

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

HENRIQUE MARGUES DA COSTA

**ESTUDO MORFOANATÔMICO, VARIABILIDADE SAZONAL E
ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE
Campomanesia pubescens (DC.) O. BERG (MYRTACEAE)**

GOIÂNIA - GO
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Henrique Margues da Costa

Título do trabalho: ESTUDO MORFOANATÔMICO, VARIABILIDADE SAZONAL E ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE *Campomanesia pubescens* (DC.) O. BERG (MYRTACEAE)

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana De Sousa Fiuza, Professor do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Margues Da Costa, Discente**, em 14/08/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3944563** e o código CRC **75902D14**.

Referência: Processo nº 23070.044070/2023-46

SEI nº 3944563

HENRIQUE MARGUES DA COSTA

**ESTUDO MORFOANATÔMICO, VARIABILIDADE SAZONAL E
ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE
Campomanesia pubescens (DC.) O. BERG (MYRTACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Farmácia, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza
Co-orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

GOIÂNIA - GO
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa, Henrique Margues da
[manuscrito] / Henrique Margues da Costa. - 2023.
LXVI, 68 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza; co-orientador Dr.
José Realino de Paula .
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2023.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras,
lista de tabelas.

1. Anatomia vegetal. 2. Cerrado. 3. Óleo essencial. 4. Plantas
medicinais . 5. Atividade Larvívora. I. Fiuza, Tatiana de Sousa, orient.
II. Título.

CDU 615.1



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao(s) **08** dia(s) do mês de **Agosto** do ano de **2023** iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado **“ESTUDO MORFOANATÔMICO, VARIABILIDADE SAZONAL E ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE *Campomanesia pubescens* (DC.) O. BERG (MYRTACEAE)”**, de autoria de **Henrique Margues da Costa**, do curso de **Farmácia**, da **Faculdade de Farmácia** da UFG. Os trabalhos foram instalados pela orientadora **Profa. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza** (ICB/UFG) e pelo co-orientador **Prof. Dr. José Realino de Paula**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Heleno Dias Ferreira** ICB/UFG, **Profa. Dra. Camila Aline Romano**. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 9,5, tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana De Sousa Fiuza, Professor do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Realino De Paula, Professor do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Aline Romano, Usuário Externo**, em 08/08/2023, às 22:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heleno Dias Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3944561** e o código CRC **2023723C**.

HENRIQUE MARGUES DA COSTA

**ESTUDO MORFOANATÔMICO, VARIABILIDADE SAZONAL E
ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS DE
Campomanesia pubescens (DC.) O. BERG (MYRTACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Farmácia, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza - Orientadora
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Heleno Dias Ferreira
Universidade Federal de Goiás

Prof^ª. Dra. Camila Aline Romano
Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus pela oportunidade de terminar mais um ciclo com êxito.

À minha falecida avó Elizabeth Elaine do Nascimento que sempre me resguardou e apoiou de todas as maneiras para que eu pudesse ter os melhores aproveitamentos nos estudos e na vida.

À minha mãe Nelma Lucila Marques por ter sido sempre uma guerreira e mesmo diante dificuldades não medir esforços para me oferecer as melhores experiências e oportunidades.

Ao meu pai Marcus Guilherme Pires da Costa por ter me apoiado nos estudos e ensinado a valorizar o processo das conquistas.

À minha amada Ana Clara Souza Cardoso por ter me apoiado e por ter me oferecido momentos inesquecíveis que me deram forças para continuar em busca de melhores oportunidades.

Aos meus animais de estimação Betina, Rita e Hanna por terem me oferecido momentos de felicidade que facilitaram na caminhada.

Aos meus familiares por terem me apoiado durante a caminhada.

A todos meus amigos pelo incentivo, apoio e auxílio durante a graduação.

A todos meus colegas do curso de Farmácia que me auxiliaram de alguma forma durante a graduação.

À Associação Atlética Acadêmica Jaldo de Souza Santos – Overdose por ter contribuído no desenvolvimento de habilidades como pessoa e por toda diversão durante o curso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza por todo conhecimento repassado, por toda paciência e respeito durante nossa caminhada na área da pesquisa durante a graduação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Realino de Paula por participar e orientar durante toda pesquisa científica realizada.

Ao Prof. Dr Heleno Dias Ferreira pelo auxílio na análise morfoanatômica e correção do trabalho

Ao Fernando Yano Abrao e à Camila Aline Romano que contribuíram na extração dos óleos essenciais, na análise dos espectros e na realização dos testes da atividade larvicida.

Ao Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges que contribuiu com a análise estatística deste trabalho.

Ao Matheus Gabriel de Oliveira que auxiliou nos experimentos de análise físico-química.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha por ceder o CG-EM do Núcleo de Ensino e Pesquisa Tóxico-Farmacológicas (NEPET) que contribuiu para realização do projeto de pesquisa.

Ao Jerônimo R. Oliveira Neto que auxiliou nos experimentos com CG-EM.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo aporte financeiro durante a pesquisa.

À Faculdade de Farmácia e todo corpo de docentes e técnicos que contribuíram com minha formação profissional.

À Universidade Federal de Goiás e todos seus colaboradores pela excelência em serviço.

E por fim, agradeço, a todos que ajudaram e apoiaram de forma direta ou indireta na minha formação profissional.

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho realizar o estudo morfoanatômico, a caracterização físico-química e determinar a composição química, variabilidade sazonal e larvicida dos óleos essenciais obtido nas folhas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. O material botânico foi coletado em Hidrolândia, Goiás. A caracterização morfonanatômica e a triagem fitoquímica foram realizadas por métodos convencionais. Amostras pulverizadas foram submetidos a hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a identificação dos componentes químicos dos óleos voláteis obtidos foi por CG-EM. A atividade larvicida foi realizada com larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio. A lâmina foliar, a nervura principal e o caule jovem apresentam epiderme uniestratificada revestida por cutícula. O mesofilo e o parênquima cortical da nervura principal e caule jovem apresentam cavidades secretoras e idioblastos com cristais. A nervura principal contém feixe bicolateral em arco aberto. O caule jovem, possui uma faixa esclerenquimática descontínua externa ao floema. Os compostos majoritários dos óleos essenciais foram o espatulenol, óxido de cariofileno, α -macrocarpeno e z-cariofileno. Na triagem fitoquímica foram detectados taninos, esteróides/triterpenos, flavonoides e fenóis totais. O teor de compostos voláteis foi de 7,36%, o de cinzas totais foi de 1,77% e o índice de intumescência foi de 3,52 ml. O óleo volátil na concentração utilizada foi inativo frente às larvas de *Ae. aegypti*. O presente estudo contribuiu para o conhecimento taxonômico da espécie e fornece parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Esse trabalho representa a primeira descrição dos compostos químicos e variabilidade sazonal dos óleos voláteis das folhas de *C. pubecens* coletadas em Goiás.

Palavras chaves: Anatomia vegetal; Cerrado; Óleo essencial; Plantas medicinais; Atividade larvicida.

ABSTRACT

The aim of this study was to perform from the morpho-anatomical study, physicochemical characterization, chemical composition, seasonal variability and larvicidal activity of the volatile oils of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg leaves. The botanical material was collected in Hidrolândia, Goiás. Morpho-anatomical characterization and phytochemical screening were performed by conventional methods. Pulverized samples were submitted to hydrodistillation in the Clevenger apparatus and the identification of the chemical components of the volatile oils obtained was done by GC-MS. The larvicidal activity was carried out with third-stage larvae of the *Aedes aegypti*. The leaf blade, the main vein, and the young stem have a uni-stratified epidermis covered by a cuticle. The mesophyll and cortical parenchyma of the main vein and young stem have secretory cavities and idioblasts with crystals. The main rib contains a bicollateral bundle in an open arch. The young stem has a discontinuous band of sclerenchyma external to the phloem cells. Most volatile oil compounds are spathulenol, caryophyllene oxide, α -macrocarpene, and z-caryophyllene. In phytochemical analysis, tannins, digitalis, flavonoids, and total phenols were detected. The content of volatile compounds was 7.36%, that of total ash was 1.77%, and that of mucilage was 3.52 ml. The volatile oil at the concentration used was inactive against *Ae aegypti* larvae. The present study contributes to the taxonomic knowledge of the species and provides parameters for quality control of the plant raw material. This work represents the first description of the chemical compounds and seasonal variability of volatile oils from *C. pubescens* leaves collected in Goiás state.

Keywords: Plant anatomy; Cerrado; Essential oil; Medicinal plants; Larvicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Campomanesia pubescens</i> . A - Aspecto geral da planta; B - Detalhe das flores	29
Figura 2. A, C, D - Corte transversal da internervura das folhas da <i>C. pubescens</i> (Azul Alcian/ Safranina). B – Secção paradérmica da lâmina da folha mostrando estômatos anomocíticos (<i>Steinmetz</i>). Tr – Tricomas. Ep – Epiderme. Es – Estômatos. CP – Cristal Poliédrico Ca – Cavidade Secretora	30
Figura 3. A, B, C - Secções transversais da nervura central das folhas da <i>C. Pubescens</i> A – Visão geral. B - Detalhe do parênquima cortical e do feixe vascular: faixa de esclerênquima, floema e xilema. CP – Cristal poliédrico. CD - Cristal tipo drusa. Ca – Cavidade secretora. ES - Esclerênquima.....	31
Figura 4. A, B, C, D, E – Secção transversal do pecíolo das folhas <i>C. pubescens</i> . A . Visão geral. B – Detalhe do parênquima cortical com cristal tipo drusa C – Detalhe do cristal poliédrico. D – Cavidade secretora no parênquima cortical e visão geral do feixe vascular. CD - Cristal tipo drusa. CP – Cristal Poliédrico. Ca – Cavidade Secretora (Azul alcian/ Safranina)	32
Figura 5. Secção transversal do caule jovem da <i>C. pubescens</i> . A – Visão geral. B – Detalhe da cavidade secretora no parênquima cortical. C – Detalhe do cristal tipo drusa e do cristal poliédrico. D – Detalhe do feixe vascular. CD - Cristal tipo drusa. CP – Cristal Poliédrico. Ep – Epiderme. Fe – Feixe esclerêquimático (Azul alcian/ Safranina)	32
Figura 6. Dendograma de similaridade baseado na distância euclidiana em relação ao período de coleta foliar de <i>C. pubescens</i> . A partir da análise do PCA, foi possível formar três agrupamentos referentes aos compostos presentes nos óleos voláteis.....	36
Figura 7. Gráfico de dispersão de PCA dos óleos essenciais das folhas de amostras de <i>C. pubescens</i> coletadas em hidrolândia. A - Eixos referentes às pontuações das amostras. B – Eixos referentes as pontuações de produtos químicos voláteis cujos constituintes discriminantes são representados por vetores	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise climática durante o período de coleta da <i>C. pubescens</i> . Pesquisa: INMET (Estação Goiânia – OMM: 83423), 2020.....	33
Tabela 2 - Porcentagem dos constituintes químicos dos óleos voláteis das folhas de <i>C. pubescens</i> coletados em Hidrolândia, Goiás.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. METODOLOGIA	19
3.1. Material vegetal.....	19
3.2. Caracterização macroscópica.....	19
3.3. Estudo anatômico	19
3.4. Obtenção da droga vegetal	19
3.5. Triagem fitoquímica.....	20
3.6. Teor de voláteis.....	20
3.7. Teor de cinzas totais.....	20
3.8. Índice de intumescência	20
3.9. Extração, obtenção e análise do óleo essencial	20
3.10. Atividade Larvícida	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
5. RESULTADOS - ARTIGO	27
6. CONCLUSÃO GERAL.....	55
APÊNDICE I – Participação do autor em outros trabalhos.....	56

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro, com uma área de 2.036.448 km² que abrange estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo, Distrito Federal, Amapá, Roraima, Amazonas e em porcentagens menores (cerca de 1%) na Bolívia e no Paraguai. Nele concentra-se nascentes que compõe as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, destacando sua importância hidrográfica (BRASIL, 2014).

É conhecido por sua biodiversidade, com cerca de 12.000 espécies de plantas nativas já catalogadas, dentre estas 34,9% são endêmicas. Contém cerca de 13,4% das espécies neotropicais e 1,5% das espécies mundiais. O Cerrado abriga mais de 250 espécies de mamíferos, 850 espécies de aves, 800 espécies de peixes, 260 espécies de répteis e 200 espécies de anfíbios (MITTERMEIER, 2004).

Apresenta mais de 10 tipos de frutos comestíveis, que geram comércio na população local e vendidos em centros urbanos, tais como pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), cacupari (*Salacia crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* A. St.-Hil.), araticum (*Annona crassifolia* Mart.) e as sementes do barú (*Dipteryx alata* Vogel) (BRASIL, 2014).

Cerca de 220 espécies vegetais têm uso medicinal de grande valor para os povos nativos no cuidado da saúde familiar e nos atendimentos de saúde. São conhecidos por raizeiros, raizeiras, benzedores, benzedadeiras, parteiras, parteiros, entre outras denominações o indivíduo local que é responsável por identificar e coletar partes da planta medicinal para preparar e indicar medicamentos (BRASIL, 2014; EVANGELISTA, LAUREANO, 2007).

A grande variedade de plantas medicinais no Cerrado se dá devido as características morfológicas das plantas, por exemplo, os xilopódios que são reservatórios de água que produzem substâncias farmacologicamente ativas. Também apresenta grande diversidade taxonômica, com grande distanciamento filogenético entre as espécies o que permite grande diversidade química (FARNSWORTH, 1988). Muitas espécies medicinais do Cerrado já possuem estudos científicos, com possibilidades de avanço em tratamentos de saúde para cura e alívio de enfermidades. No entanto, deve ser ressaltado a importância da medicina tradicional dos povos primitivos que permitem a observação, a experimentação utilizada para busca da saúde e religião (RAMOS et al., 2019).

Contudo, conforme o estudo de Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – IDS, até 2008, o desmatamento no Cerrado já havia comprometido cerca de 50% de sua área, superando a destruição dos demais biomas. Cerca de 131 espécie da flora e 99 da fauna estavam ameaçadas de extinção. Devido as alterações humanas com o intuito de abertura de novas áreas para expansão da fronteira agrícola observa-se um esgotamento dos recursos naturais da área. De acordo com o Mapbiomas, entre 1985 e 2020, o Cerrado apresentou perda de 19,8% de sua vegetação nativa e houve um crescimento de 5,6x da área de agricultura. 45,6% das paisagens que compõem seus 2 milhões de km² – campos, savanas e florestas - foram desmatadas e antropizadas, sendo 265 mil km² substituídos por monoculturas e pastagens, além disso, os 54,4 % restantes estão sofrendo constantes ataques e degradação.

O bioma apresenta extensa diversidade e grande parte ainda desconhecida, considerada a savana mais rica do mundo com possibilidades de fornecer novos princípios ativos para medicamentos, cosméticos e alimentação. O Cerrado é considerado um hotspots e estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não estão presentes em áreas protegidas (BRASIL, 2014; MYERS et al., 2000).

Desde março de 2020, após a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretar a pandemia da COVID-19, ocasionada pelo vírus SARS-Cov2, as demais doenças infecciosas foram ofuscadas. Segundo a OMS, em 2020, 219 milhões de pessoas foram afetadas pela malária e cerca de 2,7 milhões de pessoas foram diagnosticadas com dengue. Destes casos da dengue, 36,5% foram no Brasil e metade ocorreu na região Centro-Oeste (BRASIL, 2021).

O mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue, chikungunya e zika, tem origem africana. O desenvolvimento desse vetor é acelerado em locais com baixa infraestrutura em saneamento básico e em condições precárias (BRASIL, 2021). O cenário atual de destruição do cerrado e perda da vegetação nativa acarreta diversos problemas à população, como o aumento do número de infecções por vírus de vetores. O desmatamento afeta de forma direta as relações ecológicas do bioma (ROSA, 2013; NAVA et al., 2017), de forma que diminui os predadores de mosquitos devido à falta de habitat e promove melhores condições ambientais para o desenvolvimento de vetores (por exemplo, aumento da temperatura e disponibilidade de alimentos). Portanto, de forma indireta, causa danos à saúde pública (HSIANG et al., 2020; MILINOVICH et al., 2014).

A dengue é uma doença infecciosa aguda benigna ou grave de fácil transmissão pela picada de mosquitos infectados (fêmea). Considerada um problema de saúde pública devido à alta taxa de incidência e letalidade (BRASIL, 2021). Entre 2001 e 2019, foram relatados

7.950.624 casos de dengue no cerrado brasileiro e 281.833.32 km² de áreas nativas desmatadas. Segundo o estudo de Pereira et al. (2014), é possível observar a correlação entre a incidência de casos de dengue e o desmatamento. Por exemplo, no estudo, os estados formaram alguns grupos de acordo com suas características diante aos fatores analisados, Goiás e Mato Grosso do Sul se destacaram por apresentar alta incidência de casos de dengue e alta taxa de destruição da área nativa. Bahia e o Maranhão formaram outro grupo com menor taxa de casos e desmatamento moderado.

Na ausência de cobertura vacinal, para o controle destas arboviroses destaca-se o uso de larvicidas e inseticidas, principalmente nos períodos endêmicos (CARVALO et al., 2017; AL-MUHANDIS et al., 2011). Em 2002, o governo instituiu o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que propôs formas de combate as arboviroses enfatizando a importância da adesão social e incentivar as pessoas no controle da criação de possíveis criadouros (BRASIL, 2002). Além de técnicas físicas e químicas, estratégias genéticas também têm sido utilizadas, como por exemplo a infecção do *Ae. aegypti* com a bactéria *wolbachia*, que permite uma incompatibilidade no mosquito, capaz de interromper a cadeia de transmissão de doenças, como a dengue (BATISTA et al., 2017).

A resistência aos inseticidas é uma das principais ameaças ao controle de insetos. No Brasil, o Ministério da Saúde utiliza apenas inseticidas recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). São utilizadas quatro classes, todas neurotóxicas: organofosforados, carbamatos, piretróides e organoclorados. Mais recente foi aceito o uso das espinosinas. Com o intuito de diminuir a resistência dos mosquitos, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti*, indica o uso de larvicidas em conjunto com inseticidas, ambos de classes distintas (VALLE et al., 2015).

Como alternativa de controle químico, têm se realizado estudos com alguns produtos naturais, como óleos essenciais de plantas, para utilização como larvicidas. A presença de determinados grupamentos químicos nestes óleos essenciais pode aumentar ou diminuir a atividade larvicida (SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2011; PEREIRA et al., 2014). Existe grande interesse em estudos com o intuito de produzir larvicidas eficazes e seguros para os humanos e para o ambiente. Segundo Santos et al. (2011), no seu estudo, 21 compostos apresentaram boa atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, e os mais lipofílicos apresentaram maior potência. Vale salientar que além do efeito larvicida, estes compostos mostraram um efeito residual prolongado nos depósitos onde são aplicados.

No Cerrado, as famílias mais representadas são Leguminosae (POLHILL et al., 1981), Asteraceae (Compositae), Orchidaceae, Poaceae (Gramineae), Melastomataceae,

Eriocaulaceae, Rubiaceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae e Lamiaceae que compreendem 5,84% do total das famílias no Cerrado, mas que tem representatividade de 49,14% das espécies encontradas (MACHADO et al., 2008). No Brasil, Myrtaceae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997) compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos distribuído pelos continentes, exceto Antártica, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais (BARROSO, 1984; MARCHIORI; SOBRAL, 1997). No Cerrado, são encontrados 21 gêneros e cerca de 344 espécies (MACHADO et al., 2008).

As espécies de Myrtaceae apresentam características como folhas simples, com glândulas oleíferas, flores polistêmones com ovário mediano a ínfero (CONTI et al., 1997). As estruturas secretoras de óleos essenciais presentes nas partes vegetativas e reprodutivas das plantas são uma característica desta família (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984; PADOVAN et al., 2014). Os óleos essenciais são complexos em sua composição, apresentando geralmente monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Muitas funções orgânicas são exercidas por estes compostos como fenóis, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pelas diversas finalidades do uso dos óleos essenciais (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002).

O gênero *Campomanesia* é um dos mais importantes e bem definidos da família, com árvores e arbustos distribuídos da Argentina à Trindade, da costa do Brasil aos Andes no Peru, Ecuador e Colômbia (LANDRUM, 1982; LANDRUM, 1896). Segundo Berg (1855-1856, 1857-1859) *apud* Landrum (1986), *Campomanesia* apresenta ovário multilocular, com cerca de 4 a 11 lóculo multiovulares e os óvulos presos no interior do lóculo em duas fileiras com sementes de modo circular. A testa das sementes é membranácea glandular-verrugosa. Estudos demonstram que *Campomanesia* apresenta em maior quantidade monoterpenos e sesquiterpenos nos óleos essenciais de flores, frutos além de chalcona, flavonóides nas folhas (OLIVEIRA et al., 2016).

A *Campomanesia pubescens*, conhecida popularmente como gabirobeira, guabiroba, guabiroba-do-campo ou guavira é considerada um arbusto que apresenta de 60 a 80 cm de altura, normalmente observado em arbustos, com frutificação predominante nos meses de setembro a outubro, as flores são brancas e os frutos são verdes globosos, pequenas sementes e a polpa amarelada quando madura, com sabor adocicado (SILVA et al., 2009). Já o óleo da semente da *C. pubescens* é rico em compostos fenólicos que são importantes na redução oxidativa dos lipídios presentes no tecido vegetal. Estes compostos sequestram radicais livres, os quais são responsáveis por retardar o envelhecimento celular (ULIANA, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Realizar estudo morfoanatômico, variabilidade sazonal e atividade larvica dos óleos voláteis das folhas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Myrtaceae).

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar o estudo morfológico visando à identificação botânica;
- ✓ Realizar triagem fitoquímica do pó das folhas;
- ✓ Avaliar os teores de voláteis e cinzas totais das folhas;
- ✓ Extrair e caracterizar quimicamente os óleos voláteis das folhas e avaliar a variabilidade sazonal dos compostos químicos.
- ✓ Avaliar a atividade larvica dos óleos voláteis das folhas contra larvas de *Aedes aegypti*.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Folhas de *C. pubescens* da região do Cerrado foram coletadas mensalmente por 12 meses em Hidrolândia, Goiás, Brasil (786 m de altitude, 16°53'59"S e 49°13'29"W) entre os meses de agosto de 2018 até julho de 2019. O Prof. Dr. José Realino de Paula fez a identificação botânica e uma exsicata foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Goiás (n. 67844).

3.2. Caracterização macroscópica

A identificação, as descrições morfológicas e fenológicas de *C. pubescens* foram feitas à vista desarmada, mensalmente durante 12 meses, *in loco*, utilizando o microscópio estereoscópico Olympus SZ-ST e bibliografias especializadas (GENTRY, 1992, LORENZI et al., 2003, MARTIUS, 1897).

3.3. Estudo anatômico

Para o estudo anatômico, as folhas foram fixadas em FPA 70% (formaldeído, ácido propiônico e etanol 70% 1:1:18 V/V) por 48 horas e conservadas em etanol 70%. Foram realizados cortes paradérmicos do limbo foliar (terço médio da região intercostal), cortes transversais do limbo foliar (margem foliar, terzo médio da região intercostal e nervura principal); pecíolo (região mediana) e ramos caulinares jovens (segundo entrenó), corados com Alcian blue/safranina 9:1 (Kraus & Arduin, 1997) e Steinmetz (COSTA, 2001). O registro fotográfico das estruturas anatômicas foi realizado em fotomicroscópio (Zeiss-Axiostar plus) com câmera digital acoplada (Canon Power Shot G10) utilizando o software Axion Vision 4.8.

3.4. Obtenção da droga vegetal

As folhas coletadas foram secas em estufa de circulação a 40°C por 48 horas e pulverizadas em triturador comercial com copo monobloco inox LS-08MB-N (Skymssen Metalúrgicas Siemens LTDA, Brasil). O pó obtido foi destinado para a triagem fitoquímica, teor de voláteis, teores de cinzas totais e insolúveis.

3.5. Triagem fitoquímica

Na triagem fitoquímica, foram investigados antraquinonas (formação de fenatos de amônio), cumarinas (hidrólise alcalina e observação em luz ultravioleta), esteróides e triterpenos (reações de Liebermann-Burchard e Salkowski); heterosídeos digitálicos (reações

de Liebermann-Burchard, Kedde e Keller-Kiliani); amido (lugol); alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand, reagentes de Hager, ácido tânico a 1%); heterosídeos flavonóides (reação de Shinoda; oxálico-bórico; com concentrado de H₂SO₄; com hidróxido alcalino; cloreto de alumínio e cloreto férrico); saponinas (índice de espuma); taninos (reações com gelatina, sulfato de quinino 1%, acetato de cobre 4%, cloreto férrico 2% e hidróxido de sódio 20%) e metilxantinas (reação murexida) (COSTA, 2001; CUNHA, 2005).

3.6. Teor de voláteis

A determinação do teor de compostos voláteis foi realizada em um analisador de umidade que produz radiação na região do infravermelho utilizando uma lâmpada de halogênio (Ohaus modelo MB35) (BRASIL, 2010). Para isso, pesou-se 1 g do fármaco vegetal em pó, distribuiu-se o material uniformemente sobre a placa da balança e aqueceu-se a cuba até peso constante. Após iniciar o processo, o teor de voláteis foi mostrado no display digital do aparelho em aproximadamente 10 minutos. O experimento foi realizado em triplicata, calculando-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (BRASIL, 2010).

3.7. Teor de cinzas totais

Para determinação de teor de cinzas totais foi pesado exatamente 3g de amostra previamente pulverizada e transferida para um cadinho previamente calcinado. A amostra foi incinerada aumentando gradualmente a temperatura: 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C. Foi resfriado em dessecador e pesado. O experimento foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010).

3.8. Índice de intumescimento

Para determinar o índice de intumescimento, pesou-se 1 g do pó das folhas e transferiu-se para um béquer de 25 ml, mediu-se o volume do pó no béquer e adicionou-se 25 ml de água. O béquer foi tampado com uma cobertura de solo e agitado a cada 10 minutos por 1 hora. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 3 horas à temperatura ambiente. Ao final, foi medido o volume de material vegetal mais mucilagem. O experimento foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010).

3.9. Extração, obtenção e análise do óleo essencial

Para análise dos óleos voláteis, foram coletadas folhas de dois espécimes diferentes da *C. pubescens* mensalmente, secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 horas,

trituras imediatamente antes da extração do óleo volátil. 90g do pó foram submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 2 h. Após a secagem com Na₂SO₄ anidro, os óleos foram armazenados em frascos de vidro a uma temperatura de -18°C até posterior análise. Cada experimento foi realizado em triplicata. A composição dos óleos voláteis das folhas foi analisada usando uma coluna cromatográfica Shimadzu GC/MS-QP2010A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm I.D.; 0,25 µm de espessura de filme) (composta por 5% de fenilmetil polisiloxano). O seguinte programa de temperatura foi usado: a temperatura foi aumentada de 60-240°C a uma taxa de 3°C/min e depois para 280°C a uma taxa de 10°C/min, terminando com 10 min a 280°C. O gás de arraste (hélio) apresentou vazão de 1 mL/min, e o modo split teve proporção de 1:20. A porta de injeção foi ajustada para 225°C. Os parâmetros operacionais para o espectrômetro de massa quadrupolo foram os seguintes: a temperatura da interface foi ajustada para 240 °C e a ionização por impacto de elétrons para 70 eV, com uma faixa de massa de varredura de 40-350 m/z a uma taxa de amostragem de 1 varredura/ s. Os componentes foram identificados por comparação dos índices de retenção dos componentes com os dos n-alcanos C9–C28 e comparação dos espectros de massa com dados da literatura (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

A análise de componentes principais (ACP) foi usada para avaliar as possíveis inter-relações entre os compostos encontrados em óleos voláteis de folhas coletados em diferentes meses ao longo de 1 ano usando o software Statistica 7 (Statsoft Inc., Tulsa). A análise de agrupamento foi aplicada para estudar a similaridade das amostras com base na distribuição dos constituintes, e o agrupamento hierárquico foi realizado de acordo com o método de variância mínima de Ward (WARD, 1963). A análise discriminante canônica (ADC) foi empregada para detectar o padrão de distribuição das amostras e identificar os componentes que diferiam entre os grupos.

3.10. Atividade larvícida

Para avaliar a atividade larvícida, o óleo volátil das folhas de *C. pubescens* coletadas em abril de 2020 foi preparado em diluições seriadas de 100-20 µg/ml. Vinte larvas de *Ae. aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento foram expostas a 25 mL da solução teste e os eventos de mortalidade foram quantificados após 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em câmara biológica com temperatura de 25°C ± 1°C, umidade relativa de 85% ± 5% e fotoperíodo de 12 h (SILVA et al., 2003; OMS, 2005). Água e surfactante foram os controles negativos e o controle positivo utilizado foi o temefós 0,012 µg/mL. Os resultados

foram analisados por meio de regressão não linear (PROBIT), Statistica 12.0. Os seguintes critérios foram usados para avaliar a atividade larvícida: concentração letal 50 (CL50) ≤ 50 $\mu\text{g/mL}$ foi considerada muito ativa, CL50 entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ativa e CL50 >100 $\mu\text{g/mL}$ inativa (SILVÉRIO et al., 2020).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-MUHANDIS, N.; HUNTER, PR. The value of educational messages embedded in a community-based approach to combat dengue fever: A Systematic review and meta regression analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, n. o, p. e1278, 2011.

BAPTISTA, G.. et al. Modelagem do *Aedes aegypti* utilizando a bactéria *Wolbachia* como agente de controle. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa Operacional, XLIX, 2017, Blumenau-SC, Brasil.

BARROSO, G.M. et al.; **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Ed. UFV, v.2, Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 51. Brasília; 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (Funasa). Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. PP Cerrado: Plano de Ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado, 2ª fase (2014-2015). Brasília, 2014.

CARRARA, M. R. **Espécies de *Campomanesia* Ruiz & Pavan (Myrtinae, Myrtaceae) ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro**. 222 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

CARVALHO, N.S. et al. Zika virus and pregnancy: An overview. **Am J Reprod Immunol**, v.77, p. 1-8, 2017.

Critical Ecosystem Partnership Fund. **Perfil do ecossistema: hotspot de biodiversidade do Cerrado**. Org. Sawyer, D. et al., Brasília, supernova, 2017.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CONTI, E. et al. Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. **Systematic Botany**, v.22, p. 629-647, 1997.

EVANGELISTA, J.; LAUREANO, L. Medicina popular e biodiversidade no Cerrado. **Revista Agriculturas**, v. 4, n. 4, p. 6-10, 2007.

FARNSWORTH, N.R. **Screening of Plants for New Medicines**. In: Wilson, E.O., Ed., Chapter 9 in Biodiversity. Washington DC: National Academy Press, 1988.

HSIANG S. et al. The effect of large-scale anti-contagion policies on the COVID-19 pandemic. **Nature**, v.584, p. 262–267, 2020.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p. 508-536, 1997.

LANDRUM, L. R. Flora Neotropica: *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). **The New York Botanical Garden Press**, v. 45, n. 4, p. 1–178, 1986.

LANDRUM, L. R. The Development of the Fruits and Seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**. v. 34, n. 2, p. 220–24, 1982.

MACHADO, R.B. et al. **Caracterização da fauna e flora do Cerrado**. In: Faleiro, F.G; Farias-Neto, A.L. (eds.) Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Brasília, Embrapa. p. 284-300, 2008.

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas in Myrtales**. Santa Maria, Editora da UFSM, 1997.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. V.2, Oxford: Claredon Press. 1950.

MILINOVICH, G.J.; WILLIAMS, G.M.; CLEMENTS, A.C.A; HU, W. Internet-based surveillance systems for monitoring emerging infectious diseases. **Lancet Infect. Dis.**, v.14, p. 160–168, 2014.

MITTERMEIER, R.A. et al. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington, D.C.:Cemex, 2004.

MYERS, N., MITTERMEIER, R., MITTERMEIER, C. et al. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. **Nature** 403, 853–858, 2000. <https://doi.org/10.1038/35002501>

NAVA A. et al. The impact of global environmental changes on infectious disease emergence with a focus on risks for Brazil. **ILAR J.** v. 58, p. 393–400, 2017.

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividade microbiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas 33 Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v.13, p.695-716, 2014.

PEREIRA, A.I.S. et al, Atividade antimicrobiana no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educ Química**. v.25, n.4, p. 446–449, 2014.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.237-243, 2002.

Projeto MapBiomias – Coleção 6 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil, acessado em 20 de julho de 2022 através do link: <http://mapbiomas.org>

RAMOS, E.C.; MONTEIRO, L.J.; ANTIQUEIRA, L.M.O.R. **Plantas Medicinais dos Campos Gerais: patrimônio natural, histórico e cultural da região**. 1 ed. Paraná: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

ROSA, I.M.D. et al. Predictive modelling of contagious deforestation in the Brazilian Amazon. **PLoS One**, v.8, | e77231, 2013.

SANTOS, S.R. et al. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.10, n.10, p. 1049–54, 2010.

SANTOS, S.R. et al. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150–3, 2011.

SILVA, A.A.P. et al. The fewer, the better fare: Can the loss of vegetation in the Cerrado drive the increase in dengue fever cases infection? **PLoS ONE**, v.17, n.1, 2022.

SILVA, E. D. et al., Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.803-809, 2009.

ULIANA, Cíntia. Extração e caracterização do óleo da semente de guabioba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) e avaliação da qualidade durante o armazenamento. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia, Universidade Federal da Fronteira Sul, 2017. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/3018>. acesso em: 3 ago. 2022.

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise; CUNHA, Rivaldo. **Dengue: Teorias e Práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015.

5- ARTIGO I

Artigo publicado na Research, Society and Development, v. 10, n.3, e35610313412, 2021
 | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13412A>

Morphoanatomical study, seasonal variation, and larvicidal activity of volatile oils from the leaves of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Myrtaceae)

Estudo morfoanatômico, variação sazonal e atividade larvica dos óleos voláteis das folhas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Myrtaceae)

Estudio morfoanatômico, variación estacional y actividad larvica de aceites volátiles de las hojas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Myrtaceae)

Received: 12/00/2020| Reviewed: 01/00/2021| Accept: 01/00/2021| Published:01/18/2021

Henrique Margues da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5035-5518>
 Universidade Federal de GoiásBrasil.
henriquemarques0611@gmail.com

Tatiana de Sousa Fiuza

. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0135-177X>
 Universidade Federal de Goiás, Brasil
tatianaanatomia@gmail.com

Heleno Dias Ferreira

. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7763-734X>
 Universidade Federal de Goiás, Brasil.
hdiasicb@gmail.com

Fernando Yano Abrao

. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0553-0946>
 Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. Facunicamps, Brasil.
yanobruce@gmail.com

Camila Aline Romano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-6368>
 Universidade Federal de Goiás, Brasil.
camilaalineromano@gmail.com

Leonardo Luiz Borges

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2183-3944>
 Universidade Estadual de Goiás e Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brasil.
leonardoquimica@gmail.com

José Realino de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4424-7692>
 Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil
pjrpaula@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to perform from the morpho-anatomical study, physicochemical characterization, chemical composition, seasonal variability and larvicidal activity of the volatile oils of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg leaves. The botanical material was collected in Hidrolândia, Goiás. Morpho-anatomical characterization and phytochemical screening were performed by conventional methods. Leaf powders were submitted to hydrodistillation in the Clevenger apparatus and the identification of the chemical components of the volatile oils obtained was done by GC-MS. The larvicidal activity was carried out with third-stage larvae of the *Aedes aegypti*. The leaf blade, the main vein, and the young stem have a uni-stratified epidermis covered by a cuticle. The mesophyll and cortical parenchyma of the main vein and young stem have secretory cavities and idioblasts with crystals. The main rib contains a bicollateral bundle in an open arch. The young stem has a discontinuous band of sclerenchyma external to the phloem cells. Most volatile oil compounds are spathulenol, caryophyllene oxide, α -macrocarpene, and α -caryophyllene. In phytochemical analysis, tannins, digitalis, flavonoids, and total phenols were detected. The content of volatile compounds was 7.36%, that of total ash was 1.77%, and that of mucilage was 3.52 ml. The volatile oil at the concentration used was inactive against *Ae. aegypti* larvae. The present study contributes to the taxonomic knowledge of the species and provides parameters for quality control of the plant raw material. This work represents the first description of the chemical compounds and seasonal variability of volatile oils from *C. pubescens* leaves collected in Goiás state.

Keywords: Plant anatomy; Cerrado; Essential oil; Medicinal plants; Larvicidal activity.

Resumo

Objetivou-se neste trabalho realizar o estudo morfoanatômico, a caracterização físico-química e determinar a composição química, variabilidade sazonal e larvídica dos óleos essenciais obtido nas folhas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. O material botânico foi coletado em Hidrolândia, Goiás. A caracterização morfoanatômica e a triagem fitoquímica foram realizadas por métodos convencionais. Os pós das folhas foram submetidos a hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a identificação dos componentes químicos dos óleos voláteis obtidos foi por CG-EM. A atividade larvídica foi realizada com larvas do terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti*. A lâmina foliar, a nervura principal e o caule jovem apresentam epiderme uniestratificada revestida por cutícula. O mesofilo e o parênquima

cortical da nervura principal e caule jovem apresentam cavidades secretoras e idioblastos com cristais. A nervura principal contem feixe bicolateral em arco aberto. O caule jovem, possui uma faixa esclerenquimática descontínua externa ao floema. Os compostos majoritários dos óleos essenciais foram o espatulenol, óxido carifileno, α -macrocarpeno e z-cariofileno. Na triagem fitoquímica foram detectados taninos, digitálicos, flavonoides e fenóis totais. O teor de compostos voláteis foi de 7,36%, o de cinzas totais foi de 1,77% e o de mucilagem foi de 3,52 ml. O óleo volátil na concentração utilizada foi inativo frente às larvas de *Ae. aegypti*. O presente estudo contribui para o conhecimento taxonômico da espécie e fornece parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Esse trabalho representa a primeira descrição dos compostos químicos e variabilidade sazonal dos óleos voláteis das folhas de *C. pubescens* coletadas em Goiás.

Palavras-Chave: Anatomia vegetal; Cerrado; Óleo essencial; Plantas medicinais; Atividade larvicida.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue realizar el estudio morfoanatômico, la caracterización físico-química y determinar la composición química, variabilidad estacional y larvicida de los aceites esenciales obtenidos en las hojas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. El material botánico fue recolectado en Hidrolândia, Goiás, la caracterización morfonanatômica y el cribado fitoquímico se realizaron por métodos convencionales. Los polvos foliares se sometieron a hidrodestilación en aparato Clevenger y la identificación de los componentes químicos de los aceites volátiles obtenidos fue por CG-EM. La actividad larvicida se realizó con larvas del tercer estadio del mosquito *Aedes aegypti*. El limbo de la hoja, el nervio principal y el tallo joven tienen una epidermis uniestratificada cubierta por cutícula. El mesófilo y el parénquima cortical de la vena principal y el tallo joven tienen cavidades secretoras e idioblastos con cristales. La costilla principal contiene un haz bicolateral en un arco abierto. El tallo joven tiene una banda esclerénquima discontinua externa al floema. Los compuestos principales de los aceites esenciales fueron espatulenol, óxido de carifileno, α -macrocarpeno y z-cariofileno. En el cribado fitoquímico se detectaron taninos, digitálicos, flavonoides y fenoles totales. El contenido de compuestos volátiles fue del 7,36%, el de cinzas totales fue del 1,77% y el de mucílagos fue de 3,52 ml. El aceite volátil en la concentración utilizada fue inactivo contra las larvas de *Ae. aegypti*. El presente estudio contribuye al conocimiento taxonómico de la especie y proporciona parámetros para

el control de calidad de la materia prima vegetal. Este trabajo representa la primera descripción de los compuestos químicos y la variabilidad estacional de los aceites volátiles de las hojas de *C. pubescens* recolectadas en Goiás.

Palabras clave: Anatomía vegetal; Cerrado, Aceite esencial; Plantas medicinales; Actividad larvícida.

1. Introduction

The Myrtaceae family contains 131 genera and 5,900 species. A total of 23 genera and about 1034 species are distributed in Brazilian regions such as Amazon, Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest, Pampa, and Pantanal (Sobral, et al., 2015).

The genus *Campomanesia* Ruiz & Pav. contains about 80 species (APG IV, 2016). About 31 species are presentes in the Brazilian territory (Sobral, et al., 2015). Five species occur in Goiás state, including *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, *Campomanesia eugenioides* (Cambess.) D. Legrand ex L. R. Landrum, *Campomanesia pabstiana* Mattos & D. Legrand, *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg, (Forzza, 2010). This genus is characterized by 4–18 locular ovary. Inflorescences are dichasium, unifloras, or racemes. The flowers have an open to fully closed calice, arranged in irregular lobes (Landrum, 1986; Landrum & Kawasaki 1997).

Campomanesia pubescens (DC.) O. Berg (Myrtaceae) is widely known as “gabirola” and is a shrub or sub-shrub with 0.5–1.5 m high. Due to its small size, it can be grown in association with other tree fruits, allowing greater production of food by area. Studies show that in the Cerrado in Goiás, the species blooms from September to November (Almeida, et al., 1998). The fruits have a sweet taste and can be consumed in nature or processed in the form of pulps, juices, ice cream, soft drinks, sweets, puddings, liqueurs, smoothies or tanned in cachaça (Sano & Almeida, 1998). *C. pubescens* are popularly employed to combat diseases of the urinary tract and diarrhea and have an astringent action (Rodrigues & Carvalho, 2001).

C. pubescens is an aromatic shrub, containing secretory cavities that produce volatile oil. Scientific studies have found ledol and globulol (Cardoso, et al., 2009) to be the major constituents of the volatile oils in the flowers of *C. pubescens* collected in Mato Grosso do Sul, from the fruits collected in the state of Minas Gerais, limonene, and eucalyptol, in eucalyptus branches, and spatulenol, in the roots bicyclogermacrene, and spatulenol and the leaves, bicyclogermacrene and 1,8 cineol (Chang, et al., 2011).

An *in vitro* study conducted with extracts and hexane fractions of the fruits of *C. pubescens*, found antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

auruginosa, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* (Cardoso et al., 2010). In another investigation by Guerrero, et al. (2010) demonstrated an increase in the number of monocytes in hematological tests in rats after administration of the hydroethanolic extract of *C. pubescens* leaves, suggesting an anti-inflammatory activity. There are no reports in the literature on the seasonal variability of volatile oil compounds or the biological activity of *C. pubescens* on *Aedes aegypti* larvae, but studies with other species of the Myrtaceae family, such as *Eucalyptus*, *Pepper*, *Psidium*, and *Syzygium*, have verified larvicidal action (Dias, et al., 2014).

The mosquito *Ae aegypti* is the vector of human arboviruses, it breeds in standing water (Consoli & Oliveira, 1994). The main preventive measure is the use of larvicides associated with the elimination of mosquito breeding sites (Zara, et al., 2016). These chemicals can be toxic to humans and other living organisms causing environmental problems (Amer & Mehlhorn, 2006; Oliveira, et al., 2016). Ecologically sustainable insecticides with lower toxicity and biodegradability are well accepted in this context, volatile oils being an important source (Isman, 2020; Viana, et al., 2018).

Due to the pharmacological potential, this work aimed to carry out the morphoanatomical study of *C. pubescens*, the quality control of plant raw material (phytochemical screening, content of volatile compounds, total ash, particle size and intumescence index), extract and analyze the chemical constituents of the volatile oils from the leaves, check the monthly variability of volatile oil compounds for a year and their larvicidal activity on third stage larvae of the *Aedes aegypti* mosquito.

2. Methodology

Leaves of *C. pubescens* from Cerrado region were collected for 12 months in Hidrolândia, Goiás, Brazil (786 m altitude, 16 ° 53 '59" S and 49 ° 13' 29" W). Prof. Dr. José Realino de Paula identified the specimen and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Federal University of Goiás (n. 67844).

Identification, morphological and phenological descriptions of *C. pubescens* were made with the naked eye, every month for 12 months, *in loco*, and using the stereoscopic microscope Olympus SZ-ST and specialized bibliographies (Gentry, 1992, Lorenzi, et al., 2003, Martius, 1897).

For the anatomical study, the leaves were fixed in 70% FPA (formaldehyde, propionic acid, and 70% ethanol 1: 1: 18 V / V) for 48 hours and preserved in 70% ethanol. Paradermic sections of the leaf blade (middle third of the inter rib region) were carried out, cross sections

of the leaf blade (leaf margin, middle third of the inter rib region and the main rib); petiole (median region) and young stem branches (second internode internode), stained with Alcian blue/safranin 9: 1 (Kraus & Arduin, 1997) and Steinmetz (Costa, 2001). Photographic recording of the anatomical structures was performed in a photomicroscope (Zeiss-Axiostar plus) with a coupled digital camera (Canon Power Shot G10) using the Axion Vision 4.8 software.

For analysis of volatile oils, leaves were collected from ten different individuals monthly, oven-dried with air circulation at 40 °C for 24 hours, triturated immediately before volatile oil extraction. 90g of the powder was submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 2 h. After drying with anhydrous Na₂SO₄, the oils were stored in glass vials at a temperature of -18 °C until further analysis. Each experiment was performed in triplicate. The composition of the volatile oils from leaves was analyzed using a Shimadzu GC/MS-QP2010A fitted with a fused silica SBP-5 (30 m × 0.25 mm I.D.; 0.25 µm film thickness) capillary column (composed of 5% phenylmethyl polysiloxane). The following temperature program was used: the temperature was raised from 60-240 °C at a rate of 3 °C/min and then to 280 °C at a rate of 10 °C/min, ending with 10 min at 280 °C. The carrier gas (helium) had a flow rate of 1 mL/min, and the split mode had a ratio of 1:20. The injection port was set at 225 °C. The operating parameters for the quadrupole mass spectrometer were as follows: the interface temperature was set to 240 °C and the electron impact ionization to 70 eV, with a scan mass range of 40-350 m/z at a sampling rate of 1 scan/s. The components were identified by comparison of the retention indices of the components to those of C₉–C₂₈ n-alkanes and comparison of the mass spectra with literature data (Van Den Dool & Kratz, 1963; Adams, 2007).

Principal component analysis (PCA) was used to evaluate the possible interrelationships between the compounds found in volatile leaf oils collected at different months throughout 1 year using Statistica 7 software (Statsoft Inc., Tulsa). Cluster analysis was applied to study the similarity of the samples based on the distribution of the constituents, and hierarchical grouping was performed according to Ward's minimum variance method (Ward, 1963). Canonical discriminant analysis (DCA) was employed to detect the pattern distribution of samples and to identify the components that differed between the groups.

The climatic data in this period were obtained from data from the National Institute of Meteorology (INMET, 2020).

For phytochemical studies, analysis of ash and moisture contents, the leaves were collected, placed in plastic bags, dried in an oven with air circulation at a temperature of 40°C, and later sprayed in a knife mill.

In phytochemical screening, anthraquinone heterosides (formation of ammonium phenates), coumarins (alkaline hydrolysis and observation in ultra-violet light), steroids and triterpenes (Liebermann-Burchard and Salkowski reactions) were investigated; digitalis heterosides (Liebermann-Burchard, Kedde and Keller-Kiliani reactions); starch (lugol); alkaloids (Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand, Hager reactants, 1% tannic acid); flavonoid heterosides (Shinoda reaction; oxalic-boric; with H₂SO₄ concentrate; with alkali hydroxide; aluminum chloride and ferric chloride); saponin heterosides (foam index); tannins (reactions with gelatin, quinine sulfate 1%, copper acetate 4%, ferric chloride 2% and sodium hydroxide 20%) and methylxanthines (murexide reaction) (Costa, 2001; Cunha, 2005).

The determination of the content of volatile compounds was carried out in a moisture analyzer that produces radiation in the infrared region by using a halogen lamp (Ohaus model MB35) (Brazil, 2010). For this, 1 g of the powdered vegetable drug was weighed, the material was evenly distributed on the scale plate and the bowl was heated to constant weight. After starting the process, the moisture content was shown on the device's digital display in approximately 10 minutes. The experiment was carried out in triplicate, the average, standard deviation, and variation coefficient were calculated.

To determine the swelling index, 1 g of the powdered drug was weighed and transferred to a 25 ml becker, the volume of the dry drug in the beaker was measured and 25 ml of water was added. The beaker was capped with a ground cover and stirred every 10 minutes for 1 hour. After stirring, the mixture was left to stand for 3 hours at room temperature. In the end, the volume of plant material plus mucilage was measured. The experiment was carried out in triplicate.

3 crucibles were calcined at 500 ° C for 60 minutes to determine the total ash content. of the pulverized vegetable drug (3 g) was weighed and transferred to the calcined and tared crucible. The sample was incinerated by gradually increasing the temperature: 30 minutes at 200 °C, 60 minutes at 400 °C, and 90 minutes at 600°C. It was cooled in a desiccator and weighed. The experiment was carried out in triplicate.

To evaluate the larvicidal activity, the volatile oil from *C. pubescens* leaves collected in April 2020 were prepared in serial dilutions 100-20 µg / ml. Twenty-third-instar *Ae. aegypti* larvae were exposed to 25 mL of the test solution and mortality events were quantified after 24 hours. All assays were performed in triplicate in a biological chamber with a temperature

of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity $85\% \pm 5\%$, and photoperiod of 12 h (Silva, et al., 2003; WHO, 2005). Water and surfactant were negative controls and the positive control used was the temephos 0,012 $\mu\text{g/mL}$. The results were analyzed using non-linear statistics (PROBIT), Statistica 12.0. The following criteria were used to assess larvicidal activity: lethal concentration 50 (LC_{50}) $\leq 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ is considered very active, LC_{50} between 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ active, and $\text{LC}_{50} > 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ inactive (Silvério, et al., 2020).

3. Results

3.1 Morphological study

C. pubescens (Figure 1 A and B) occurs in open Cerrado stony and sandy soil. Flowering occurs from September to October and fruiting from October to November.

Figure 1. *Campomanesia pubescens*. **A** - General aspect of the plant. **B**- Detail of flowers



It is a woody shrub, about 1.5 m tall in clump. Green and medium leaves, discolors (the adaxial face of the leaves has a darker tone compared to the abaxial face), full of trichomes on both sides, simple, crossed, and petiolate opposite. The leaf blade is elliptical, 5-7 cm x 1.5-2 cm with obtuse apex, obtuse base, entire margin, peninervous venation.

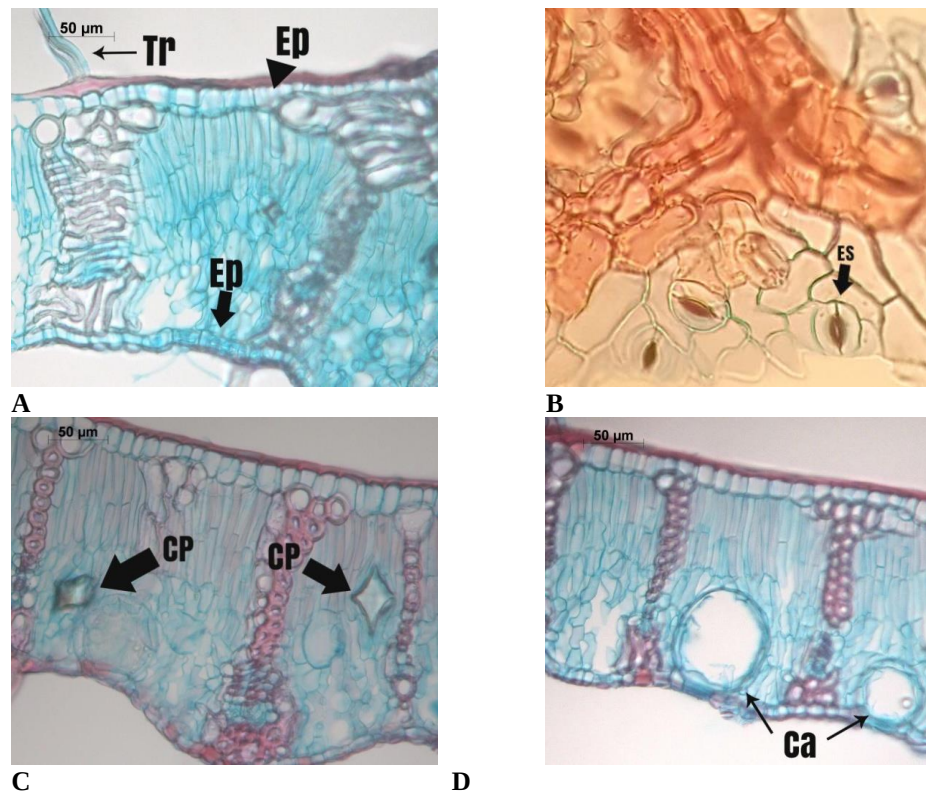
The flowers are androgynous, heteroclamidous, white, pedunculated, caryophyllus corolla with 5-petals, dialipetals and actinomorphic, androceu polistémone, of simple, free and white fillet. Spherical berry type fruit, becoming yellow when ripe.

3.2 Anatomic study

The leaf of *C. pubescens*, in cross section, shows uni-stratified epidermis with rectangular cells covered by cuticle, thick in the adaxial portion and thin in the abaxial portion. The epidermal cells of the adaxial face are more elongated vertically (Figure 2A - arrowhead) than those of the abaxial face (Figure 2A - thick arrow). Presence of non-branched, single-celled trichomes with the absence of a pedal cell (Figure 2A - thin arrow) on both sides of the leaf blade. Anomocytic stomata were found on the abaxial face (Figure 2B).

The mesophyll, in the transverse section, is dorsiventral, the palisade parenchyma has up to 3 layers of cells, and the lacunous parenchyma of 4 to 6 layers of cells, composed of cells of different shapes (Figure 2C). In the mesophyll, the presence of idioblasts with polyhedral crystals (Figure 2C) or druses and secretory cavities (Figure 2D) was observed. The leaf margin, in the cross-section, is rounded and covered by a cuticle.

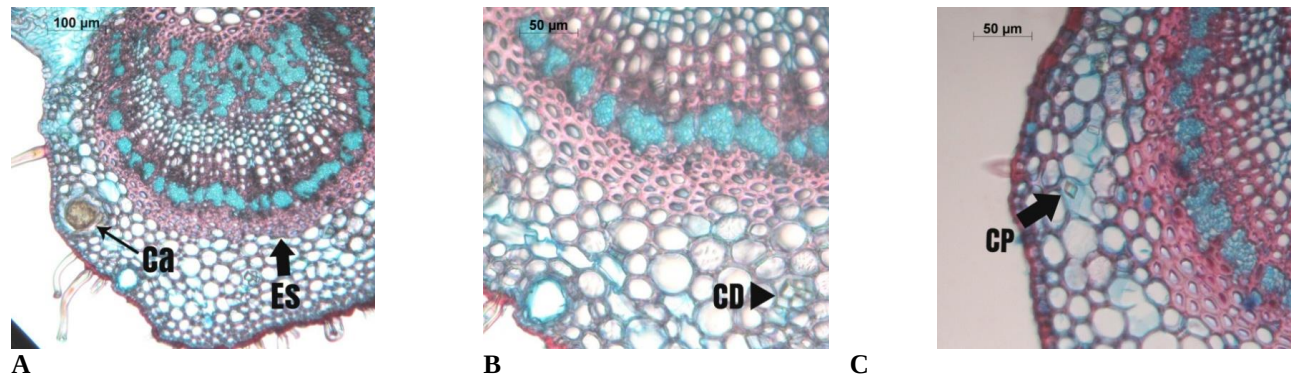
Figure 2. A-C-D- Cross-section of the inter-rib from *C. pubescens* leaves (Alcian blue/safranin). **B** - Paradermal section of the leaf blade showing anomocytic stomata (*Steimntz*). **Tr** - Trichomes. **Ep** - Epidermis. **Es** - Stomata. **CP** - Polyhedral crystal. **Ca** - Secretory cavity.



The midrib, in the cross-section, has a plane-convex to slightly biconvex outline (Figure 3A). The collenchyma, just below the epidermis, has 2-3 layers of cells, the cortical parenchyma has 5 to 8 layers of cells (Figure 3B), with the presence of idioblasts containing polyhedral crystals (Figure 3C) or drusas and secretory cavities dispersed in the cortical

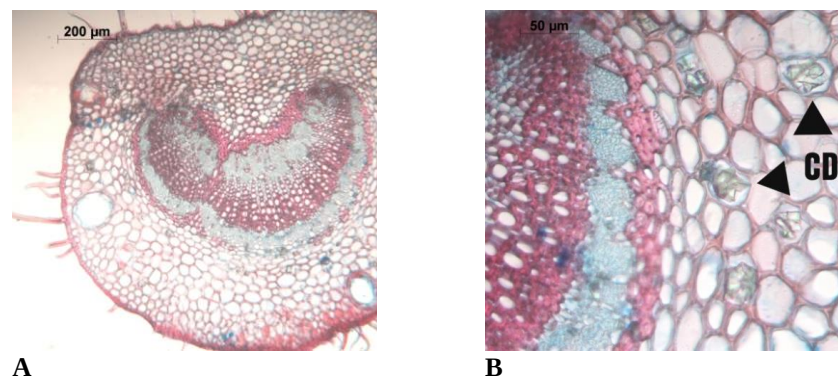
parenchyma. The vascular bundle is bicollateral with an open arch shape. A sclerenchyma band that emits projections up to the xylem surrounds the external phloem. The internal phloem has sclerenchyma cells dividing it into small sets of phloem cells.

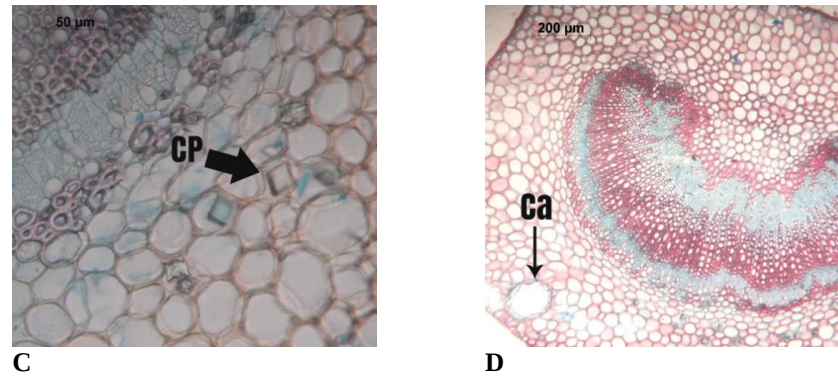
Figure 3– A, B, C - Cross-sections of the midrib from *C. pubescens* leaves. **A**- Overview. **B**- Detail of the cortical parenchyma and vascular bundle: sclerenchyma band, phloem and xylem. **CP** - Polyhedral crystal. **CD** - Drusa-shaped crystal. **Ca** - Secretory cavity. **ES** - Sclerenchyma.



The petiole, in the transverse section, has a plane-convex outline, delimited by an epidermal layer covered by a thick cuticle. It presents single-celled trichomes (Figure 4A). The cortical parenchyma has 10 to 12 layers of cells, with the occurrence of idioblasts containing drusa-type crystals (Figure 4B - arrowhead) or polyhedral crystals (Figure 4C - thick arrow) and secretory cavities (Figure 4D - thin arrow). The vascular bundle is bicollateral in the shape of an open arch and is surround by a 1 to 3 layers strip of sclerenchymatous cells.

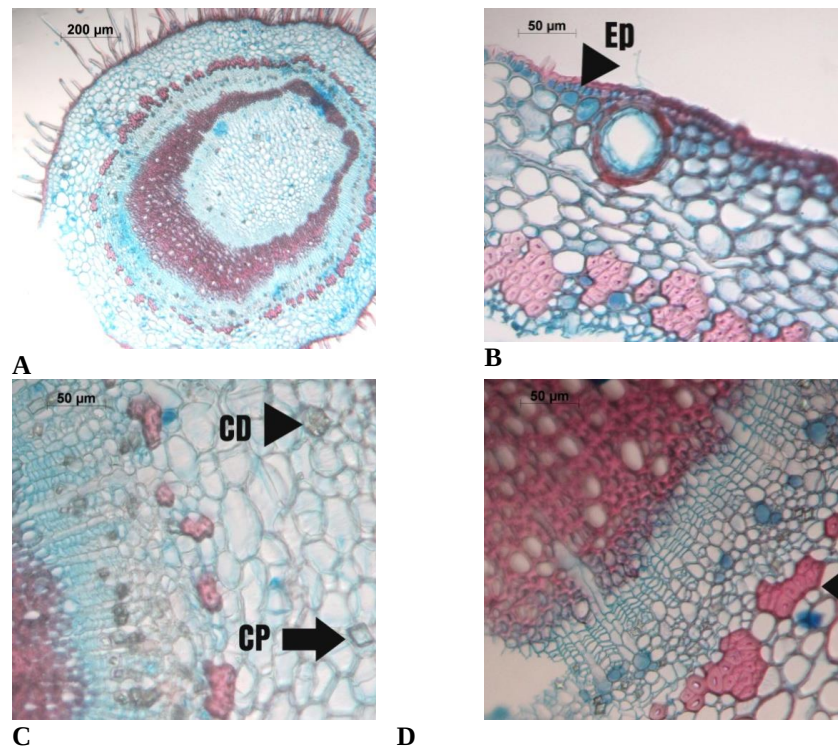
Figure 4 – A, B, C, D, E – Cross-sections of the petiole of *C. pubescens* leaves. **A**- Overview. **B**- Detail of the cortical parenchyma with drusa-shaped crystal. **C**- Detail of the Polyhedral crystal. **D**- Secretory cavity in the cortical parenchyma and overview of the vascular bundle. **CD** – Druze-shaped crystal. **CP** - Polyhedral crystal. **Ca** - Secretory cavity. (Alcian blue/safranin).





The young stem, in cross-section, with a cylindrical shape (Figure 5A), is delimited by a uni-stratified epidermis and covered by a thick cuticle (Figure 5B) and there are unicellular non-branched trichomes. The cortical parenchyma contains up to 10 layers of cells, presenting idioblasts with drusas (Figure 5C - arrowhead) or polyhedral crystals (Figure 5C - thick arrow) and secretory cavity (Figure 5B). A discontinuous sclerenchyma band, separated by parenchymal cells, externally to the phloem (Figure 5D) are observed. In the medullary parenchyma, there is the presence of scattered sclerenchyma cells

Figure 5 – Cross-section of *C. pubescens* young stem. **A**- Overview. **B**- Detail of the secretory cavity in the cortical parenchyma. **C**- Detail of the drusa-shaped crystal and polyhedral crystal. **D**- vascular bundle detail. **CD**– Druze-shaped crystal. **CP** - Polyhedral crystal. **Ep** – Epidermis. **Fe** – Sclerenchymatic band. (Alcian blue/safranin).



3.3 Volatile oil

During the leaf collection period, the months of greatest rainfall were October / 2018 (148.6 mm), November / 2018 (181.6 mm), December / 2018 (184.6 mm), February / 2019 (223.4 mm), March / 2019 (134.6 mm), April / 2019 (265.0 mm), and the temperature ranged from 17.2 to 36.7 °C. The months with the lowest rainfall were June / 2019 (0.0 mm), July / 2018 (0.0 mm), August / 2018 (34.4 mm), September / 2018 (38.0 mm), January / 2019 (62.3 mm) and May / 2019 (44.4 mm) and the temperature ranged from 8.6 to 37.4 °C (Table 1).

Table 1. Climatic analysis during the period of leaf collection of *C. pubescens*. Source: INMET (Goiânia Station - OMM: 83423), 2020.

Station	Date	Rain fall total	Maxim um temperature (°C)	Tempera ture minimum (°C)	Moist ure Relati ve
83423	07/31/2018	0	33.1	10.9	53.4
83423	08/31/2018	18.8	34.4	8.6	48.4
83423	09/30/2018	38.0	37.4	11.3	46.7
83423	10/31/2018	148.6	36.7	18.5	67.5
83423	11/30/2018	181.6	32.9	18.5	75.8
83423	12/31/2018	184.6	35.3	17.6	69.2
83423	01/31/2019	63.2	35.3	17.3	65.9
83423	02/28/2019	223.4	35.9	18.0	73.6
83423	03/31/2019	134.6	33.9	17.8	73.9
83423	04/30/2019	265.0	32.6	17.2	74.7
83423	05/31/2019	44.4	32.7	13.0	70.8
83423	06/30/2019	0	32.5	11.9	61.0

The yield of volatile oils ranged from 0.07 to 0.18%. The presence of oxygenated monoterpenes (0.1-0.6%), sesquiterpene hydrocarbons (8.4-79.9%), and oxygenated sesquiterpenes (17.0-86.0%) was found. The major compounds in volatile oils were spatulenol (ranging from 1.3 to 43.4%), caryophyllene oxide (ranging from 1.3 to 29.7%), α -macrocarpene (ranging from 2.2 to 22.4%), and z- caryophyllene (ranging from 1.8 to 19.5%) (Table 2).

Table 2. Percentage of volatile oil chemical compounds from *C. pubescens* leaves collected in Hidrolândia, Goiás.

	2018								2019					
	KI	IR	Aug	Set	Oct	Nov	Dez	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul
Linalool	1096	1099	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18	0.56	0.13	0.11
β -Elemene	1390	1371	1.7	1.5	0.6	-	1.1	2.5	2.1	1.0	1.7	0.9	2.9	2.9
z-Caryophyllene	1408	1399	9.4	3.3	1.8	2.8	6.1	8.8	7.2	19.5	6.0	3.7	11.7	11.0
α -Gurjunene	1409	1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1
β -Duprezianene	1422	1417	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
β -copaene	1432	1425	-	-	-	-	-	-	0.2	0.6	0.2	-	0.6	0.4
γ -Elemene	1436	1436	2.6	1.1	0.5	0.9	1.7	2.2	0.9	-	0.6	-	0.9	0.9
α -Guaiene	1439	1434	0.8	0.4	0.3	-	0.5	0.8	0.5	0.1	0.4	-	0.7	0.6
6,9-Guaiadiene	1444	1439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.2
α -Humulene	1454	1448	-	-	-	-	-	-	2.1	3.9	1.7	1.1	2.8	2.7
allo-Aromadendrene	1460	1460	0.6	0.3	-	-	-	-	0.7	0.2	0.6	0.4	1.1	1.2
cis-Cadina-1(6),4 diene	1463	1455	-	-	-	-	-	0.2	-	0.3	0.4	-	0.1	0.1
9-epi-(E)-Caryophyllene	1466	1461	-	-	1.8	1.1	1.4	0.5	-	-	-	-	-	-
β -Acoradiene	1470	1464	-	-	0.7	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-
α -Macrocarpene	1472	1474	-	13.7	2.2	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -Gurjunene	1477	1477	-	-	-	-	0.6	22.8	11.0	36.8	8.2	3.0	24.3	21.6
γ -Himachalene	1482	1481	-	-	-	-	-	0.4	-	-	0.1	-	0.2	0.1
D-Germacrene	1487	1485	-	-	-	-	-	1.0	-	0.3	-	-	0.4	0.3
β -Macrocrapene	1499	1493	13.5	0.3	-	-	7.3	21.1	14.0	12.1	11.5	5.1	21.0	20.5
γ -Amorphene	1495	1497	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-
α -Muurolene	1500	1496	-	-	-	-	0.3	-	0.4	0.8	0.3	-	0.8	0.6
Germacrene A	1509	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1
δ - Amorphene	1512	1503	1.7	2.4	0.6	1.1	1.4	3.0	-	0.2	0.1	-	0.4	0.3
10-epi Italicene ether	1516	1510	-	-	-	-	0.4	-	1.2	0.9	1.0	1.8	0.9	1.2
δ -cadinene	1523	1520	-	-	-	-	-	-	2.2	4.0	1.8	1.0	3.2	2.7
(E)-iso- γ Bisabolene	1529	1535	-	0.9			0.4	1.0	-	-	-	-	-	-
α -Cadinene	1538	1533	-	-	-	-	0.4	-	-	0.2	-	-	0.4	0.1
Germacrene B	1561	1551	0.8	0.7	-	-	0.9	-	0.8	-	0.5	-	2.2	1.3
Maaliol	1567	1567	-	-	-	-	-	-	0.5	0.1	0.5	-	1.3	0.5
Spathulenol	1578	1557	28.9	9.0	37.9	43.4	31.8	2.2	18.0	1.3	20.6	34.2	2.2	4.8

Caryophyllene oxide	1583	1561	13.7	11.1	29.7	27.5	15.0	1.4	13.3	3.4	17.2	24.6	4.2	5.2
Presilphiperfolan-8-ol	1586	1571	-	2.4	-	-	-	2.6	-	-	-	-	-	-
Thujopsan-2- α -ol	1587	1564	3.3	-	0.5	3.6	3.5							
Thujopsan-2- β -ol	1589	1572	3.3	2.4	-	1.0	1.7	1.6	1.5	0.6	1.4	0.6	1.3	1.3
Globulol	1590	1601	-	2.1	-	-		0.4	1.4	0.5	1.4	1.5	1.0	1.0
Viridroflorol	1592	1582	1.0	-	0.6	1.0	0.8	0.5	-	-	-	-	-	-
Carotol	1594	1604	-	0.6	-	-	0.4	0.7	-	-	-	-	-	-
Cubeban-11-ol	1595	1595	-	1.0	-	-	0.9	0.5	0.7	0.2	0.6	-	0.6	0.5
Rosifoliol	1600	1596	-	0.9	-	-	0.3	0.9	0.3	0.1	0.6	-	0.5	0.5
β -Atlantol	1608	1607	-	-	1.0	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-
Humulene epoxide II	1608	1587	2.4	1.5	4.7	4.5	2.9	-	1.7	0.3	2.2	3.5	0.4	0.6
1,10-di-epi-Cubenol	1619	1620	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-
10-epi- γ Eudesmol	1623	1620	-	-	-	-	-	-	0.3	-	0.4	-	0.3	0.3
Muurolo-4,10(1,4) dien-1- β -ol	1631	1624	-	2.3	-	-	-	-	1.6	-	1.4	1.9	-	0.9
Caryophylla-4(12), 8 (13)-dien-5- α -ol	1640	1639	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
epi- α -Muurolo	1642	1622	2.1	6.4	2.7	-	-	4.4	3.5	3.7	3.2	2.3	3.0	3.0
α -Muurolo	1646	1640	-	2.3	-	-	-	-	0.8	0.8	0.7	0.5	0.9	0.9
α -Cardinol	1654	1634	4.7	10.4	4.5	5.1	4.0	5.0	4.7	4.9	4.7	3.2	4.4	4.6
14-hydroxy-9-epi-(E)- Caryophyllene	1669	1666	-	0.6	-	-	-	-	0.9	-	0.3	-	0.0	0.3
epi-Zizanone	1670	1669	-	0.4	-	-	-	-	0.6	-	0.4	-	0.2	0.3
Mustakone	1676	1653	-	0.3	2.9	-	-	-	0.3	-	0.7	1.3	-	0.1
Khusinol	1680	1678	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.2
Germacre- 4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1686	1680	-	0.6	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	0.1
Shyobunol	1688	1684	-	0.4	-	-	-	0.2	-	0.2	0.3	-	0.2	0.3
Oxygenated monoterpenes			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	0.1	0.1
Sesquiterpenes	-	-	31.1	24.6	8.4	9.4	22.6	65.4	42.1	79.9	34.1	15.2	74.1	67.5
Oxygenated sesquiterpenes	-		59.4	55.0	85.1	86.0	63.4	20.3	51.3	17.0	58.0	75.6	21.6	26.4
Total identified (%)	-	-	90.4	79.6	93.5	95.3	86.0	85.7	93.4	96.8	92.3	91.3	95.8	94.0
Yield (%)	-	-	0.07	0.06	0.13	0.12	0.11	0.09	0.1	0.1	0.12	0.1	0.18	0.18

The results obtained from PCA and the cluster analysis showed the existence of chemical variability among volatile oils obtained from *C. pubescens* leaves (Figure 6). Figure 7 indicates that the relative position of the 2D axis originated in the PCA. This analysis suggests that cluster I (volatile leaf oils collected in (February, April, May, August, and December) is

characterized by the compound α -cadinol and α -macrocarpene. Cluster II (volatile oils from leaves collected in September, October, and November) is characterized by caryophyllene oxide and 9-epi (E) - caryophyllene. In addition, cluster III (leaves collected in January, March, June, July) contains γ -gurjunene, z- caryophyllene, δ -cadinene, and β -macrocarpene. The results indicate that the classification proposed by the PCA and HCA was adequate for the classification of the samples regarding the chemical profile of volatile oils.

Figure 6. Similarity dendrogram based on Euclidean distance concerning the leaf collection period of *C. pubescens*. From the PCA analysis, it was possible to form three clusters concerning the compounds present in volatile oils.

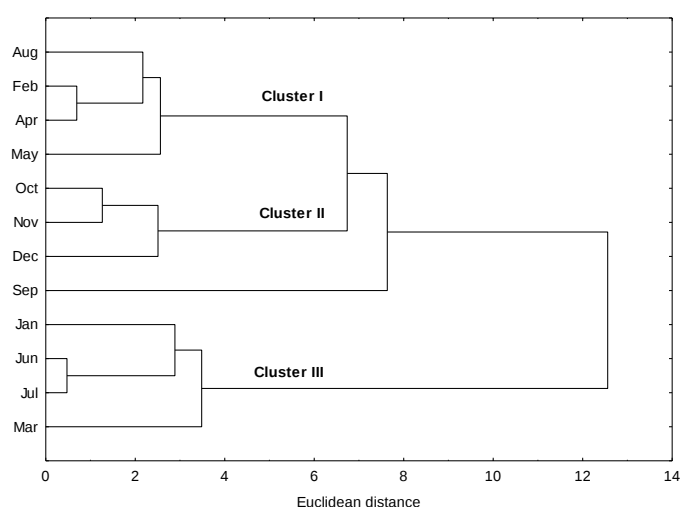
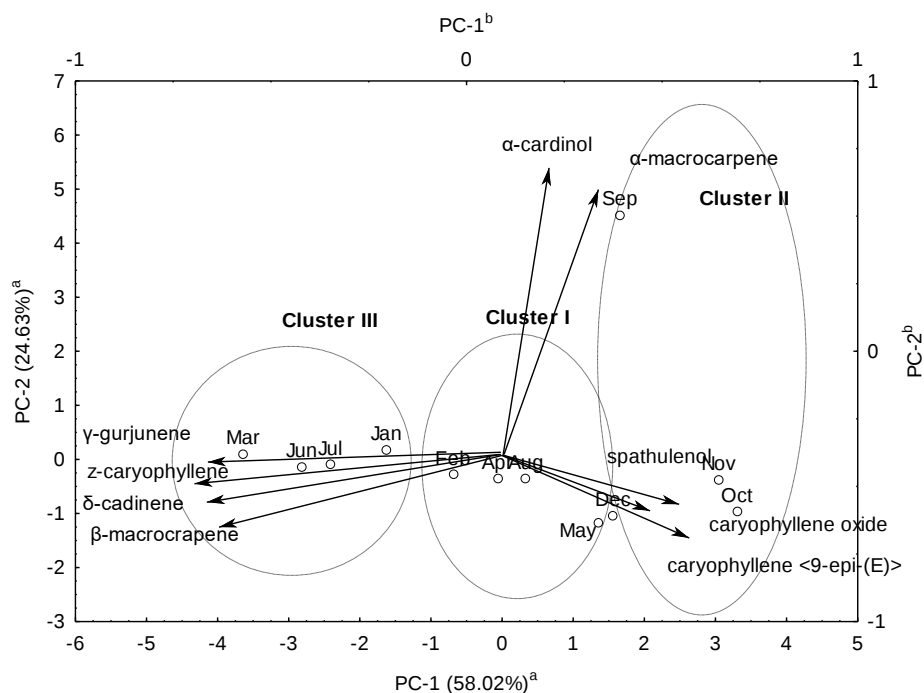


Figure 7. Scatterplot of PCA of the essential oils from the leaves of *C. pubescens* samples collected from Hidrolândia. A Axes referring to the scores of samples. B Axes referring to scores of volatile chemicals whose discriminant constituents are represented by vectors.



The canonical discriminant analysis was performed to assist in the validation of the classification proposed by the hierarchical cluster analysis ($p = 0.012$). The compounds selected to obtain the canonical discriminant analysis model were z-caryophyllene and γ -gurjunene. The level of correct classification indicated by the analysis of main components was 91.6%.

3.4. Phytochemical analysis

In phytochemical screening, the presence of tannins, steroids/triterpenes, flavonoids (0.84% content), saponins (foam index less than 100) and total phenols (1.42% content) were found. The content of volatile compounds was $7.36\% \pm 1.03$ and a variation coefficient of 14.07%. The total ash content was $1.77\% \pm 0.0004$. The mucilage content was 3.52 ml.

The powder of the leaves of *C. pubescens* presented, according to the Brazilian Pharmacopoeia (Brazil 2010), granulometry between 90 μm to 450 μm , with retention of 77.50% and 10.83% in the diameters of 450 μm (sieve 710) and 224 μm (sieve 355), respectively.

3.5. Determination of lethal concentration in *Aedes aegypti* larvae

The volatile oil of *C. pubescens* does not induce death in the larvae in twenty-four hours in any of the evaluated dilutions (100, 80, 60, 40, and 20 $\mu\text{g/mL}$).

4. Discussion

Campomanesia pubescens was observed with flowers from September to October and fruiting from October to November, which is in agreement with Silva, et al. (2009) who observed the peak of flowering and fruiting in September and October, respectively, of *C. pubescens* present in the south of Minas Gerais state. Another study conducted in Mato Grosso do Sul, showed that *C. adamantium* follows the same flowering and fruiting periods (Nucci & Alves-Junior, 2017). According to Fidalgo and Kleinert (2009), the flowering period of Myrtaceae starts in the transition period to wet weather, justifying the peak of flowering in September, followed by fruiting.

According to Lima, et al. (2011a), *C. pubescens* occurring in the state of Paraná, is a shrub or sub-shrub, ranging from 0.5m - 1.5m, with discolored, petiolate green leaves, densely covered by trichomes, elliptical and lanceolate leaf blade, cuminated apex or acute and acute base, entire margin. The flowers have glabrous petals or with trichomes only on the margins, polystemone (100 to 160 stamens), ovary 5 - 8 locular. The fruits are yellowish, globose, and smooth. The present work differs only in the classification of the apex and the base, presenting them as obtuse. According Amaral, et al. (2016) characteristics that proved the identification of the species *C. pubescens* are associated with the presence of pubescence or puberulence; bracts in the shape of scales or tiny leaves; sepals acute, rounded or intermediate forms; green or yellow-green fruits and ovary with 4 to 7 locules. These being the ones observed in this work. Oliveira, et al. (2018) observed morphological features of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg, *C. eugenoides* var. *eugenoides* (Cambess.) D.Legrand ex Landrum, *C. eugenoides* var. *desertorum* (DC.) Landrum, *C. xanthocarpa* var. *xanthocarpa* (Mart.) O.Berg and *C. xanthocarpa* var. *littoralis* (D.Legrand) some characteristics similar to those found in this study, such as being predominant shrub, with leaves petiolate and opposite.

C. pubescens is similar to *C. adamantium*, differentiating itself by conspicuous indument, besides, the corded leaf base does not occur in *C. pubescens* (Landrum, 1986). Another method of characterizing *C. pubescens* within the genus *Campomanesia* is that the leaves are strongly discolored, both fresh and dry in herbaceous materials (Lima, et al., 2011a).

A thick cuticle in the adaxial face, and a thin cuticle in the abaxial face, cover the *C. pubescens* leaves. The cuticle is an adaptation to the Cerrado environment and acts as a protective layer against the loss of water to the environment and in the protection against

excess brightness (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2009). In *C. pubescens*, the presence of unicellular trichomes was observed, with the absence of a pedal cell, corroborating with Conti, et al. (1997) who described these characteristics as a synapomorphy of Myrtaceae.

The dorsiventral mesophyll presented in the leaves of *C. pubescens* can be described as another evolutionary aspect, that due to the shape and arrangement of the palisade cells, the chloroplasts can be located parallel to the cell walls, intensifying photosynthesis (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2009).

Gomes, et al. (2009), in their study, anatomically analyzed leaves of four species of the family Myrtaceae (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, *Myrcia cordifolia* O. Berg, *M. decrescens* O. Berg and *M. torta* DC) and observed that all are hypostomatic, as in the present study for *C. pubescens*. However, in *C. adamantium* they found anomocytic and paracytic stomata, while in *C. pubescens* they were observed only anomocytic stomata, which can be used as a characteristic for differentiation.

The presence of secretory cavities in different parts of specimens of Myrtaceae is widely cited in the literature as a characteristic of the family (Carr & Carr, 1970). The interior of these cavities may consist of oils, phenols, and mucilages for some species (Fahn, 1979). Kuster and Vale (2016) observed that in the leaf secretory cavities are presents among the mesophyll cells. Histochemical tests demonstraeded voltile oils widely distributed in the secretory cavities of *C. adamantium*, as presented in this study, observing the presence of secretory cavities in the mesophyle, in the cortical parenchyma of the main vein, petiole, and young stem. Idioblasts containing polyhedral crystals or druses were also found in the various organs of *C. pubescens*, differentiating from *C. adamantium* which, according to Gomes, et al. (2009) contain only polyhedral crystals. Oliveira, et al. (2018) described secretory cavities distributed on leaves of others species of *Campomanesia*, parenchymatous cells in the leaf blade endings and the mesophyll, always near the epidermis, forming a space delimited by radially disposed cells. The dorsiventral mesophyll and a uni-stratified epidermis on both leaf blade surfaces was observed. The stomata occupied the same plane as the epidermal cells. Petiole shapes varied among different morphotypes, with the most common types being planar-convex and concave. It was observed unicellular tector trichomes and bicollateral vascular bundles.

Myrtaceae species may present the midrib biconvex, plane-convex or concave-convex, usually a single bundle in the shape of an almost flat or semi-closed arch (Gomes, et al.,

2009), in agreement with what was observed in *C. pubescens* in this work, presenting the main vein plane-convex, single bundle in the shape of a flat arc.

The results of the morphoanatomic study of *C. pubescens*, corroborate providing basic knowledge, differentiation characteristics and are of great importance to provide standards of control of the vegetable drug if it is used as herbal medicine.

Several chemical constituents were detected in the volatile oil of *C. pubescens*, the majority of which are spatulenol, caryophyllene oxide, α -macrocarpene, and z- caryophyllene. Essential oils act in the protection and development of the plant, being able to attract pollinators, reduce the attack of insects by repelling them by insecticidal action, allelopathy, thus acting in the perpetuation of the species (Castro & Machado, 2003). Cardoso, et al. (2009) obtained ledol (19.8%), globulol (9.2%), α -cadinol (7.3%) as volatile oil from the flowers of *C. pubescens* collected in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, and epi- α -muurolol (5.0%). In the volatile oil from *C. pubescens* leaves, Silva, et al. (2009) found limonene (22.4%), α -pinene (13.3%), sabinene (9.5%), bicyclogermacrene (4.4%), and linalool (3.9%) as main constituents. Chang et al. (2011) observed as major constituents in the volatile oils from *C. pubescens* leaves collected in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, bicyclogermacrene (12.54%), germacrene-D (9.38%), eucalyptol (8.17%), and trans-sabinene hydrate (5.22%), in fruits limonene (25.98%), eucalyptol (24.57%), α -pinene (7.71%) and α -terpineol (6.92%), in the branches, eucalyptol (24.54%), spatulenol (8.36%), bicyclogermacrene D (7.59%) and germacrene D (5.07%) predominated and in the roots, bicyclogermacrene (14.65%), spatulenol (10.23%), germacrene D (9.02%) and viridiflorol (7.45%) were obtained.

The chemical composition of the volatile oil of *C. pubescens* showed a variety of components, due to ongoing studies in different regions, with different temperatures, rainfall, altitudes, soil type, and incidence of ultraviolet rays (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). According to Sangwan, et al. (2001), the production of volatile oils depends on physiological, biochemical, metabolic and genetic aspects of the plant, and may undergo environmental and molecular modulations that elucidate the chemical variations of volatile oils.

The seasonal analysis of the volatile oil of *C. pubescens*, during twelve months, it was possible to observe the formation of three groups (Clusters), associated with flowering/fruitlet periods (Cluster II) and vegetative period (Clusters I and II). This study was the first to observe the seasonality of volatile compounds in the oils of this species. Since this plant is a shrub, it is much more susceptible to environmental variations, thus reflecting in

the variation of secondary metabolites, thus making it difficult to observe a clear correlation pattern.

C. pubescens is widely used in some regions of Brazil as a medicinal plant, it is necessary to have a better knowledge about the secondary metabolites of the plant, which in most cases have observed pharmacological actions. In this work, tannins were detected in the leaves of *C. pubescens*, confirming the study of Metcalfe and Chalk (1950) when they observed that the species of the Myrtaceae family present tannins that protect the plant against possible attacks by microorganisms and insects (Schmid, 1972).

Abe, et al. (2014) when performing phytochemical prospecting of *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex O. Berg identified the presence of flavonoid, tannins and saponins, which were also found in the present study. However, the flavonoid content is lower. The presence of tannins and main flavonoids confers antioxidant activity in the human body, with possible effects on the prevention of cardiovascular and circulatory diseases (Ness & Powles, 1997; Stoclet, et al., 2004) and cancer (Wang & Mazza, 2002; Katsube, et al., 2003).

Excess water content in vegetable raw materials promotes the development of microorganisms, insects, and unwanted hydrolysis chemical reactions. The humidity index is related to the quality control and preservation of the drug. In the present work, the content of volatile compounds was 7.36% close to the moisture limits for vegetable raw materials established by the Brazilian Pharmacopoeia IV (Brazil, 1988).

Another important method for the quality control of the vegetable raw material is the analysis of the total ash content. Basically, these are the non-volatile residues coming from the mineral and organo-metallic self constituents (physiological ashes) or associated to foreign materials, especially sand and soil (non-physiological ashes) (Brazil, 1988; Costa, 2001). A content of 1.77% was identified for the leaf powder of *C. pubescens*, indicating that different values for this, perhaps due to adulteration.

The granulometry in the present study, it was observed that according to the Brazilian Pharmacopoeia IV (Brazil, 1988), leaves powder of *C. pubescens* is considered coarse because it remains 77% retained in the 710 μm sieve.

The volatile oil of *C. pubescens* at the concentration used was inactive against *Ae. aegypti* larvae, according to the criteria described by Silvério et. al., (2020). Other species of the Myrtaceae family, however, have larvicidal activity as *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (Lethal Concentration 50%- LC_{50} 21.4 $\mu\text{g/mL}$) (Costa, et al., 2005), *Eucalyptus gunnii* Hook. F. (LC_{50} 21.1 $\mu\text{g/mL}$) (Lucia, et al., 2008), *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore (LC_{50} 27 $\mu\text{g/mL}$) (Leyva, et al., 2009), *Psidium guajava* L. (LC_{50} 24.7 $\mu\text{g/mL}$) (Lima, et

al., 2011b), *Leptospermum scoparium* J.R. Forst and G. Forst (LC₅₀ 47.97ppm) (Muturi, et al., 2020), *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels LC₅₀ 17.3 µg/mL (An, et al., 2020), and *Melaleuca leucadendra* (L.) L (LC₅₀ 1.4µg/mL) (An, et al., 2020). Volatile oils are an interesting source of new insecticidal molecules, mainly because they are biodegradable and have low toxicity (Isman, 2020; Viana, et al., 2018).

5. Conclusion

It is concluded that the morpho-anatomical study of *C. Pubescens* is important in the correct taxonomic classification of the species. The phytochemical study, evaluation of volatile compounds content, total ash content, granulometry and intumescence provide quality control parameters for this plant raw material. The majority compounds found in the volatile oils were spatulenol, caryophyllene oxide, α -macrocarpene, and z-caryophyllene. The presence of three clusters was observed, with cluster II corresponding to the reproductive period of the plant (flowering and fruiting) and clusters I and III to the vegetative period. No larvicidal activity of the volatile oil was observed against *Ae. aegypti* larvae. This work represents the first leaf anatomical description, chemical compounds, and seasonal variability of volatile oils from *C. pubecens* leaves collected in Goiás.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). This study was financed in part by the CAPES, Finance Code 001.

6. References

- Abe, S. Y.; Mendes Silva, S.; Possamai, J. C. & Nakashima, T. (2014). Prospecção fitoquímica, teor de flavonoides totais e capacidade antioxidante de *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex O. Berg (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 11 (2), 1-14.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. 4th ed. Carol Stream, IL: Allured Publ. Corp.

Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M. & Ribeiro, J. F. (1998). *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC – DF.

Amaral, É. V. E. J.; Reis, E. F.; Ressel, K.; Pinto F. N. (2016). Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia ruiz & pavon* (Myrtaceae). *Revista Agrotecnologia*, 7(1), 42-52.

Amer, A. & Mehlhorn, H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, 99 (4), 466-472. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0182-3>

An, N. T. G; Huong, L. T.; Satyal, P.; Tai, T. A.; Dai, D. N.; Hung, N. H.; Ngoc, N. T. B. & Setzer, W. N. (2020). Mosquito larvicidal activity, antimicrobial activity, and chemical compositions of essential oils from four species of Myrtaceae from Central Vietnam. *Plants*, 22, 9(4), 544. [https://doi: 10.3390/plants9040544](https://doi.org/10.3390/plants9040544).

Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M. (2009). *Anatomia vegetal*. Viçosa: Editora UFV.

APG IV (2016). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14. Missouri Botanical Garden Retrieved from <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Brasil (1988). *Farmacopéia Brasileira*. 4. ed. São Paulo: Atheneu.

Brasil. Ministério da Saúde (2010). ANVISA. RDCNº10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA e dá outras providências. Retrieved from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html.

Cardoso C. A. L. & R-Poppi, N. (2009). Identification of the volatile compounds of flower oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 21 (5), 433-434. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700210>

Cardoso, A. C. L.; Salmazzo, G. R.; Honda, N. K.; Prates C. B.; Vieira, M. C. & Coelho, R. G. (2010). Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of

Campomanesia Species (Myrtaceae). *Journal of Medical Food*, 13 (5), 1273–1276.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0047>

Carr, D. J. & Carr, S. M. G. (1970). Oil glands and ducts in *Eucalyptus* L'Hérit. II. Development and structure of oil glands in the embryo. *Australian Journal of Botany*, 18 (2), 191-212. <https://doi.org/10.1071/BT9700191>

Castro, M. M. & Machado, S. R. (2003). *Células e tecidos secretores*. In: Appezzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM (eds). *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

Chang, R.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Cunha, L. C. S.; Rocha, E.O.; Aquino, F. J. T., Souza, M. G. M., Cunha W. R. & Martins C. H. G. (2011). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, native of Brazilian Cerrado. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30 (9): 1843-1848.

Consoli, R. A. G. B. & Oliveira, R. L. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

Conti, E; Litt, A.; Wilson, P. G.; Graham, S. A.; Briggs, B. G.; Johnson, L. A. S. & Sytsma, K. J. (1997). Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany*, 22 (4), 629-647.
<https://doi.org/10.2307/2419432>

Costa, A. F. (2001). *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Angélico, E. C.; Silva, M. R.; Mota, M. L.; Santos, N. K. A.; Cardoso, A. L. H. & Lemos, T. L. G. (2005). Chemical biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 304–309.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>

Cunha, A. P. (2005). *Farmacognosia e fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Dias, C. N. & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitology Research*, 113, 565–592. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>.

Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.

Fidalgo, A. O. & Kleinert, A. M. P. (2009). Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae: is there a syndrome associated with buzz-pollination? *New Zealand Journal of Botany*, 47 (4), 355–365. <https://doi.org/10.1080/0028825x.2009.9672712>

Forzza, R. C. (2010). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Gentry, A. H. (1992). Bignoniaceae Part II: Tribe Tecomeae. *Flora Neotropica*, 25 (2), 51-105.

Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

Gomes, S. M.; Somavilla, N. S. D. N.; Gomes-Bezerra, K. M.; Miranda, S. C.; Carvalho, P. S. & Graciano-Ribeiro, D. (2009). Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botanica Brasilica*, 23, 224–238. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000100024>

Guerrero, F. M. G.; Zimmerman, L. R.; Cardoso, E. V.; Lima, C. A.; Cardoso de Perdomo, R. T.; Alva, R. & Carollo, C. A. (2010). Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. *Revista Fitos*, 5 (2), 64-72.

INMET (2020). *Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento*. Retrieved from <http://www.inmet.gov.br/portal/> (acessado em novembro de 2020).

Isman, M. B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century-fulfilling their promise? *Annual Review of Entomology*, 65, 233–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>

Katsube, N.; Iwashita, K.; Tsushida, T.; Yamaki, K. & Kobori, M. (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 68-75. <https://doi.org/10.1021/jf025781x>

Kraus, J. E. & Arduin, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Ed. Universidade Rural.

Kuster, V. C. & Vale, F. H. A. (2016). Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, 673–678. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.015>

Landrum, L. R. (1986). *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). New York: Flora Neotropica.

Landrum, L. R. & Kawasaki, M. L. (1997). The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, 49, 508-536. <https://doi.org/10.2307/2807742>

Leyva, M.; Marquetti, M. C.; Tacoronte, J. E.; Scull, R.; Tiomno, O.; Mesa, A. & Montada, D. (2009). Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomed*, 20, 5–13.

Lima, D. F.; Goldenberg, R. & Sobral, M. (2011a). O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, 62, 683-693. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201162313>

Lima, M. A. A.; Oliveira, F. F. M.; Gomes, G. A. et al. (2011b). Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology*, 10, 11716–11720. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1102>

Lorenzi, H.; Souza, H. M.; Torres, M. A. V. & Bacher, L. B. (2003). *Árvores exóticas do Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora.

Lucia, A.; Licastro, S.; Zerba, E. & Masuh, H. (2008). Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *The Netherlands Entomological Society*, 129, 107–114. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x>

Martius, C. F. P. (1897). Flora Brasiliensis, enumeratio plantarum in Brasilia hactenus detectarum: quas suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturali digestas partim icone illustratas. *Flora Brasiliensis*, 8(2), 383.

Metcalf, C. R. & Chalk, L. (1950). *Anatomy of the dicotyledons*. London: Oxford University Press.

Muturi, E. J.; Selling, G. W.; Doll, K. M.; Hay, W. T. & Ramirez, J. L. (2020). *Leptospermum scoparium* essential oil is a promising source of mosquito larvicide and its toxicity is enhanced by a biobased emulsifier. *PLoS ONE*, 15(2), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229076>

Ness, A. R. & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26 (1), 1-13. <https://doi.org/10.1093/ije/26.1.1>

Nucci, M. & Alves-Junior, V. V. (2017). Biologia floral e sistema reprodutivo de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg- Myrtaceae em área de Cerrado no sul do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Interciencia*, 42 (2), 127-131.

Oliveira, J. D.; Alves, C. C. F.; Miranda, M. L. D.; Martins, C. H. G.; Silva, T. S.; Ambrosio M. A. L. V.; Alves, J. M. & Silva, J. P. (2016). Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18, 502- 510. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_206

Oliveira, M. I. U.; Rebouças, D. A.; Leite, K. R. B.; Oliveira, R. P. & Funch, L. S. (2018). Can leaf morphology and anatomy contribute to species delimitation? A case in the *Campomanesia xanthocarpa* complex (Myrtaceae), *Flora*, 249, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.10.004>

Rodrigues, V. E. G. & Carvalho, D. A. (2001). *Plantas medicinais no domínio dos cerrados*. Viçosa: UFLA.

Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F. & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plant. *Plant Growth Regulation*, 34, 3-21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>

Sano, S. M. & Almeida, S. P. (1998). Cerrado: Ambiente e Flora. Mendonça RC et al. Flora vascular do Cerrado. Brasília: Embrapa CPAC.

Schmid, R. (1972). A resolution of the *Eugenia-Syzygium* controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, 59, 423-436. <https://doi.org/10.2307/2441553>

Silva, E. P.; Vilas Boas, E. V. B.; Rodrigues, L. J. & Siqueira, H. H. (2009). Physical, chemical and physiological characterization of gabioba fruit. (*Campomanesia pubescens*) during its development. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 4, 803-809. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400016>.

Silva, I. G.; Silva, H. H. G. & Lima, C. G. (2003). Ovipositional behavior of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in different strata and biological cycle. *Acta Biológica Paranaense*, 32:1-8.

Silvério, M. R. S.; Espindola, L. S.; Lopes, N. P. & Vieira, P. C. (2020). Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. *Molecules*, 25(15), 3484:1-42. <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>

Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F. & Lucas, E. (2015). *Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Retrieved from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>

- Stoclet, J. C.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, M.; Bedoui, J. E.; Chataigneau, M. & Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500, 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.034>
- Van Den Dool, H. & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the Retention Index system including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Viana, G. A.; Sampaio, C. G. & Martins, V. E. P. (2018). Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. *Journal of Health & Biological Sciences*, 6(4), 449-462. <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v6i4.2079>.
- Wang, J. & Mazza, G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4183-4189. <https://doi.org/10.1021/jf011613d>
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- World Health Organization (2005). *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. World Health Organization. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf.
- Zara, A. L. S. A.; Santos, S. M.; Fernandes-Oliveira, E. S; Carvalho, R. G. & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25(2), 391–404. <https://doi.org/10.5123/S1679-4974201600020001>

5. CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que o presente estudo demonstra a importância do Cerrado e as oportunidades de descobertas deste Bioma. O estudo fitoquímico, a avaliação do teor de compostos voláteis, o teor de cinzas totais, a granulometria e a intumescência fornecem parâmetros de controle de qualidade para esta matéria prima vegetal. Os compostos majoritários encontrados nos óleos voláteis foram espatulenol, óxido de cariofileno, α -macrocarpeno e z-cariofileno. Observou-se a presença de 3 clusters, sendo o cluster II correspondente ao período reprodutivo da planta (floração e frutificação) e os clusters I e III ao período vegetativo. Nenhuma atividade larvicida do óleo volátil foi observada contra larvas de *Ae. aegypti*. Este trabalho relata a primeira descrição anatômica foliar, dos compostos químicos e da variabilidade sazonal dos óleos voláteis de folhas da *C. pubescens* coletadas em Goiás.

APÊNDICE I

Anatomical study of the leaves and evaluation of the chemical composition of the volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves and fruits

Estudo anatômico das folhas e avaliação da composição química dos óleos voláteis de folhas e frutos de *Psidium guineense* Swartz

Estudio anatómico de las hojas y evaluación de la composición química de los aceites volátiles de hojas y frutos de *Psidium guineense* Swartz

Received: 05/09/2021 | Reviewed: 05/16/2021 | Accept: 05/20/2021 | Published: 06/08/2021

Fernando Yano Abrao

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0553-0946>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: yanobruce@gmail.com

Henrique Marques da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5035-5518>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: henriquemarques0611@gmail.com

Tatiana de Sousa Fiuza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0135-177X>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: tatiananatomia@gmail.com

Camila Aline Romano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-6368>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: camilaalineromano@gmail.com

Heleno Dias Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7763-734X>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: hdiasich@gmail.com

Luiz Carlos da Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-8528>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: lucacunha@gmail.com

Jerônimo R. Oliveira Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0261-4554>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: jeromoneto8@gmail.com

José Realino de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4424-7692>
Universidade Federal de Goiás, Brazil
E-mail: jose_realino@ufg.br

Abstract

Psidium guineense Swartz is a bush used in urinary tract diseases, diarrhea, and dysentery. The present study aims to perform the anatomical study of the leaves and evaluation of the chemical composition of the volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves and fruits. The botanical material was collected in Hidrolândia, Goiás. Anatomical characterization and phytochemical screening of the leaves were performed by conventional methods. Leaf and fruit (green fruits, immature fruits, and ripe fruits) powders were submitted to hydrodistillation in the Clevenger apparatus and the identification of the chemical components of the volatile oils obtained was done by GC-MS. The leaf blade is hypostomatic with paracytic and anisocytic stomata. Secretory cavities are observed in the central vein, mesophyll, petiole, and young stem. The powder moisture content was 7.4%. The total ash content of the leaf powder was 6.3% and the acid-insoluble ash content was 0.8%. The presence of tannins, flavonoids, and saponins in the leaves were identified. Leaves volatile oil's majority compounds were 2Z,6E-farnesol (23.1-25.4%), α -copaene (17.7-20.3%), muurola-4,10(1.4) dien-1- β -ol (5.8-6.7%), epi- α -cadinol (5.5- 6.3%), and δ -Cadinene (5.0- 5.9%). Fruits volatile oil's majority compounds were 2Z,6E-farnesol (31.9-41.4%), α -copaene (13.3-26.6%), δ -cadinene (5.4-9.8%), γ -himachalene (3.8-6.1%), and cubenol (2.6-6.1%). This is the first report on anatomical study of the leaves, and chemical composition of volatile oils from leaves and fruits of *P. guineense* collected in Hidrolândia, Goiás.

Keywords: Cerrado; Essential oils; Medicinal plants; Myrtaceae.

Resumo

Psidium guineense Swartz é um arbusto usado em doenças do trato urinário, diarreia e disenteria. O presente estudo tem como objetivo realizar o estudo anatômico das folhas e avaliação da composição química dos óleos voláteis das folhas e frutos de *Psidium guineense* Swartz. O material botânico foi coletado em Hidrolândia, Goiás. A caracterização anatômica e a triagem fitoquímica das folhas foram realizadas por métodos convencionais. Os póis das folhas e frutos (frutos verdes, frutos imaturos e frutos maduros) foram submetidos à hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a identificação dos componentes químicos dos óleos voláteis obtidos foi feita por CG-EM. A lâmina foliar é hipoestomática com estômatos paracíticos e anisocíticos. Cavidades secretoras são observadas na nervura principal, mesófilo, pecíolo e caule jovem. O teor de umidade do pó foi de 7,4%. O teor total de cinzas do pó da folha foi de 6,3% e o teor de cinzas insolúveis em ácido foi de 0,8%. Foi identificada a presença de taninos, flavonóides e saponinas nas folhas. Os compostos majoritários do óleo volátil das folhas foram 2Z, 6E-farnesol (23,1-25,4%) e α -copaeno (17,7-20,3%), muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol (5,8-6,7%), epi- α -Cadinol (5,5- 6,3%) e δ -Cadineno (5,0- 5,9%). Os compostos majoritários de óleo volátil dos frutos foram 2Z,6E-farnesol (31,9-41,4%), α -copaeno (13,3-26,6%), δ -cadineno (5,4-9,8%), γ -himachalene (3,8-6,1%) e cubenol (2,6-6,1%). Este é o primeiro relato de estudo anatômico das folhas e composição química dos óleos voláteis das folhas e frutos de *P. guineense* coletados em Hidrolândia, Goiás.

Palavras-chave: Cerrado; Óleos essenciais; Plantas medicinais; Myrtaceae.

Resumen

Psidium guineense Swartz es un arbusto utilizado en enfermedades del tracto urinario, diarrea y disenteria. El presente estudio tiene como objetivo realizar el estudio anatómico de las hojas y evaluar la composición química de los aceites volátiles de las hojas y frutos de *Psidium guineense* Swartz. El material botánico fue recolectado en Hidrolândia, Goiás, la caracterización anatómica y cribado fitoquímico de las hojas se realizó por métodos convencionales. Los polvos de hojas y frutos (frutos verdes, frutos inmaduros y frutos maduros) fueron sometidos a hidrodestilación en aparato Clevenger y la identificación de los componentes químicos de los aceites volátiles obtenidos se realizó mediante CG-EM. La lámina de la hoja es hipoestomática con estomas paracíticos y anisocíticos. Se observan cavidades secretoras en la vena principal, mesófilo, peciolo y tallo joven. El contenido de humedad del polvo fue del 7,4%. El contenido total de cenizas del polvo de hojas fue del 6,3% y el contenido de cenizas insolubles en ácido fue del 0,8%. Se identificó la presencia de taninos, flavonoides y saponinas en las hojas. Los compuestos principales en el aceite volátil de las hojas fueron 2Z, 6E-farnesol (23,1-25,4%), α -copaeno (17,7-20,3%), muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol (5,8-6,7%), epi- α -Cadinol (5,5- 6,3%) y δ -Cadineno (5,0- 5,9%). Los principales compuestos de aceite volátil de frutos fueron 2Z, 6E-farnesol (31,9-41,4%), α -copaeno (13,3-26,6%), δ -cadineno (5,4-9,8%), γ -himachalene (3,8-6,1%) y cubenol (2,6-6,1%). Este es el primer informe de un estudio anatómico de las hojas y composición química de los aceites volátiles de las hojas y frutos de *P. guineense* recolectados en Hidrolândia, Goiás.

Palabras clave: Cerrado; Aceites esenciales; Plantas medicinales; Myrtaceae.

1. Introduction

The Cerrado is the most diverse savanna in the world, with 12,700 known vascular plants species, 35% of which are endemic (Forzza, et al., 2012; Novaes, et al., 2013). The Cerrado has 11 phytophysiognomies, divided into forest, savanna, and peasant formations (Coutinho, 2006). Myrtaceae family with 211 species occur in the Cerrado and are distributed in 14 genera, highlighting *Eugenia* L., *Myrcia* DC. Ex. Guill., and *Psidium* L. (Novaes, et al., 2013).

Psidium guineense Swartz known as "araçá comum", "araçá-azedo", or "araçá-mirim", is distributed in Brazilian States such as Amazonas, Pará, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, and Ceará (São Paulo, 1978). *P. guineense* is a shrub of up to 6 m, with yellowish-brown coriaceous leaves of elliptical shape and flat central rib. The flowers can be solitary or in dichásio with white petals (Silva & Mazze, 2016; Peixoto, et al., 2017). The fruit is a globular berry rich in vitamin C with high dispersion capacity, can be consumed *in natura* or as an ice cream, beverages, and liquors. The pulp is fleshy, white, mucilaginous, sweet, slightly sour, and aromatic and has numerous small seeds (Manica, 2000).

Brazilian folk medicine uses *P. guineense* to treat urinary tract diseases, diarrhea, and dysentery. Due to its high tannin content, fruit peel can be used in tanneries (Rodrigues & Carvalho, 2001; González, et al., 2005). *P. guineense* has volatile oils stored in the leaf and fruit secretory cavities (Oliveira, et al., 2014; Silva, et al., 2020).

Scientific studies performed with *P. guineense* leaves observed neuropharmacological effects in mice as the increase of sleeping time, anticonvulsant action, analgesic action (Santos, et al., 1996; 1997); anti-nociceptive, anxiolytic and antidepressant activity (Santos, et al., 2020).

The present study aims to perform the anatomical study of the leaves and evaluation of the chemical composition of the volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves and fruits collected in Hidrolândia, Goiás.

2. Material and Methods

2.1 Plant material

Psidium guineense Swartz leaves, green fruits, immature fruits, and ripe fruits were collected in January and February, during the morning and the first day each month in Hidrolândia - GO (786 m, 16° 53' 59" S and 49° 13' 29" W). Professor Dr. José Realino de Paula identified the specimen, and a voucher was deposited at the UFG Herbarium, Goiás, Brazil, under code number UFG-67843. The leaves and fruits were dried in an oven with air circulation at 38 °C by 2 days.

2.2 Anatomical study

For the anatomical study, leaves and stems were sectioned and stained with Alcian blue/safranin 9: 1 (Kraus & Arduin, 1997) and histochemical tests Steinmetz and Lugol reagents (Costa, 2001). The photographic recording of the anatomical structures was performed in a photomicroscope (Zeiss-Axiostar plus) with a coupled digital camera (Canon Power Shot G10) using the Axion Vision 4.8 software.

2.3 Phytochemical screening

The moisture analyzer (Ohaus model MB35) determined the moisture content leaf powder (Brasil, 2010). Total and insoluble ash content was determined according to the Brazilian Pharmacopocia (Brasil, 2019). The phytochemical composition of leaf powder was screened for the presence of anthraquinone heterosides, coumarins, steroids, and triterpenes; starch (Lugol), alkaloids, flavonoid heterosides, saponins heterosides, and tannins (Costa, 2001; Cunha, 2009).

2.4 Volatile oils

Healthy leaves, green fruits, immature fruits, and ripe fruits were collected from ten different individuals in January and February, triturated immediately before volatile oil extraction, and 90g of the powder submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 2 h. After drying with anhydrous Na₂SO₄, the oils were stored in glass vials at a temperature of -18 °C until further analysis. Each experiment was performed in triplicate. The composition of the volatile oils was analyzed using a Shimadzu GC/MS-QP5050A fitted with a fused silica SBP-5 (30 m × 0.25 mm I.D.; 0.25 µm film thickness) capillary column (composed of 5% phenylmethyl polysiloxane). The following temperature program was used: the temperature was raised from 60-240 °C at a rate of 3 °C/min and then to 280 °C at a rate of 10 °C/min, ending with 10 min at 280 °C. The carrier gas (helium) had a flow rate of 1 mL/min, and the split mode had a ratio of 1:20. The injection port was set at 225 °C. The operating parameters for the quadrupole mass spectrometer were as follows: the interface temperature was set to 240 °C and the electron impact ionization to 70 eV, with a scan mass range of 40-350 m/z at a sampling rate of 1 scan/s. The components were identified by comparison of the retention indices of the components to those of C₉-C₂₈ n-alkanes and comparison of the mass spectra with literature data (Van Den Dool & Kratz, 1963, Adams, 2007).

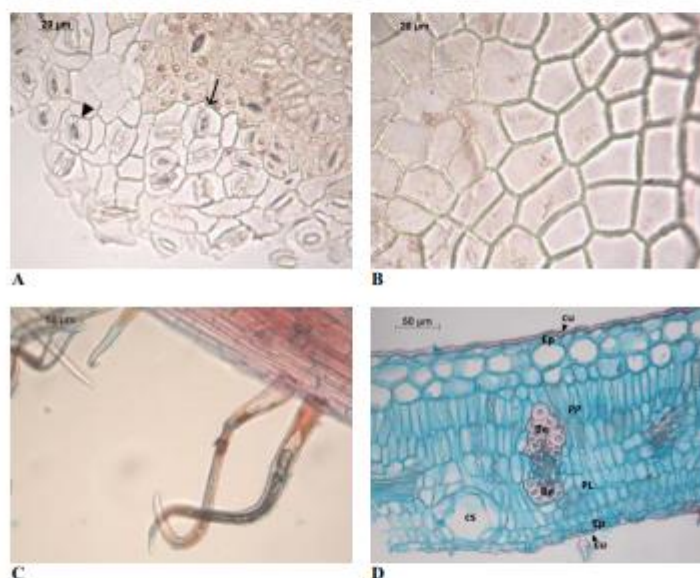
3. Results

3.1 Anatomic study

The foliar blade of *P. guineense* is hypostomatic with paracytic and anisocytic (Figure 1A) stomata in paradermic section. The epidermis on both sides present cells with straight to slightly curved walls (Figure 1B). In the transversal section, it has unistratified epidermis on the adaxial surface and hypodermis with two layers of cells, and unistratified epidermis covered

by thick cuticle on both sides (Figure 1D) and unicellular trichomes (Figure 1C). The mesophyll is dorsiventral, present palisade parenchyma with two cell layers, and lacunae parenchyma with four to five cell layers (Figure 1D). Secretory cavities are present in the lacunous parenchyma (Figure 1D). A vascular bundle with the extension of the sheath is observe (Figure 1D).

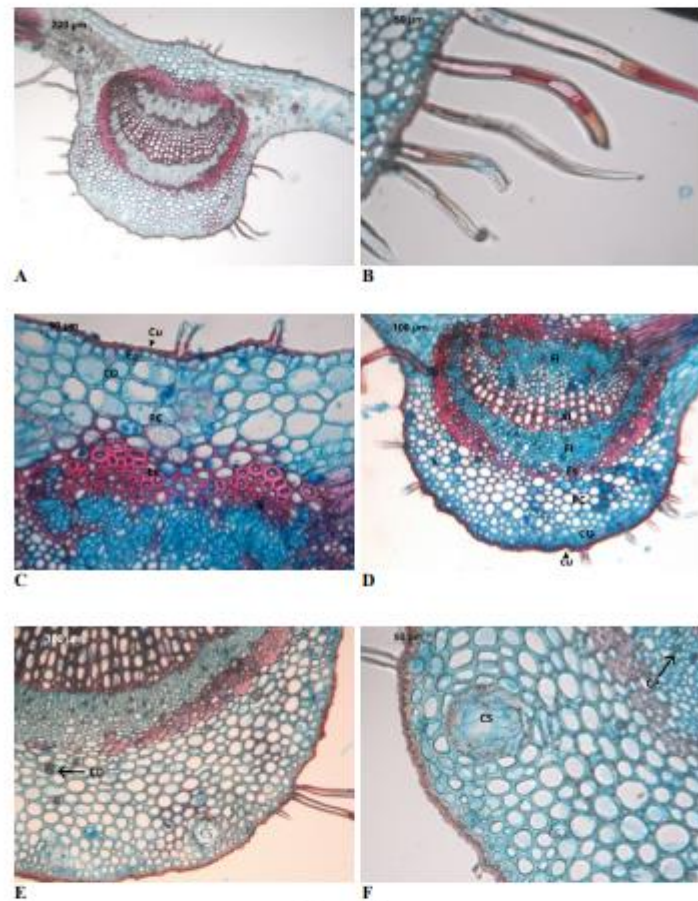
Figure 1 – A, B - Leaf blade Paradermic section. **A-** Paracytic (arrow) and anisocytic stomata (arrowhead) show in the abaxial face – **B-** Adaxial face. **C-D -** Transversal section of the mesophyll. **C.** unicellular trichomes. **D.** Secretory cavities are present in the lacunous parenchyma and cuticle on both sides (arrowhead). **Be** - Sclerenchymatous sheath. **CS** - Secretory cavity. **Cu** - Cuticle. **Ep** - Epidermis. **PL** - Lacunous parenchyma. **PP** - Palisadic parenchyma.



Source: Authors.

The main rib, in cross-section, has a plane-convex shape (Figure 2A). The epidermis is uniestratified coated by cuticle (Figure 2C), observing the presence of simple trichomes (Figure 2B). After the epidermis, there are about three to four layers of collenchyma cells (Figure 2D). The cortical parenchyma has from eight to ten layers of cells with secretory cavities (Figure 2F) and idioblasts containing druse-type crystals (Figure 2E). The vascular bundle is bicollateral with an arch shape surrounded by a range of sclerenchymatous sheath cells ranging from one to seven layers that emit projections between cells from the external and internal xylem to the phloem (Figure 2D). In the external phloem, idioblasts cells containing prismatic crystals are presented (Figure 2E).

Figure 2 - A, B, C, D, E, F: Principal rib transverse sections. **A-** General aspect. **B.** Simple trichomes. **C.** Detail of the epidermis coated by cuticle, collenchyma and cortical parenchyma. **D.** Vascular bundle detail. **E.** Idioblast cells containing prismatic crystals. **F.** Cortical parenchyma with secretory cavity **CS-** Secretory cavity. **CD** = Crystal druse. **CO** = Collenchyma cells. **CP** = Polyhedral crystal. **Cu** = Cuticle. **Ep** = Epidermis. **Es** = Sclerenchymatous sheath. **Fl** = phloem. **PC** = Cortical Parenchyma **Xi** = Xylem.

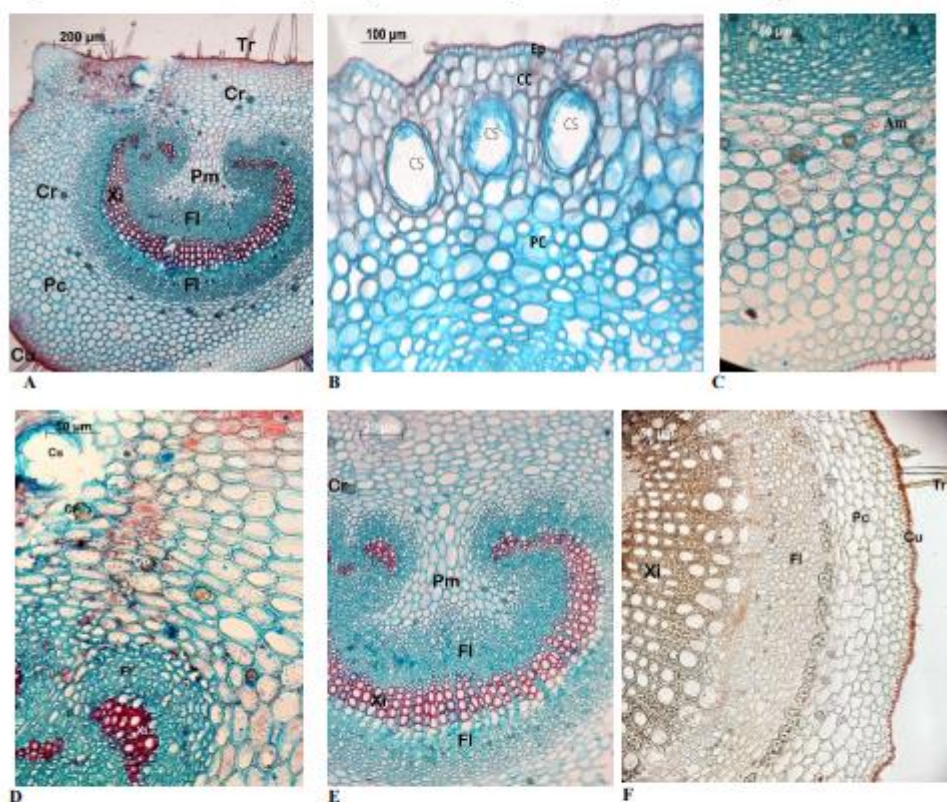


Source: Authors.

The petiole, in the transversal section, presents a plane-convex shape (Figure 3A) with unistratified epidermis covered by a cuticle (Figure 3B and 3F). It presents a unicellular trichomas tectores. Below the epidermis, a collenchyma with three to four cell layers (Figure 3B) followed by cortical parenchyma with 10 to 12 cell layers, some presenting amyloplasts (Figure 3C). Secretory cavities (Figure 3B) and cells with points (Figure 3D) are observed in the cortical parenchyma. The vascular bundle is

bicollateral with a revolute arch shape (Figure 3E). It presents medullary parenchyma with cells of different sizes. Druse-like crystals are observed in the cortical parenchyma and medullary parenchyma and prismatic crystals in the phloem (Figure 3E).

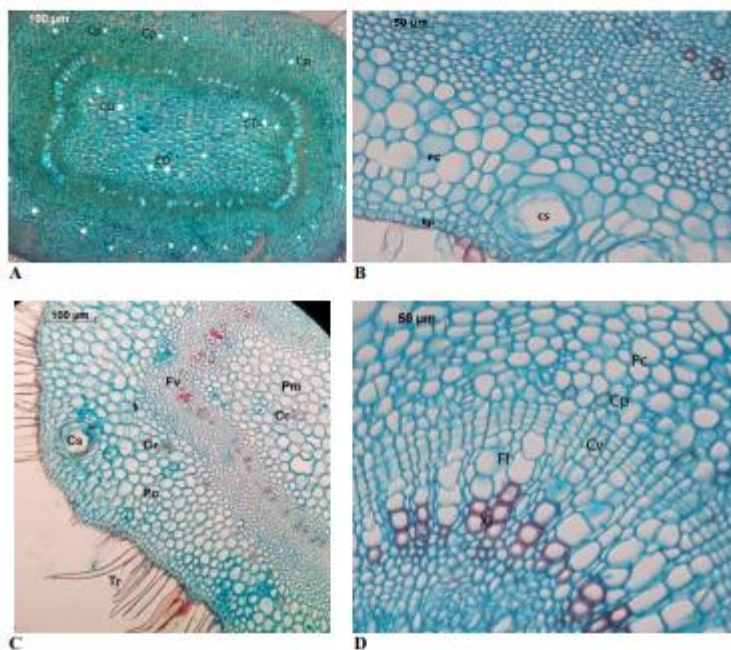
Figure 3 - A, B, C, D, E, F -Cross-sections of petiole. **A.** Overview of the petiole. **B.** Secretory cavities in the cortical parenchyma. **C.** Cortical parenchyma presenting amyloplasts. **D.** Secretory cavity, cells with points and druse-like crystals in the cortical parenchyma. **E.** Vascular bundle detail. **F.** Uniestratified epidermis covered by a cuticle (Steinmetz). **A, B, C, D, E**- Alcian blue/safranin. **Am** - Amyloplasts. **CS**- Secretory cavity. **CC** - Collenchyma cells. **Cr** - Crystal. **Cu** - Cuticle. **Ep** - Epidermis. **Fl** - Phloem. **PC** - Cortical parenchyma. **Pm** - Parenchyma medullary. **Tr** - Trichome **Xi**- Xylem.



Source: Authors.

The young stem, in cross-section, has an oval shape (Figure 4A) and is delimited by a uniestratified epidermis coated with cuticle (Figure 4B) and numerous unicellular trichomes (Figure 4C). The cortical parenchyma contains about eight to nine cell layers, presenting secretory cavities Figures 4B and 4C). In the vascular bundle a phloem is observed followed by medullary parenchyma with isodiametric cells of varying sizes. Presence of idioblasts containing druses in the cortical and medullary parenchyma and prismatic crystals in the phloem.

Figure 4 - A. The general appearance of the young stem in the transversal section (polarized light), **B, C, D, E** Transversal sections of young stem. **B.** Secretory cavities in the cortical parenchyma **C.** Unicellular trichomes. **D.** Vascular bundle detail. **CS**- Secretory cavity. **CD**- Crystal drusa. **Cp**- Polyhedral crystal. **Cr** - Crystal. **Cv**- Vascular exchange. **Ep** - Epidermis. **Fl**- Phloem. **Fv**- Vascular bundle **PC** - Cortical parenchyma. **Pm**- Parenchyma medullary. **Tr** - Trichome. **Xi** - Xylem



Source: Authors.

3.2 Total ash content, acid-insoluble ash content, and phytochemical screening

The powder moisture content was 7.4%. The total ash content of the leaf powder was 6.3% and the acid-insoluble ash content was 0.8%. The qualitative presence of tannins, flavonoids, and saponins in the leaves were identified.

3.3 Volatile Oil

The volatile oil yield from *P. guineense* leaves varied from 0.05 to 0.06% and 93.5 to 99.7% compounds were identified. The analysis resulted in the identification of 31 components (Table 1), which were 0.5% to 1.2% monoterpene hydrocarbons, 46.2% to 50.0% sesquiterpene hydrocarbons, 40.2% to 50.4% sesquiterpene oxygenates, 1.9% to 2.6% phenylpropanoids and 0% to 0.2% ketone. The major compounds were 2Z,6E-farnesol (23.1-25.4%), α -copaene (17.7-20.3%) (Figure 5), muurola-4,10(1.4) dien-1- β -ol (5.8-6.7%), and epi- α -cadinol (5.5- 6.3%).

For the fruits, the yield of volatile oil varied between 0.03-0.5% and 96.8 to 100% compounds. The analysis resulted in the identification of 34 components were identified, being 0% to 0.2% monoterpene hydrocarbons, 30.6% to 56.1% sesquiterpene hydrocarbons, 43.0% to 66.2% oxygenated sesquiterpenes and 0.4% to 1.0% phenylpropanoids. The major ones

being 2Z,6E-farnesol (31.9-41.4%), α -copaene (13.3-26.6%), δ -cadinene (5.4-9.8%), γ -himachalene (3.8-6.1%), and cubenol (2.6-6.1%) (Table 1).

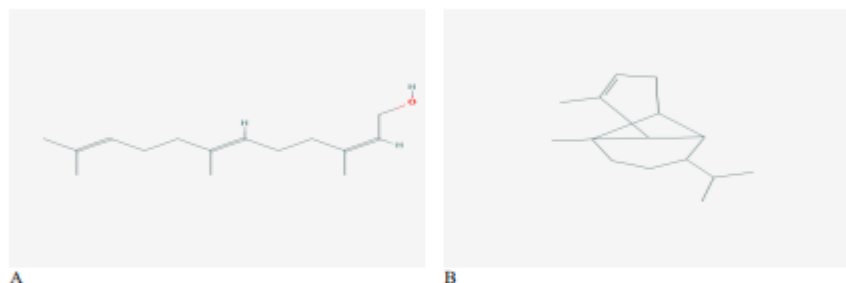
Table 1 - Percentage of chemical compounds of volatile oils from *Psidium guineense* leaves and fruits collected in Hidrolândia-Goiás, Brazil, in 2020.

Chemical compounds	KI	IR	Leaves		Green fruit		Immature fruit		Ripe fruit	
			Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb
Hepten-2-one 6-methyl-5	985	984	0.2*	0	0	0	0	0	0	0
1,8-Cineole	1031	1028	1.2	0.5	0	0	0	0	0	0.2
2-(1Z)-propenyl Phenol	1150	1158	1.1	2.1	0.9	0.9	0.9	0.6	1.0	0.4
Hydrocinnamyl acetate	1368	1367	0.8	0.5	0	0	0	0	0	0
α -Copaene	1376	1372	17.7	20.3	26.6	17.8	21.1	13.3	17.6	17.2
β -Funebrene	1414	1415	2.3	1.8	1.5	0.9	1.5	0.6	1.7	1.0
α -Humulene	1454	1449	0.8	0.7	0.6	0	0.5	0.3	0.6	0.4
E- β -Farnesene	1456	1456	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.7
9-epi-E- Caryophyllene	1466	1465	0	0	0	0	0	0.3	0	0.4
γ -Gurjunene	1477	1472	1.0	1.4	1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	1.0
γ -Himachalene	1482	1484	4.9	5.1	6.1	4.7	4.9	3.8	4.0	4.5
β -Selinene	1490	1490	4.1	4.3	5.8	4.3	4.5	3.6	3.8	4.2
α -Murolene	1500	1497	1.7	2.1	1.8	1.3	1.6	0	1.5	1.5
β -Bisabolene	1505	1506	0	0	0.6	0	0	0	0	0
α -Cuprenene	1505	1512	0	2.0	0	0	0	0	0	0
δ -Amorphene	1512	1510	1.5	0	1.7	1.3	1.6	1.8	1.6	0
δ -Cadinene	1523	1520	5.0	5.9	9.8	6.6	8.2	5.4	6.0	6.1
Zonarene	1529	1529	0	0.5	0	0	0	0	0	0
α -Calacorene	1545	1539	0.5	1.0	0	0	0	0	0.3	0.3
E-Nerolidol	1563	1562	3.0	2.6	1.7	3.3	2.4	3.1	2.3	3.0
β -Copaen-4- α -ol	1590	1582	1.1	0.9	0	0	0	0.2	0	0
Carotol	1599	1598	1.6	1.4	0	0	0	1.1	0.9	1.0
Globulol	1587	1590	0	0	0	0	0	0.1	0	0
Ledol	1602	1607	0.7	1.0	0	0	0	1.0	0.5	0.9

Muurolo-4,10(14)-dien-1β-ol	1631	1624	6.7	5.8	0	0	0	0	0	0
α-Acorenol	1631	1624	0	0	1.7	2.8	2.4	3.4	0	0
Muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1631	1624	0	0	0	0	0	0	3.6	3.4
Zonarene	1528	1529	0	0	0	0	0	0.3	0.3	0.4
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5α-ol	1640	1631	0.8	0.6	0	0	0	0	0.3	0
epi-α-Cadinol	1640	1637	6.3	5.5	2.7	4.7	4.0	5.1	4.8	4.8
α-Muurolo	1646	1642	2.1	1.9	0.5	1.4	0.9	1.4	1.4	1.4
Cubenol	1646	1649	0	5.0	2.6	5.5	4.7	6.1	5.4	5.5
Cadalene	1676	1670	0	0.5	0	0	0	0	0	0
2E,6Z-Farnesal	1684	1670	0	0	0	0	0	0	0	0.5
α-Bisabolol	1685	1682	0	0	0	0	0	0.3	0	0
2Z,6E-Farnesol	1723	1723	25.4	23.1	31.9	39.8	36.4	41.4	35.4	35.3
2E,6E-Farnesal	1740	1741	0.4	0.4	0	0	0	0	0	0
2E,6E-Farnesal	1740	1741	0	0	0.7	1.1	0.9	1.1	0.7	1.0
2E,6E-Farnesol	1742	1738	0	0	0	0	0	0.4	0.6	0.5
β-Bisabolenal	1767	1769	0.8	0.9	0	0	0	0	0	0
2E,6E-Methyl farnesoate	1784	1783	0	0	0	0	0	0.2	0	0
2Z,6E-Farnesyl acetate	1846	1841	1.1	1.3	1.2	1.1	1.3	1.0	1.6	1.2
Ketone			0.2	0	0	0	0	0	0	0
Phenylpropanoid			1.9	2.6	0.9	0.9	0.9	0.6	1.0	0.4
Sesquiterpene hydrocarbons			50.0	46.2	56.1	38.3	45.4	30.6	38.6	37.3
Oxygenated sesquiterpenes			40.2	50.4	43.0	59.7	53.0	66.2	57.8	58.9
Hydrocarbon Monoterpenes			1.2	0.5	0	0	0	0	0	0.2
Total identified (%)			93.5	99.7	100.0	98.9	99.3	97.4	97.4	96.8
Yield (%)			0.05	0.06	0.04	0.04	0.03	0.03	0.5	0.16

KI: Kovax index; RI: retention index; Jan: January; Feb: February; ● all the number of the constituents are expressed in percentage.
Source: Authors.

Figure 5 - Chemical structure of the major components of *Psidium guineense* volatile oil leaves **A**, 2Z,6E Farnesol. **B**, α -Copaene.



Source: Pubchem (2021a, b).

4. Discussion

In the present study, unistratified adaxial epidermis with double layer of hypodermis, palisadic parenchyma with 2 layers of cells, numerous unicellular trichomes, paracytic, and anisocytic stomata were observed while Silva, et al. (2007) observed only paracytic stomata in the abaxial epidermis of *P. guineense* and only one layer of cells in the palisadic parenchyma. According to Brewer, et al. (1991), the trichomes may be responsible for water retention on the leaf surface by retaining water droplets, improving the photosynthetic process by allowing greater opening of the stomata. Secretory cavities containing volatile oils and crystals in forms of druses described in the leaves and young stem in this study were also described by Oliveira (2015), being a common feature of Myrtaceae species (Metcalf & Chalk 1979).

The determination of moisture in herbal drugs is important in quality evaluation. Water excess produces unwanted chemical reactions and microbial contamination. Total ash and acid-insoluble ash in high levels indicates impurities like non-organic materials and silica (Alves, et al., 2010; Brasil, 2019). Official compendia have not established parameters for *P. guineense*. However, limit values for moisture are 12.0% and total ash 9.0 % for *P. guajava* powder (Brasil, 2019). *P. guineense* powder of the leaves displayed values of 7.4% moisture, 6.3% total ash, and 0.8% acid-insoluble ash. Tannins, flavonoids, and saponins were also identified in the leaves. These compounds were also described in the methanolic extract of *P. guineense* leaves from India by Sruthi, et al. (2019), alongside coumarins, terpenoids, and quinones.

The majority of compounds in volatile oil from *P. guineense* leaves were 2Z,6E-farnesol, α -copaene, muurola-4,10(1,4),dien-1- β -ol, cubenol, epi- α -cadinol, δ -cadinene, and γ -himachalene, whereas for the fruits were 2Z,6E-farnesol, α -copaene, β -bisabolene, δ -cadinene, β -amorphene, cubenol, and epi- α -cadinol. However, Figueiredo, et al. (2018) identified α -pinene, α -copaene, and E-caryophyllene as major components in the leaf volatile oils collected in Pará, while Silva, et al. (2003) identified β -bisabolol, limonene, and epi- α -bisabolol from leaves collected in Roraima State.

In volatile oil from *P. guineense* leaves collected in Ceará State, Brazil, Neto, et al. (1994) found as major components 1.8-cineole (40.5%), β -eudesmol (19.5%) and α -pinene (13.9%). Tucker et al. (1995) determined as the main components of the leaves volatile oil in Mexico, β -bisabolene (13.18%), α -pinene (12.85%) and Z-nerolidol (5.50%). Spathulenol (80.71%) was the main component of the volatile oil, followed by 2Z,6E-farnesol (3.65%) and γ -terpineol (1.91%) in Mato Grosso do Sul (Nascimento, et al., 2018). Peralta-Bohórquez (2011), in Mexico, identified in the fruits volatile oil the components ethyl butyrate (30.3%), ethyl hexanoate (23.8%), β -caryophyllene (3.3%) by headspace solid phase extraction and β -caryophyllene (8.6%), while butanol (7.4%) and ethyl butyrate (7.4%) when obtained by distillation extraction.

2Z,6E-farnesol belongs to the class of organic compounds known as sesquiterpenoids. These terpenes are constructed by three consecutive isoprene units (HMDB, 2021). Su, et. al. (2015) described the antimicrobial activity of 2Z-6E farnesol by microdilution broth method using minimum inhibitory concentration against *Aspergillus niger* (500 µg/mL), *Bacillus cereus* (62.25 µg/mL), *Candida albicans* (31.25 µg/mL), *Enterobacter aerogenes* (62.25 µg/mL), *Escherichia coli* (62.5 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (125 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (125 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (31.25 µg/mL), *S. epidermidis* (31.25 µg/mL), and *Vibrio parahaemolyticus* (500 µg/mL). The anticancer potential was tested on three human cancer cell lines: HT-29 (human colon), J5 (human hepatocellular carcinoma), and A549 (human lung adenocarcinoma). 2Z-6E farnesol reduced the viability 50% of HT-29, J5, and A549 cells at 10.6, 36.8, and 26.8 µg/mL, respectively.

α -Copaene belongs to the sesquiterpenoid class (HMDB, 2021b). Rodrigues, et al. (2018) observed antileishmanial activity of α -copaene *in vitro*, reducing viability by 50% for *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* at the concentration of 17.2 and 11.4 µg/mL, respectively.

The chemical composition of the volatile oil of *P. guineense* showed component variation due to the studies being made in different regions, with different temperatures, pluviometric indexes, altitudes, type of soil, and incidence of ultraviolet rays (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). According to Sangwan, et al. (2001) the volatile oils production depends on physiological, biochemical, metabolic and genetic aspects of the plant, and may suffer environmental and molecular modulations elucidating the chemical variations of volatile oils.

Due to the small size of the fruit, the amount of volatile oil obtained was low, a fact that represented a limitation of the study.

5. Conclusion

Anatomical studies, moisture content and total and insoluble ash in this study contribute to the quality control of plant raw material. Phytochemical screening is important to observe classes of molecules with possible biological activity. In this context qualitative presence of tannins, flavonoids, and saponins in the leaves were observed.

Leaves and fruits volatile oil's majority compounds were 2Z,6E-farnesol and α -copaene. This is the first report on anatomical study of the leaves, and chemical composition of volatile oils from *P. guineense* leaves and fruits collected in Hidrolândia, Goiás.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). This study was financed in part by the CAPES, Finance Code 001.

References

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy* (4a ed.). Carol Stream, IL: Allured Publ. Corp.
- Alves, M. S. M., Mendes, P. C., Vieira, J. G. P., Ozela, E. F., Barbosa, W. L. R., & Júnior, J. O. C. S. (2010). Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20 (2), 215-221. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200013>
- Brasil (2010). *Farmacopéia Brasileira* (5a ed.). Atheneu.
- Brasil (2019). *Farmacopéia Brasileira* (6a ed.). Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Brewer, C. A., Smith, W. K., & Vogelmann, T. C. (1991). Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water. *Plant, Cell & Environment*, 14, 955-962. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb00965.x>
- Costa, A. F. (2001). *Farmacognosia: Farmacognosia Experimental* (3a ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Coutinho, L. M. (2006). O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasílica*, 20 (1), 13-23. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100002>
- Cunha, A. P. (2009). *Farmacognosia e Fitoquímica* (2a ed.). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Figueiredo, P. L. B., Silva, R. C., Silva, J. K. R., Suemitsu, C., Mourão, R. H. V., & Maia, J. G. S. (2018). Chemical variability in the essential oil of leaves of araçá (*Psidium guineense* Sw.), with occurrence in the Amazon. *Chemistry Central Journal*, 12 (52), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0428-z>
- Forzza, R. C., Baumgratz, J. F. A., Bicuado, C. E. M., Canhos, D. A. L., Carvalho Jr., A. A., Coelho, M. A. N., Costa, A. F., Costa, D. P., Hopkins, M. G., Leitman, P. M., Lohmann, L. G., Lughadha, E. N., Maia, L. C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M. P., Peixoto, A. L., Pirani, J. R., Prado, J., Queiroz, L. P., Souza, S., Souza, V. C., Stehmann, J. R., Sylvestre, L. S., Walter, B. M. T., & Zappi, D. C. (2012). New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *Biotropica*, 62, 39-45. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.8>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- González, A. M. N., González, M. B. R., & Pinto, N. L. S. (2005). Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1, 3-4.
- HMDB (2021a). *Human Metabolome Database*. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0059849>
- HMDB (2021b). *Human Metabolome Database*. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0061851>
- Kraus, J. E., & Arduin, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Manica, I. (2000). *Frutas nativas, silvestres e exóticas 1 - Técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba*. Porto Alegre: Cinco Continentes.
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1979). *Anatomy of dicotyledons* (2a ed.). Clarendon Press.
- Nascimento, K. F., Moreira F. M. F., Santos, J. Á., Kassuya, C. A. L., Croda, J. H. R., Cardoso, C. A. L., Vicina, M. C., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., & Formagio, A. S. N. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimicrobial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.030>
- Neto, M. A., Alencar, J. W., Cunha, A. N., Silveira, E. R., & Batista, T. G. (1994). Volatile constituents of *Psidium pohlium* Berg. and *Psidium guineense* Pers. *Journal of Essential Oil Research*, 6, 299-300. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698379>
- Novaes, P., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., & Macías, F. A. (2013). Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. *Phytochemistry Reviews*, 12, 839-855. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-9315-3>
- Oliveira, E. F. (2015). Morfologia e micromorfologia comparada das folhas de espécies de *Psidium* L. (Myrtaceae) do cerrado goiano. Dissertation, Universidade Estadual de Goiás.
- Oliveira, R. F., Mendes, V. D., Molina, S., & Clemente, E. (2014). Study Post-Harvest about impact and compression mechanical in the cell quality of guava fruit (CV. Paluma). *International Journal of Science*, 3(8), 30-34.
- Peixoto, A. L., Carrijo, T. T., & Tuler, A. C. (2017). Revisitando a flora de Macaé de Cima, Rio de Janeiro, Brasil: o gênero *Psidium* (Myrtaceae). São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 61, 1323-1331. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768414>
- Peralta-Bohéquez, A. F., Parada, F., Quijano, C. E., & Pino, J. A. (2010). Analysis of volatile compounds of sour guava (*Psidium guineense* Swartz) fruit. *Journal of Essential Oil Research*, 22 (6), 493-498. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700381>
- Pubchem (2021a). *Compound summary Alpha-Copaene*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19725>
- Pubchem (2021b). *Compound summary (Z,Z,6E)-Farnesol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549108>
- Rodrigues, V. E. G., & Carvalho, D. A. (2001). *Plantas medicinais no domínio dos cerrados*. UFPA.
- Rodrigues, I. A., Ramos, A. S., Falcão, D. Q., Ferreira, J. L. P., Basso, S. L., Silva, J. R. A., & Amaral, A. C. F. (2018). Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of *Copaifera pauciflora* oleoresins. *BioMed Research International*, 9, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/9781724>
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabib, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plant. *Plant Growth Regulation*, 34, 3-21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>
- Santos, E., Radai, J. A. S., Nascimento, K. F., Formagio, A. S. N., Balsalobre, N. M., Ziff, E. B., Konkiewitz, E. C., & Kassuya, C. A. L. (2020). Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of *Psidium guineense*. *Nutritional Neuroscience*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1815330>
- Santos, F. A., Rao, V. S. N., & Silveira, E. R. (1996). Studies on the neuropharmacological effects of *Psidium guineense* and *Psidium pohlium* essential oils. *Phytotherapy Research*, 10, 655-658. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199612\)10:83.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199612)10:83.0.CO;2-X)
- Santos, F. A., Rao, V. S. N., & Silveira, E. R. (1997). The leaf essential oil of *Psidium guineense* offers protection against pentylenetetrazole-induced seizures. *Planta Medica*, 63 (2), 133-135. <https://doi.org/10.1055/a-2006-957629>
- São Paulo (1978). Secretaria da Agricultura. Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária. Instituto de Tecnologia de Alimentos. *Frutas tropicais: goiaba: da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas.
- Silva, A. T., & Mazzei, F. F. (2016). A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, 583 São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 67(1), 203-223. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667110>

- Silva, J. D., Luz, A. I. R., Silva, M. H. L., Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B., & Maia, J. G. S. (2003). Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 240–243. <https://doi.org/10.1002/ffj.1219>
- Silva, L. C., Freitas-Silva, L., Rocha, D. I., Pereira, J. S. C., & Assis, D. E. F. (2020). Leaf morpho-anatomical structure determines differential response among restinga species exposed to emissions from an iron ore pelletizing plant. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231 (152), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04533-x>
- Silva, M. D., Chagas, M. G. S., & Pimentel, R. M. M. (2007). Anatomia foliar de espécies lenhosas dominantes numa área de restinga. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (1), 543–545.
- Sruthi, C. P., Anithi, S. V., Joseph, J., & Thomas, B. (2019). Phytochemical screening of leaf extracts of *Psidium guajava* and *Psidium guineense* (Myrtaceae). *International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)*, 6 (1), 37–42. <https://doi.org/10.30574/gschps.2017.1.2.0024>
- Su, Y., Hsu, K., Wang, E. I., & Ho, C. (2015). Composition, *in vitro* cytotoxic and antimicrobial activities of the flower essential oil of *Diospyros discolor* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 10 (7), 1311–1314. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000744>
- Tucker, A. O., Maciarello, & M. J., Landrum, L. R. (1995). Volatile leaf oils of american Myrtaceae. III. *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *P. guineense* Sw., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu. *Journal of Essential Oil Research*, 7 (2), 187–190. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698497>
- Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the Retention Index system including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)