



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU
INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Sheila Assunção da Silva

**Avaliação sazonal e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de
Eugenia calycina (pitanga-do-cerrado)**

UBERLÂNDIA – MG
JUNHO DE 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU
INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Sheila Assunção da Silva

**Avaliação sazonal e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de
Eugenia calycina (pitanga-do-cerrado)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharelado em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientação: Prof^a. Dr^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa

UBERLÂNDIA – MG

JUNHO DE 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU

INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Sheila Assunção da Silva

**Avaliação sazonal e atividade antibacteriana do óleo essencial das
folhas de *Eugenia calycina* (pitanga-do-cerrado)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito do Curso de Química
Industrial da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharelado em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, Minas Gerais, 28 de Junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dr.^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa

(Orientador- UFU)

Prof. Dr. Alberto de Oliveira

(Examinador- UFU)

Ms. Michelle Nauara Gomes do Nascimento

(Examinador- UFU)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me deu força, nunca me desamparando em nenhum momento de minha vida.

Aos meus pais, Claudio José e Elana, a minha Avó Aparecida e a minha irmã Claudiana por nunca me deixar desanimar, ficando sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, às vezes, sacrificando a si próprio em razão do meu bem estar e felicidade. Nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos. Obrigada eu amo muito vocês e sem vocês hoje eu não estaria aqui.

Agradeço aos professores que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para melhor aprendizado, em especial a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Raquel Sousa pela orientação, dedicação e paciência durante todo o desenvolvimento das atividades de pesquisa, auxiliando e sanando todas as dúvidas, apresentando técnicas laboratoriais das quais não fazia parte da grade curricular. Só tenho a agradecer pelo carinho, dedicação e pelos ensinamentos, obrigada por tudo, aprendi muito com a grande professora, amiga e mulher que você é.

Ao meu namorado e amigo Douglas Mendes que me apoiou, me entendeu, colaborou e vibrou comigo nesta conquista.

As minhas grandes amigas Érica Abadia e a Fernanda Soler por sempre me apoiarem, que sempre me ouviram e me aconselharam com paciência e compreensão, agradeço também pelos momentos de risadas e descontração que passamos juntas durante os 4 anos da graduação.

A todos os pesquisadores e amigos do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPeN) que direto ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho.

À FAPEMIG (APQ01392-14 A.O., APQ02481-14 M.P e APQ02342-18 R.M.F.S, CEX-RED00010-14 Rede Mineira), CAPES e CNPq (449846/2014-8M.P) e pelos incentivos como bolsas e projetos aprovados no NuPPeN.

E por fim, agradeço também à UFU e ao Instituto de Química por ter me dado à chance e todas as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

*“Nós somos aquilo que fazemos repetidas vezes, repetidamente. A excelência, portanto não é um
feito, mas um hábito.”*

Aristóteles

RESUMO

Eugenia calycina é uma espécie vegetal encontrada no Cerrado, popularmente conhecida como “pitanga do cerrado”. Trabalhos realizados revelaram a presença de sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados no óleo essencial das folhas, que apresentou boa atividade contra bactérias encontradas na cavidade oral. Sabe-se que as composições químicas dos óleos essenciais estão sujeitas às variações provocadas pelas condições climáticas e estágios vegetativos. Devido a estas variações, se torna importante determinar o melhor período do ano para realizar a coleta das folhas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das variações sazonais na composição química do óleo essencial das folhas frescas de *E. calycina*, bem como sua atividade antibacteriana contra bactérias da cavidade bucal. Este estudo identificou e comparou os compostos do óleo essencial extraído das folhas frescas coletadas de dois em dois meses, a primeira coleta iniciou-se em janeiro e a última em novembro de 2018. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e a sua composição química foi determinada através da análise usando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Observou-se que a composição química do óleo essencial variou ao longo do ano, qualitativamente e quantitativamente. Na amostra 1 (coleta e extração realizado em janeiro) o constituinte majoritário do óleo essencial foi o biciclogermacreno (22,13%), enquanto nas amostras 2, 3, 4 e 6 (coletas e extrações realizadas em março, maio, julho e novembro respectivamente) o constituinte majoritário foi o espatulenol (54,61, 15,60, 16,50 e 24,04%, respectivamente). A amostra 5 (coleta e extração realizado em setembro) apresentou o *trans*-cariofileno como constituinte majoritário (20,22%). O óleo essencial apresentou rendimento homogêneo ao longo do ano, aproximadamente 0,35%. Destaca-se a amostra 4 que apresentou 0,18% de rendimento, mostrando-se como o pior período para coleta. A atividade antibacteriana contra as bactérias da cavidade bucal (aeróbicas e anaeróbicas) foi realizada por microdiluição em caldo em microplacas, sendo o resultado expresso em concentração inibitória mínima (CIM). A atividade antibacteriana demonstrou não ser influenciada pelo índice pluviométrico, uma vez que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra as bactérias aeróbicas (CIM entre 200 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e com relação às bactérias anaeróbicas, todas as amostras apresentaram baixa atividade antibacteriana (CIM igual ou maior que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

PALAVRAS-CHAVE: *Eugenia calycina*. Sazonalidade. Terpenoides. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Eugenia calycina is a plant species found in the Cerrado, popularly known as "pitanga do cerrado". Studies showed the presence of oxygenated and non-oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of the leaves, which showed good activity against bacteria present in the oral cavity. It is known that the composition of essential oils is subject to variations caused by climatic conditions and vegetative stages. Due to these variations, it is important to determine the best time of year for leaf collection. The objective of this work was to evaluate the influence of seasonal variations on the chemical composition of the essential oil of fresh *E. calycina* leaves, as well as their antibacterial activity against bacteria of the oral cavity. This study identified and compared compounds of the essential oil extracted from fresh leaves collected every two months, the first collection was in January and the last one was in November 2018. The essential oil was extracted by hydrodistillation and its chemical composition was determined by analysis using gas chromatographic coupled to mass spectrometry (GC-MS). It was observed that the chemical composition of the essential oil varied throughout the year, qualitatively and quantitatively. In sample 1 (collection and extraction performed in January) the major constituent of the essential oil was bicyclogermacrene (22.13%), while in samples 2, 3, 4 and 6 (collections and extractions performed in March, May, July and November, respectively) the major constituent was spatulenol (54.61, 15.60, 16.50, 24.04%). Sample 5 (collection and extraction performed in September) presented *trans*-caryophyllene as the major constituent (20.22%). Essential oil showed a homogeneous yield throughout the year, approximately 0.35%. We highlight the sample 4 that showed 0.18% yield, showing as the worst period for collection. Antibacterial activity against oral cavity bacteria (aerobic and anaerobic) was performed by microdilution in microplate broth, the result being expressed as minimum inhibitory concentration (MIC). Antibacterial activity showed that it is not influenced by rainfall index, since all samples showed moderate antimicrobial activity against aerobic bacteria (MIC between 200 to 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and for anaerobic bacteria, all samples showed low antibacterial activity (MIC equal to or greater than 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

KEY WORDS: *Eugenia calycina*. Seasonality. Terpenoids. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografias de frutos e flores da espécie <i>E. calycina</i>	16
Figura 2 - Fluxograma das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides.....	17
Figura 3 - Rota biossintética de formação do precursor DMAP dos terpenos através da condensação de moléculas acetil-SCoA.....	18
Figura 4 - Via do metileritritol fosfato para a produção de DMAP e IPP.....	19
Figura 5 - Reação de formação dos terpenos a partir dos intermediários IPP e DMAP.	20
Figura 6 - Esquema da extração do óleo essencial de <i>E. calycina</i>	24
Figura 7 - Cromatograma obtido por análise em GC-EM do óleo essencial da <i>E. calycina</i> das amostra 1, 2 e 3.....	29
Figura 8 - Cromatograma obtido por análise em GC-EM do óleo essencial da <i>E. calycina</i> das amostra 4, 5 e 6.....	30
Figura 9 - Fórmula estrutural dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> nas 6 amostras analisadas.....	34
Figura 10 - Gráfico da relação entre as porcentagens de TIC por composto identificado do 01 ao 25.	35
Figura 11 - Gráfico da relação entre as porcentagens de TIC por composto identificado do 26 ao 55.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições apresentadas no momento da coleta	23
Tabela 2 - Rendimento da extração do óleo essencial.....	27
Tabela 3 - Constituintes voláteis identificados no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i>	31
Tabela 4 - Percentual de compostos oxigenados e não oxigenados.	33
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra bactérias da cavidade bucal do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i>	37

LISTA DE ABREVIACÕES

Acetil-SCoA	Acetil coenzima A
HMG-CoA	β -hidróxi- β -metilglutaril coenzima A
IPP	Isopentilpirofosfato
DMAP	Dimetilalil pirofosfato
TPP	Tiamina difosfato
DXP	1-Deóxi-D-xilulose-5-fosfato
GPP	Geranil difosfato
FPP	Farnesil difosfato
CIM	Concentração inibitória mínima
CG-EM	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas
IA	Índice aritmético
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
NIST	National Institute of Standard and Technology
NuPPeN	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
OE	Óleo essencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DO ÓLEO ESSENCIAL	14
2.2. ASPECTOS DA <i>EUGENIA CALYCINA</i>	15
2.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO (ESPECIAL)	16
2.4. FATORES QUE INTERFEREM NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	20
3. OBJETIVO	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	22
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	22
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	22
5.1. COLETA DAS FOLHAS	22
5.2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	23
5.3. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	24
5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS DA CAVIDADE BUCAL.....	25
5.4.1. <i>Microrganismos utilizados</i>	25
5.4.2. <i>Procedimento de análise da atividade antimicrobiana</i>	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
6.1. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
6.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL EM DIFERENTES PERÍODOS DO ANO	28
6.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE A - TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DE ALCANOS (C8-C30) NA ANÁLISE POR CG-EM	45

APÊNDICE B - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	46
APÊNDICE C– CROMATOGRAMAS EXPANDIDOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>E. calycina</i> OBTIDOS POR CG-EM; (A) AMOSTRA 1, (B) AMOSTRA 2, (C) AMOSTRA 3, (D) AMOSTRA 4, (E) AMOSTRA 5, (F) AMOSTRA 6.....	48
APÊNDICE D - COMPOSTOS IDENTIFICADOS PARA AS AMOSTRAS 1, 2, 3, 4, 5 E 6 COM O IA CALCULADO, IA ENCONTRADO NA LITERATURA, ÍNDICE DE SIMILARIDADE DOS ESPECTROS BEM COMO AS REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam diversas substâncias através do metabolismo secundário, essas substâncias, por exemplo, podem apresentar característica inseticida, ou são produzidas para a tolerância da planta a condições de estresse como intensa luminosidade, umidade dentre outros (FALLATAH; KHATER, 2010). A biossíntese dos metabólitos secundários não é homogênea ao longo de um período. Fatores externos, como temperatura, índice pluviométrico, altitude e estação do ano, interferem, de forma significativa na elaboração dos constituintes do óleo essencial (PINTO; BERTOLUCCI, 2002).

A sazonalidade é um dos principais fatores que interferem nos teores e composição dos constituintes químicos dos vegetais, nas espécies da família Asteraceae, por exemplo, as lactonas sesquiterpênicas, os ácidos clorogênicos e os flavonoides têm sua produção influenciada pela sazonalidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Em estudos com a *Hyptis marruboides* (família Lamiaceae), conhecida como hortelã-do-campo, observaram que no verão foram extraídos os maiores teores de óleo essencial das folhas comparado as demais estações. Também foram observadas diferenças quantitativas na composição química do óleo nas diferentes estações do ano (BOTREL et al., 2010). Isso faz com que o estudo dessas variáveis seja necessário para avaliar sua implicação na atividade biológica apresentada pelo produto obtido do material vegetal. Assim, torna-se interessante o estudo do período de coleta em que o material gerado apresente maior potencial antimicrobiano. Estudos com folhas de *E. calycina* (espécie de planta do Cerrado) já demonstraram a presença majoritária de sesquiterpenos no óleo essencial, sendo que este apresentou atividade antibacteriana contra bactérias da cavidade oral (SOUSA et al., 2015). Portanto, avaliar a influência da sazonalidade neste óleo essencial e sua atividade biológica é um aspecto importante.

Produtos de origem natural são utilizados como antimicrobianos devido às propriedades dos seus metabólitos secundários. As bactérias da cavidade bucal são exemplos de microrganismos que necessitam do desenvolvimento de compostos que as combatam, pois, além de promover a formação de cárie, que pode levar a perda dos dentes, algumas bactérias bucais estão associadas à pneumonia e a doenças cardiovasculares (DORN et al., 2010; KUMAR, 2013a).

Segundo Sousa (2015) o óleo essencial da *E. calycina* apresentaram forte atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal, e as frações compostas basicamente por sesquiterpenos oxigenados apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra bactérias

aeróbias e anaeróbias. E aliado a isso o elevado rendimento do óleo essencial torna a espécie comercialmente promissora em possíveis fármacos fitoterápicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS DO ÓLEO ESSENCIAL

A cavidade bucal é colonizada por muitas espécies de bactérias que formam um biofilme na superfície dos dentes, chamado de placa bacteriana ou placas dentárias. De acordo com Kumar (2013a), mais de 1000 espécies de bactérias têm sido identificadas na cavidade bucal, sendo que cada pessoa carrega mais de 200 espécies de bactérias. Estudos sugerem que essas bactérias podem estar associadas com doenças como pneumonia e doenças cardiovasculares (DORN et al., 2010; KUMAR, 2013a).

Placas dentárias podem ser removidas mecanicamente durante a escovação dos dentes, mas a utilização de solução para bochechar tem sido interessante para diminuir ou controlar o crescimento do biofilme. Produtos antibacterianos, tais como clorexidina, cloreto de cetilpiridínio e derivados fenólicos são frequentemente utilizados para este fim (BOTELHO et al., 2007). Mas a resistência dos patógenos as drogas é um dos maiores problemas no tratamento de doenças microbianas. A clorexidina, por exemplo, tem mostrado redução da sua atividade antibacteriana devido à seleção de bactérias mais resistentes (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005). Associado a isto, estudos têm mostrado que a clorexidina sofre degradação formando *p*-cloroanilina, que é hematóxico e carcinogênico, assim o uso seu indiscriminado a torna um poluente emergente (ZONG; KIRSCH, 2012; LIMA et al., 2014).

Os óleos essenciais têm se mostrado uma fonte promissora de antimicrobianos contra bactérias. Comercialmente já se pode verificar a utilização de óleos essenciais como agentes antiplaca em soluções de bochecho ou em formulações de gel (HAFFAJEE; YASKELL; SOCRANSKY, 2008; YENGOPAL, 2009; CHARLES et al., 2011). Essa característica antibacteriana observada pelos óleos essenciais é devido à hidrofobicidade da sua composição química, que lhe permitem penetrar nos lipídeos da membrana celular bacteriana e de suas mitocôndrias, perturbando a estrutura celular e tornando-a permeável (BURT, 2004).

Compostos presentes nos óleos essenciais tais como mentol, timol, eucaliptol têm sido incorporados a produtos de higiene oral e estes produtos podem reduzir os níveis de placa dentária e gengivite em ensaios clínicos (FINE et al., 2007). Os óleos essenciais de algumas espécies de plantas também tiveram a sua atividade antimicrobiana investigadas, como

Zingiber officinale gengibre (gengibre) (SABULAL et al., 2006), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) (SÁ et al., 2006), *Caryophyllus aromaticus* (cravo da Índia) (DORMAN; DEANS, 2000), *Cymbopogum citratus* (capim cidreira) (NGUEFACK et al., 2004), mostrando resultados muito promissores.

Trabalhos realizados revelaram a presença de sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados no óleo essencial das folhas de *E. calycina*. Esse óleo apresentou boa atividade antibacteriana para bactérias comumente encontradas na cavidade oral (SOUSA et al., 2015). Somado a isto, outros trabalhos demonstraram a atividade antioxidante e inibidora de enzima alfa-amilase no extrato de folhas, flores e galhos dessa espécie, bem como identificando a presença de flavonoides e proantocianidinas nestes extratos (SOUSA, 2015). Foi também observada uma excelente atividade antifúngica do extrato desta espécie (FERREIRA et al., 2014).

2.2. ASPECTOS DA *Eugenia calycina*

A família Myrtaceae, em todo o mundo, inclui aproximadamente 3.100 espécies com aproximadamente 140 gêneros, divididos em duas subfamílias, *Leptospermoideae* e *Myrtoideae*. (Moraes et al., 2014). É representada por diversas espécies frutíferas como, goiabeira (*Psidium guajava* L.), jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), guabirobeira (*Campomanesia spp.*), cabeludinha (*Myrciaria glazioviana*), cambuci (*Campomanesia phaea*), cereja-nacional (*Eugenia cerasiflora*) dentre outras (SOUZA; LORENZI, 2012). Das quais, várias espécies são utilizadas na medicina popular com atividades antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante, antirreumática e anti-inflamatória (DI STASI et al, 2002).

O gênero *Eugenia* compõe um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, apresentando cerca de 1.115 espécies, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais das Américas. Muitas de suas espécies são usadas na medicina popular e outras submetidas a estudos químicos e avaliações de ações farmacológicas (DIAS et al., 2013).

Eugenia calycina Cambess. (Figura 1) é uma espécie frutífera típica do Cerrado, conhecida popularmente como pitanga-do-cerrado (BORGES et al., 2010; BULLOW et al., 1994). No Brasil, *E. calycina* já foi encontrada nas áreas de Cerrado dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal e transição cerrado-vereda (ARANTES; MONTEIRO, 2002). O gênero *Eugenia* possui indivíduos na forma de arbusto e de árvore e as flores difundidas em

racemos, floresce no início da primavera, com flores vistosas geralmente de cor branca, além dos estames numerosos e dos frutos carnosos que exibem coloração de amarelado a vermelho quando maduros (Romagnolo; Souza, 2006). A espécie *E. calycina* pode chegar a medir 1,5 m de altura (ARANTES; MONTEIRO, 2002).

Figura 1 - Fotografias de frutos e flores da espécie *E. calycina*.



Fonte: Sousa (2015).

A presença de terpenos é uma característica definidora da família Myrtaceae, famosa por ter algumas das mais altas concentrações de terpenos foliares no reino vegetal (KESZEI et al., 2008). Muitas indústrias têm grande interesse nos compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais devido às propriedades medicinais que eles apresentam. Portanto, espécies da família Myrtaceae se tornam ótimas fontes de óleos essenciais devido à alta concentração de terpenos encontrados predominantemente em suas folhas (PADOVAN et al., 2014).

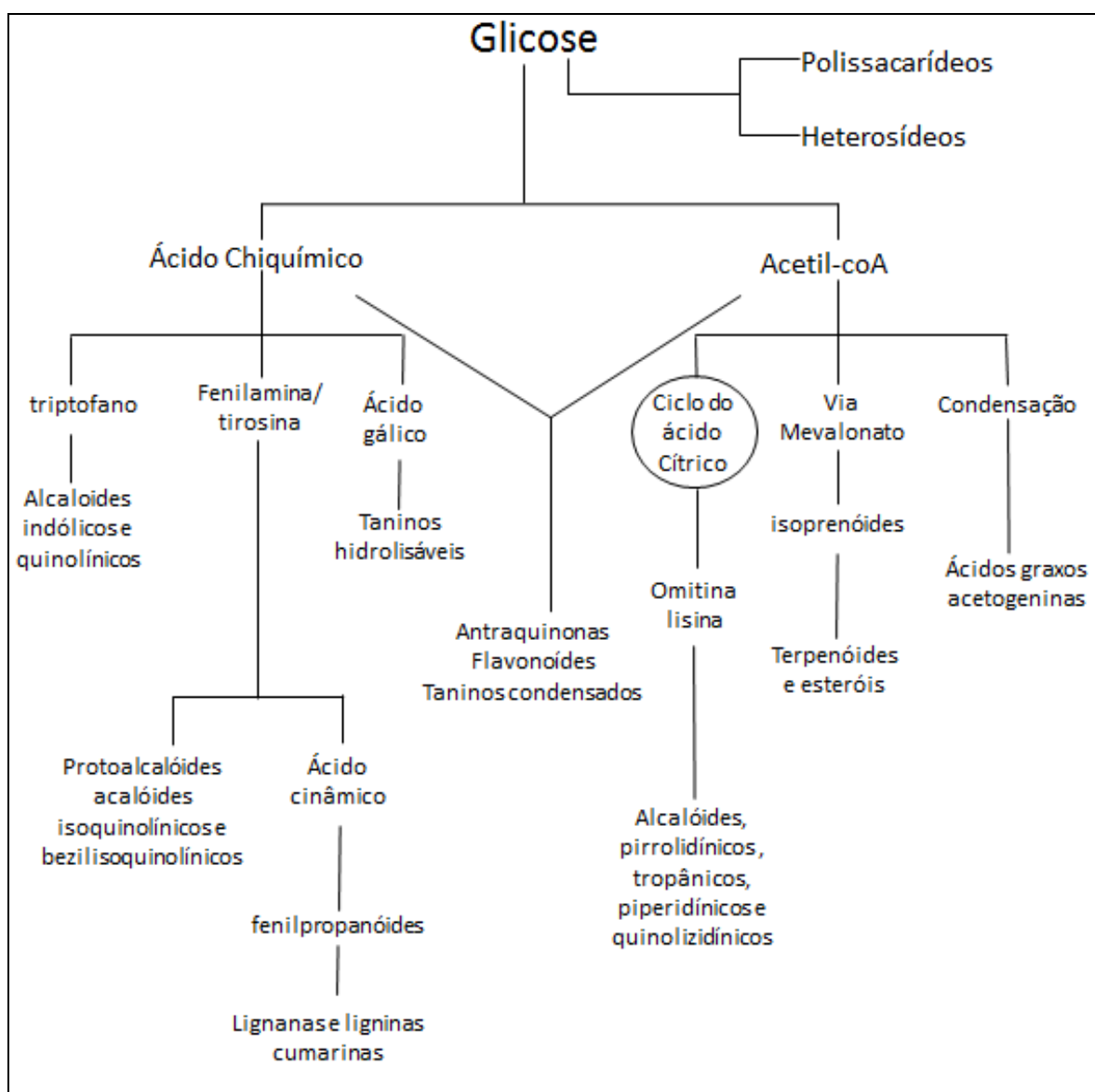
2.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO (ESPECIAL)

O metabolismo primário é responsável pela produção de compostos essenciais para a sobrevivência e são comuns a todas as plantas como: carboidratos, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos (SOUSA, 2015). O metabolismo secundário (ou especial) difere do primário pelo fato de a produção das substâncias serem limitada a um menor número de espécies. Os metabólitos secundários, como são chamados os produtos derivados do metabolismo

secundário, não estão diretamente ligados à manutenção da vida do vegetal, porém, conferem vantagens à sua sobrevivência (SANTOS, 1999).

O metabolismo secundário pode ser dividido em vias biossintéticas, as quais são precursoras de terpenoides, compostos nitrogenados e fenilpropanóides (fenólicos). As principais vias dos metabólitos secundários são as do ácido chiquímico, acetato e os aminoácidos (CASTRO, 2010). Na Figura 2 pode-se observar a formação dessas classes de compostos e suas principais rotas biossintéticas.

Figura 2 - Fluxograma das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides.

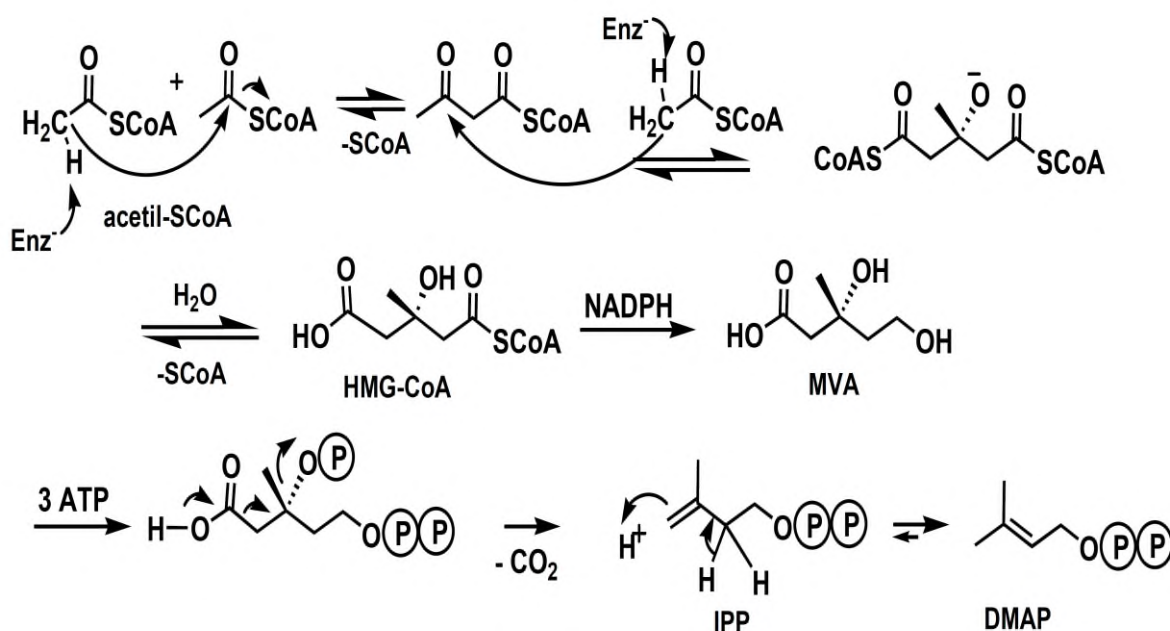


Fonte: adaptado de Simões (2003).

Dentre os compostos sintetizados no metabolismo secundário, os terpenos são responsáveis pelo odor que algumas frutas exalam. Eles são sintetizados nas plantas através da “junção” de duas unidades isoprênicas (oriundas de equivalentes de isoprenos: 3-isopentenilpirofosfato (IPP) e 3,3'-dimetilalilpirofosfato (DMAP)), constituídas de cinco átomos de carbono. Estes são classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (VOLHARDT, 2013).

Segundo Lobo e Lourenço (2007) há duas vias biossintéticas para a formação dos intermediários (DMAP) e (IPP) (Figura 3 e 4). A primeira é a rota do mevalonato que representa a etapa inicial para que a reação enzimática aconteça. Nesta etapa, duas moléculas de acetil-SCoA reagem por uma reação de condensação de Claisen (catalisada pelas enzimas tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase), em seguida, mais uma molécula de acetil-SCoA reage através de reação aldólica, formando 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), o qual, por hidrólise e redução enzimática dá origem ao ácido mevalônico (MVA). Este sofre 3 fosforilação dos grupos hidroxilas, seguida de descarboxilação e eliminação de um grupo pirofosfato, dando origem ao IPP. A enzima isomerase converte o IPP em DMAP (DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007).

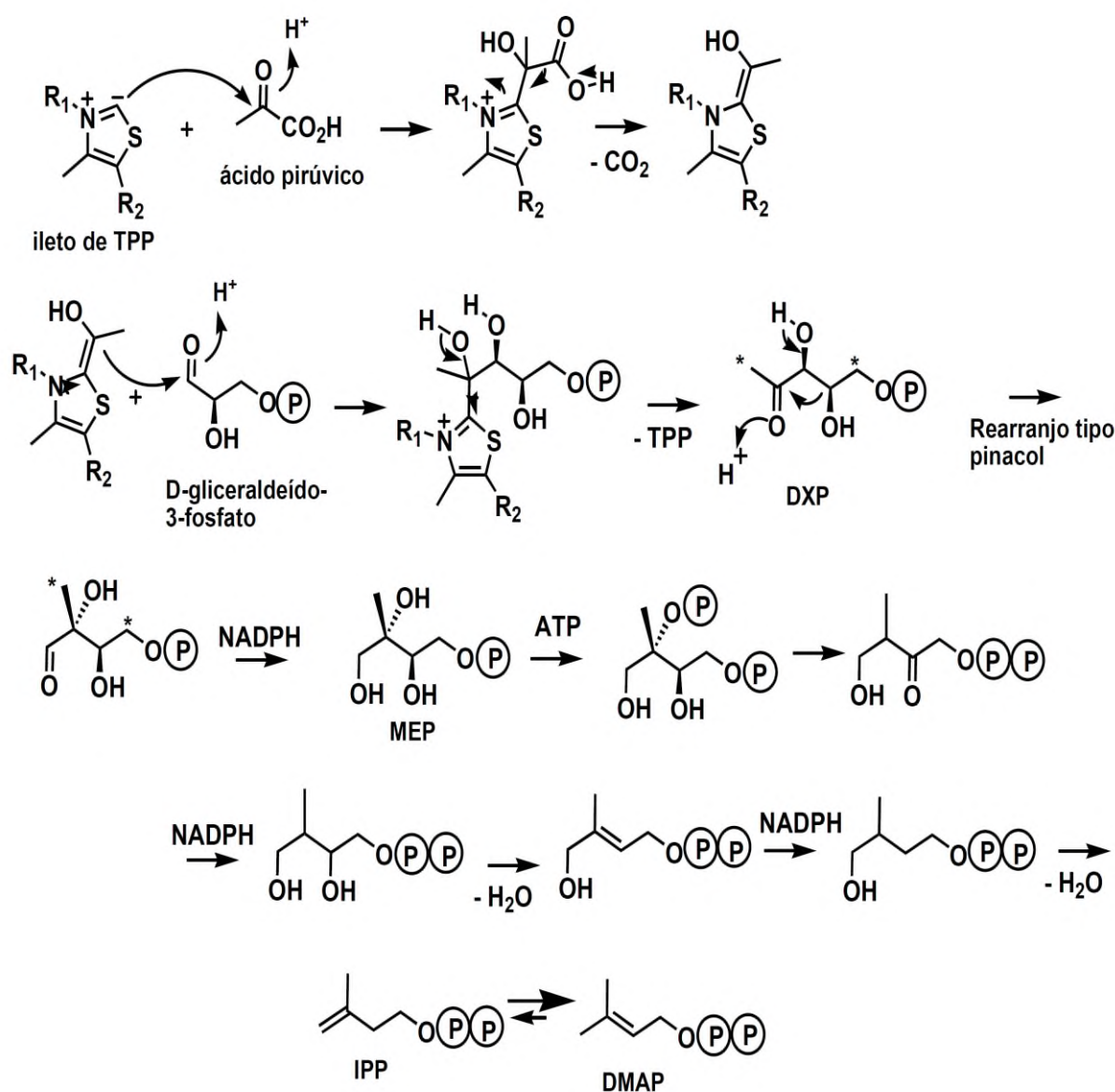
Figura 3 - Rota biossintética de formação do precursor DMAP dos terpenos através da condensação de moléculas acetil-SCoA



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

Outra rota biossintética a respeito da formação do IPP é a via do metileritritol fosfato (MEP) mediada pela coenzima tiamina difosfato (TPP). Esta catalisa a reação entre o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído, formando o intermediário 1-deóxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Através de um rearranjo do tipo pinacol seguido de uma redução, a DXP é convertida no 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP). Em seguida observa-se a fosforilação seguida de eliminação, originando o DMAP, o qual é convertido por uma enzima isomerase em IPP (DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007).

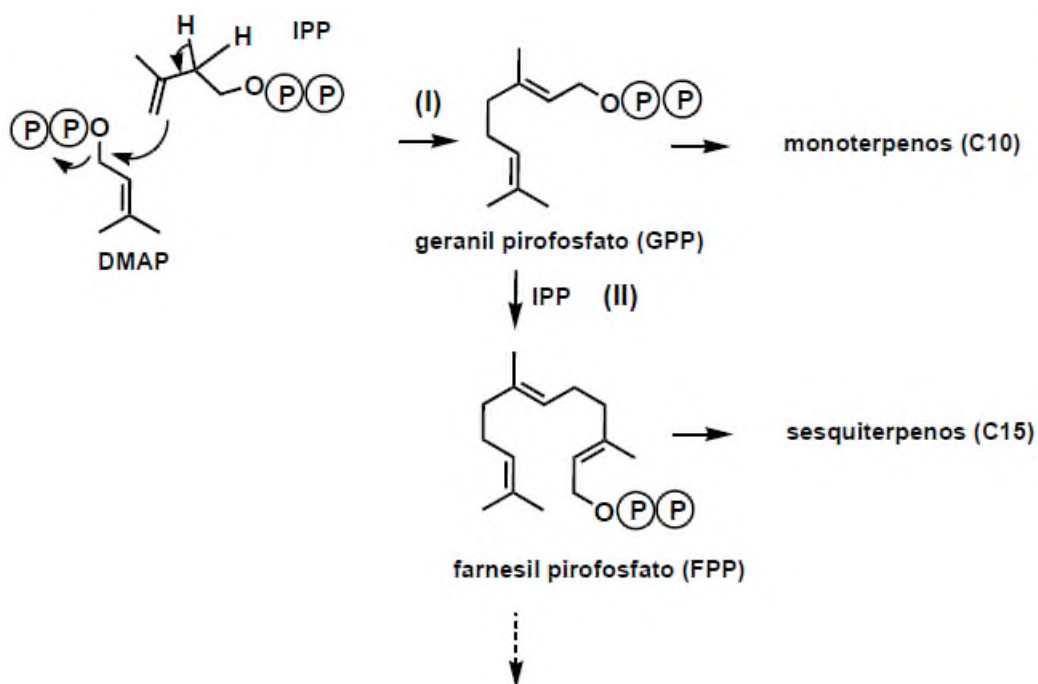
Figura 4 - Via do metileritritol fosfato para a produção de DMAP e IPP.



Fonte: adaptado de Dewick (2002) e Lobo e Lourenço (2007).

Portanto, segundo Lobo e Lourenço (2007), a produção dos terpenoides ocorre pela condensação entre moléculas de DMAP e IPP (I), catalisadas pela enzima preniltransferase, dando origem ao geranyl pirofosfato (GPP). A condensação do GPP com IPP (II) forma a cadeia de farnesil pirofosfato (C15) conforme demonstrado na Figura 5. Para a formação dos diterpenos (C20) é necessário que ocorra a condensação do geranyl pirofosfato com uma unidade de DMAPP originando o farnesil pirofosfato e assim sucessivamente.

Figura 5 - Reação de formação dos terpenos a partir dos intermediários IPP e DMAP.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

2.4. FATORES QUE INTERFEREM NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial faz parte do metabolismo secundário das plantas e alguns fatores como horário, a época de colheita e o ataque de patógenos podem influenciar na produção e variabilidade dos óleos (FONSECA, 2001). A composição química dos óleos essenciais pode variar em função de fatores ambientais tais como a umidade do ar, disponibilidade hídrica, condições do solo, intensidade luminosa, temperatura e período de coleta (WATERMAN, 1993, TISSERAND; BALACS, 1995). Fatores endógenos como idade da planta e estágio fenológico, bem como a existência de quimiotipos também podem acarretar mudanças na composição e no rendimento dos voláteis (TISSERAND; BALACS, 1995).

A sazonalidade é um dos principais fatores que interferem nos teores e composição dos constituintes químicos das plantas, na família Asteraceae, os flavonoides têm sua produção no vegetal altamente influenciada pela sazonalidade, ou seja, amostras de uma mesma planta coletadas em diferentes épocas do ano podem apresentar diferenças em sua constituição química tanto do ponto de vista de composição quanto do teor de metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

3. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo geral estudar a influência da sazonalidade na composição química do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e a influência na atividade antibacteriana desse óleo.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Extração de óleo essencial bimestralmente (durante 1 ano) a partir das folhas de *E. calycina* através de hidrodestilação;
- Identificação da composição química de cada óleo essencial obtido através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas,
- Avaliação da atividade antibacteriana contra as bactérias da cavidade bucal do óleo essencial obtido em cada extração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;
- Aparelho tipo Clevenger;
- Manta de aquecimento (QUIMIS);
- Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-EM), SHIMADZU modelo QP2010;

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

- Diclorometano, grau analítico (VETEC);
- Água destilada.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. COLETA DAS FOLHAS

As coletas das folhas de *E. calycina* foram realizadas a cada dois meses no período da manhã no Parque Municipal Victório Siquierolli, na cidade de Uberlândia (MG), no Brasil, (coordenadas: lat: -18.9186000823975 long: -48.2771987915039 err: ±58223 WGS84). A planta foi identificada por um especialista, e uma amostra depositada no Herbário Uberlandense - HUFU, da Universidade Federal de Uberlândia (MG), sob exsicata de número HUFU67513. Em cada coleta anotou-se a temperatura e a umidade do ar. Além disso, também se realizou o controle da chuva acumulada em mm do período anterior à coleta, os quais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições apresentadas no momento da coleta.

Amostra	Data	Hora (h)	Temperatura (°C)	Umidade do ar (%)	Umidade das folhas (%)	Índice pluviométrico do período anterior a coleta (mm) *
1	10/01/2018	09:40	27,5	66,0	66,2	373,0
2	06/03/2018	09:25	29,2	66,0	54,5	291,0
3	02/05/2018	09:05	25,6	51,0	52,1	150,0
4	20/07/2018	08:02	22,0	49,0	56,4	33,6
5	20/09/2018	08:14	25,2	64,0	57,5	44,8
6	22/11/2018	08:35	25,6	69,0	63,9	431,4

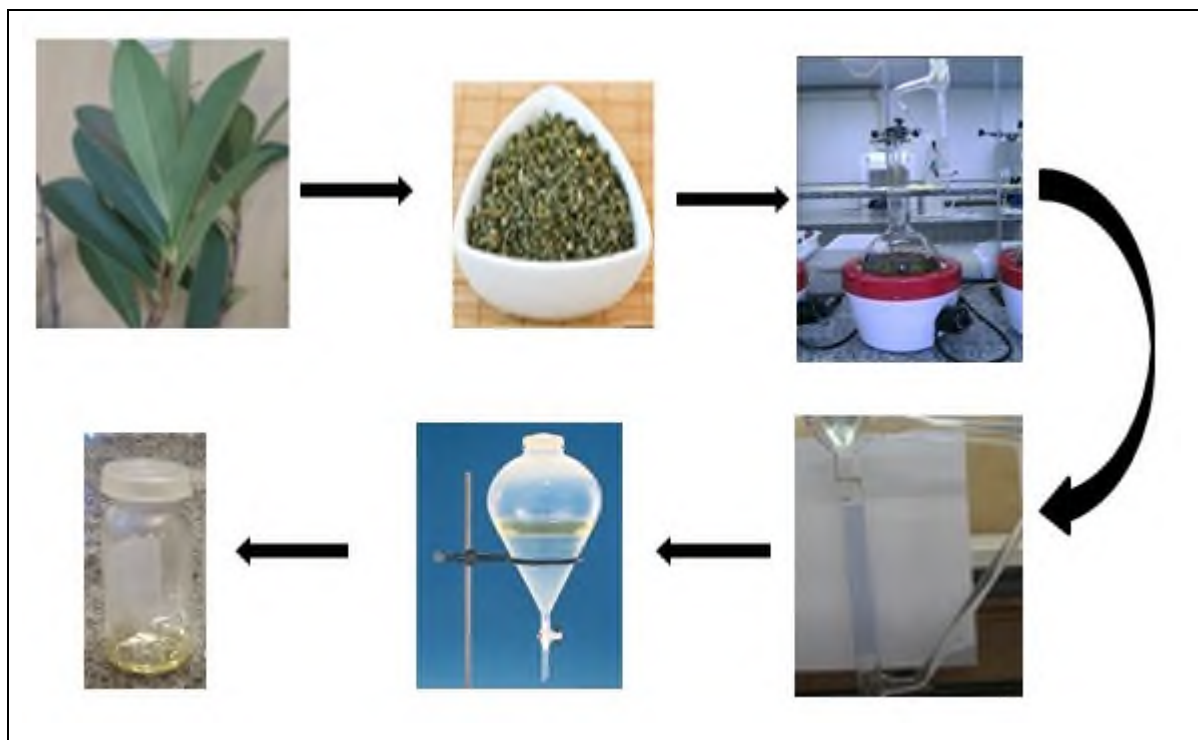
Fonte: autora

Nota: * Dados obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

5.2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação com o auxílio de um aparelho tipo Clevenger sob refluxo de 4 horas (realizado em triplicata). Utilizaram-se balões de fundo redondo de 2 L, contendo cada um, uma média de 100 g de folhas frescas, que foram retiradas dos galhos e trituradas. Removeu-se o óleo essencial do aparelho de Clevenger juntamente com a água presente para um funil de separação, o óleo essencial foi extraído com 15,0 mL de diclorometano PA (3 x 5,0 mL). O diclorometano foi removido por evaporação a 35°C e o óleo obtido armazenado a $18 \pm 5^\circ\text{C}$.

Figura 6 - Esquema da extração do óleo essencial de *E. calycina*.



Fonte: autora

5.3. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

Os constituintes voláteis da extração do óleo essencial de *E. calycina* foram identificados através da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um equipamento da marca Shimadzu (modelo QP2010) e uma coluna do tipo DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de largura e 0,25 μm de película) utilizando o gás hélio como gás de arraste. A análise foi realizada pelo método proposto por Adams (2007), no qual foi utilizado fluxo de 1 mL min^{-1} ; temperatura do detector e injetor de 220 e 240°C , respectivamente; modo split de injeção 1:20; temperatura do forno com a programação de 60 a 246°C com taxa de 3°C min^{-1} ; energia do impacto de elétrons de 70 eV. A identificação baseou-se em índices aritméticos calculados e comparando-os ao da NIST Standard Reference Data e Adams (2007). No Apêndice A encontram-se os tempos de retenção dos padrões de alcanos (C8-C30) os quais foram utilizados nos cálculos dos IA. Utilizou-se ainda a comparação com o índice de similaridade dos espectros de massas de livrarias comerciais, como Nist08, Nist27, Wiley139, Wiley229, e Shim2205.

5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS DA CAVIDADE BUCAL

5.4.1. *Microrganismos utilizados*

Bactérias da cavidade bucal foram obtidas de padrões de cepas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC). As bactérias aeróbicas utilizadas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717). As bactérias anaeróbicas utilizadas foram: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

5.4.2. *Procedimento de análise da atividade antimicrobiana*

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi realizada pelo método da microdiluição em caldo em microplacas (CARVALHO et al., 2011, PETROLINI et al., 2013). Neste método determinou-se a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento bacteriano, conhecida como “Concentração Inibitória Mínima” (CIM).

Para as bactérias aeróbicas o meio de cultura utilizado foi o caldo triptona de soja (TSB) (CLSI, 2012b) e para as bactérias anaeróbicas utilizou-se o caldo Schaedler suplementado com hemina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menadiona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CLSI, 2012a). O preparo dos caldos utilizados se encontra descrito no Apêndice B. A análise da atividade antimicrobiana foi realizada em uma microplaca contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra (óleo) foram adicionados em cada orifício, obtendo-se um volume final de $100 \mu\text{L}$ para as bactérias aeróbicas e $200 \mu\text{L}$ para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de $20 \mu\text{L}$ para os testes com bactérias aeróbicas e $40 \mu\text{L}$ para os testes com bactérias anaeróbicas. O preparo do inóculo se encontra descrito no Apêndice B. O volume de amostra ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de caldo variou conforme a concentração de amostra desejada no orifício. As amostras foram inicialmente preparadas com concentração de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas para $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando o caldo. A faixa de concentração de amostras utilizada nos experimentos foi de $0,195$ a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle negativo foi utilizado o DMSO (concentração de 4%, v:v, na microplaca). Como controle positivo foi utilizado o dicloridrato de clorexidina (CHD) (dissolvido em água;

0,0115 - 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$; concentração na microplaca). Foram realizados controles de esterilidade da CHD, dos caldos, das amostras e do DMSO.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 30 μL do indicador resazurina (0,01%, em água) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 horas em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H_2 , 10% CO_2 , 80-85% N_2) a 36 °C, sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, sendo a coloração vermelha a presença do crescimento bacteriano.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A Tabela 2 mostra os rendimentos das extrações ao longo do ano, bem como as quantidades de óleo obtidas. É possível verificar que na amostra 4 (extração realizada em julho) ocorreu uma queda maior no rendimento do óleo, sendo justamente quando ocorre uma variação significativa no índice pluviométrico. O que pode justificar essa diferença no rendimento.

Tabela 2 - Rendimento da extração do óleo essencial.

Amostra	Massa de folha (g)	Massa de óleo (g)	Rendimento (massa seca) (%)	Umidade do ar (%)	Umidade das folhas (%)	Índice pluviométrico do período anterior a coleta (mm) *
1	68,0±0	0,08±0,01	0,35±0,06	66,0	66,17±0,89	373,0
2	140,0±0	0,20±0,01	0,31±0,03	66,0	54,53±2,09	291,0
3	150,0±0	0,22±0,07	0,30±0,10	51,0	52,10±1,47	150,0
4	101,0±0	0,08±0,01	0,18±0,01	49,0	56,40±0,40	33,6
5	107,0±0	0,17±0,01	0,38±0,03	64,0	57,47±0,58	44,8
6	120,0±0	0,13±0,02	0,31±0,05	69,0	63,90±1,33	431,4

Fonte: autora

Nota: * Dados obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Segundo Gobbo Neto e Lopes (2007), a época do ano e o horário de coleta dos materiais vegetais podem influenciar no rendimento e na composição química do seu óleo essencial. Em estudos com a *Hyptis marrubiodes* observaram maiores teores de óleo extraído das folhas da planta no verão comparado as demais estações. (BOTREL et al., 2010).

A influência do horário de coleta do material vegetal sobre o rendimento do óleo essencial foi demonstrado em estudos com *Melissa officinalis*. Segundo Blank et al. (2005), o horário de colheita das folhas de *M. officinalis* influenciou na composição química e no rendimento do seu óleo essencial. O maior teor desse óleo foi observado na extração do mesmo das folhas frescas de *M. officinalis*, que foram cultivadas em seu habitat natural.

Autores citam rendimento médio de 1,5 a 3,5% de óleo essencial de patchouli quando extraído pelo método de hidrodestilação (CHAVES et al., 2011; EPAGRI, 2004; JOY et al., 2001). Araujo (2008) relatou em seus estudos variação no rendimento do óleo essencial de acordo com a época de colheita do patchouli no município de Florianópolis - SC, obtendo maiores rendimentos no inverno.

6.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL EM DIFERENTES PERÍODOS DO ANO

Após cada extração, o óleo essencial foi injetado no CG-EM para identificação da composição. As Figuras 7 e 8 mostram os cromatogramas do óleo essencial das 6 amostras, os mesmos encontram-se expandidos e em triplicata no Apêndice C.

Na Tabela 3 encontram-se os compostos identificados no óleo essencial das folhas de *E. calycina* referente as 6 coletas. Os compostos identificados para as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com o IA calculado, IA encontrado na literatura, índice de similaridade dos espectros bem como as referências encontram-se descritos no Apêndice D.

Figura 7 - Cromatograma obtido por análise em GC-EM do óleo essencial da *E. calycina* das amostra 1, 2 e 3.

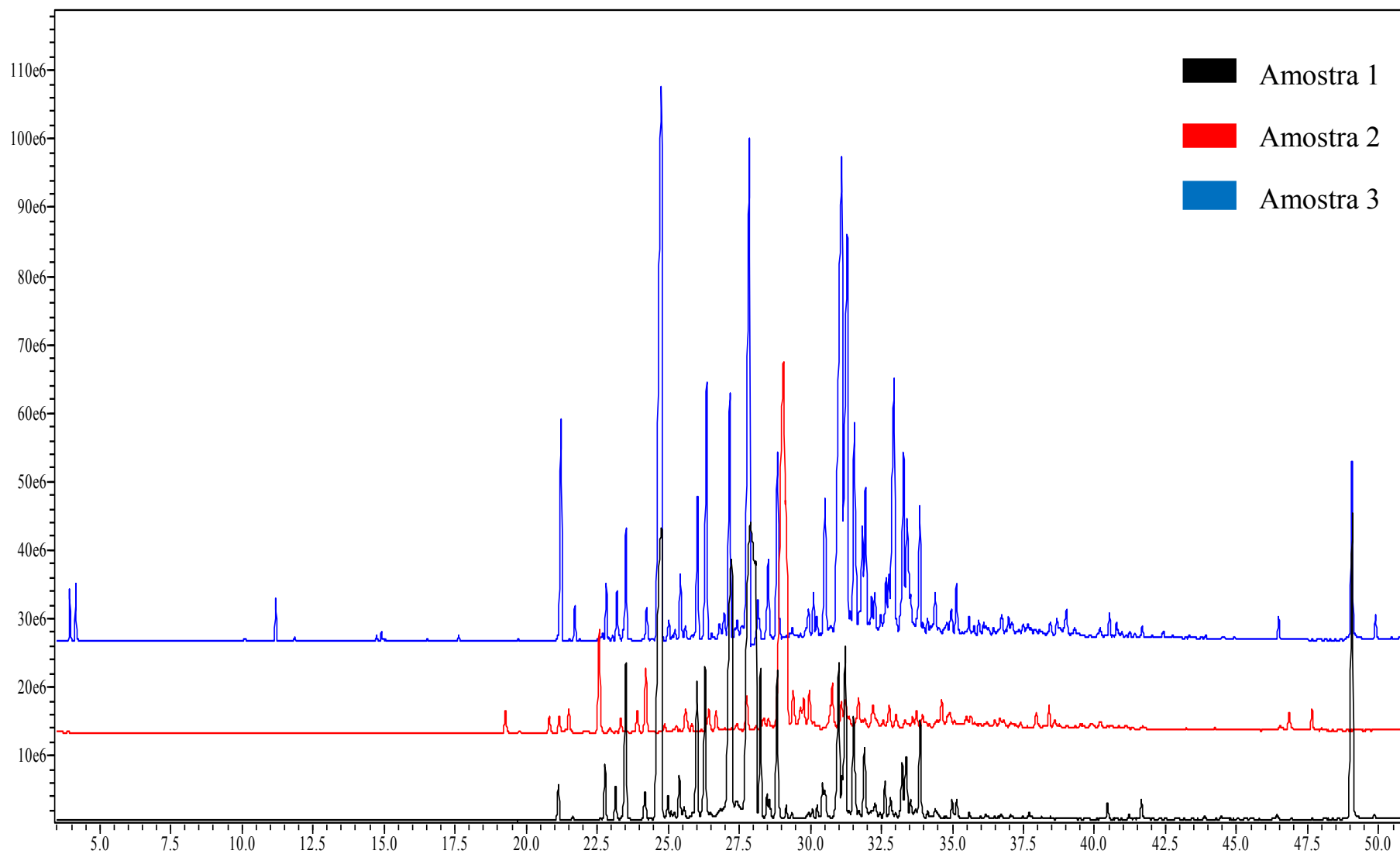


Figura 8 - Cromatograma obtido por análise em GC-EM do óleo essencial da *E. calycina* das amostra 4, 5 e 6.

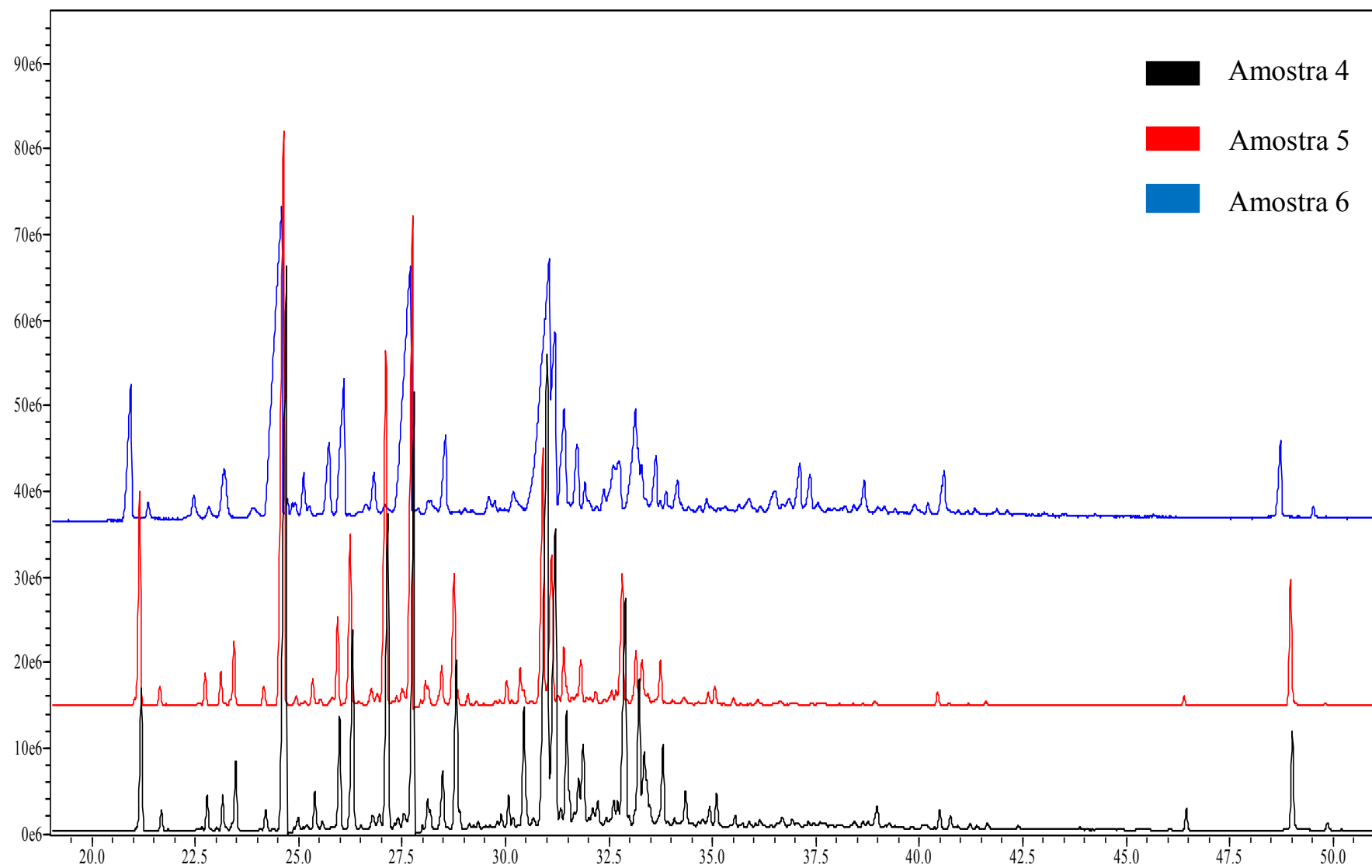


Tabela 3 - Constituintes voláteis identificados no óleo essencial das folhas de *E. calycina*.

(continuação)						
Compostos		Amostras				
		1 TIC (%)	2 TIC (%)	3 TIC (%)	4 TIC (%)	5 TIC (%)
1	1-Hexanol	-	-	2,72	-	-
2	2-Undecanone	0,17	1,06	0,22	-	-
3	(Z)-3-Hexen-1-ol	-	-	0,28	-	-
4	(Z)-9-Hexadecen-1-ol	0,36	-	-	-	-
5	Alloaromadendreno	3,22	2,4	3,39	3,51	3,75
6	α -Amorpheno	0,44	-	-	-	10,63
7	α -cadinol	3,54	1,99	2,09	1,78	1,09
8	α -copaeno	0,92	0,62	0,66	0,7	0,88
9	α -Cubebeno	-	-	0,32	0,36	0,34
10	α -Gurjuneno	0,65	-	0,54	0,44	0,56
11	α -Humuleno	2,68	0,87	1,86	1,93	1,83
12	Dehidro-aromadendrano	-	-	-	0,32	-
13	Aromadendreno	0,89	0,57	0,94	0,71	0,73
14	Benzoato de benzila	-	-	-	0,39	0,25
15	β -Atlantol	-	-	-	-	0,89
16	β -bourboneno	0,58	0,72	0,74	0,67	0,86
17	β -copaeno	0,5	-	-	-	-
18	β -Cubebeno	-	3,94	-	0,26	-
19	β -Elemeno	3,22	0,98	1,48	1,54	1,82
20	Biciclogermacreno	20,49	-	8,16	6,43	9,89
21	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	-	-	-	0,51	0,69
22	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	-	-	-	-	0,35
23	Óxido de Cariofileno	0,67	1,77	-	-	-
24	Cubebol	-	1,21	-	1,38	1,3
25	10-epi-Cubebol	-	1,42	1,48	-	-
26	δ -Cadineno	3,37	-	2,77	4,39	3,14
27	δ -Elemeno	0,65	0,85	2,91	2,34	5,22
28	Elemol	-	-	-	-	0,32
29	Epicubenol	0,6	-	-	2,14	-
30	γ -Amorfeno	-	-	0,11	-	-
31	γ -Cadineno	-	-	-	-	0,52
32	<i>E</i> -, <i>Z</i> -Geranil linalool	-	-	-	0,46	-
33	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	0,43	-	-	-	-
34	Germacreno A	2,6	-	0,56	0,56	0,61
35	Germacreno B	-	-	0,63	0,62	0,65

Tabela 3 - Constituintes voláteis identificados no óleo essencial das folhas de *E. calycina*.

						(Conclusão)
Compostos	Amostras					
	1 TIC (%)	2 TIC (%)	3 TIC (%)	4 TIC (%)	5 TIC (%)	6 TIC (%)
36 Germacreno D	10,54	-	3,2	5,66	7,99	-
37 Globulol	3,48	-	7,86	7,02	4,26	-
38 Hexadecanol	-	-	-	0,39	0,38	-
39 Epóxido de humuleno II	-	1,93	-	-	-	-
40 Isobiciclogernacrenal	-	-	-	0,44	0,31	-
41 isoespatulenol	-	1,56	2,95	-	-	-
42 Ledol	1,72	-	3,42	-	-	-
43 Linalool	-	-	0,32	-	-	-
44 Naftaleno	-	0,14	0,55	-	-	-
45 (<i>E</i>)-Nerolidol	-	0,73	2,2	2,3	0,96	-
46 (<i>Z</i>)-Nerolidol	0,62	-	-	-	-	-
47 Palustrol	-	0,92	-	-	-	-
48 Fitol	8,38	0,91	2,58	1,89	7,24	1,88
49 Rosifoliol	0,7	-	-	-	-	-
50 Espatulenol	4,97	32,05	12,32	12,41	6,31	13,63
51 Supraeno	0,41	-	-	-	-	-
52 Torreiol	0,43	-	-	-	-	-
53 <i>Trans</i> -Cariofileno	12,98	-	11,57	11,21	15,65	13,55
54 Veridiflorol	2,39	2,05	0,15	2,45	-	-
55 NI	7,42	41,31	21,02	24,79	22,62	43,26
Total de Compostos Identificados	30	21	30	30	27	17

Fonte: autora

Nota: TIC = Total íons cromatográficos; NI = Não Identificados.

Com base na Tabela 3, observou-se que as amostras analisadas apresentaram quantidades diferentes de compostos identificados, sendo 75,00, 40,39, 62,50, 48,39, 39,71 e 25,37% para as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente, o que traduz uma dificuldade na comparação quanto aos dados obtidos, uma vez que a quantidade de compostos identificados foram diferentes para cada amostra.

A partir dos compostos identificados, determinou-se a quantidade percentual de compostos oxigenados e não oxigenados os quais estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Percentual de compostos oxigenados e não oxigenados.

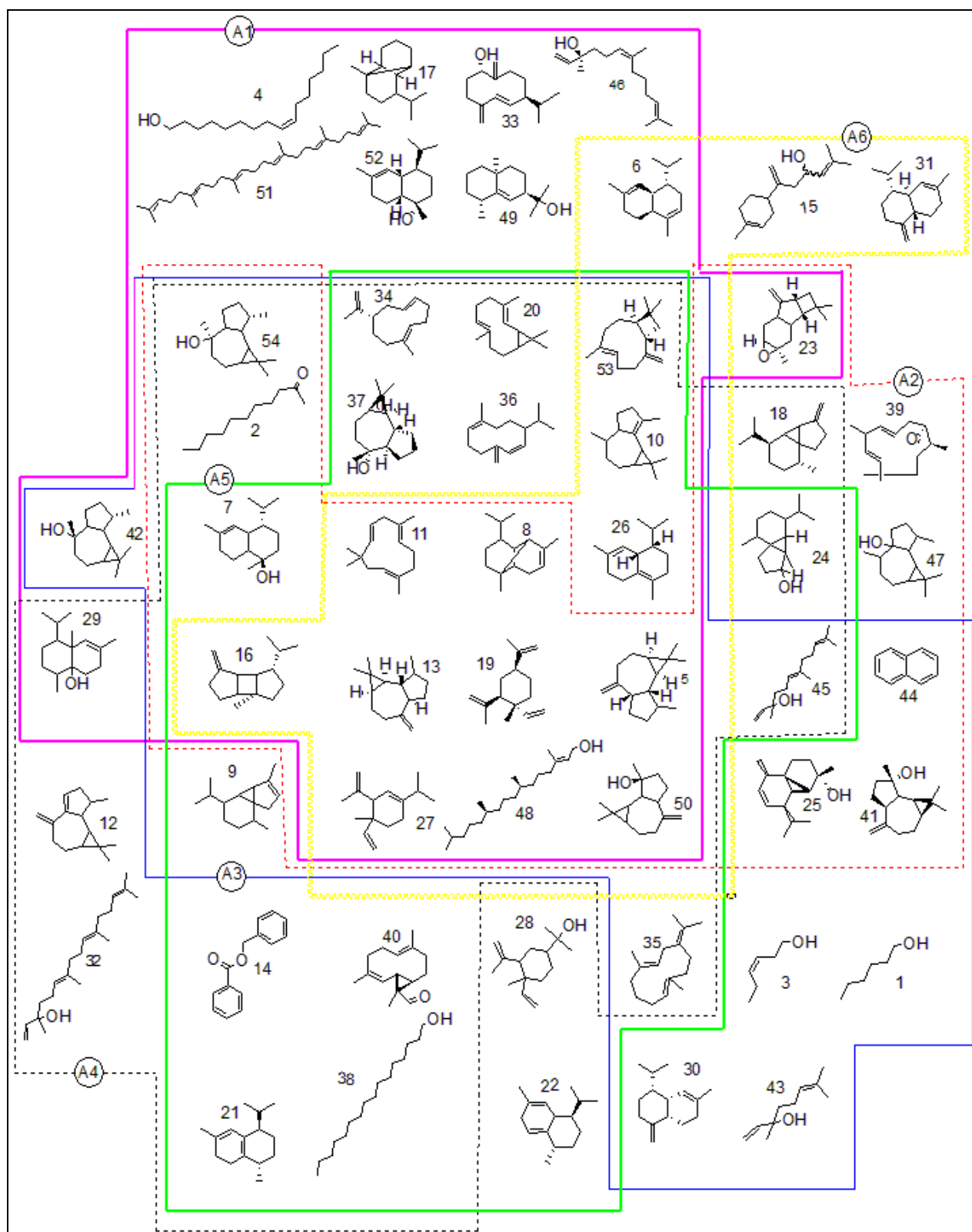
Amostras	Compostos	
	Oxigenados (%)	Não oxigenados (%)
1	43,33	56,67
2	52,38	47,62
3	40,00	60,00
4	36,67	63,33
5	33,33	66,67
6	17,65	82,35

Fonte: autora.

Dentre os compostos não oxigenados identificados os constituintes majoritários das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram biciclogermacreno **(20)** (22,3%), β -cubebeno **(18)** (6,71%), *trans*-cariofileno **(53)** (14,63%), *trans*-cariofileno **(53)** (14,90%), *trans*-cariofileno **(53)** (20,22%), *trans*-cariofileno **(53)** (23,88%), respectivamente. Enquanto os compostos oxigenados majoritários do óleo essencial para as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6, são fitol **(48)** (9,05%), espatulenol **(50)** (54,61%), espatulenol **(50)** (15,60%), espatulenol **(50)** (16,50%), fitol **(48)** (9,36%), espatulenol **(50)** (24,04%), respectivamente.

A Figura 9 apresenta a fórmula estrutural dos compostos apresentados anteriormente. Observando as fórmulas estruturais, verifica-se que a grande maioria delas são cíclicas. O que pode ser justificado por estudos realizados por Stefanello e Pascoal (2011), nos quais se verificaram as propriedades químicas e biológicas de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae, os compostos presentes no óleo de espécies de *Eugenia* apresentam predominantemente sesquiterpenos cíclicos (SOUSA et al., 2015).

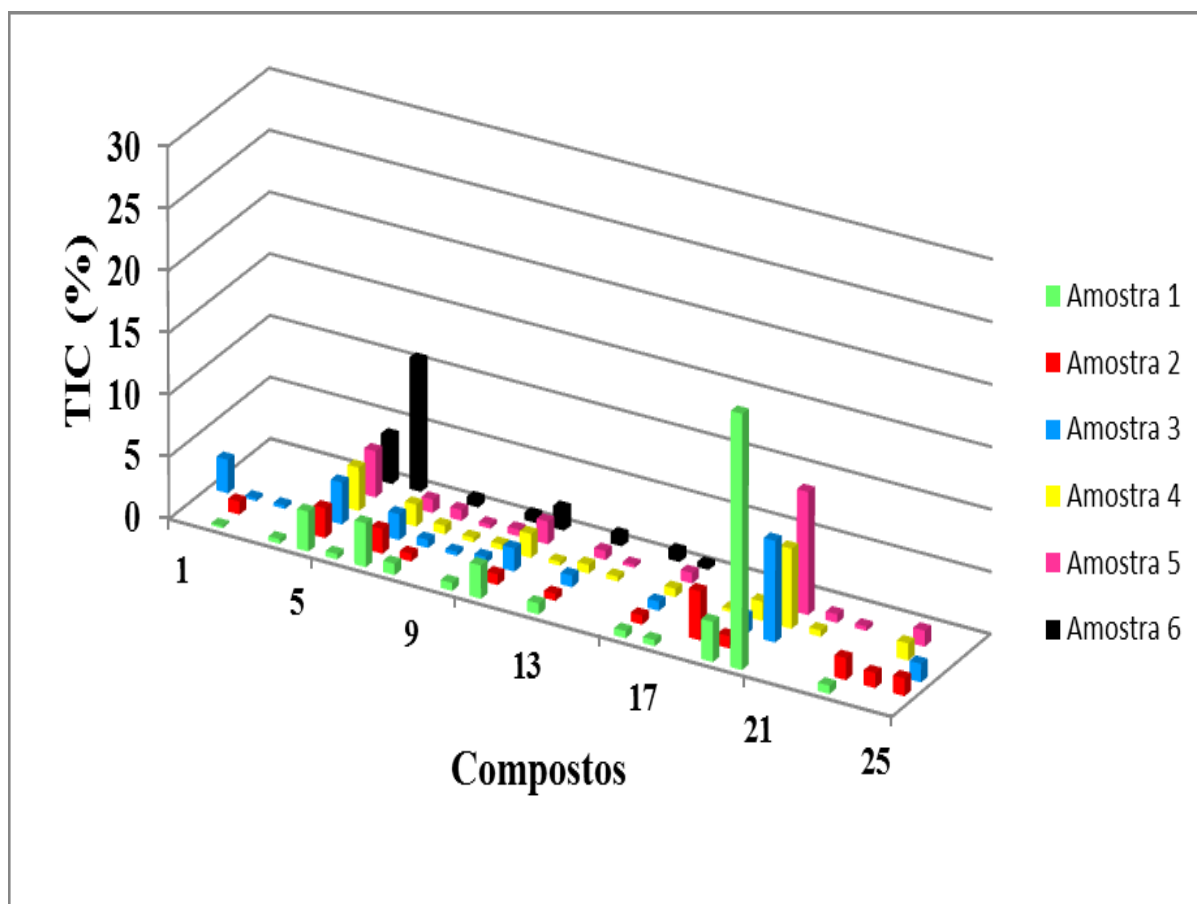
Figura 9 - Fórmula estrutural dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de *E. calycina* nas 6 amostras analisadas.



Fonte: autora

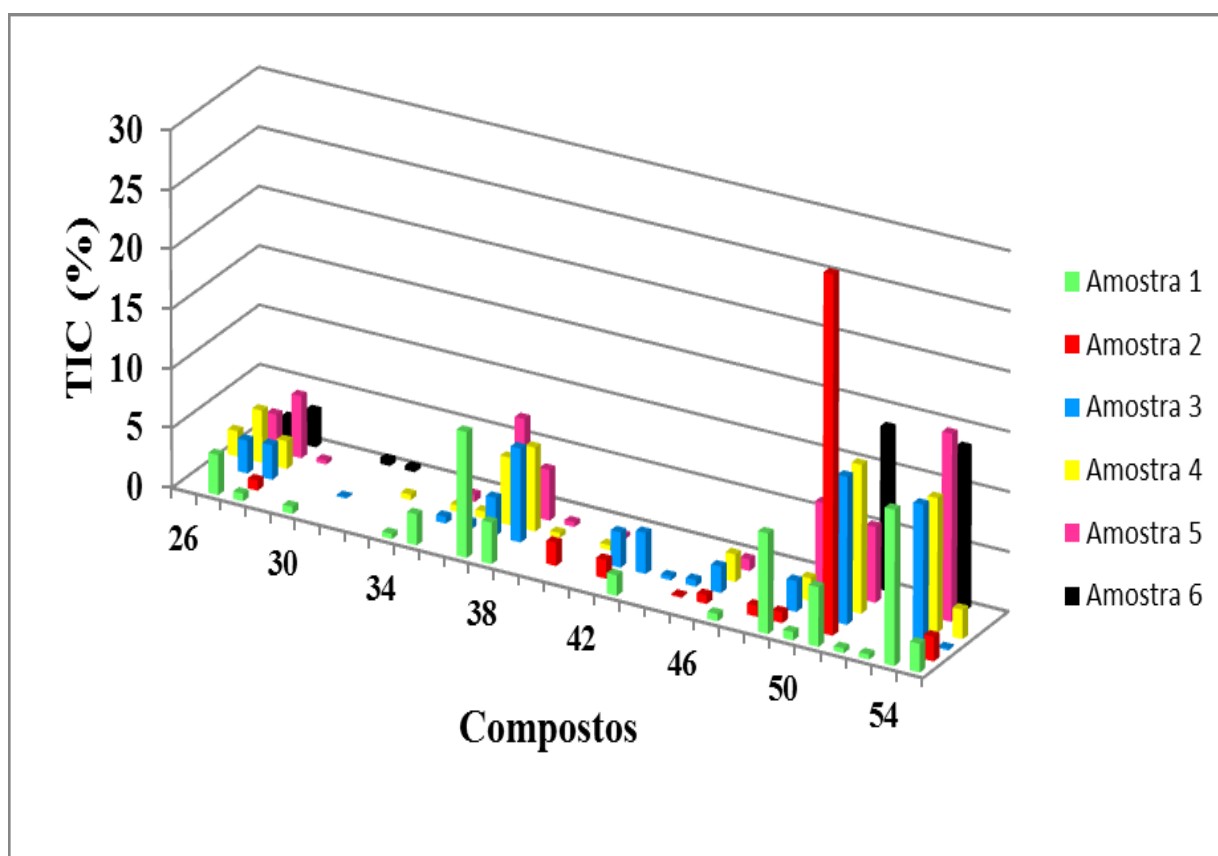
As Figuras 10 e 11 mostram as substâncias identificadas para cada amostra e o percentual total de íons cromatográficos.

Figura 10 - Gráfico da relação entre as porcentagens de TIC por composto identificado do 01 ao 25.



Fonte: autora

Figura 11 - Gráfico da relação entre as porcentagens de TIC por composto identificado do 26 ao 55.



Fonte: autora

Nota-se pelas Figuras 10 e 11 que os compostos identificados nas seis amostras foram destoantes tanto com relação ao tipo de composto quanto às suas quantidades. Na amostra 1 o constituinte majoritário do óleo essencial foi o biciclogermacreno com percentagem total de íons cromatográficos de 20,49%, enquanto nas amostras 2, 3, 4 e 6 o constituinte majoritário foi o espatulenol, com 32,05, 12,32, 12,41 e 13,63% de TIC, respectivamente, já na amostra 5 o *trans*-cariofileno foi o composto identificado como majoritário apresentando TIC de 15,65%.

6.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi avaliado quanto à atividade contra bactérias da cavidade bucal, sendo o resultado dado em “Concentração Inibitória Mínima” (CIM) (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra bactérias da cavidade bucal do óleo essencial das folhas de *E. calycina*.

		Concentração inibitória mínima (CIM) – $\mu\text{g mL}^{-1}$					
		Amostras					
		1	2	3	4	5	6
Aeróbia	<i>Streptococcus mutans</i> ¹	>400	>400	>400	>400	>400	400
	<i>Streptococcus mitis</i> ¹	200	400	200	200	200	400
	<i>Streptococcus sanguinis</i> ¹	200	400	200	200	400	400
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ²	400	>400	400	400	>400	400
Anaeróbia	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ²	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ²	>400	>400	400	400	400	>400
	<i>Actinomyces naeslundii</i> ²	>400	400	400	400	400	400

Fonte: autora; Nota: ¹bactéria gram-positiva; ²bactéria gram-negativa; controle positivo: Clorexidina.

De acordo com Holetz e colaboradores (2002), para valores de CIM abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é considerada boa, valores entre 100 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ é moderada, valores entre 500 e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ é fraca, valores acima de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerada inativa. Portanto, observando os resultados apresentados na Tabela 4, pôde-se verificar que as amostras 1, 3 e 4 apresentaram os melhores resultados contra as bactérias aeróbias. Entretanto, com relação às bactérias anaeróbias, todas as amostras mostraram-se atividade antibacteriana ineficientes, apresentando CIM igual ou maior que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As amostras 1, 3 e 4 apresentaram os melhores resultados com relação à atividade antibacteriana contra as bactérias aeróbicas Gram-positiva *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* (CIM de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), porém, o O.E de todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana moderada segundo Holetz e colaboradores (2002), para as bactérias aeróbicas, resultado satisfatório uma vez que o período da coleta e extração do O.E não interferem de forma significativa na atividade antimicrobiana. Para as bactérias anaeróbicas analisadas, todas as amostras apresentaram atividade antibacteriana com CIM igual ou maior que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve uma variação nos constituintes identificados no óleo essencial *E. calycina* ao longo do ano, sendo que a disponibilidade hídrica pode influenciar na produção de óleo. O óleo essencial das folhas apresenta variação na composição química ao longo do ano e, em algumas amostras houve alteração quanto ao componente majoritário. O composto majoritário, na maioria das amostras foi o espatulenol (presente nas amostras 2, 3, 4 e 6), porém na amostra 1 o composto majoritário foi o biciclogermacreno e na amostra 5 o *Trans*-cariofileno.

A atividade antibacteriana não demonstrou ser influenciada pelo índice pluviométrico, uma vez que as amostras 1, 3 e 4 apresentaram a melhor atividade antimicrobiana contra as bactérias aeróbicas Gram-positiva *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* (CIM de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e com relação às bactérias anaeróbicas, todas as amostras apresentaram baixa atividade antibacteriana, apresentando CIM igual ou maior que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O óleo essencial das folhas da espécie *E. calycina* apresentou bons rendimentos rendimento se comparado com outras plantas comercialmente importantes, porém pode-se observar que a amostra 4 (coleta e extração realizado em julho) obteve-se o menor rendimento, concluindo assim que esse não seria o melhor período para coleta, devido ao baixo rendimento, visto que a atividade biológica não foi influenciada pela sazonalidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. ed. Carol Stream: Allured Bussiness Media, 2007. 804 p.
- ARANTES, A. A., MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 111-127, 2002.
- ARAÚJO, A.C., 2008. Fracionamento do óleo essencial de patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] obtido por extração supercrítica. 2008. 108p. Dissertação (Mestrado - Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológico) - Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- BLANK, A. F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.
- BORGES, K. C. D. F. et al. Pulp yield and morphometric characters of fruit and seed of *Eugenia calycina*/Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 471, 2010. ISSN 0100-2945.
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 349-356, Mar. 2007.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.
- BULOW, J. F. W.; CARMONA, R.; PARENTE, T. V. Treatment and storage of *Eugenia-calycina* seeds. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 29, n. 6, p. 961-970, 1994.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CASTRO, H. G.; SANTOS, R. G.; LEAL, T. C. A. B.; PERINE, V.B.M. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciências Agronômica**, v. 41, n. 2, 308-314, 2010.

CHARLES, C. A.; MCGUIRE, J. A.; SHARMA, N. C.; QAQISH, J. Comparative efficacy of two daily use mouthrinses: randomized clinical trial using an experimental gingivitis model. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 25, n., p. 338-344, July/ Aug. 2011.

CHAVES, F.F.M. et al. Teor e caracterização química do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 6., 2011, Campinas. Livro de resumos. Campinas: Unicamp, p. 223, 2011.

CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: CLSI document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: CLSI document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd. New York: John Wiley & Sons, 2002.

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

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

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-16, 2000.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

DORN, J. M.; GENCO, R. J.; GROSSI, S. G.; FALKNER, K. L.; HOVEY, K. M.; IACOVIELLO, L.; TREVISAN, M. Periodontal disease and recurrent cardiovascular events

in survivors of myocardial infarction (MI): the western New York acute MI study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 4, p. 502-511, Apr. 2010.

EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchouli**. Florianópolis, p. 58, 2004.

FALLATAH, S. A.; KHATER, E. I. Potential of medicinal plants in mosquito control. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 40, n. 1, p. 1-26, 2010.

FERREIRA, F. P. S.; MORAIS, S. R.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; PAULA, J. R.; CARVALHO, T. C.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; REZENDE, M. H. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 221-225, Aug. 2005.

FINE D, H, MARKOWITZ K, FURGANG D, GOLDSMITH D, NITTEL-RICCI D, CHARLES CH. et al. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. **J Periodontol**, 78(10):1935-42, 2007.

FONSECA, M. C. M. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini**. 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

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

HAFFAJEE, A. D.; YASKELL, T.; SOCRANSKY, S. S. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 139, n. 5, p. 606-611, May 2008.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JOY, P.P. et al. Aromatic plants. **Tropical Horticulture**, v. 2. (eds. Bose, T.K., Kabir, J., Das, P. and Joy, P.P.). Naya Prokash, Calcutta, p. 633-733, 2001.

- KESZEI A., BRUBAKER C. L., FOLEY W. J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Aust J Bot*, V. 56, P. 197–213, 2008.
- KUMAR, P. S. Oral microbiota and systemic disease. **Anaerobe**, London, v. 24, n. 0, p. 90-93, Oct. 2013a.
- LIMA, A. P.; STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; CUNHA, R. R.; JUVENCIO, L. A.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Electrochemical oxidation of chlorhexidine and its amperometric determination by flow-injection analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 448-452, Mar. 2014.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. 1. ed. Lisboa: IST Press, p. 123-125, 2007.
- MORAIS, L. M., CONCEIÇÃO, G. M., NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica. *Agrarian Academy*, v.1, p. 317-346, 2014.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.
- NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 561-584, out./ dez. 2003.
- NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.5, p.395-400, 2004.
- PADOVAN, A., KESZEI, A., KULFEIM, C., FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochem Ver**, v. 13, p. 695–716, 2014.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.
- ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do alto rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

SÁ, R.C.S. et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male wistar rats'organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.324-32, 2006.

SABULAL, B. et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v 67, n.22, p.2469-73, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis Ed. Da UFSC. p. 232-354, 1999.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICKA, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 Ed. UFRGS, p. 1104, 2003.

SOUSA, R. M. F.; DE MORAIS, S. A. L.; VIEIRA, R. B. K.; NAPOLITANO, D. R.; GUZMAN, V. B.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, C. H. G.; CHANG, R.; DE AQUINO, F. J. T.; DO NASCIMENTO, E. A.; DE OLIVEIRA, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, n. 0, p. 71-78, 2015.

SOUSA, R. M. F., 2015. Estudo químico de *Eugenia calycina* Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana , antioxidante e inibidora de alfaamilase. 2015. Tese (Doutorado em química orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

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

TISSERAND, R.; BALACS, T. Essential oil safety: a guide for health care professionals. **Belland Bain Ltd.**, Glasgow, 1995.

VOLLHARDT, K. P. S., NEIL E. Química Orgânica - Estrutura e Função. n. 6, 2013.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. *In*: Hay, R.K.M. & Waterman, P.G. (eds.). Volatile oil crops: **their biology, biochemistry and production**. Avon: Iorigman Group, p. 47-61, 1993.

YENGOPAL, V. Essential oils for caries prevention: a viable option? **Journal of Minimum Intervention in Dentist**, Houghton, v. 2, n. 3, p. 190-204, Sept. 2009.

ZONG, Z.; KIRSCH, L. E. Studies on the instability of chlorhexidine, part I: kinetics and mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 101, n. 7, p. 2417-2427, Jul. 2012.

**APÊNDICE A - TEMPOS DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DE ALCANOS (C8-C30)
NA ANÁLISE POR CG-EM**

Alcano	Tempo de retenção (min)
octano (C8)	3,17
nonano (C9)	4,56
decano (C10)	7,50
undecano (C11)	11,22
dodecano (C12)	15,25
tridecano (C13)	19,34
tetradecano (C14)	23,73
pentadecano (C15)	27,58
hexadecano (C16)	31,59
heptadecano (C17)	35,31
octadecano (C18)	38,86
nonadecano (C19)	42,23
eicosano (C20)	45,46
heneicosano (C21)	48,54
docosano (C22)	51,49
tricosano (C23)	54,34
tetracosano (C24)	57,06
pentacosano (C25)	59,68
hexacosano (C26)	62,21
heptacosano (C27)	65,5
octacosano (C28)	68,58
nonacosano (C29)	—
triacontano (C30)	—

APÊNDICE B - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

- Caldo triptona de soja - TSB (BD®)

Composição: peptona de caseína (17,0 g); peptona de soja (3,0 g); glicose (2,5 g); cloreto de sódio (5,0 g); hidrogenofosfato dipotássico (2,5 g).

Preparação (CLSI, 2012b): Foi preparada uma solução de concentração de 30,0 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C.

- Ágar triptona de soja - TSB (BD®)

Composição: infusão de músculo cardíaco (2,0 g); digestão pancreática de caseína (13,0 g); extrato de levedura (5,0 g); cloreto de sódio (5,0 g); ágar (15,0 g).

Preparação: Foi preparada uma solução de concentração de 40,0 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada com aquecimento até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento (45 a 50 °C) foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada placa de Petri recebeu 25 mL dessa mistura.

- Caldo Schaedler (BD®)

Composição: digestão pancreática de caseína (8,10 g); digestão peptídica de tecido animal (2,50 g); digestão papaínica de farelo de soja (1,00 g); dextrose (5,82 g); extrato de levedura (5,00 g); cloreto de sódio (1,70 g); fosfato dipotássico (0,82 g); hemina (0,01 g); L-cistina (0,40 g); Tris (hidroximetil) aminometano (3,00 g).

Preparação (CLSI, 2012a): Foi preparada uma solução de concentração 28,4 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi suplementada com 1 mL de solução de hemina de concentração 5,0 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadiona de concentração 1,0 mg mL⁻¹.

- Ágar Schaedler (BD®)

Composição: digestão pancreática de caseína (8,20 g); digestão peptídica de tecido animal (2,50 g); digestão papaínica de farelo de soja (1,00 g); dextrose (5,80 g); extrato de levedura (5,00 g); cloreto de sódio (1,70 g); fosfato dipotássico (0,80 g); hemina (0,01 g); L-cistina (0,40 g); Tris (hidroximetil) aminometano (3,00 g); Agar (13,5 g).

Preparação: Foi preparada uma solução de concentração 41,9 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi

suplementada com 1 mL de solução de hemina de concentração $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e 1 mL de solução de menadiona de concentração $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Após o resfriamento (45 a 50°C), foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada placa de Petri recebeu 30 mL dessa mistura.

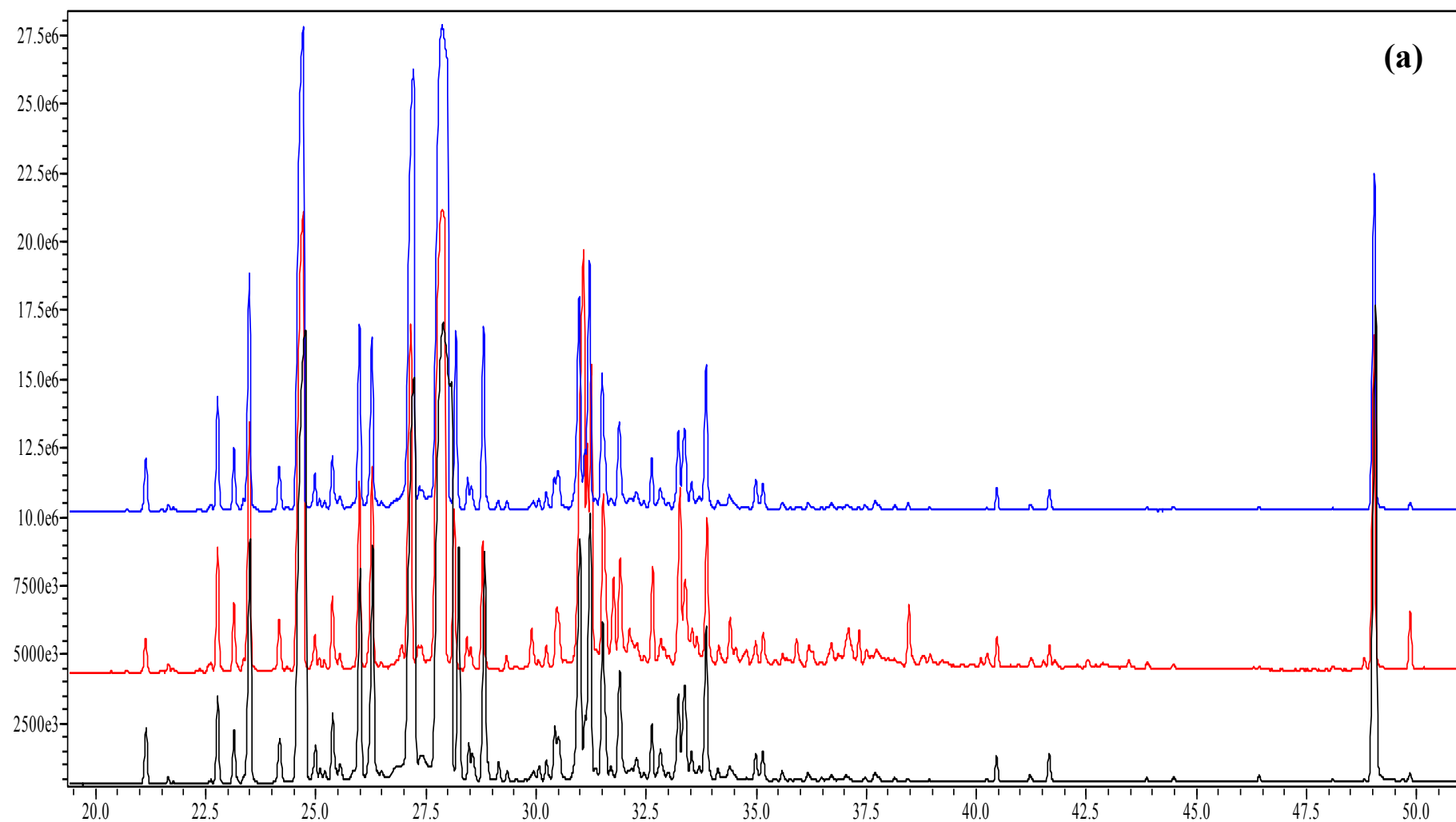
- Inóculos

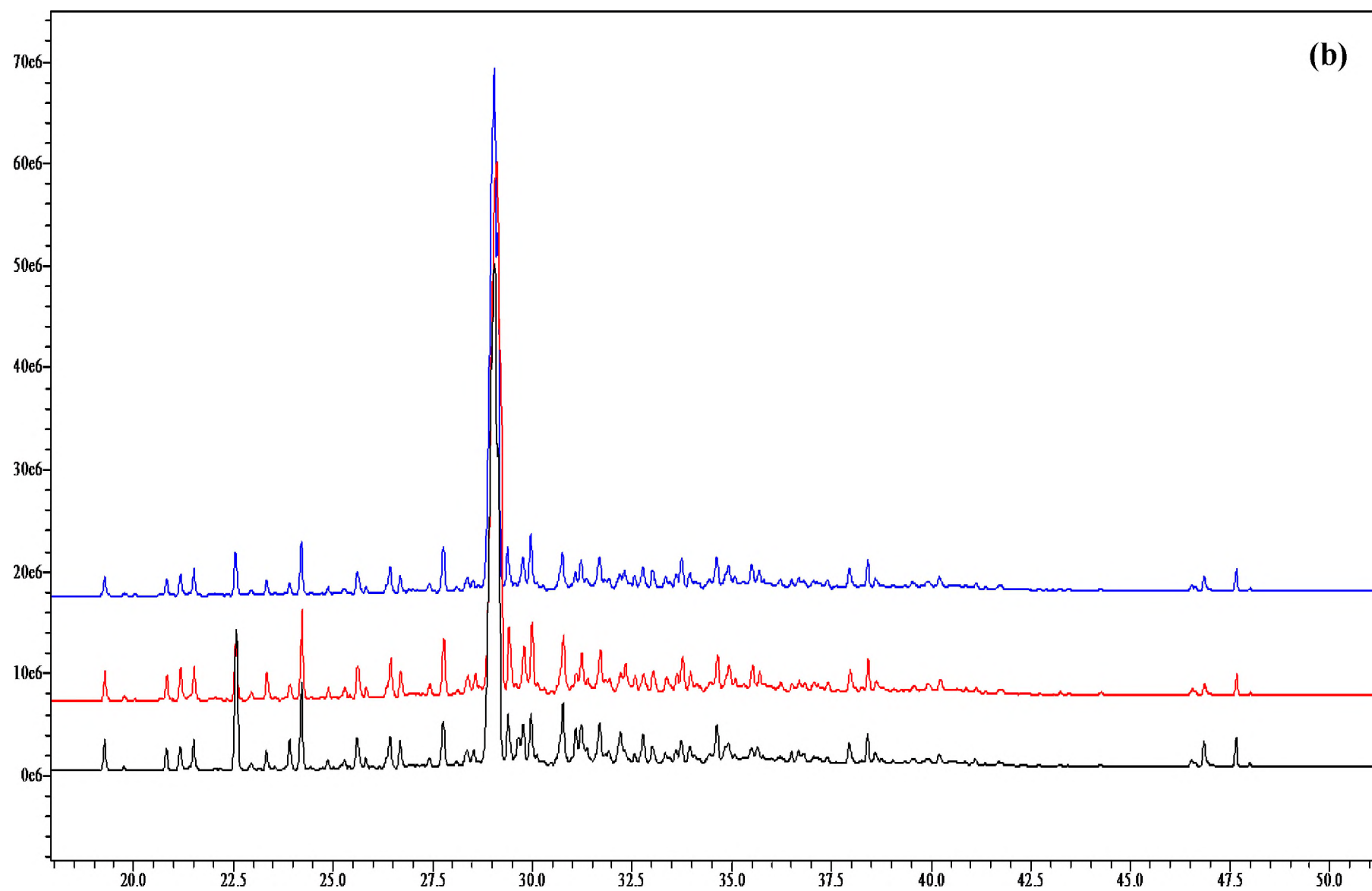
Para inóculos utilizados em bactérias aeróbicas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos, crescidos no meio de cultura de ágar triptona de soja, foram transferidas para tubos contendo caldo triptona soja;

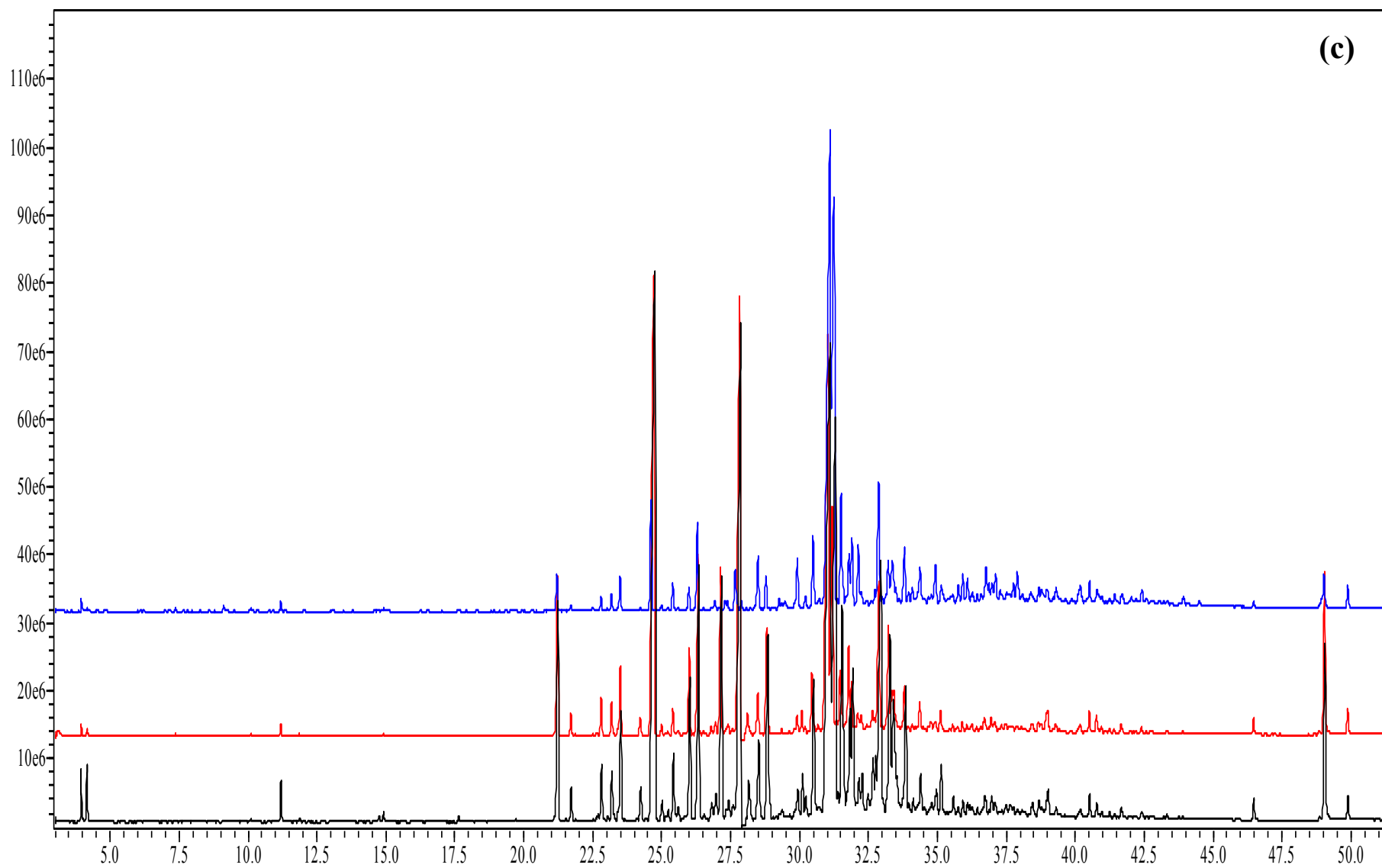
Para inóculos utilizados em bactérias anaeróbicas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 72 horas dos microrganismos, crescidos no meio de cultura de ágar Schaedle, foram transferidas para tubos contendo caldo Schaedle.

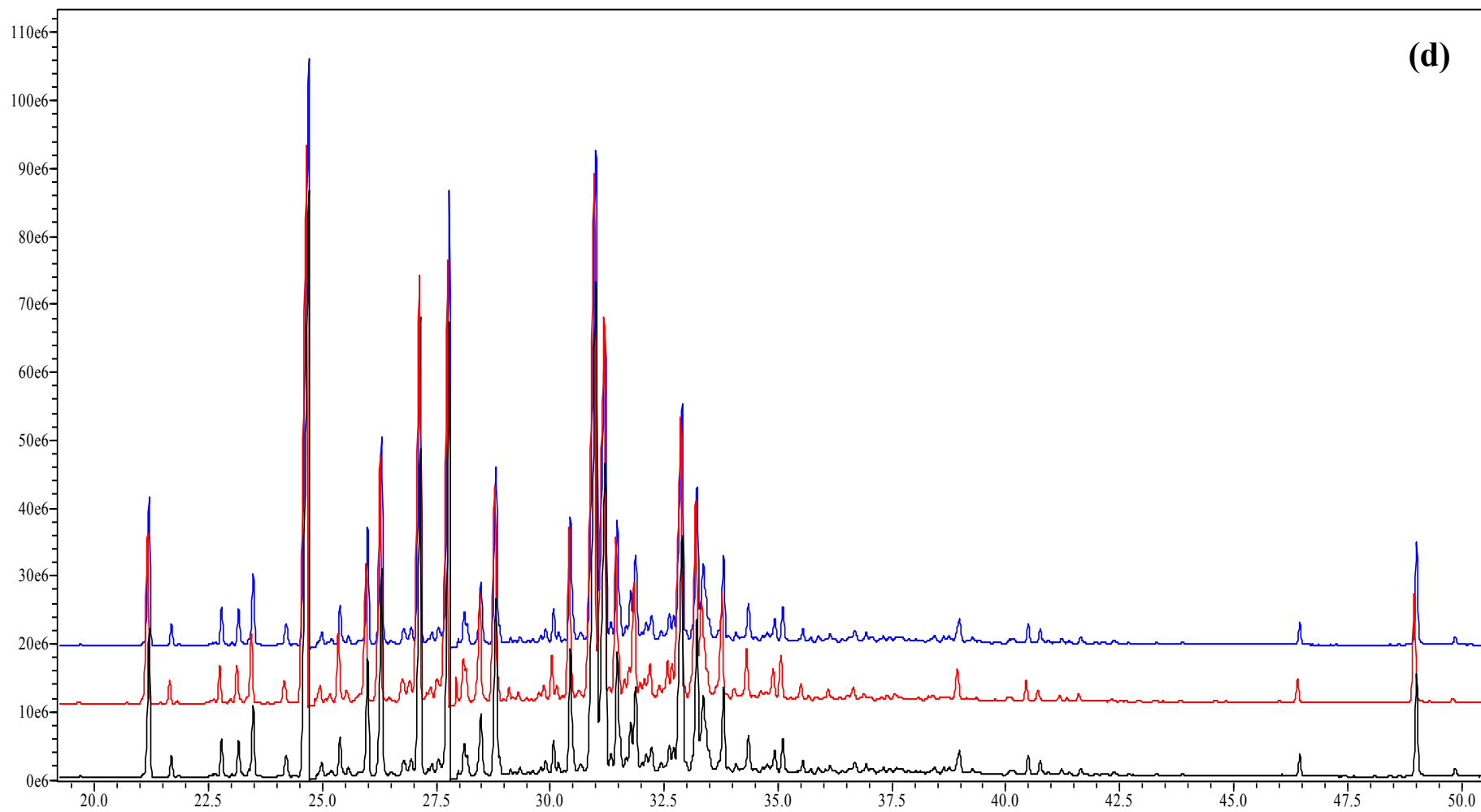
Através de um turbidímetro, os inóculos foram padronizados fazendo a comparação de sua turbidez com o tubo 0,5 da escala de McFarland para bactérias (corresponde a $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$).

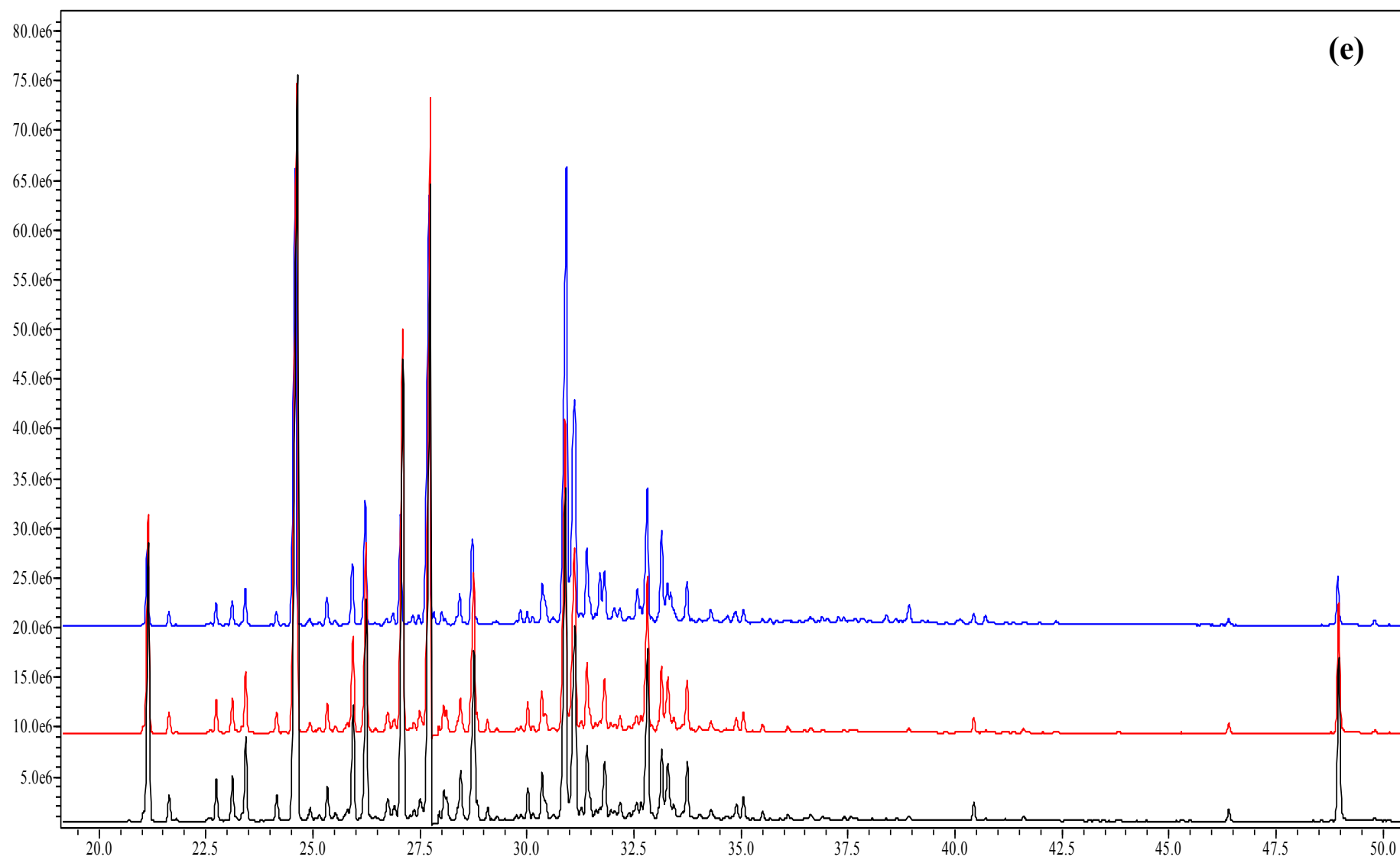
APÊNDICE C– CROMATOGRAMAS EXPANDIDOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA *E. calycina* OBTIDOS POR CG-EM; (A) AMOSTRA 1, (B) AMOSTRA 2, (C) AMOSTRA 3, (D) AMOSTRA 4, (E) AMOSTRA 5, (F) AMOSTRA 6

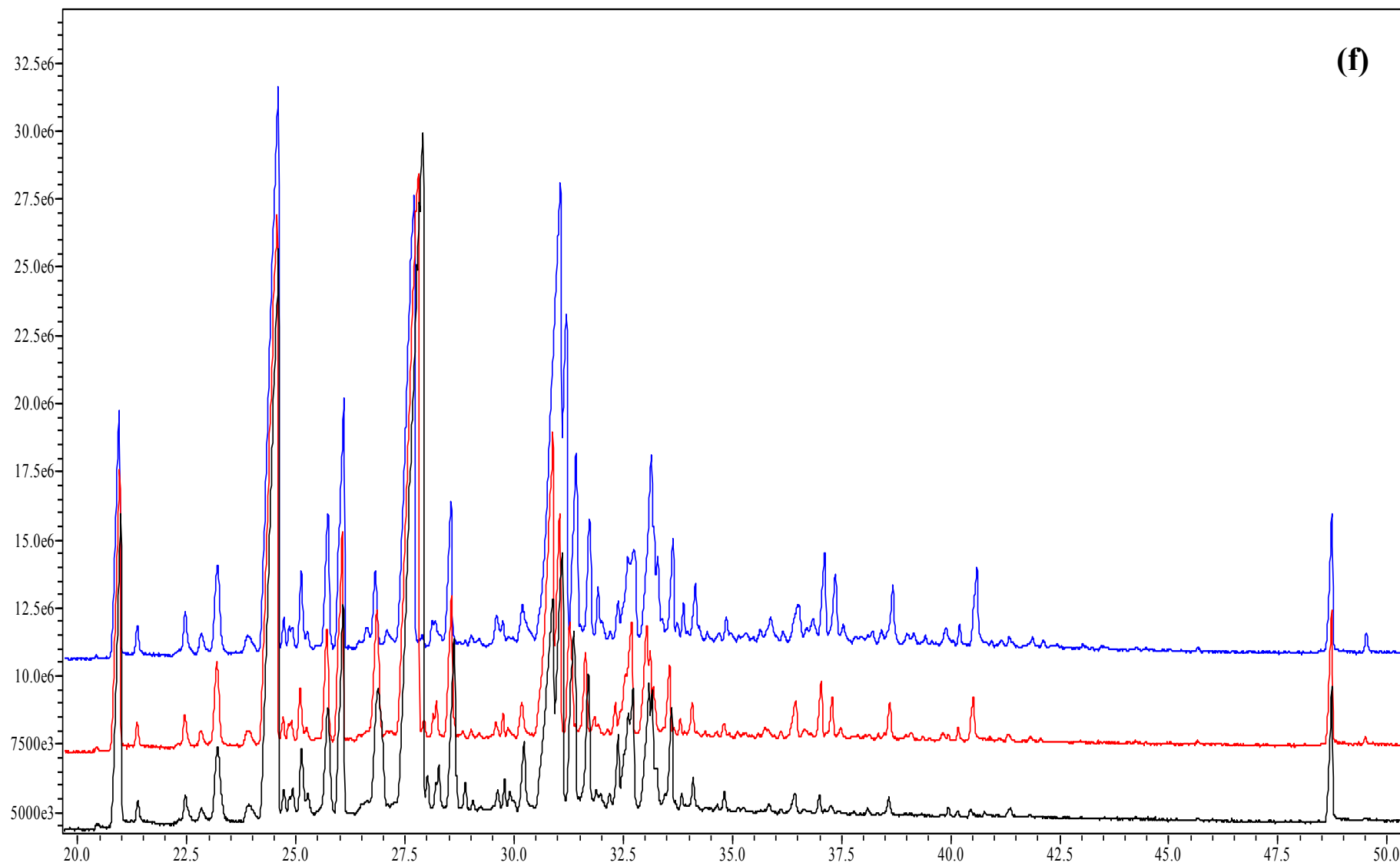












APÊNDICE D - COMPOSTOS IDENTIFICADOS PARA AS AMOSTRAS 1, 2, 3, 4, 5 E 6 COM O IA CALCULADO, IA ENCONTRADO NA LITERATURA, ÍNDICE DE SIMILARIDADE DOS ESPECTROS BEM COMO AS REFERÊNCIAS

AMOSTRA 1

(continua)

Tempo de retenção (min)	Área %	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
21,141	0,65	δ-elemeneno	94	Shim2205	1321	1335	Adams
22,776	0,92	α-copaeno	94	Wiley229	1341	1374	Adams
23,147	0,58	β-bourboneno	91	Wiley139	1346	1387	Adams
23,512	3,22	β-elemeneno	95	Shim2205	1350	1389	Adams
24,184	0,65	α-gurjuneno	94	Wiley229	1407	1409	Adams
24,763	12,98	trans-cariofileno	93	Wiley229	1414	1417	Adams
24,996	0,50	β-copaeno	93	Shim2205	1417	1430	Adams
25,386	0,89	Aromadendreno	94	Nist08	1422	1439	Adams
26,01	2,68	α-humuleno	94	Shim2205	1430	1452	Adams
26,297	3,22	Alloaromadendreno	94	Nist08	1433	1458	Adams
27,232	10,54	Germacreno D	91	Shim2205	1445	1484	Adams
27,417	0,95	NI	-	-	-	-	-
27,893	20,49	Biciclogermacreno	95	Wiley229	1453	1500	Adams
28,06	2,24	NI	-	-	-	-	-
28,092	1,67	NI	-	-	-	-	-
28,248	2,60	Germacreno A	93	Wiley229	1458	1508	Adams
28,477	0,44	α-Amorfeneno	93	Shim2205	1461	1483	Adams
28,556	0,41	NI	-	-	-	-	-
28,837	3,37	δ-cadinene	93	Wiley229	1465	1522	Adams
30,429	0,62	Z-Nerolidol	95	Shim2205	1537	1531	Adams
30,51	0,68	NI	-	-	-	-	-
31,001	4,97	Espatulanol	93	Wiley229	1544	1577	Adams
31,118	0,65	Óxido de Cariofileno	92	Wiley229	1546	1582	Adams
31,235	3,48	Globulol	91	Wiley229	1547	1590	Adams
31,517	2,39	Veridiflorol	95	Shim2205	1551	1592	Adams
31,905	1,72	Ledol	90	Nist27	1553	1602	Adams
32,284	0,48	NI	-	-	-	-	-
32,633	0,70	Rosifoliol	88	Shim2205	1566	1600	Adams
32,825	0,60	Epicubenol	91	Shim2205	1568	1627	Adams

(conclusão)

Tempo de retenção (min)	Área %	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
33,529	0,43	Torreiol	93	Wiley139	1626	1645	Adams
33,866	3,54	α -cadinol	95	Nist08	1631	1652	Adams
34,392	0,54	NI	-	-	-	-	-
34,99	0,43	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	91	Shim2205	1651	1685	Adams
35,149	0,45	NI	-	-	-	-	-
40,455	0,17	2-Undecanone	92	Wiley139	1824	1293	Adams
41,648	0,36	Z-9-Hexadecen-1-ol,	96	Nist08	1842	1874	Adams
49,071	8,38	Fitol	95	Wiley229	2018	1942	Adams
69,597	0,41	Supraeno	93	Nist 27	2749	2798	Kowalski, 2005

AMOSTRA 2

(continua)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
19,268	0,85	δ-Elemeneno	96	Wiley229	1348	1335	Adams
20,819	0,62	α-Copaeno	93	Wiley229	1366	1374	Adams
21,164	0,72	β-Bourboneno	93	Wiley139	1370	1387	Adams
21,506	0,98	β-Elemeneno	96	Shim2205	1374	1389	Adams
22,575	3,94	β-Cubebeno	91	Wiley229	1386	1387	Adams
23,332	0,57	Aromadendreno	95	Nist08	1448	1439	Adams
23,911	0,87	α-Humuleno	95	Wiley229	1455	1452	Adams
24,21	2,4	Alloaromadendreno	96	Wiley229	1459	1458	Adams
24,87	0,14	Naftaleno	94	Nist27	1467	1178	Adams
25,605	1,21	Cubebol	92	Shim2205	1525	1514	Adams
26,427	1,42	10-epi-Cubebol	92	Shim2205	1535	1533	Adams
26,687	0,95	NI	-	-	-	-	-
27,765	1,77	Óxido de cariofileno	93	Wiley229	1552	1582	Adams
28,359	0,92	Palustrol	91	Wiley139	1560	1567	Adams
28,529	0,73	E-Nerolidol	94	Nist27	1562	1561	Adams
29,055	32,05	Espatuleno	94	Shim2205	1568	1577	Adams
29,129	8,25	NI	-	-	-	-	-
29,391	2,05	Viridiflorol	94	Shim2205	1573	1592	Adams
29,657	1,39	NI	-	-	-	-	-
29,767	1,46	NI	-	-	-	-	-
29,966	1,93	Epóxido de humuleno II	91	Shim2205	1580	1608	Adams
30,772	3,09	NI	-	-	-	-	-
31,094	1,56	isoespatulenol	92	Wiley229	1546	1577	Adams
31,228	1,77	NI	-	-	-	-	-
31,366	0,86	NI	-	-	-	-	-
31,689	1,99	α-Cadinol	91	Nist08	1654	1652	Adams
31,919	0,7	NI	-	-	-	-	-
32,215	1,69	NI	-	-	-	-	-
32,299	0,92	NI	-	-	-	-	-
32,563	0,57	NI	-	-	-	-	-
32,781	1,52	NI	-	-	-	-	-
33,016	1,09	NI	-	-	-	-	-
33,335	0,8	NI	-	-	-	-	-
33,602	0,68	NI	-	-	-	-	-
33,736	1,08	NI	-	-	-	-	-

(Conclusão)							
Tempo de retenção (min)	Área (%)	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
33,947	0,95	NI	-	-	-	-	-
34,445	0,87	NI	-	-	-	-	-
34,621	1,71	NI	-	-	-	-	-
34,913	1,8	NI	-	-	-	-	-
35,072	0,73	NI	-	-	-	-	-
35,498	0,9	NI	-	-	-	-	-
35,644	0,87	NI	-	-	-	-	-
36,201	1,02	NI	-	-	-	-	-
36,49	0,67	NI	-	-	-	-	-
36,672	0,73	NI	-	-	-	-	-
36,808	0,78	NI	-	-	-	-	-
37,939	1,35	NI	-	-	-	-	-
38,401	1,06	2-Undecanone	93	Wiley229	1845	1293	Adams
38,598	0,71	NI	-	-	-	-	-
40,201	0,71	NI	-	-	-	-	-
46,846	0,91	Fitol	96	Wiley229	1974	1942	Adams
47,652	0,69	NI	-	-	-	-	-

AMOSTRA 3

(Continua)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
3,945	0,28	Z-3-Hexen-1-ol	93	Wiley139	818	850	Adams
4,154	2,72	1-Hexanol	96	Nist27	828	796	Adams
11,19	0,32	Linalool	97	Wiley229	10,49	1095	Adams
21,237	2,91	δ-Elemeno	96	Shim2205	1323	1335	Adams
21,72	0,32	α-Cubebeno	95	Nist27	1329	1345	Adams
22,823	0,66	α-Copaeno	95	Wiley229	1342	1374	Adams
23,196	0,74	β-Bourboneno	95	Wiley229	1346	1387	Adams
23,515	1,48	β-Elemeno	94	Shim2205	1351	1389	Adams
24,239	0,54	α-Gurjuneno	95	Shim2205	1408	1409	Adams
24,759	11,57	Trans-Cariofileno	95	Wiley139	1414	1417	Adams
25,426	0,94	Aromadendreno	93	Wiley229	1423	1439	Adams
25,598	0,11	γ -Amorfenos	91	Shim2205	1425	1495	Adams
26,028	1,86	α-Humuleno	97	Wiley139	1431	1452	Adams
26,347	3,39	Alloaromadendreno	96	Wiley229	1435	1458	Adams
26,813	0,14	NI	-	-	-	-	-
26,975	0,55	Naftaleno	92	NIST27	1442	1178	Adams
27,171	3,2	Germacreno D	96	Shim2205	1445	1484	Adams
27,867	8,16	Biciclogermacreno	95	Shim2205	1454	1500	Adams
28,15	0,56	Germacreno A	95	Wiley229	1507	1508	Adams
28,521	1,48	10-epi-Cubebol	95	Shim2205	1512	1533	Adams
28,85	2,77	δ-Cadineno	94	Wiley229	1517	1522	Adams
29,936	0,86	NI	-	-	-	-	-
30,111	0,63	Germacreno B	94	Wiley229	1533	1559	Adams
30,225	0,15	Veridiflorol	93	Nist08	1535	1592	Adams
30,514	2,2	E-Nerolidol	93	Shim2205	1538	1561	Adams
31,108	12,32	Espatuleno	95	Wiley139	1546	1577	Adams
31,299	7,86	Globulol	91	Wiley229	1549	1590	Adams
31,545	3,42	Ledol	95	Nist27	1552	1602	Adams
31,829	1,56	NI	-	-	-	-	-
31,934	2,11	NI	-	-	-	-	-
32,154	0,62	NI	-	-	-	-	-
32,277	0,9	NI	-	-	-	-	-
32,669	1,06	NI	-	-	-	-	-
32,765	0,79	NI	-	-	-	-	-
32,952	4,74	NI	-	-	-	-	-
33,283	2,95	isopatuleno	92	Wiley229	1624	1577	Adams
33,406	2,27	NI	-	-	-	-	-

(Conclusão)							
Tempo de retenção (min)	Área (%)	Composto	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
33,532	0,76	NI	-	-	-	-	-
33,855	2,09	α -Cadinol	94	Nist08	1631	1652	Adams
34,392	0,74	NI	-	-	-	-	-
34,965	0,7	NI	-	-	-	-	-
35,143	0,97	NI	-	-	-	-	-
36,722	0,85	NI	-	-	-	-	-
38,07	0,52	NI	-	-	-	-	-
38,452	0,64	NI	-	-	-	-	-
39,014	0,79	NI	-	-	-	-	-
40,523	0,22	2-Undecanone	93	Wiley229	1776	1293	Adams
49,054	2,58	Fitol	96	Wiley229	1959	1942	Adams

AMOSTRA 4

(Continua)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
21,193	2,34	δ-Elemeno	95	Shim2205	1322	1335	Adams
21,681	0,36	α-Cubebeno	96	Nist27	1328	1345	Adams
22,787	0,7	α-Copaeno	96	Wiley139	1342	1374	Adams
23,161	0,67	β-Bourboneno	96	Wiley229	1346	1387	Adams
23,479	1,54	B-elemeno	96	Shim2205	1351	1389	Adams
24,202	0,44	α-Gurjuneno	95	Wiley139	1406	1409	Adams
24,695	11,21	<i>trans</i> -Cariofileno	96	Wiley139	1412	1417	Adams
24,99	0,26	β-Cubebeno	93	Wiley229	1416	1387	Adams
25,388	0,71	Aromadendreno	96	Wiley229	1421	1439	Adams
25,988	1,93	α-Humuleno	97	Wiley229	1428	1452	Adams
26,301	3,51	Alloaromadendreno	97	Wiley229	1433	1458	Adams
26,788	0,49	-	-	-	-	-	-
26,948	0,44	-	-	-	-	-	-
27,152	5,66	Germacreno D	94	Shim2205	1444	1488	Adams
27,403	0,32	Aromadendrene-dehydro	91	Shim2205	1447	1460	Adams
27,545	0,51	<i>Trans</i> -cadin-1(6),4-diene	91	Shim2205	1449	1475	Adams
27,785	6,43	Biciclogermacreno	96	Shim2205	1452	1500	Adams
28,114	0,56	Germacreno A	95	Wiley229	1507	1508	Adams
28,172	0,32	-	-	-	-	-	-
28,482	1,38	Cubebol	94	Shim2205	1512	1514	Adams
28,81	4,39	δ-Cadineno	96	Wiley229	1516	1522	Adams
29,897	0,39	-	-	-	-	-	-
30,076	0,62	Germacreno B	96	Wiley229	1532	1559	Adams
30,442	2,3	<i>E</i> -Nerolidol	95	Shim2205	1537	1561	Adams
30,67	0,46	-	-	-	-	-	-
31,004	12,41	Espatulanol	97	Nist08	1540	1577	Adams
31,201	7,02	Globulol	93	Nist08	1545	1590	Adams
31,334	0,47	-	-	-	-	-	-
31,472	2,45	Viridiflorol	94	Shim2205	1550	1592	Adams
31,668	0,39	-	-	-	-	-	-
31,767	0,91	-	-	-	-	-	-
31,875	1,72	-	-	-	-	-	-
32,104	0,46	-	-	-	-	-	-
32,226	0,79	-	-	-	-	-	-

(Conclusão)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
32,71	0,5	-	-	-	-	-	-
32,434	0,37	-	-	-	-	-	-
32,615	0,77	-	-	-	-	-	-
32,71	0,5	-	-	-	-	-	-
32,894	4,97	-	-	-	-	-	-
33,223	3,1	-	-	-	-	-	-
33,358	2,14	Epicubenol	92	Shim2205	1624	1627	Adams
33,48	0,45	-	-	-	-	-	-
33,802	1,78	α -cadinol	93	Shim2205	1631	1652	Adams
34,075	0,38	-	-	-	-	-	-
34,351	0,97	-	-	-	-	-	-
34,765	0,36	-	-	-	-	-	-
34,931	0,66	-	-	-	-	-	-
35,102	0,85	-	-	-	-	-	-
35,545	0,53	-	-	-	-	-	-
35,888	0,35	-	-	-	-	-	-
36,142	0,48	-	-	-	-	-	-
36,685	0,44	Isobiciclogermacrenal	92	Shim2205	1720	1733	Adams
36,93	0,41	-	-	-	-	-	-
37,043	0,32	-	-	-	-	-	-
37,61	0,39	Benzoato de benzila	92	Nist08	1734	1759	Adams
38,438	0,53	-	-	-	-	-	-
38,755	0,32	-	-	-	-	-	-
38,977	0,73	-	-	-	-	-	-
40,491	0,43	-	-	-	-	-	-
40,749	0,47	-	-	-	-	-	-
41,642	0,39	Hexadecanol	93	Shim2205	1843	1874	Adams
46,453	0,46	<i>E,Z</i> -Geraniol linalool	95	Shim2205	1867	1987	Adams
49,013	1,89	Fitol	96	Wiley229	1960	1942	Adams

AMOSTRA 5

(Continua)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
21,157	5,22	δ –Elemeno	94	Shim2205	1322	1335	Adams
21,641	0,34	α-Cubebeno	96	Nist27	1328	1345	Adams
22,74	0,88	α-Copaeno	95	Wiley139	1341	1374	Adams
23,116	0,86	β-Bourboneno	95	Wiley229	1346	1387	Adams
23,432	1,82	β-elemeno	96	Shim2205	1350	1389	Adams
24,153	0,56	α-Gurjuneno	95	Wiley139	1405	1409	Adams
24,637	15,65	<i>Trans</i> -cariofileno	96	Shim2205	1412	1417	Adams
24,938	0,43	-	-	-	-	-	-
25,147	0,28	-	-	-	-	-	-
25,338	0,73	Aromadendreno	96	Wiley229	1421	1439	Adams
25,519	0,32	-	-	-	-	-	-
25,806	0,51	-	-	-	-	-	-
25,938	1,83	α-Humuleno	96	Wiley139	1428	1452	Adams
26,246	3,75	Alloaromadendreno	96	Wiley229	1432	1458	Adams
26,454	0,36	-	-	-	-	-	-
26,75	0,69	<i>Trans</i> -cadina-1(6),4-diene	93	Shim2205	1439	1475	Adams
26,903	0,44	-	-	-	-	-	-
27,106	7,99	Germacreno D	96	Nist08	1445	1484	Adams
27,36	0,33	-	-	-	-	-	-
27,498	0,67	-	-	-	-	-	-
27,75	9,89	Biciclogermacreno	96	Shim2205	1450	1500	Adams
28,063	0,61	Germacreno A	94	Wiley229	1506	1508	Adams
28,126	0,45	-	-	-	-	-	-
28,451	1,3	Cubebol	92	Shim2205	1511	1514	Adams
28,758	3,14	δ -Cadinene	93	Wiley229	1516	1522	Adams
28,834	0,29	-	-	-	-	-	-
29,084	0,35	<i>Trans</i> -cadina-1,4-diene	93	Shim2205	1520	1533	Adams
29,298	0,27	-	-	-	-	-	-
29,755	0,32	Elemol	92	Shim2205	1528	1548	Adams
29,859	0,25	-	-	-	-	-	-
30,021	0,65	Germacreno B	94	Wiley229	1530	1559	Adams
30,353	0,96	<i>E</i> -Nerolidol	97	Shim2205	1536	1561	Adams
30,426	0,42	-	-	-	-	-	-
30,614	0,34	-	-	-	-	-	-
30,9	6,31	Espatulenol	95	Nist08	1543	1577	Adams
31,116	4,26	Globulol	92	Nist08	1546	1590	Adams
31,267	0,38	-	-	-	-	-	-
31,406	1,65	-	-	-	-	-	-

(conclusão)							
Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
31,61	0,34	-	-	-	-	-	-
31,712	0,27	-	-	-	-	-	-
31,816	1,24	-	-	-	-	-	-
31,965	0,27	-	-	-	-	-	-
32,051	0,29	-	-	-	-	-	-
32,178	0,56	-	-	-	-	-	-
32,387	0,29	-	-	-	-	-	-
32,562	0,6	-	-	-	-	-	-
32,666	0,36	-	-	-	-	-	-
32,822	3,18	-	-	-	-	-	-
33,148	1,41	-	-	-	-	-	-
33,294	1,4	-	-	-	-	-	-
33,429	0,39	-	-	-	-	-	-
33,639	0,31	-	-	-	-	-	-
33,747	1,09	α -Cadinol	94	Shim2205	1630	1652	Adams
34,029	0,36	-	-	-	-	-	-
34,298	0,5	-	-	-	-	-	-
34,667	0,33	-	-	-	-	-	-
34,893	0,45	-	-	-	-	-	-
35,054	0,65	-	-	-	-	-	-
35,506	0,31	-	-	-	-	-	-
36,097	0,4	-	-	-	-	-	-
36,631	0,31	Isobiciclogermacrenal	93	Shim2205	1705	1733	Adams
37,569	0,25	Benzoate de benzila	94	Nist27	1721	1759	Adams
38,077	0,26	-	-	-	-	-	-
38,929	0,32	-	-	-	-	-	-
40,444	0,43	-	-	-	-	-	-
41,604	0,38	Hexadecanol	95	Wiley139	1842	1874	Adams
46,398	0,31	-	-	-	-	-	-
48,974	7,24	Fitol	95	Wiley229	1958	1942	Adams

AMOSTRA6

(continua)

Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridade	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
20,945	3,06	δ -Elemeno	96	Shim2205	1320	1335	Adams
21,361	0,4	-	-	-	-	-	-
22,464	0,66	α -Copaeno	92	Wiley229	1338	1374	Adams
22,833	0,42	β -Bourboneno	92	Wiley229	1342	1387	Adams
23,2	1,55	β -Elemeno	96	Shim2205	1347	1389	Adams
23,897	0,62	α -Gurjuneno	93	Wiley229	1402	1409	Adams
24,591	13,55	<i>Trans</i> -Cariofileno	96	Shim2205	1411	1417	Adams
24,725	0,39	-	-	-	-	-	-
24,906	0,33	-	-	-	-	-	-
25,12	0,91	Aromadendreno	95	Wiley139	1415	1439	Adams
25,728	1,79	α -Humuleno	97	Wiley139	1425	1452	Adams
26,095	3,88	Alloaromadendreno	97	Wiley229	1430	1458	Adams
26,632	0,52	γ -Amorfene	93	Shim2205	1437	1495	Adams
26,816	1,17	-	-	-	-	-	-
27,084	0,38	-	-	-	-	-	-
27,704	10,63	α -amorfno	93	Shim2205	1450	1483	Adams
28,12	0,39	γ -Cadineno	92	Wiley139	1510	1513	Adams
28,191	0,62	-	-	-	-	-	-
28,553	1,96	δ -Cadineno	94	Wiley229	1516	1522	Adams
29,018	0,35	-	-	-	-	-	-
29,598	0,84	-	-	-	-	-	-
29,739	0,4	Germacreno B	94	Shim2205	1531	1559	Adams
30,187	0,83	-	-	-	-	-	-
30,28	0,57	-	-	-	-	-	-
31,058	13,63	Espatulanol	92	Wiley139	1547	1577	Adams
31,194	3,93	-	-	-	-	-	-
31,411	3,11	-	-	-	-	-	-
31,723	1,86	-	-	-	-	-	-
31,921	0,72	-	-	-	-	-	-
31,997	0,49	-	-	-	-	-	-
32,191	0,34	-	-	-	-	-	-
32,379	0,66	-	-	-	-	-	-
32,597	1,58	-	-	-	-	-	-
32,737	1,73	-	-	-	-	-	-
33,141	3,37	-	-	-	-	-	-
33,2	0,71	-	-	-	-	-	-
33,282	0,89	β -Atlantol	91	Shim2205	1623	1608	Adams

(conclusão)							
Tempo de retenção (min)	Área (%)	Compostos	Índice de similaridad e	Biblioteca	Índice aritmético obtido	Índice aritmético literatura	Referência
33,372	0,39	-	-	-	-	-	-
33,637	1,49	-	-	-	-	-	-
33,736	0,36	-	-	-	-	-	-
33,881	0,56	-	-	-	-	-	-
34,151	1,02	-	-	-	-	-	-
34,239	0,34	-	-	-	-	-	-
34,685	0,47	-	-	-	-	-	-
34,86	0,48	-	-	-	-	-	-
34,948	0,41	-	-	-	-	-	-
35,641	0,44	-	-	-	-	-	-
35,88	0,85	-	-	-	-	-	-
36,155	0,42	-	-	-	-	-	-
36,485	0,84	-	-	-	-	-	-
36,524	0,46	-	-	-	-	-	-
36,703	0,36	-	-	-	-	-	-
36,855	0,73	-	-	-	-	-	-
37,118	1,36	-	-	-	-	-	-
37,359	1,27	-	-	-	-	-	-
37,539	0,73	-	-	-	-	-	-
38,22	0,43	-	-	-	-	-	-
38,413	0,37	-	-	-	-	-	-
38,67	1,31	-	-	-	-	-	-
39,001	0,43	-	-	-	-	-	-
39,146	0,39	-	-	-	-	-	-
39,416	0,34	-	-	-	-	-	-
39,893	0,59	-	-	-	-	-	-
40,204	0,53	-	-	-	-	-	-
40,598	1,37	-	-	-	-	-	-
48,735	1,88	Fitol	92	Nist27	1954	1942	Adams
49,532	0,14	-	-	-	-	-	-