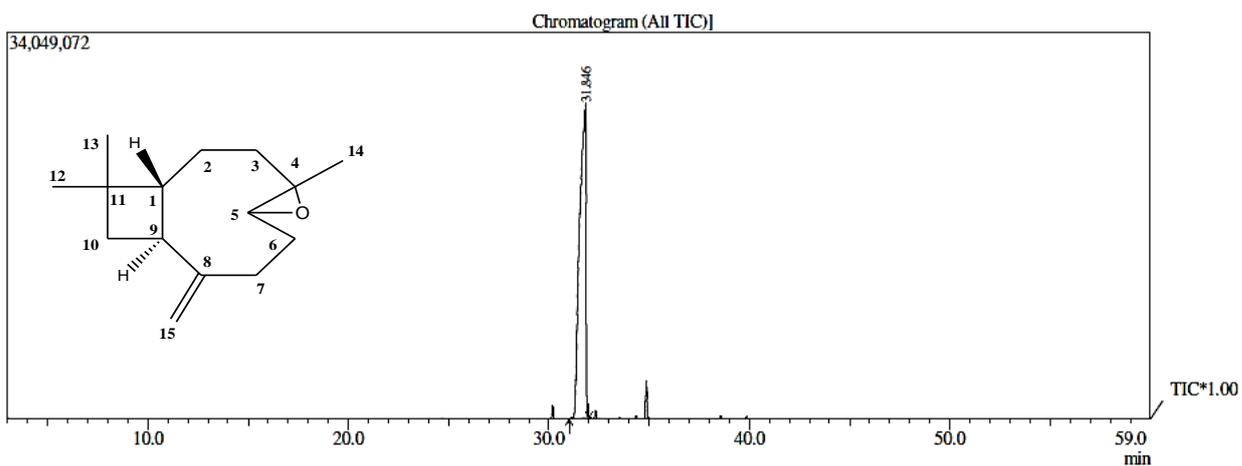


Anexo 31. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do derivado 1 (Método 1).

Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	Paulo Henrique LITMO CDCl ₃ 20-10-2014 Monoepoxidacao do B-cariofileno		
Date	20 Nov 2014 16:42:08	Date Stamp	20 Nov 2014		
File Name	Derivado 1 obtido via método 1		Frequency (MHz)	150.91	
Nucleus	13C	Number of Transients	273	Origin	spect
Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	15085.9795
Sweep Width (Hz)	36056.59	Temperature (degree C)	28.476	Spectrum Type	STANDARD

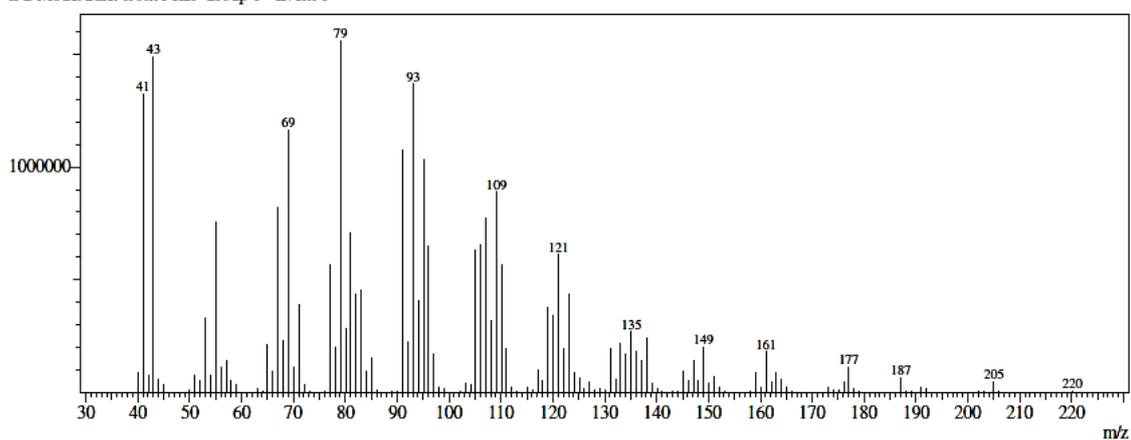


Anexo 32. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado **1** (**Método 1**).

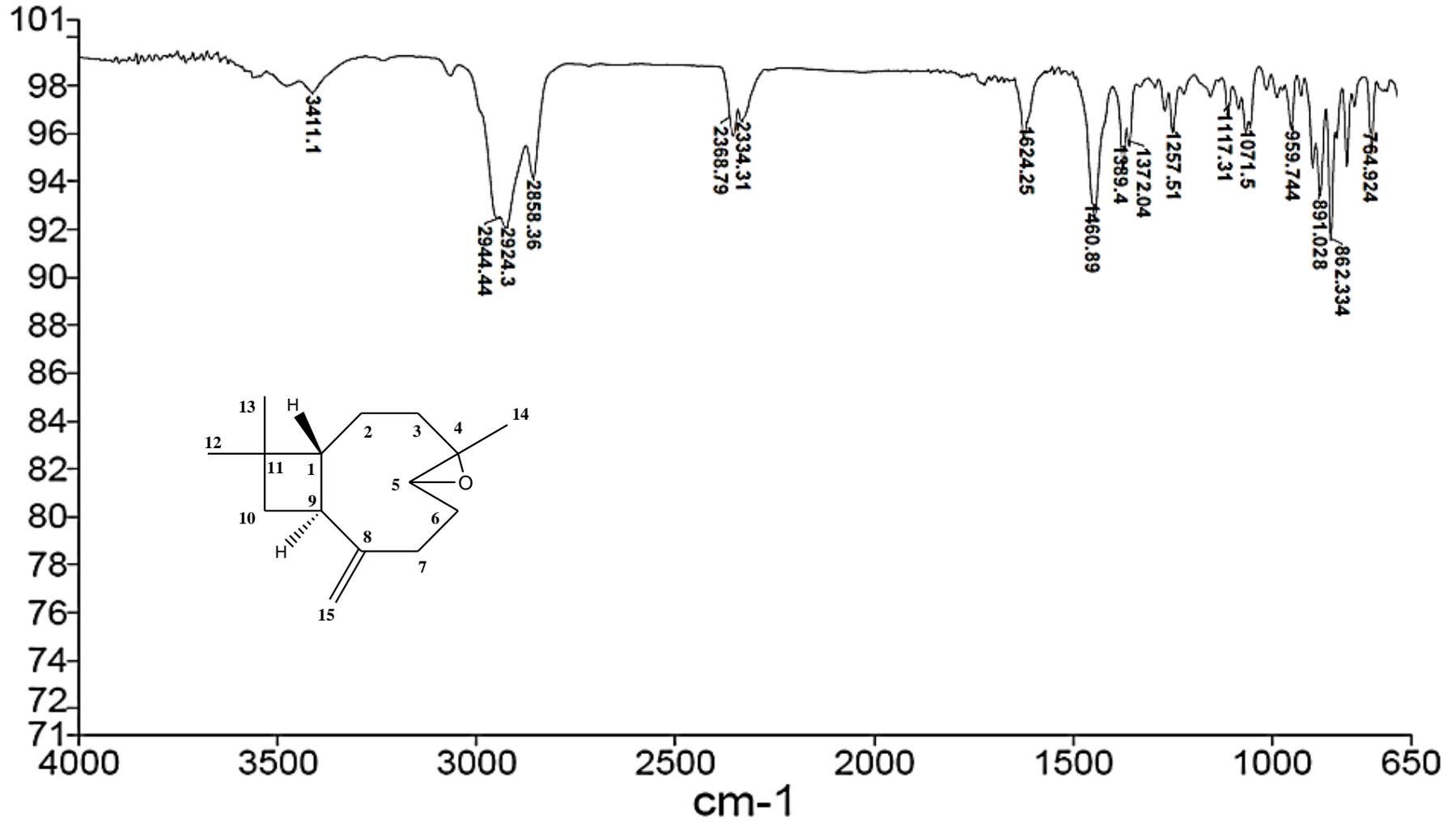


Spectrum

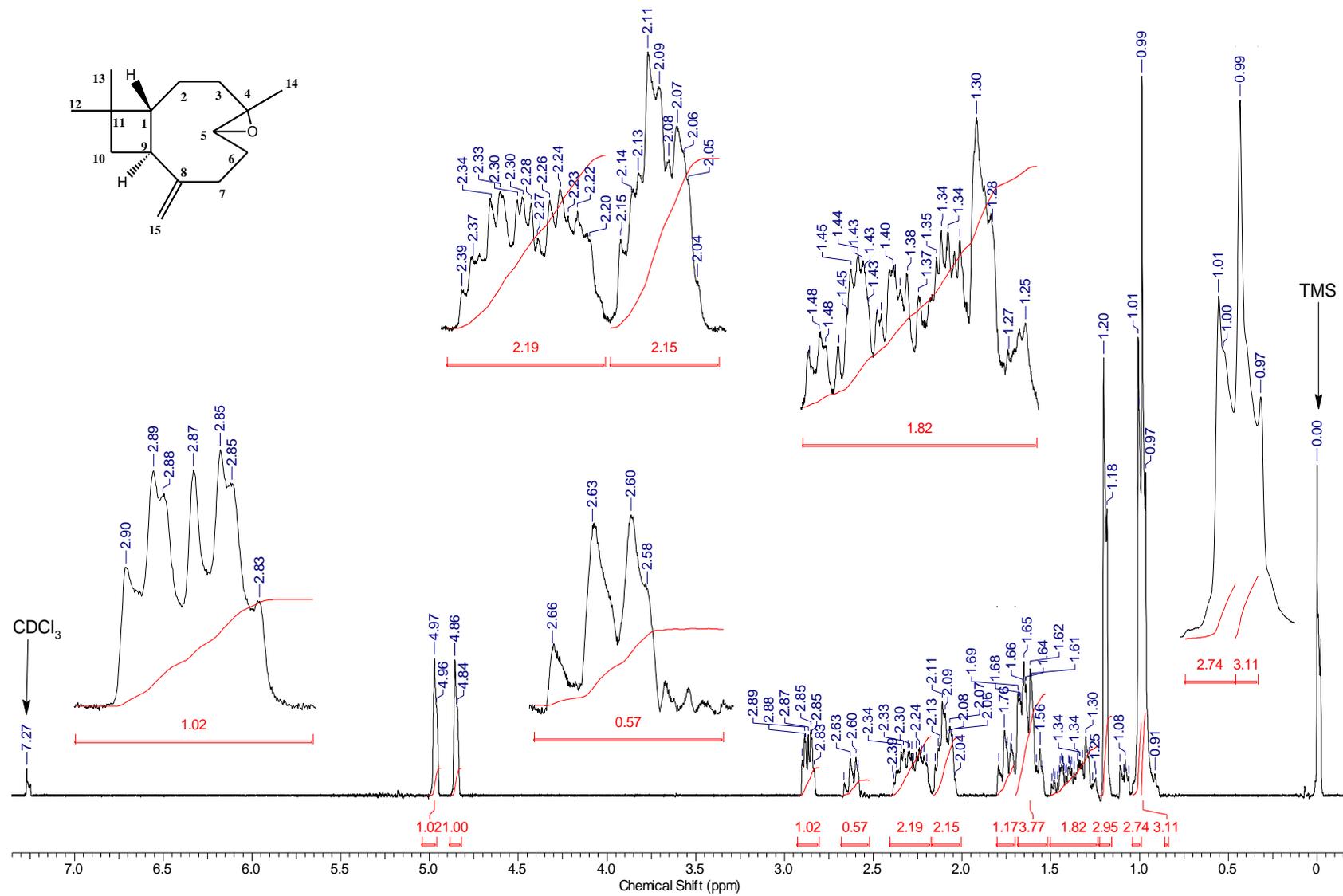
Line#1 R.Time:31.850(Scan#:3463)
MassPeaks:144
RawMode:Averaged 31.842-31.858(3462-3464) BasePeak:79.05(1559062)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



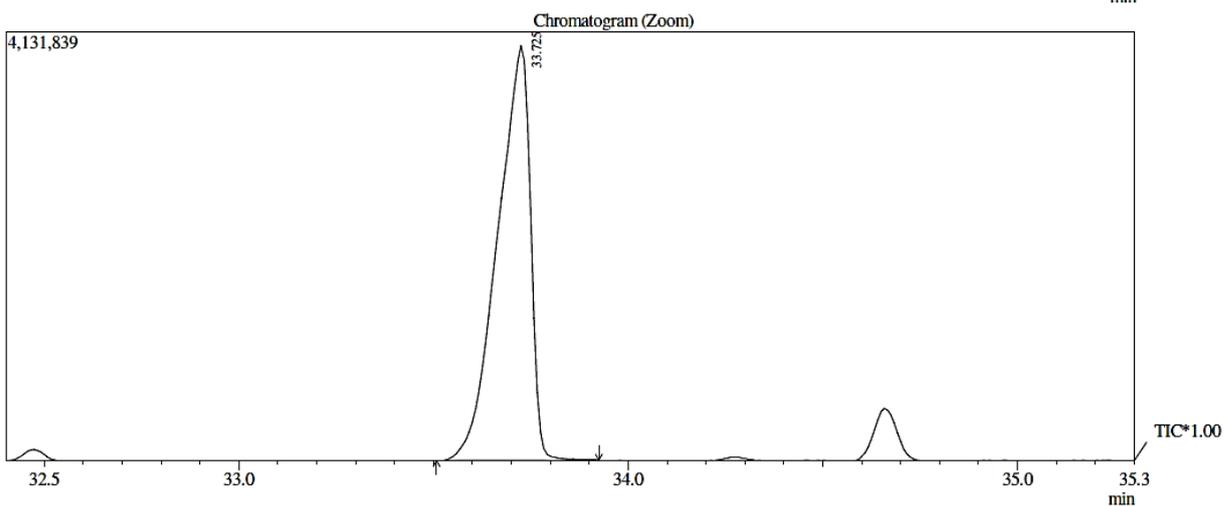
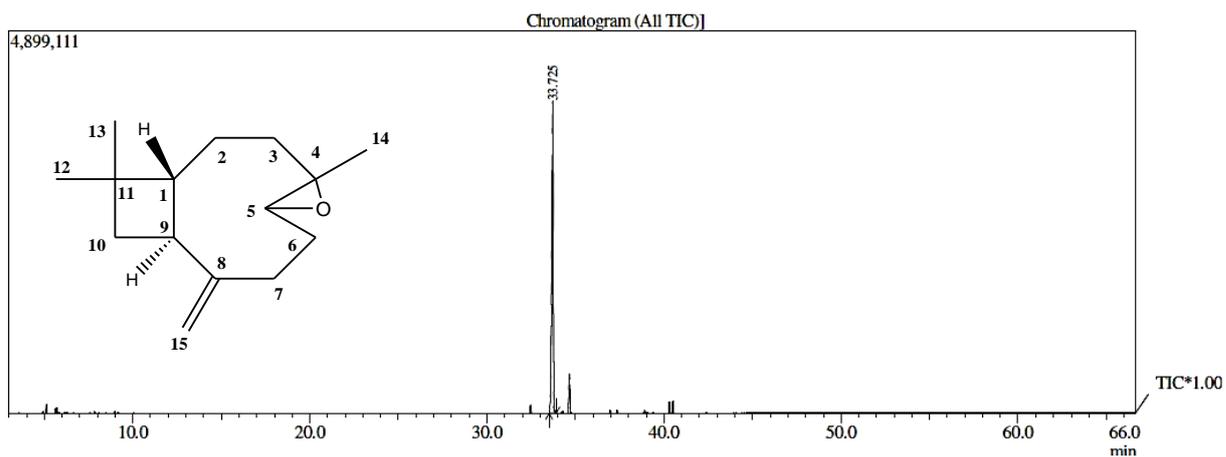
Anexo 33. Espectro de IV (ATR) do derivado 1 (Método 2).



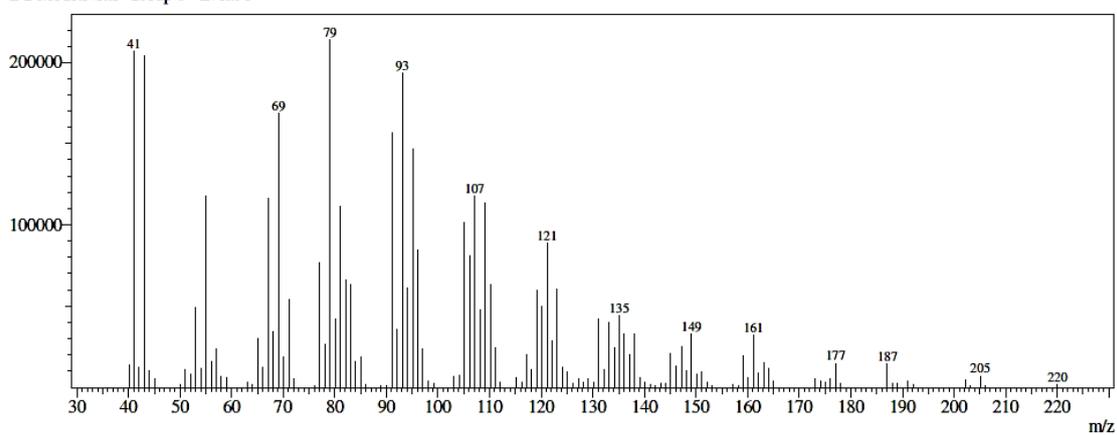
Anexo 34. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do derivado 1 (Método 2).



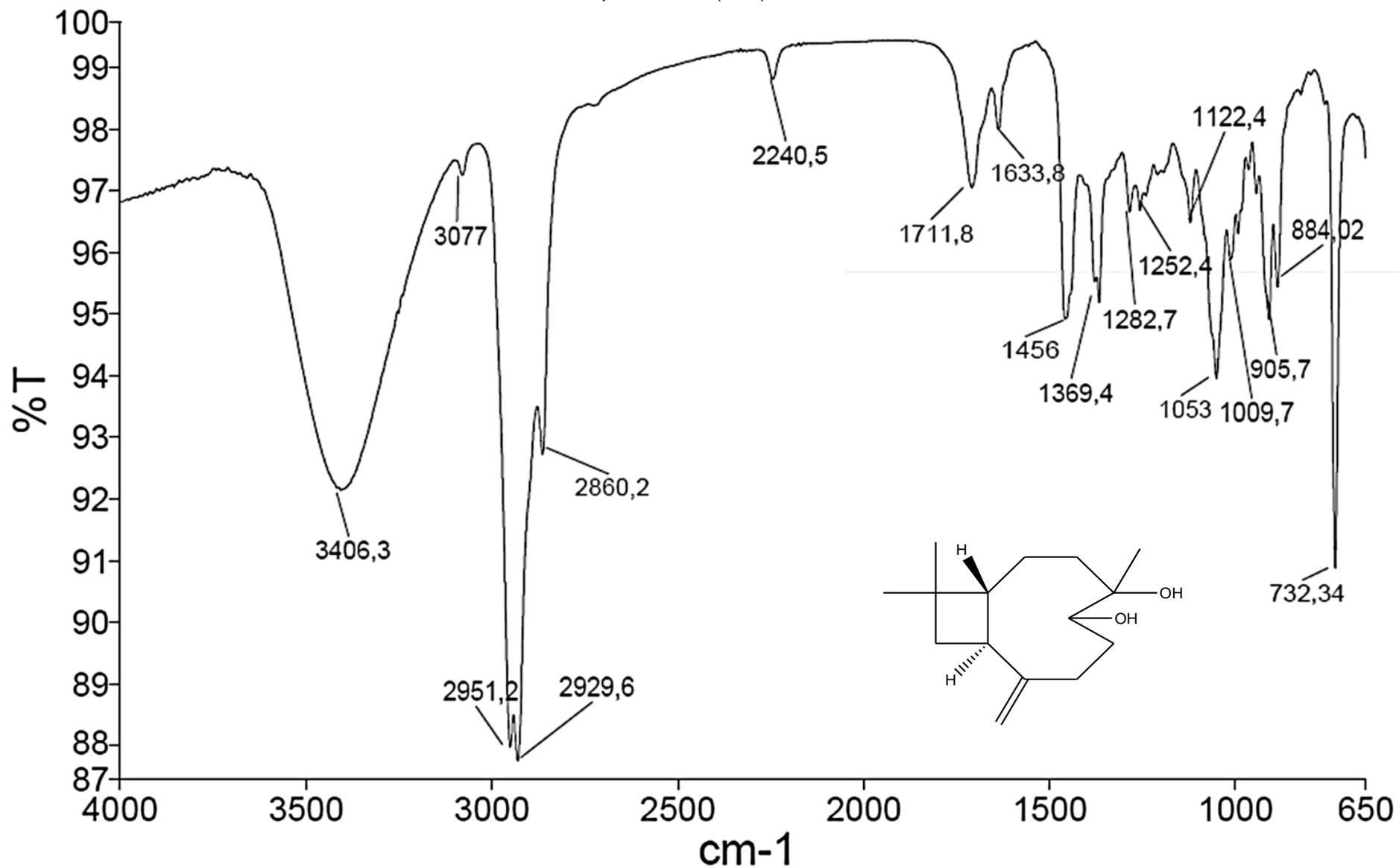
Anexo 35. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado 1 (**Método 2**).



Line#:1 R.Time:33.725(Scan#:3688)
MassPeaks:122
RawMode:Single 33.725(3688) BasePeak:79.05(213674)
BG Mode:None Group 1 - Event 1

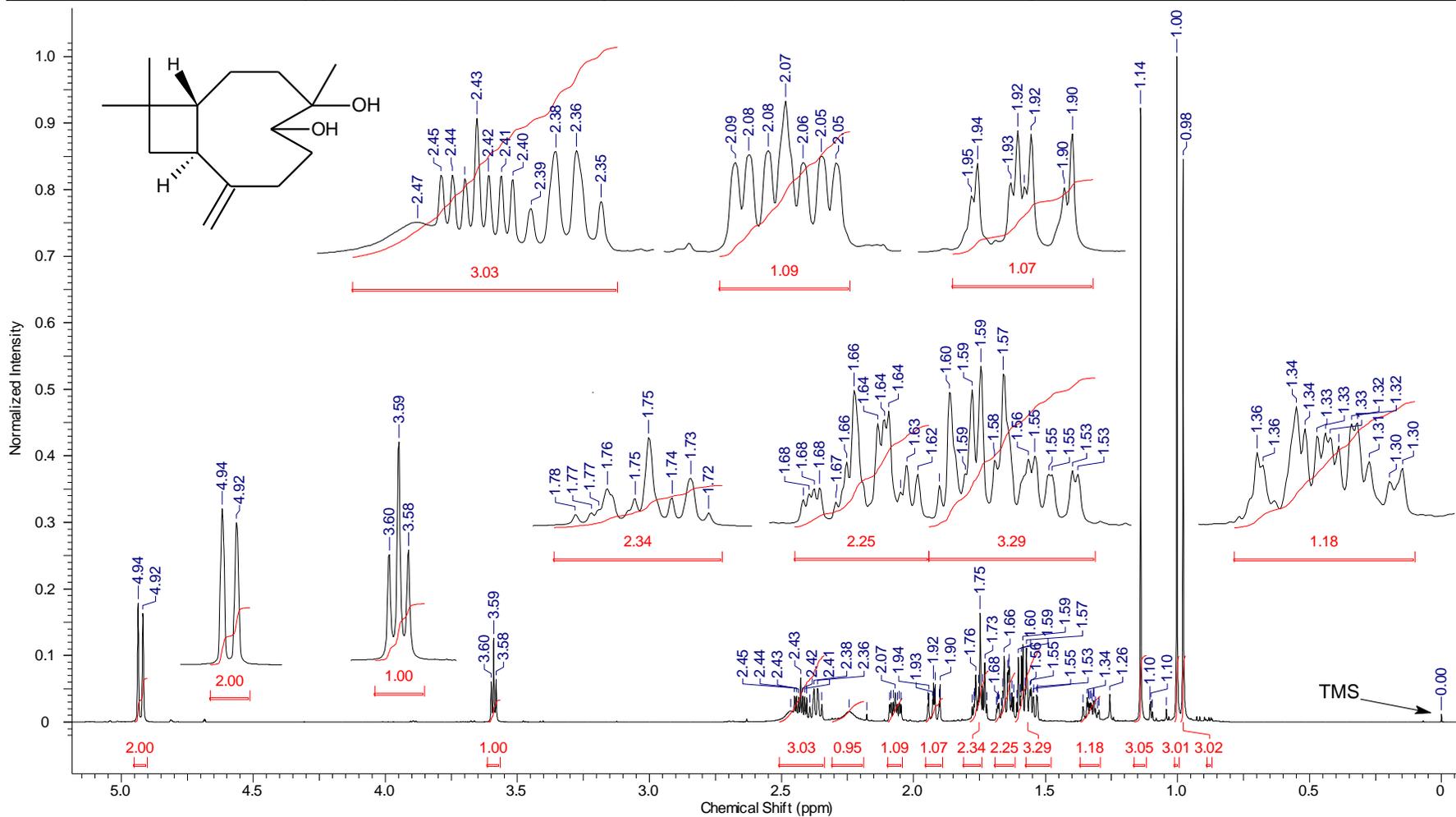


Anexo 36. Espectro de IV (ATR) do derivado 2.



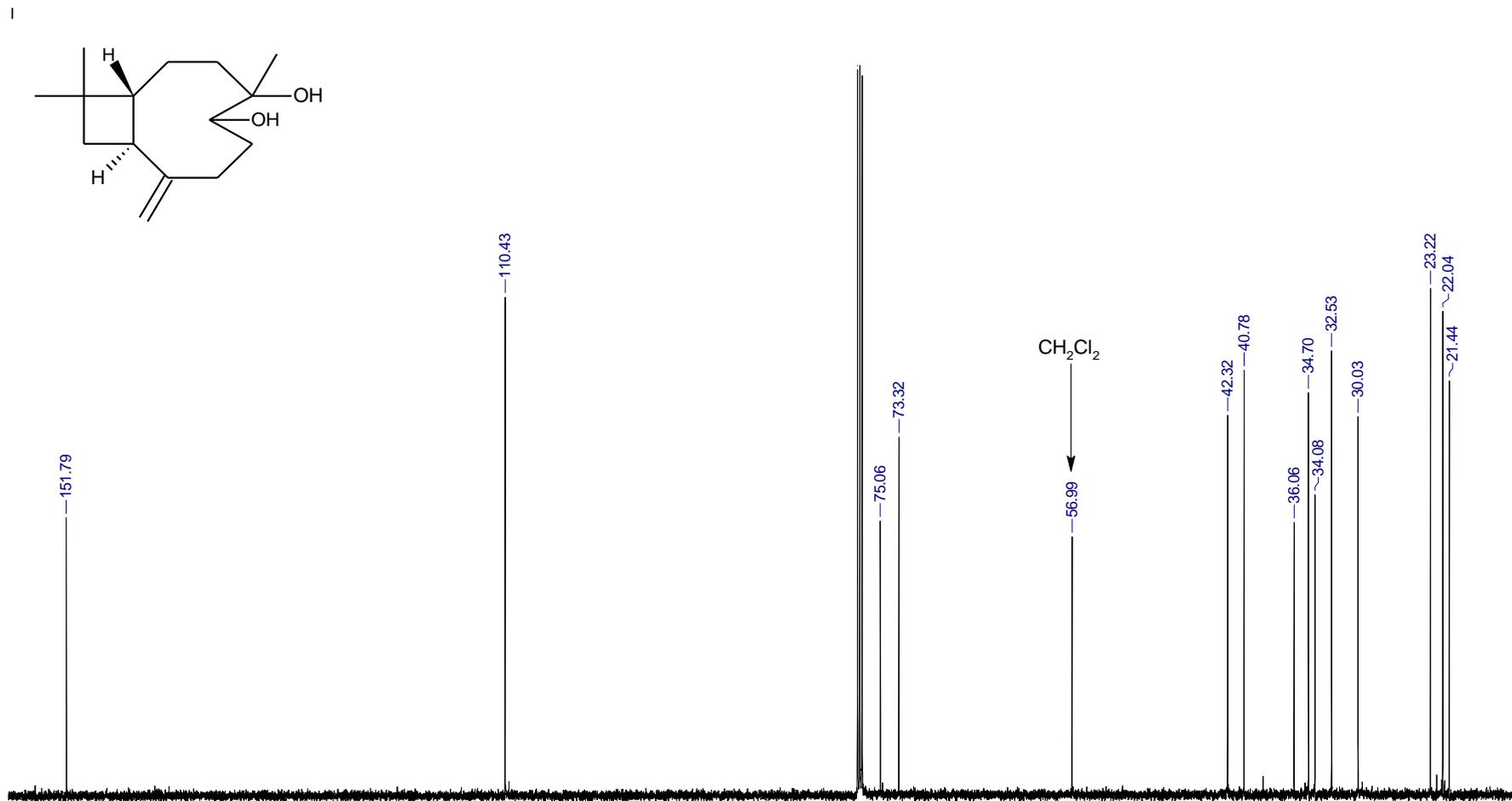
Anexo 37. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do derivado 2.

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	5 mm PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD Z114607/0139		Date	13 Abr 2015	
Date Stamp	13 Nov 2014 14:12:48	File Name	Derivado 2				
Frequency (MHz)	600.17	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zq30
Receiver Gain	31.21	SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	3694.9375	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12018.86	Temperature (degree C)	28.154

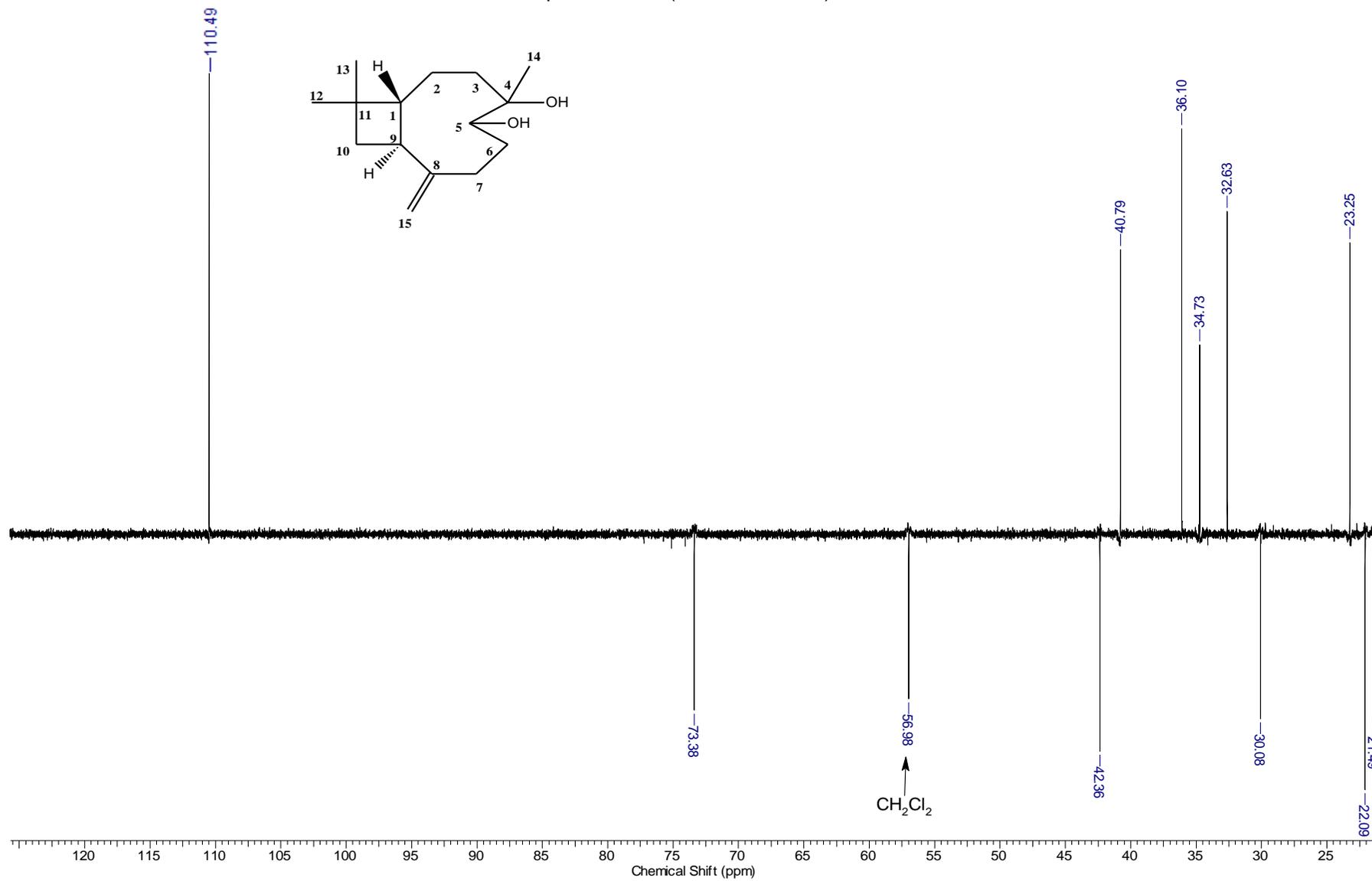


Anexo 38. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do derivado 2.

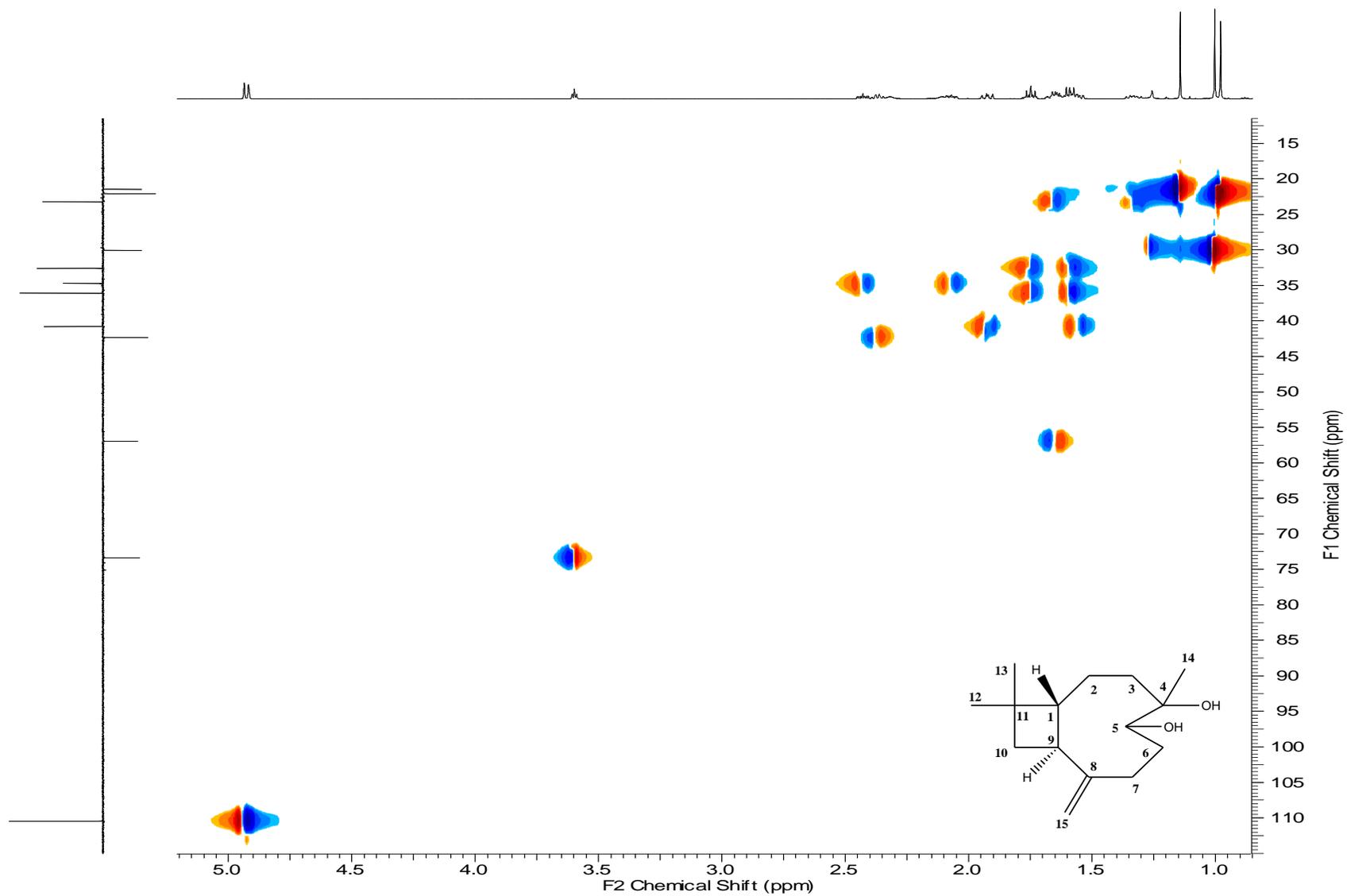
Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	5 mm PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD Z114607/0139		Date	13 Abr 2015	
Date Stamp	13 Nov 2014 14:14:56	File Name	Derivado 2				
Frequency (MHz)	150.91	Nucleus	13C	Number of Transients	188	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Receiver Gain	189.02	SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	15084.8799	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	36056.59	Temperature (degree C)	28.556



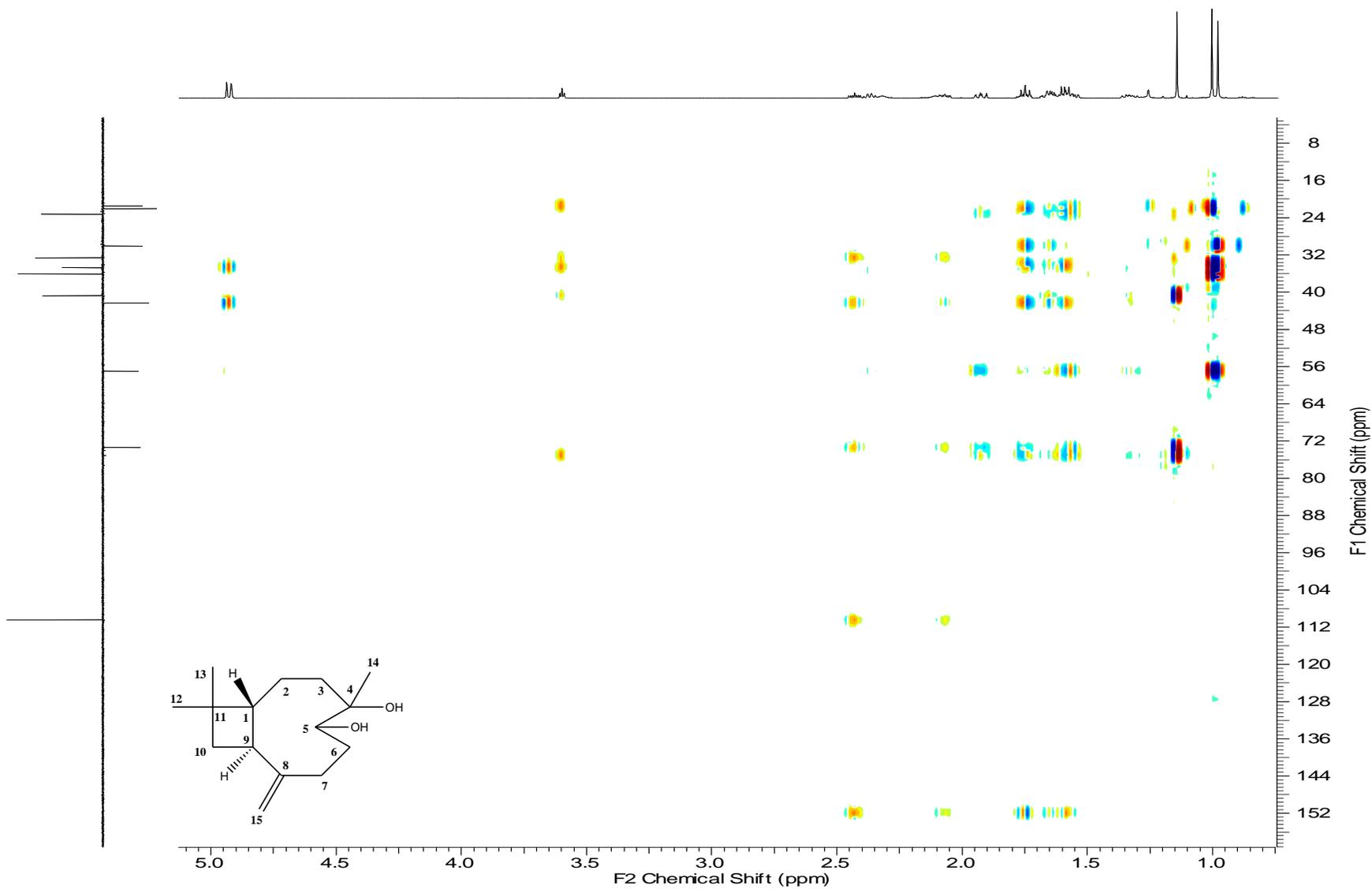
Anexo 39. Espectro DEPT (135 MHz, CDCl₃) do derivado 2.



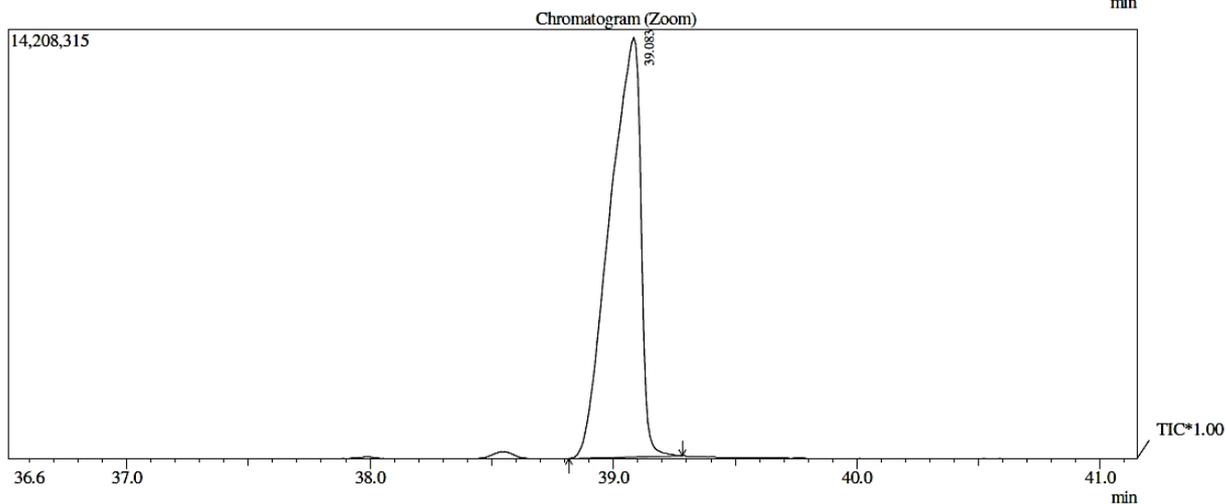
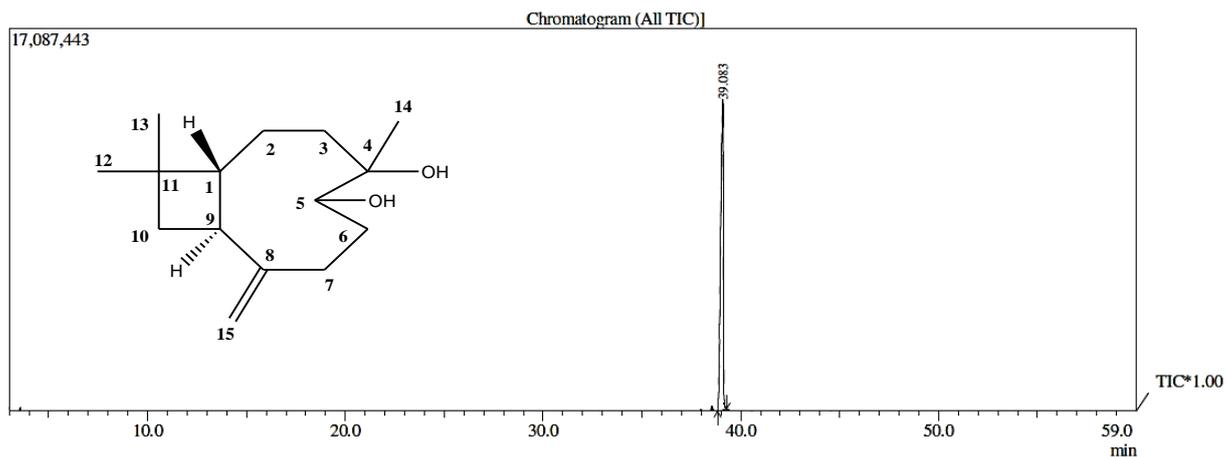
Anexo 40. Espectro HSQC (RMN ^1H = 600 MHz e DEPT = 135 MHz, CDCl_3) do derivado 2.



Anexo 41. Espectro HMBC (RMN ^1H = 600 MHz e DEPT = 135 MHz, CDCl_3) do derivado 2.

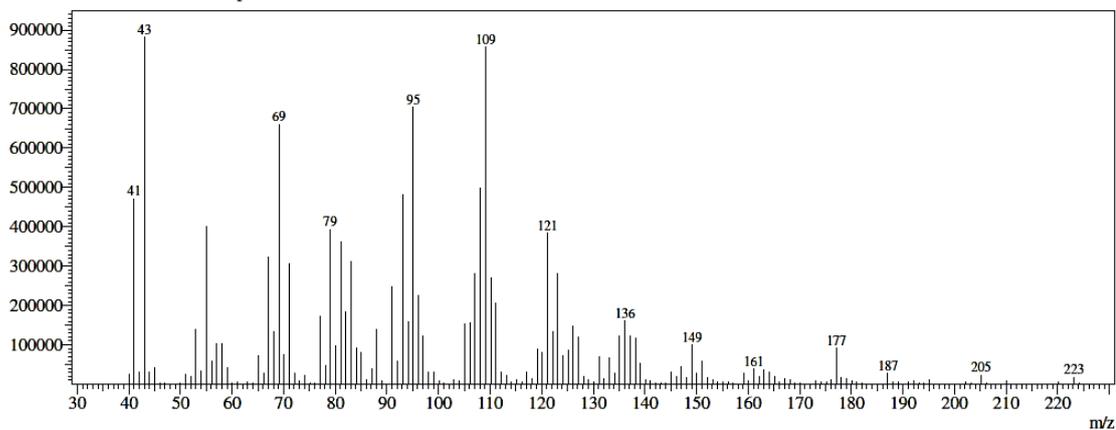


Anexo 42. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado 2.



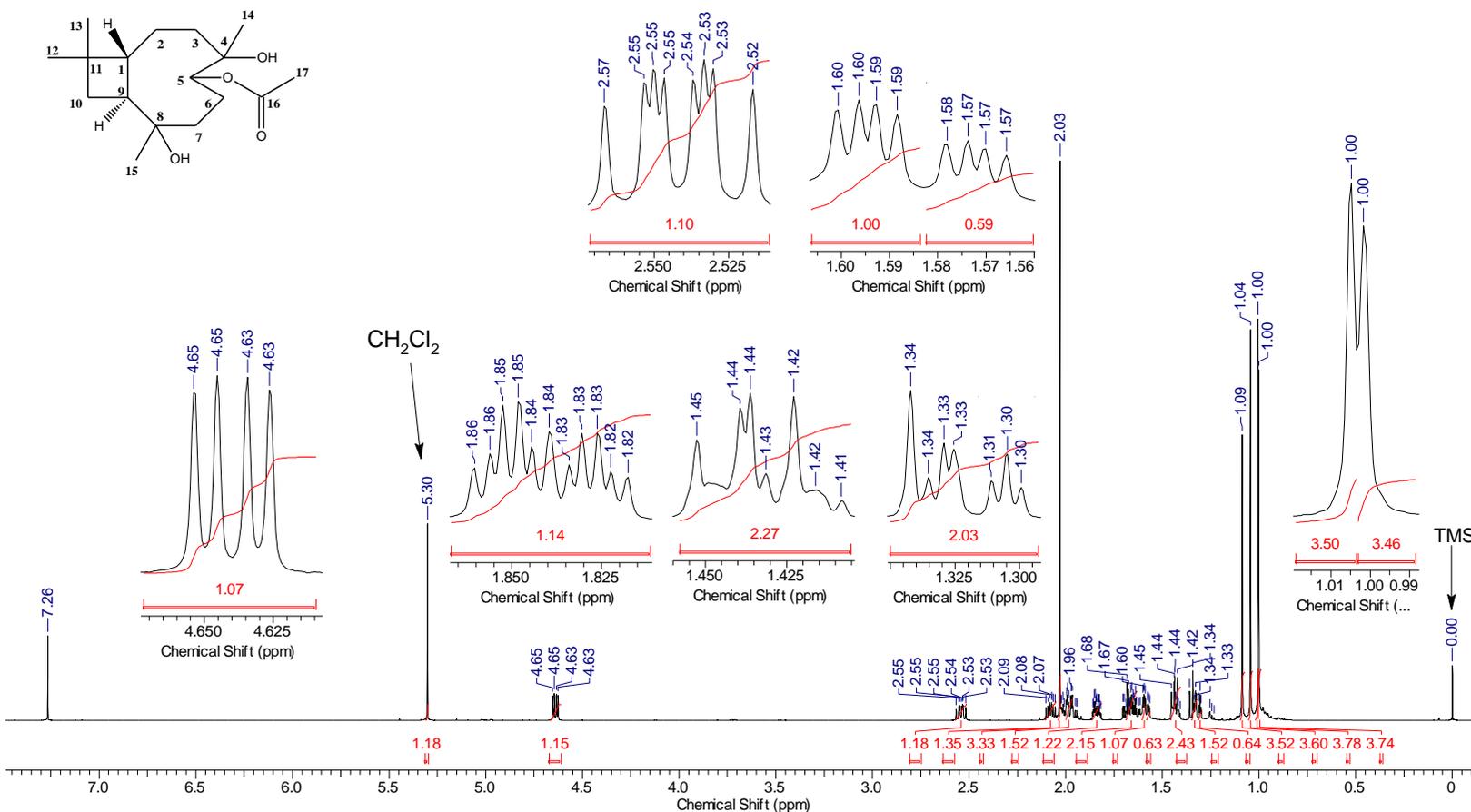
Spectrum

Line#:1 R.Time:39.083(Scan#:4331)
 MassPeaks:160
 RawMode:Averaged 39.075-39.092(4330-4332) BasePeak:43.00(882620)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



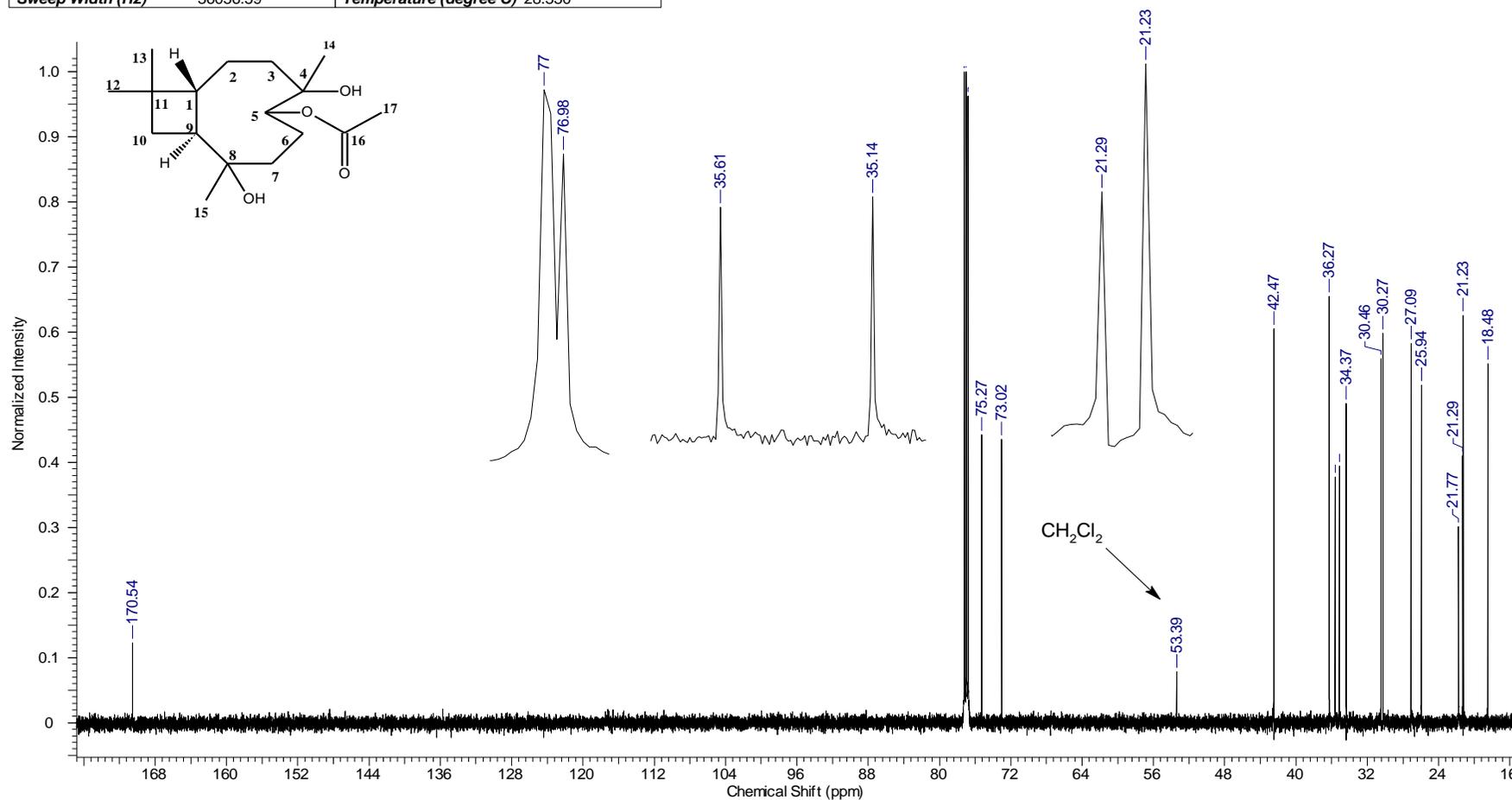
Anexo 43. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do derivado 3.

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	Paulo Henrique CDCl ₃	Date	-----	Date Stamp	-----
File Name	Derivado 3						
Frequency (MHz)	600.17	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Receiver Gain	84.95	SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	3692.3699
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12018.86	Temperature (degree C)	25.151		

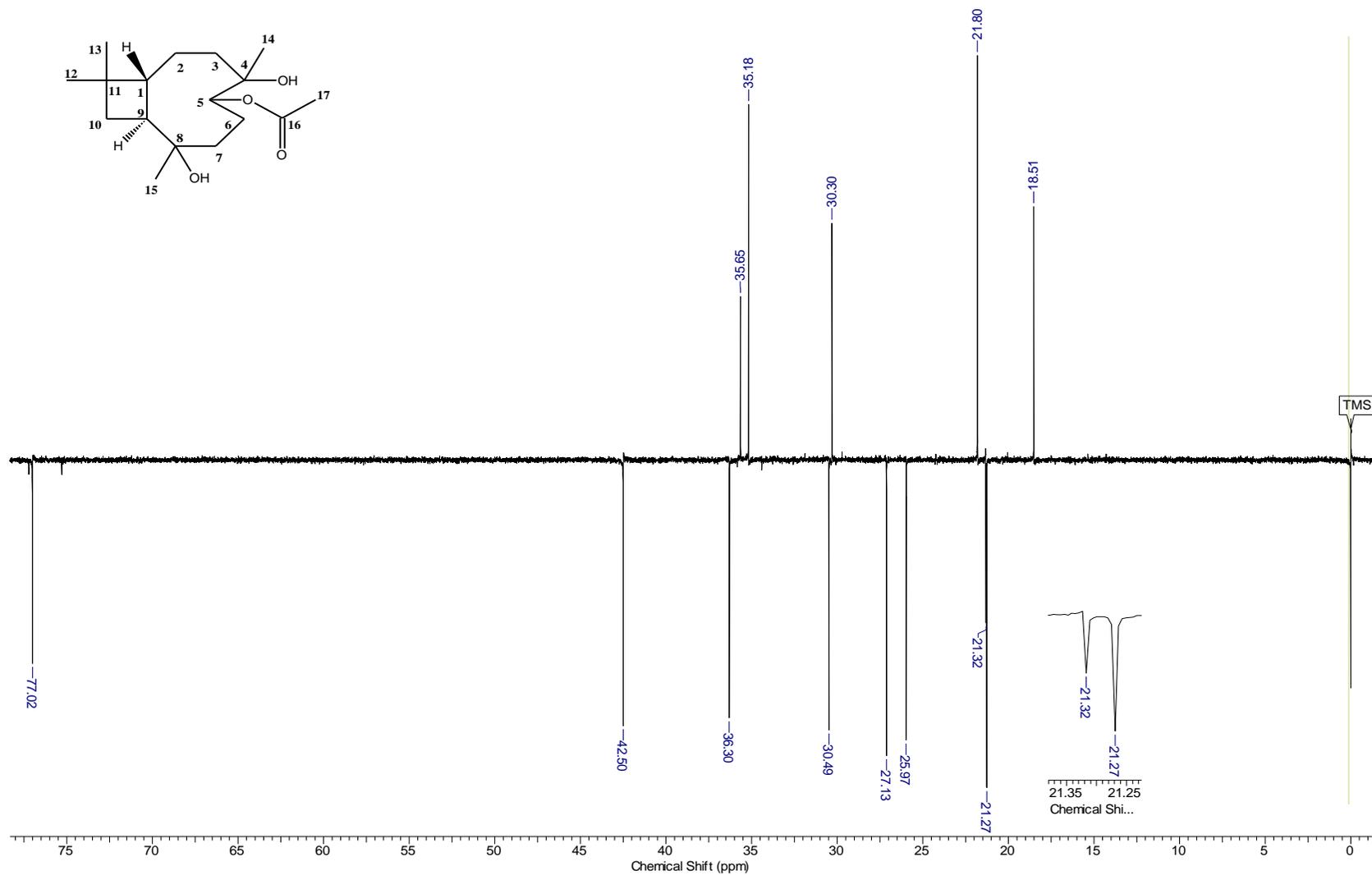


Anexo 44. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do derivado 3.

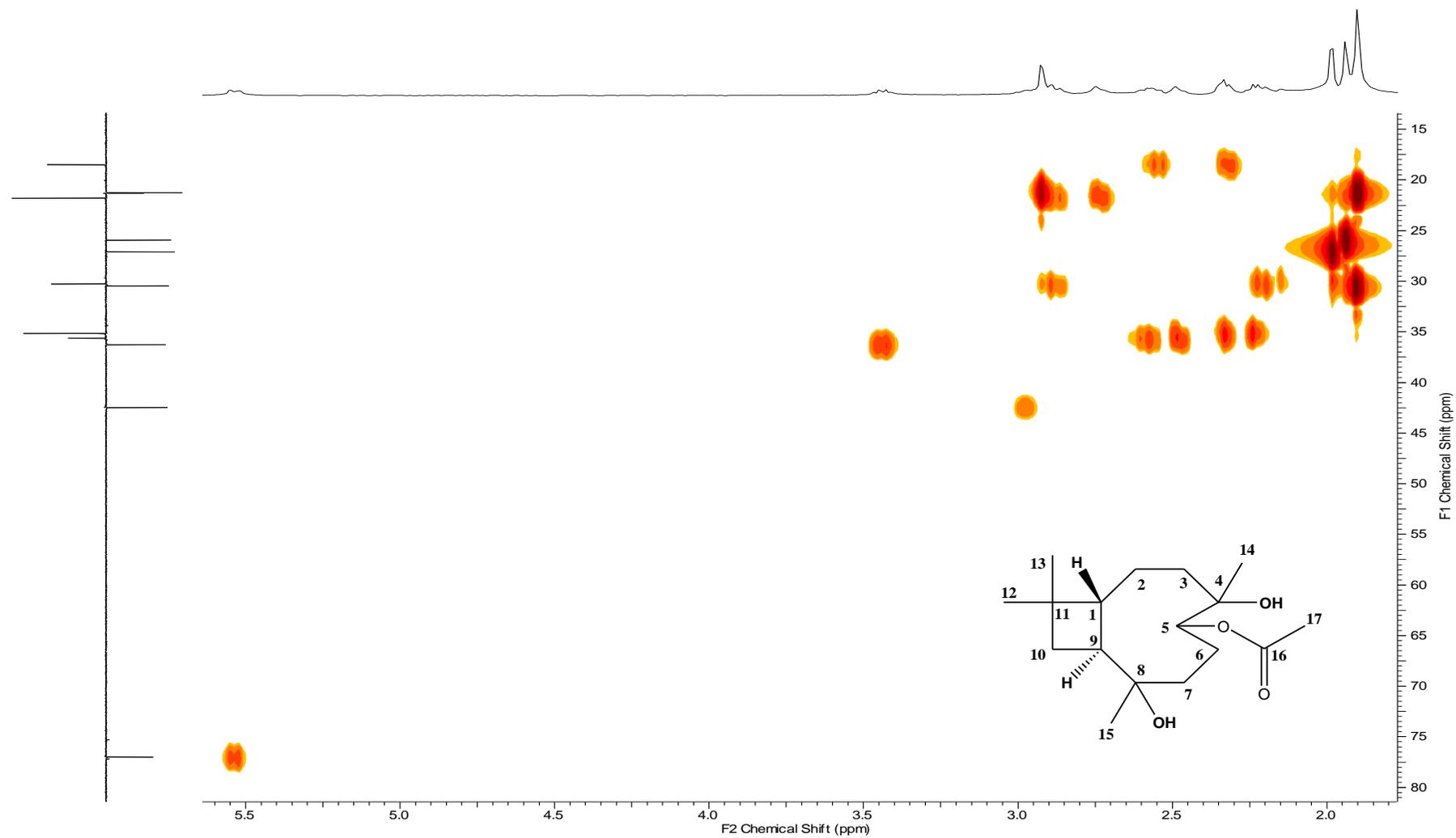
Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	Paulo Henrique LITMO CDCI3 23-10-2014	Date	23 Oct 2014
Date Stamp	23 Oct 2014 15:18:56				
File Name	Derivado 3		Frequency (MHz)	150.91	
Nucleus	13C	Number of Transients	824	Origin	spect
Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	15087.0801
Sweep Width (Hz)	36056.59	Temperature (degree C)	28.330	Receiver Gain	189.02
				Spectrum Type	STANDARD



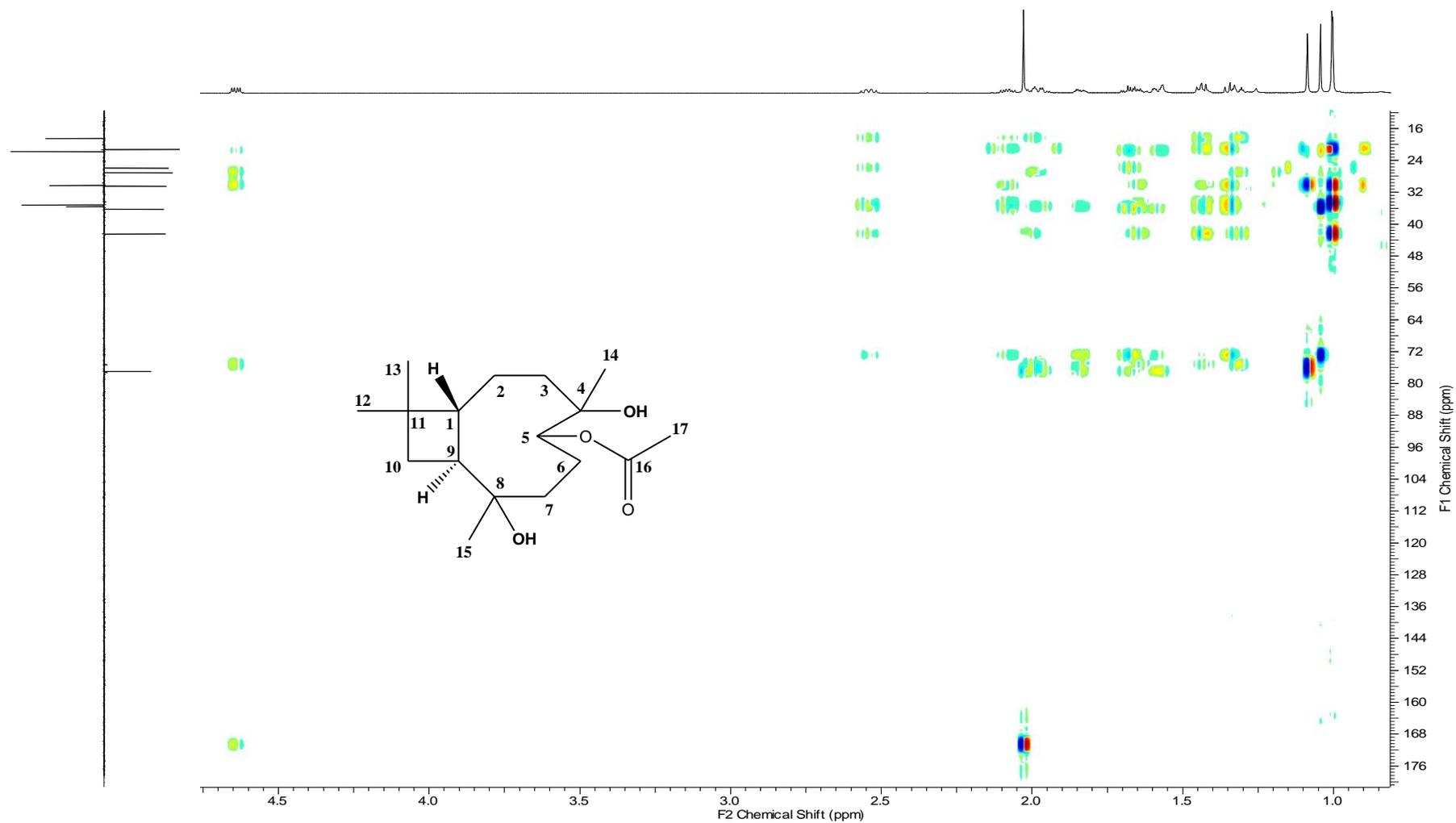
Anexo 45. Espectro DEPT (135 MHz, CDCl₃) do derivado 3.



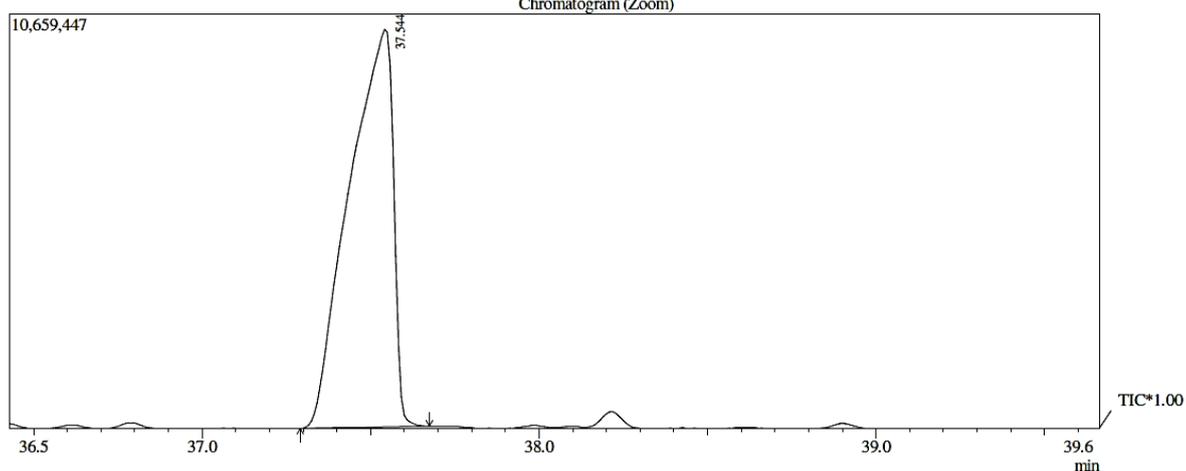
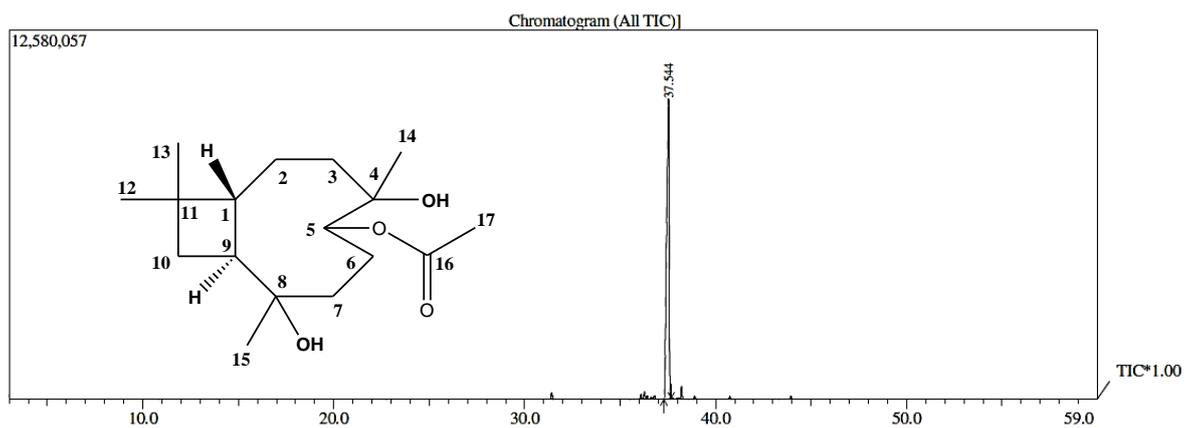
Anexo 46. Espectro HSQC (RMN ^1H = 600 MHz e DEPT = 135 MHz, CDCl_3) do derivado **3**.



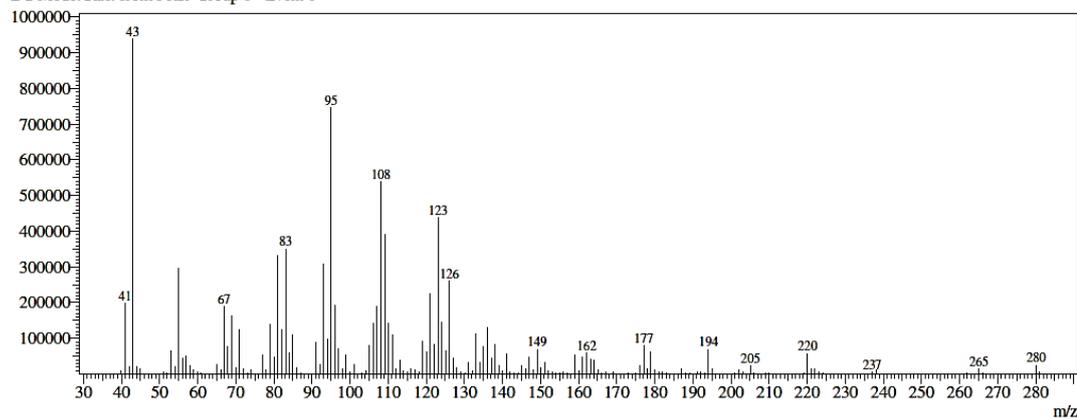
Anexo 47. Espectro HMBC (RMN ^1H = 600 MHz e DEPT = 135 MHz, CDCl_3) do derivado 3.



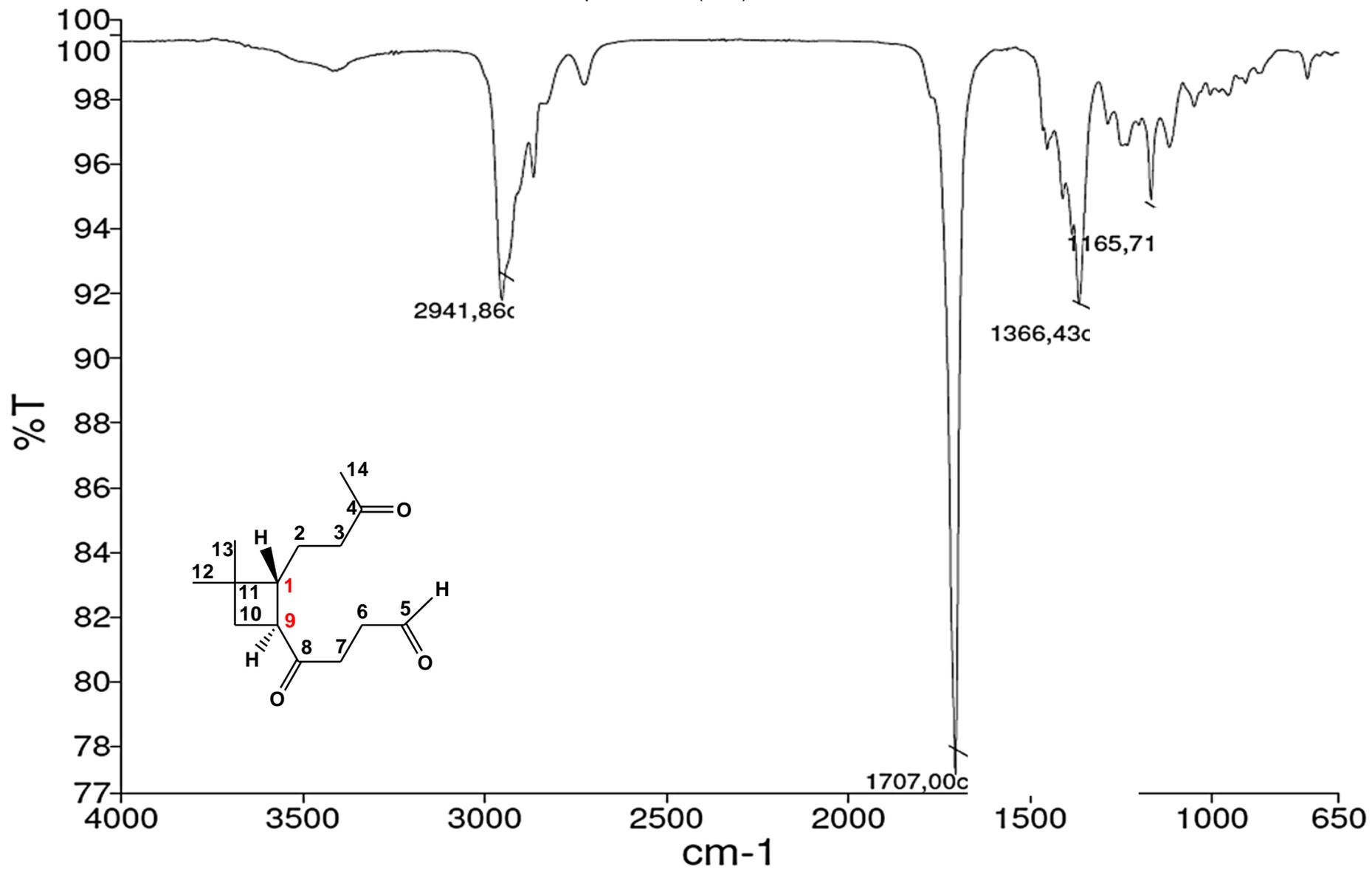
Anexo 48. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado 3.



Line#:1 R.Time:37.542(Scan#:4146)
 MassPeaks:164
 RawMode:Averaged 37.533-37.550(4145-4147) BasePeak:42.95(939468)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

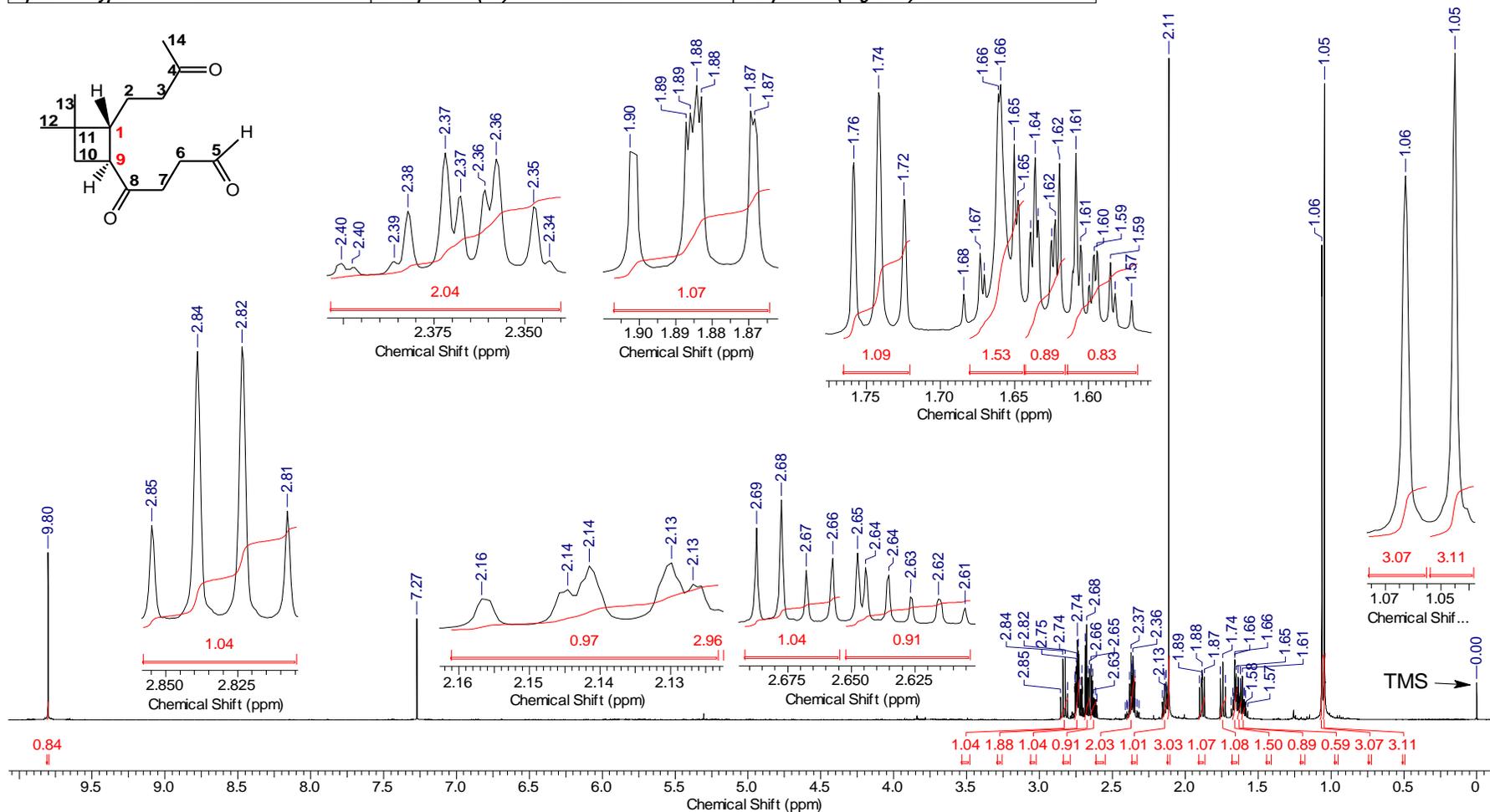


Anexo 49. Espectro de IV (ATR) de derivado 4.



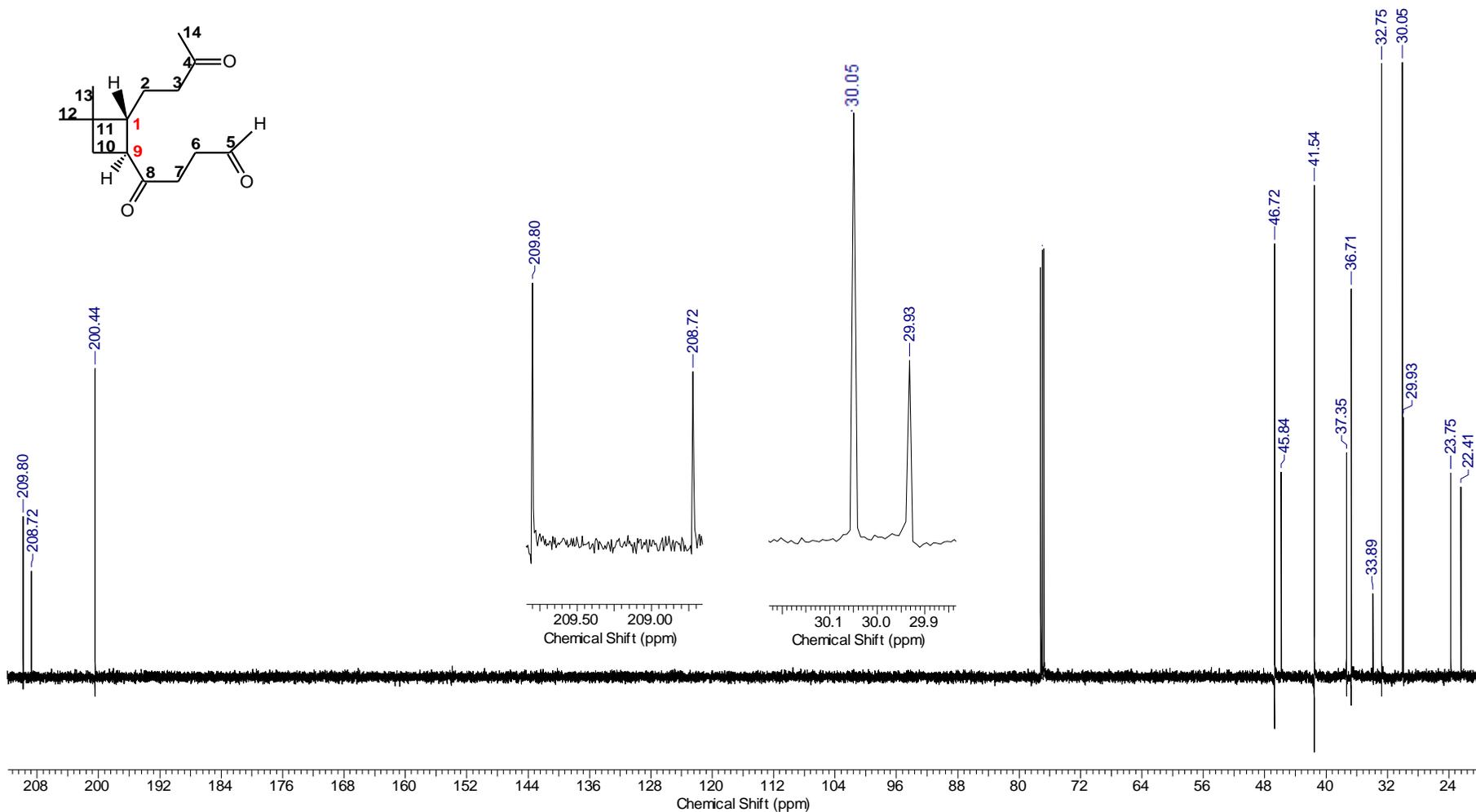
Anexo 50. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do derivado 4.

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	Paulo Henrique CDCl ₃	Date	-----	Date Stamp	-----
File Name	Derivado 4						
Frequency (MHz)	600.17	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Receiver Gain	75.86	SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	3696.4048
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12018.86	Temperature (degree C)	25.154		

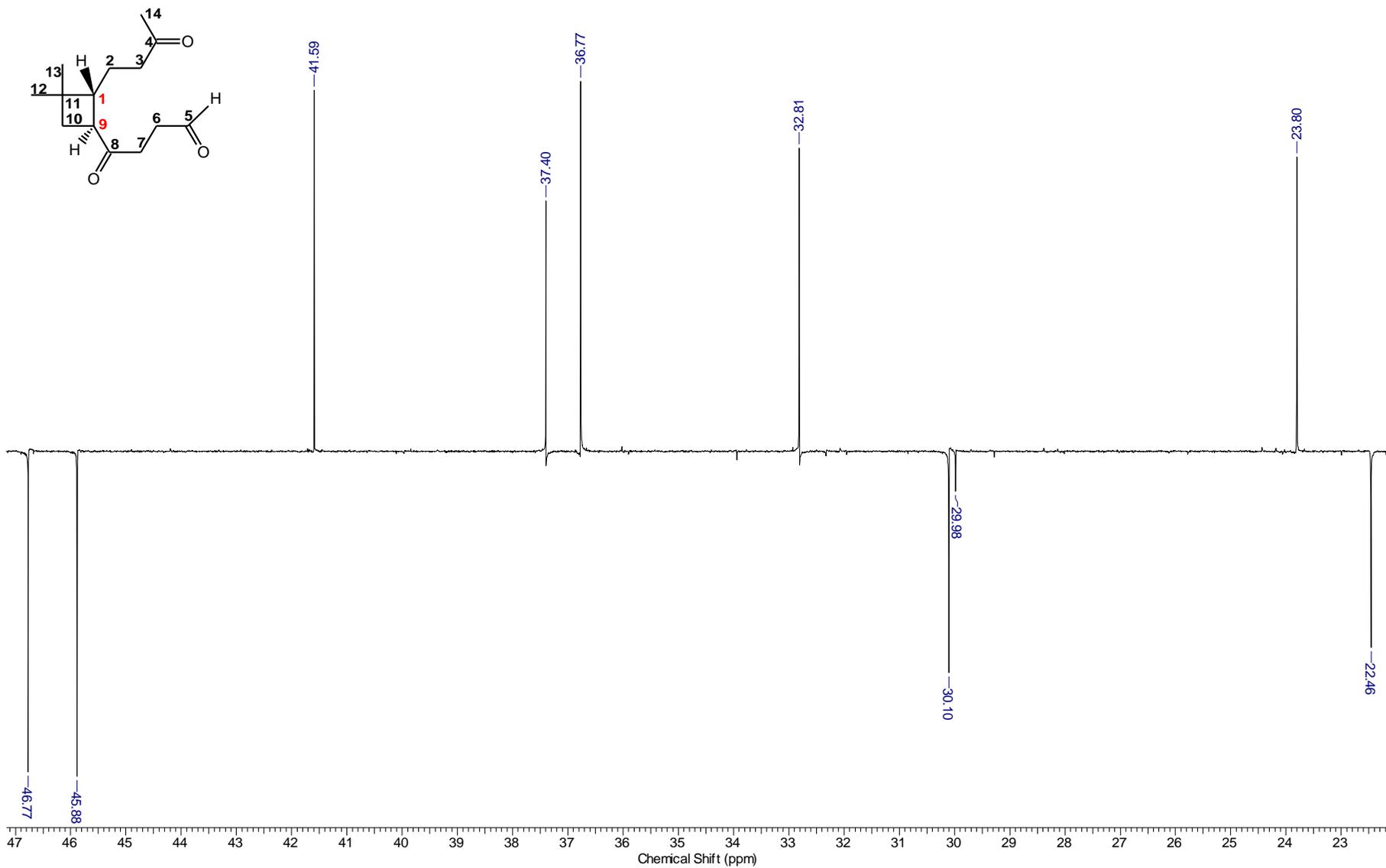


Anexo 51. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do derivado 4.

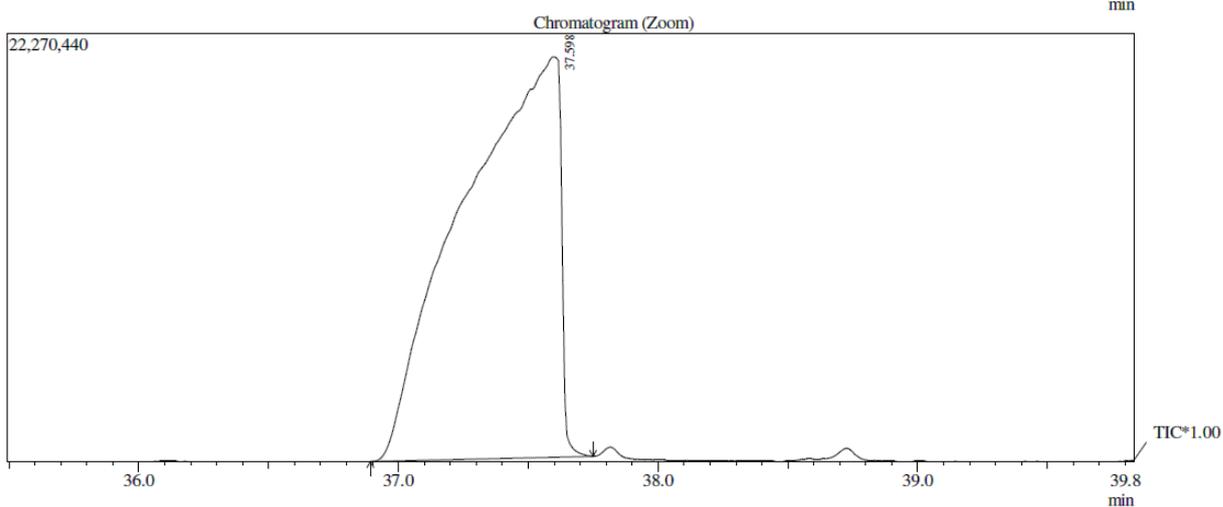
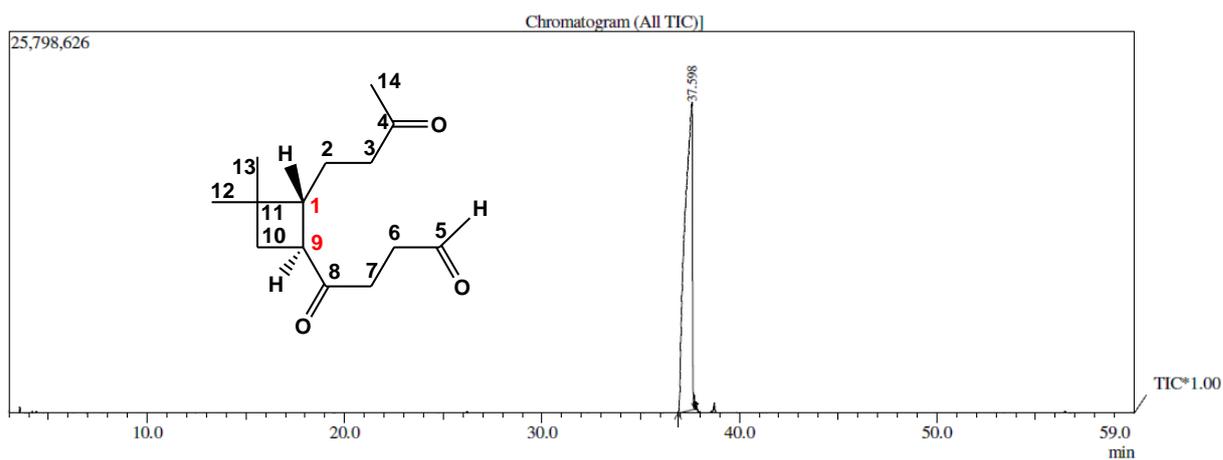
Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	Análise do derivado 4		
Date	06 Nov 2014	Date Stamp	06 Nov 2014		
File Name	Derivado 4	Frequency (MHz)	150.91		
Nucleus	13C	Number of Transients	277	Origin	spect
Owner	nmsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgg30
SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	15084.8799
Sweep Width (Hz)	36056.59	Temperature (degree C)	28.422	Spectrum Type	STANDARD



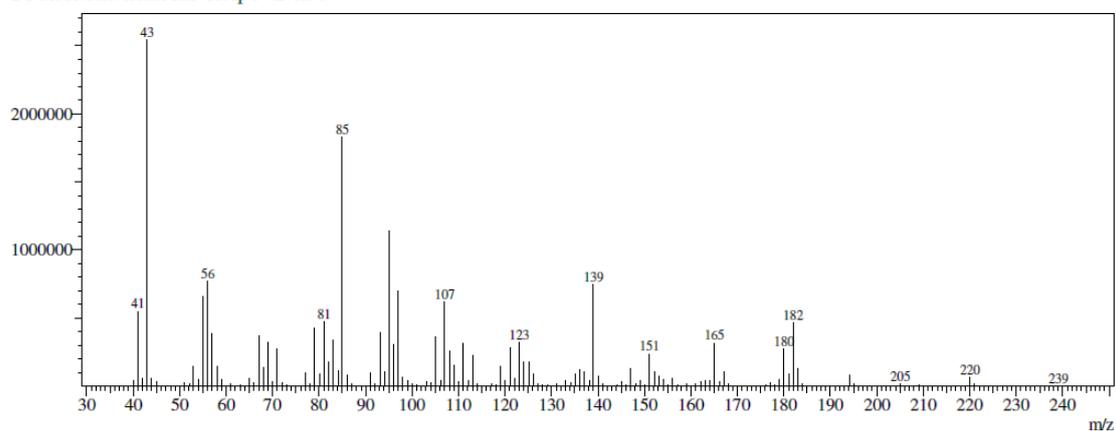
Anexo 52. Espectro DEPT 135 (135 MHz, CDCl₃) do derivado 4.



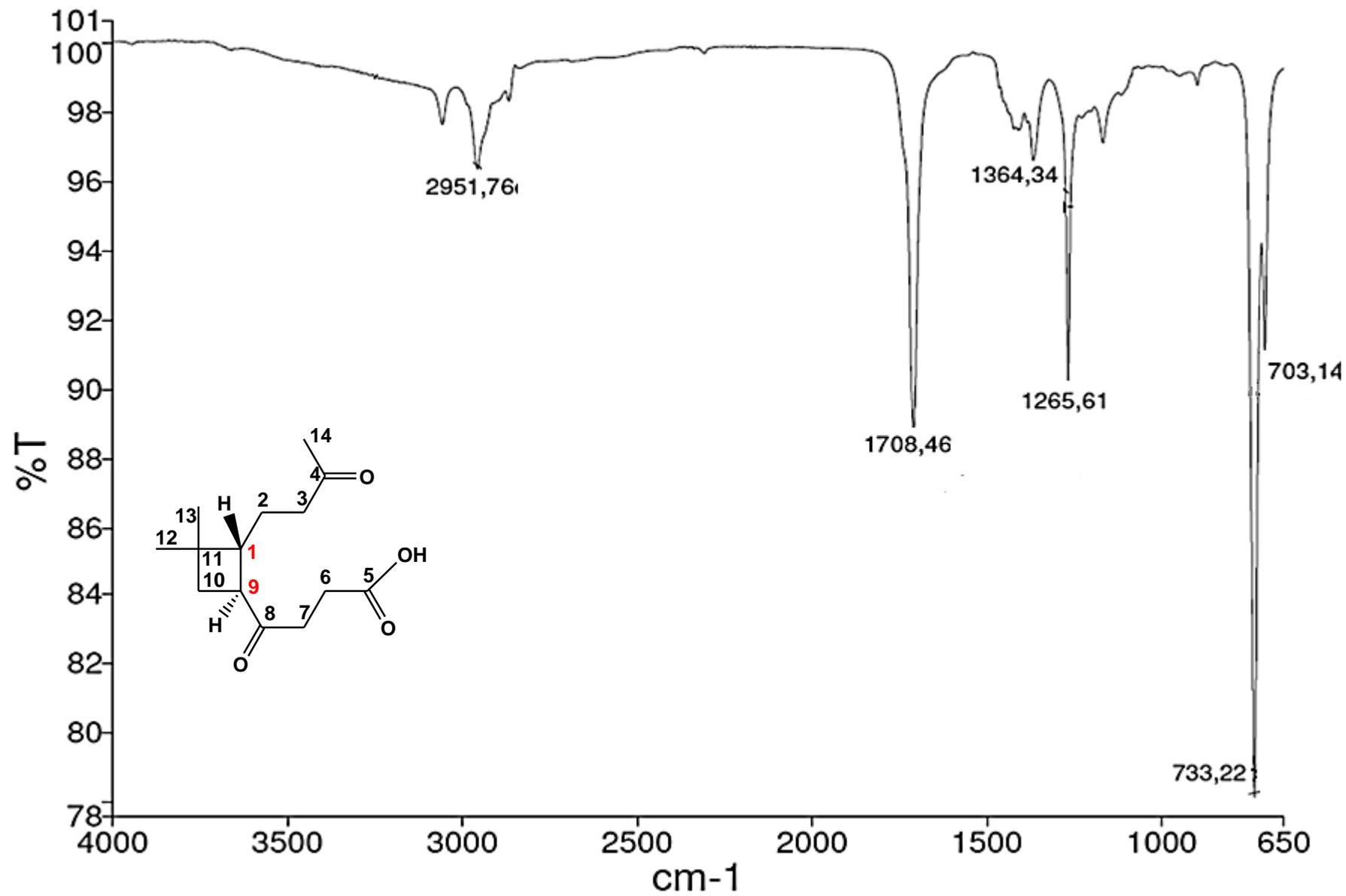
Anexo 53. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado 5.



Line#:1 R.Time:37.600(Scan#:4153)
 MassPeaks:159
 RawMode:Averaged 37.592-37.608(4152-4154) BasePeak:43.00(2544757)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

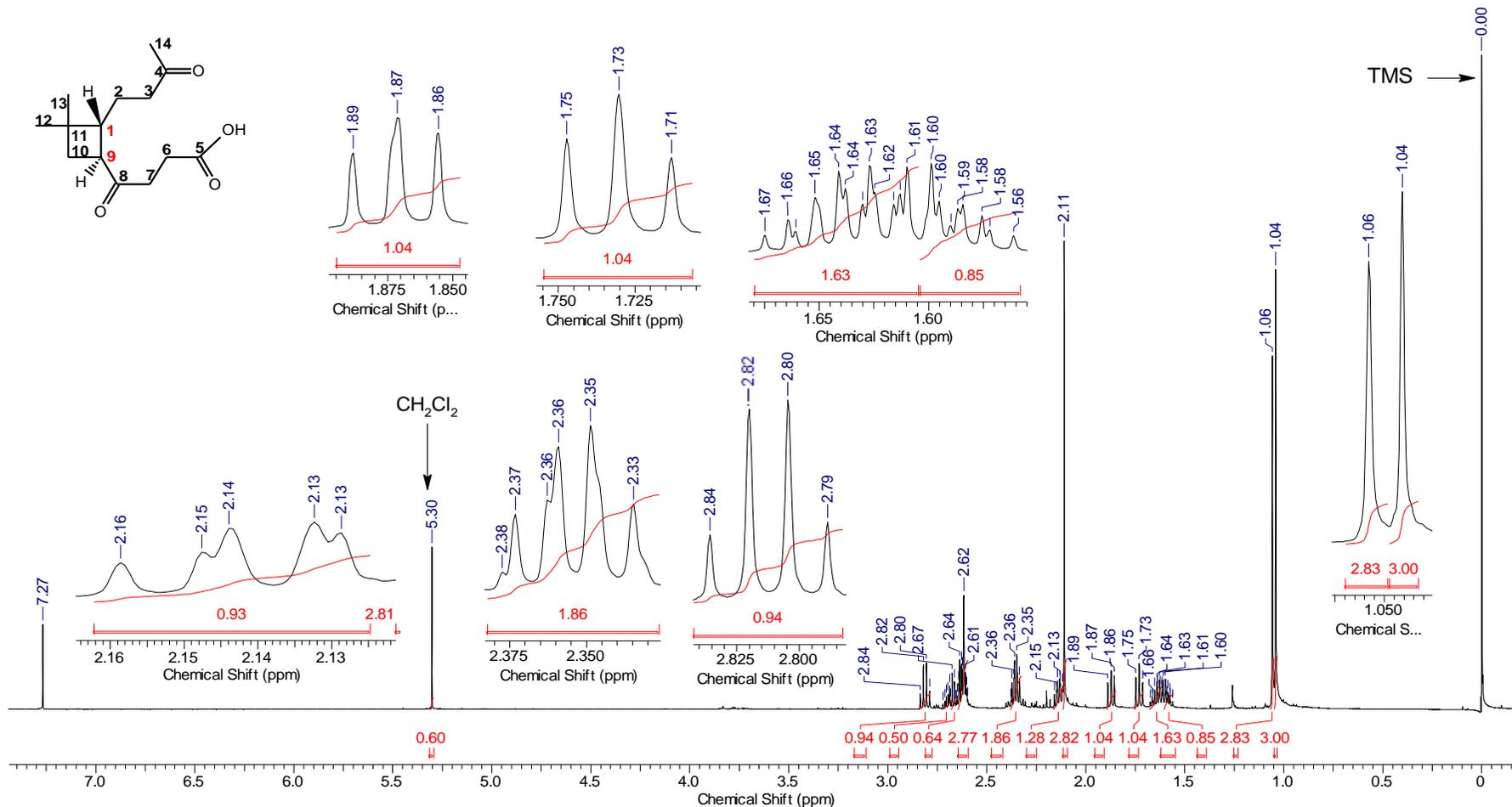


Anexo 54. Espectro de IV (ATR) do derivado 5.



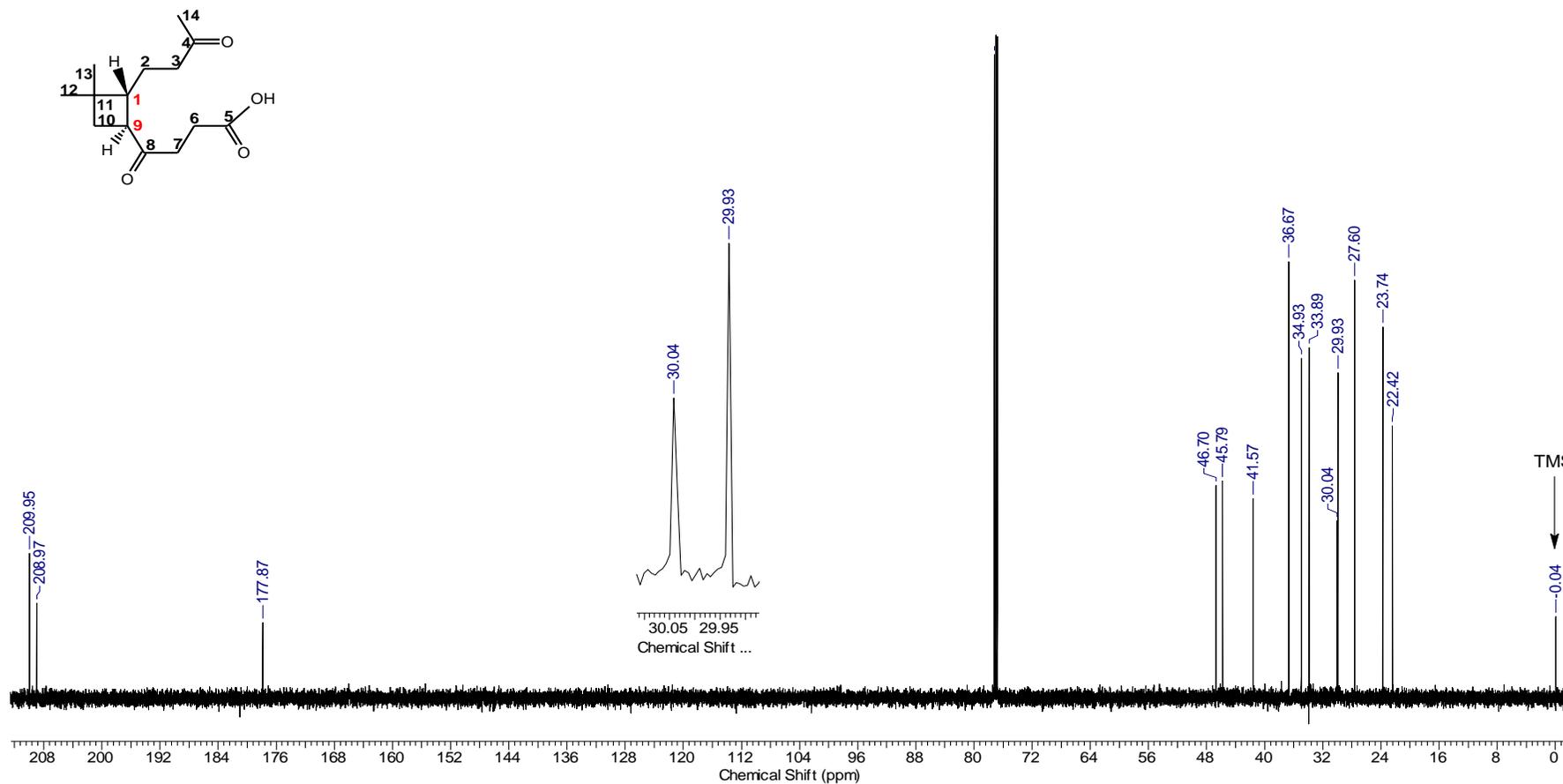
Anexo 55. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do derivado 5.

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	Paulo Henrique Produto Minoritario da Ozonolise		Date	----	
Date Stamp	---						
File Name	Derivado 5						
Frequency (MHz)	600.17	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	nmrsu	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Receiver Gain	84.95	SW(cyclical) (Hz)	12019.23	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	3694.5708
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12018.86	Temperature (degree C)	25.153		

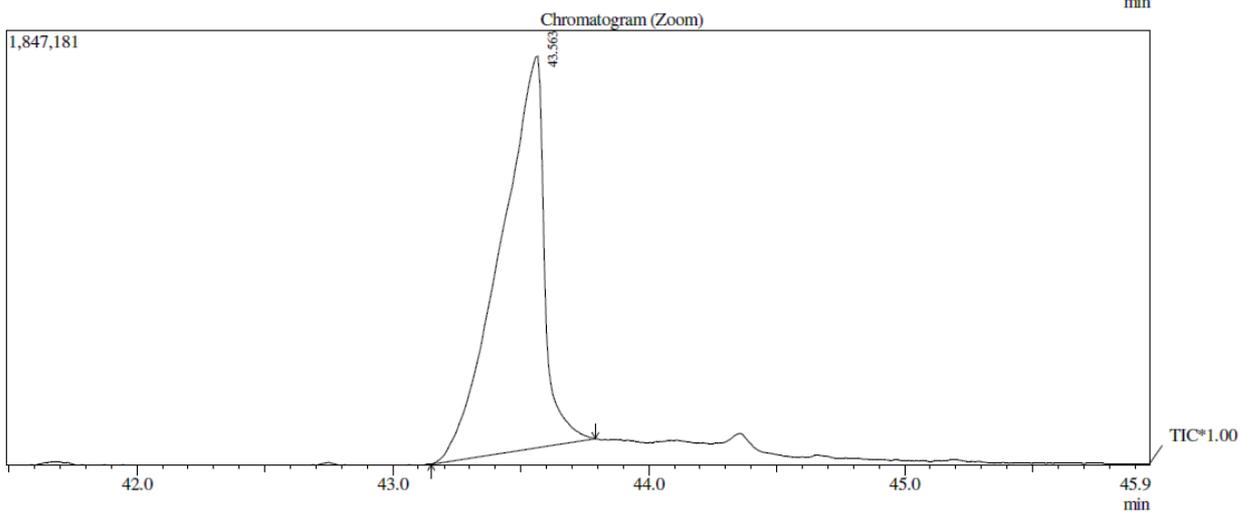
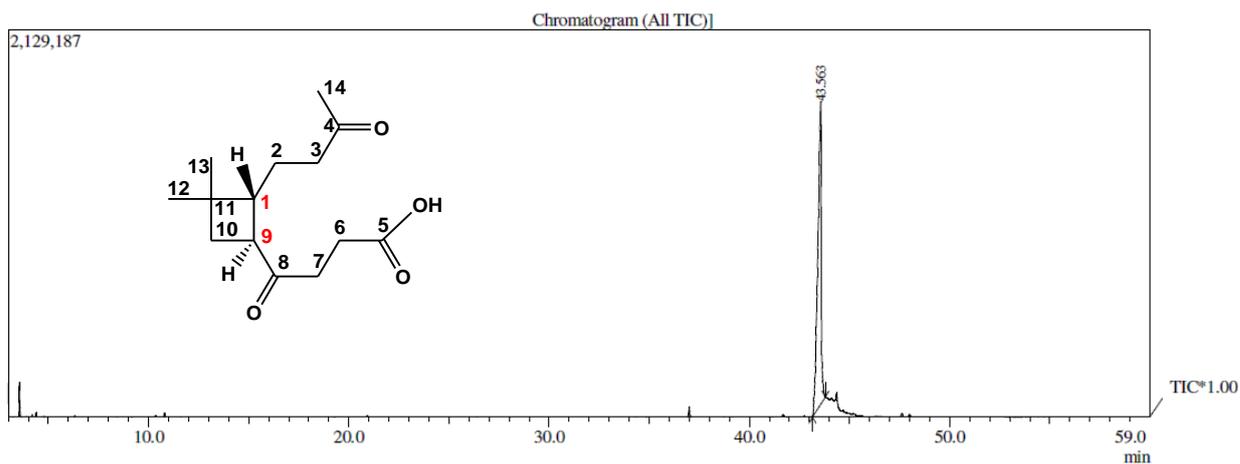


Anexo 56. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do derivado 5.

Acquisition Time (sec)	0.9088	Comment	Análise do derivado 5		
Date	-----	Date Stamp	-----		
File Name	Derivado 5	Frequency (MHz)	150.91		
Nucleus	13C	Number of Transients	267	Origin	spect
Owner	nmrsu	Points Count	32768	Original Points Count	32768
SW(cyclical) (Hz)	36057.69	Pulse Sequence	zgpg30	Receiver Gain	189.02
Sweep Width (Hz)	36056.59	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	15085.9795
		Temperature (degree C)	28.418	Spectrum Type	STANDARD



Anexo 57. Cromatograma e espectro de massas (dados da técnica) do derivado 5.



Line#:1 R.Time:43.558(Scan#:4868)
MassPeaks:120
RawMode:Averaged 43.550-43.567(4867-4869) BasePeak:42.95(191884)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

