



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO ODEONE DA SILVA CUNHA

**Estudos químico, histoquímico e anatômico das folhas de
Eugenia pitanga (O. BERG) NIED e *Eugenia dysenterica*
DC.**

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, 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 das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Gustavo Odeone da Silva Cunha

Título do trabalho: "Estudos químico, histoquímico e anatômico das folhas de *Eugenia pitanga* (O. BERG) NIED e *Eugenia dysenterica* DC."

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 03/03/2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. 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;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

GUSTAVO ODEONE DA SILVA CUNHA

**ESTUDOS QUÍMICO, HISTOQUÍMICO E ANATÔMICO DAS FOLHAS
DE *Eugenia pitanga* (O. BERG) NIED E *Eugenia dysenterica* DC.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial para obtenção do grau de mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

Goiânia
2019

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

Cunha, Gustavo Odeone da Silva
Estudos químico, histoquímico e anatômico das folhas de Eugenia pitanga (O. BERG) NIED e Eugenia dysenterica DC. [manuscrito] / Gustavo Odeone da Silva Cunha. - 2019.
201 f.

Orientador: Profa. Dra. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino; co-orientadora Dra. Dra. Leticia de Almeida Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Eugenia pitanga. 2. Eugenia dysenterica. 3. Histoquímica. 4. Óleos essenciais. 5. Leaf spray. I. Severino, Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 316 da sessão de Defesa de Dissertação de **Gustavo Odeone da Silva Cunha**, que confere o título de Mestre(a) em **Química**, na área de concentração em **Química**.

Ao/s 23 (vinte e três) dias do mês de agosto de 2019 (dois mil e dezenove), a partir da(s) **15:00 horas**, na **sala 205 do Instituto de Química, bloco 1**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“ESTUDOS QUÍMICO, HISTOQUÍMICO E ANATÔMICO DAS FOLHAS DE *Eugenia pitanga* (O. BERG) NIED E *Eugenia dysenterica* DC.”**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Prof. Dra. **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dra. **Lucilia Kato (UFG)**, membro titular interno e Prof. Dr. **Afif Felix Monteiro (USP)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca (**não fizeram**) sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **[aprovado]** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Prof. Dra. **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 23 (vinte e três) dias do mês de agosto de 2019 (dois mil e dezenove).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino**, Professor do Magistério Superior, em 23/08/2019, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato**, Professora do Magistério Superior, em 23/08/2019, às 18:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Afif Felix Monteiro**, Usuário Externo, em 26/08/2019, às 21:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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 **0846381** e o código CRC **162342D9**.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, que tanto apoiaram e incentivaram o meu crescimento pessoal e profissional. À minha esposa pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada. Sem os incentivos as conquistas não ocorreriam.

AGRADECIMENTOS

De repente a defesa! Não vou falar que foi fácil chegar até aqui, tampouco tranquilo. Foi um tempo de muito estudo, empenho, esforço, abdições e superações. Segundo um provérbio africano, “a sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” e a minha como conhece!

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam, inclusive *in memoriam*, que foram fundamentais para a realização desse projeto tão ambicioso. Venho de uma família humilde, em que mesmo com muita dificuldade meus avós (João, Oscar, Orlanda e Adelaide) conseguiram educar de forma virtuosa meus queridos pais. Apesar de não terem a oportunidade de estudar em uma universidade, são doutores em suas áreas de atuação. Meu querido pai, Ineis, a melhor pessoa desse mundo, desconheço coração maior, sempre disposto a ajudar nas mais diversas situações que a vida me colocou. Minha querida mãe, Sueli, um amor incondicional comigo, obrigado por acreditar sempre em mim e acreditar que seu filho tinha potencial e que conseguiria chegar até aqui. Meu querido irmão, Oscar, por todas as dificuldades que juntos superamos e por nossa grande amizade.

De forma especial gostaria de agradecer a pessoa que mudou a minha vida, que fez de mim o homem que sou hoje, a minha querida esposa, Elis. Simplesmente, o que você fez e faz por mim não tem preço. Obrigado meu amor do fundo do meu coração. Chegou a vez da minha pequena, Gabriela, que de pequena não tem nada. Filha, nos últimos meses fiquei ausente por diversas vezes, chegava tarde da faculdade, me dedicava pouco como pai. Peço desculpa, mas você sabe o quanto o papai te ama e te admira. Saiba que eu acredito em você e que moverei as montanhas que forem necessárias para que conquiste seus objetivos.

Aos meus queridos sogros, Gersinei e Raquel, por todo o apoio e dedicação nas horas difíceis de embates, dando dicas e orientando quais seriam os caminhos mais adequados e menos atribulados para seguir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade durante todo o processo.

À minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Leticia de Almeida Gonçalves, por todo o tempo a mim dedicado, pela busca incansável de todos os reagentes para a realização do presente trabalho e, por seu cuidado afetivo de mãe.

Ao amigo, irmão, Diego Armando, pelos trabalhos e disciplinas realizados em conjunto e, principalmente, pela preocupação e apoio constantes. Ao amigo, irmão, Paulo Antônio, por todo esforço a mim dedicado, por sua capacidade de ensinar e de tornar todo o processo da Histoquímica uma verdadeira maravilha aos meus olhos. A amiga Yasmine, por toda a ajuda, nos momentos mais difíceis, me apoiava e fazia o que era possível para me ajudar a cumprir os prazos. A amiga Eunice, por acreditar na minha capacidade e me ajudar a desenvolver os cortes a mão livre. Ao amigo Jorge, por sua tranquilidade para lidar com as mais diversas adversidades que ocorreram durante todo o processo. Ao amigo Eurides, por toda a serenidade e alta capacidade em acolher, pessoa de uma energia fantástica. De forma geral, a todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica e Laboratório de Anatomia Vegetal, Vinicius, Marcos, Carla, Stéphanie, Gerso, Paiva, Márcia, Maria Ivanir, Luiza, Bryna, Iza, Ana Clara, Maria Olívia, Felipe, Ivonete, Uglânia, Igor, Lorena Lana, Pedro e Antônio.

Aos professores do Instituto de Química, que de uma forma especial, criaram condições para que eu me apaixonasse por essa ciência, em especial à Profa. Dra. Lucilia Kato, Profa. Dra. Cecilia Maria Alves de Oliveira, Profa. Dra. Andrea Rodrigues Chaves, Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, Profa. Dra. Emilia Celma de Oliveira, Profa. Dra. Agustina Rosa Echeverria, Profa. Dra. Liliane Magalhães Nunes, Prof. Dr. Márton Hebert Flora Barbosa Soares, Profa. Dra. Nyuara Araújo da Silva Mesquita e ao diretor do IQ, Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.

Ao Prof. Dr. Anselmo Elcana de Oliveira, pelas contribuições com os dados quimiométricos. Ao Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro, que gentilmente por inúmeras vezes cedeu as folhas de *E. pitanga* para o presente trabalho. Às colegas da Universidade Federal de Catalão, Andréia e Tainara por terem realizado as etapas prévias ao meu trabalho.

Aos colegas João Bronzel e Juliana que me receberam de forma tão cordial em Araraquara no NuBBE - Núcleo de Bioensaios Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais. À Profa. Dra. Maysa Furlan, pela parceria para a realização dos experimentos de *Leaf-Spray*. À Dra. Ana Paula Terezan pelas contribuições em meu exame de qualificação e na obtenção dos dados por CLAE-EM.

Agradeço às agências de fomento, principalmente à CAPES que forneceu a bolsa para realização deste trabalho, e sem as quais muitas pesquisas importantes no Brasil não seriam possíveis.

A Deus, pela dádiva da vida e por me possibilitar realizar inúmeros sonhos nesta passagem. Obrigado por me permitir errar, aprender e a cada amanhecer, crescer como uma pessoa melhor.

Meu Jeito

E agora o fim está próximo
E, portanto, encaro o desafio final
Meu amigo, direi claramente
Irei expor o meu caso do qual estou certo
Eu tenho vivido uma vida completa
Viajei por cada e todas as rodovias
E mais, muito mais do que isso
Eu fiz do meu jeito

Tradução livre da Música *My Way* – Frank Sinatra

RESUMO

A espécie *Eugenia dysenterica* DC. é uma planta conhecida popularmente e utilizada para vários fins. Estudos químicos de *E. dysenterica* relatam a presença de polifénóis e óleos essenciais, com prevalência maior de terpenos, nas folhas. Outra espécie do mesmo gênero é a *Eugenia pitanga* (O.Berg) Nied., habitualmente empregada popularmente para fins terapêuticos. Apenas dois estudos com *E. pitanga* investigaram a composição monoterpênica das folhas frescas, bem como a composição do óleo essencial. A combinação de técnicas químicas e biológicas para investigação das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* pode fornecer informações importantes sobre essas espécies. O objetivo deste trabalho foi analisar química, histoquímica e anatomicamente das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*. A descrição da anatomia vegetal, assim como a histoquímica, possibilitaram a localização *in situ* e a identificação de classes de compostos como sesquiterpenos/oides, bem como compostos fenólicos e um alcaloide, presentes nas folhas das espécies. Os óleos essenciais de *E. pitanga* e *E. dysenterica*, foram caracterizados por CG-EM, cujo resultado encontrou α -muurolol, β -eudemol, β -guaiene, β -acorenol, e-cariophyllene, e-farnesylacetone, eudesmol, geranyl- α -terpene, germagrene, phytol e α -cadinol em ambas as espécies. A análise quimiométrica agrupou as amostras de cada espécie, de diferentes estações do ano, de folhas frescas ou secas, em *clusters* com constituintes semelhantes. A CLAE-EM, identificou que a maioria dos compostos fenólicos e flavonoides são semelhantes nas duas espécies, sendo os principais, ácido gálico, ácido protocatéquico, epicatequina, ácido p-cumarínico, kaempferol, narigenina, quercetina, ácido cafeico e ácido gentísico, anteriormente descritos na literatura. O *leaf spray* possibilitou o primeiro relato de um alcaloide na espécie *E. dysenterica*, a uniflorina, que, apesar de ter sido relatada antes em outras espécies desse gênero, nunca anteriormente foi identificada nessa espécie. Assim, os compostos presentes nas espécies de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram descritos e comparados e uma análise química pôde ser realizada, após o direcionamento formado pelos resultados da histoquímica e anatomia vegetal.

Palavras-chave: *Eugenia pitanga*, *Eugenia dysenterica*, histoquímica, anatomia foliar, óleos essenciais, *leaf spray*.

ABSTRACT

Eugenia dysenterica DC. is a Brazilian popular species, that has been used to various purposes. *E. dysenterica* chemical studies report the presence of polyphenols and essential oils in the plant leaves, whereas in the EO, the most prevalent compounds are terpenes. Another species from the same genus is *Eugenia pitanga* (O.Berg) Nied, often employed popularly for its therapeutic properties. Two studies about *E. pitanga* investigated fresh leaves monoterpene composition and essential oils composition. The combination of chemical and biological techniques to the study of *E. pitanga* and *E. dysenterica* leaves could provide important information about them. The purpose of this work was to analyse the chemistry, histochemistry and anatomy of *E. pitanga* and *E. dysenterica* leaves. Leaf anatomy description, as histochemistry, showed *in situ* location and identification of sesquiterpenes and sesquiterpenoids, as well as, phenolic compounds and alkaloids. CG-EM showed the majority presence of α -muurolol, β -eudemol, β -guaiene, β -acorenil, *e*-cariophyllene, *e*-*e*-farnesylacetone, eudesmol, geranyl- α -terpene, germagrene, phytol e α -cadinol in both species. Chemometrics grouped the samples of each species, obtained in different year stations and from fresh or dry leaves, in clusters with the same compounds characteristics. HPLC-MS made clear that most of the phenolic and flavonoid compounds were similar in both species, whereas the common compounds were gallic acid, protocatechuic acid, epicatechin, *p*-cumarinic acid, kampferol, narigenin, quercetin, caffeic acid and gentisic acid, previously described in other studies. Leaf spray enabled the identified identification of the uniflorine alkaloid in *E. dysenterica*. Although this compound was reported before in other species of this genus, for the first time it was identified in this species. Thus, the chemical compounds present in *E. pitanga* and *E. dysenterica* were described and compared and a deep chemical analysis could be performed, guided by the results obtained in leaves anatomy and histochemistry,

Key-words: *Eugenia pitanga*, *Eugenia dysenterica*, histochemistry, leaf anatomy, essential oils, leaf spray.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paisagem típica do domínio Cerrado.....	21
Figura 2 – <i>Eugenia dysenterica</i> DC.....	24
Figura 3 – <i>Eugenia pitanga</i> (O.Berg) Nied.....	26
Figura 4 – Estruturas químicas de a) dronabinol; b) lisdexanfetamina; e c) capsaicina.....	30
Figura 5 – Esquema do <i>Leaf spray</i>	35
Figura 6 – Etapas de desenvolvimento do trabalho.....	38
Figura 7 – Regiões da folha utilizadas nas análises.....	42
Figura 8 – Reagentes Sudan III e Sudan IV.....	45
Figura 9 – Mecanismo da reação de formação do indofenol.....	46
Figura 10 – Vermelho de rutênio.....	47
Figura 11 – Mecanismo de detecção de fenóis.....	47
Figura 12 – Mecanismo para verificação de taninos condensados.....	48
Figura 13 – Verificação de ligninas por floroglucinol.....	49
Figura 14 – Estrutura molecular do amido.....	50
Figura 15 – Representação esquemática da histoquímica	51
Figura 16 – Extração líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	54
Figura 17 – Equipamento em operação com a amostra de <i>E. pitanga</i> ...	57
Figura 18 – Dendograma gerado com as similaridade entre as espécies <i>E. dysenterica</i> (azul) e <i>E. pitanga</i> (vermelho).....	61
Figura 19 – Dendograma contendo as similaridade entre as folhas secas (azul) e frescas (vermelho) de ambas as espécies nas diferentes estações de coleta.....	63
Figura 20 – Agrupamento das espécies após a análise de PCO.....	64
Figura 21 - Seleção de variáveis independentes usando o GA-PLS (análise genética do quadrado parcial mínimo).....	65
Figura 22 – Cortes transversais da folha da <i>E. dysenterica</i> (A C E G) e da <i>E. pitanga</i> (B D F G) submetidos à fucsina básica azul de astra.....	67
Figura 23 – Cortes transversais da folha de <i>E. dysenterica</i> (A, C, E, G) e <i>E. pitanga</i> (B, D, F, H) submetidos à fucsina básica azul de astra.....	68

Figura 24 – Fotomicrografias da lâmina foliar de <i>E. pitanga</i>	70
Figura 25 – Histoquímica da lâmina foliar de <i>E. pitanga</i>	71
Figura 26 – Fotomicrografias da folha da <i>E. dysenterica</i>	72
Figura 27 – Compostos identificados por CLAE-EM em <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i> e compostos comuns entre as espécies.....	84
Figura 28 – Espectros gerados por infusão direta dos extratos brutos recém-preparados das folhas de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	85
Figura 29 – Localização dos cortes nas folhas de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i> para a realização de <i>Leaf spray</i>	86
Figura 30 – Espectros da <i>E. pitanga</i> em triplicata.....	87
Figura 31 – Espectros da <i>E. dysenterica</i> em triplicata.....	87
Figura 32 – Espectros de três folhas diferentes da <i>E. pitanga</i> em triplicata.....	88
Figura 33 – Espectros de três folhas diferentes de <i>E. dysenterica</i> em triplicata.....	88
Figura 34 – Espectros de ambas as espécies <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	90
Figura 35 – Fragmentação do íon – m/z 381.....	90
Figura 36 – Visão ampliada do pico m/z 381.....	91
Figura 37 – Proposta de fragmentação para o pico m/z 381.....	92
Figura 38 – Proposta de fragmentação do pico m/z	93
Figura 39 – Fragmentação do íon – m/z 206.....	94
Figura 40 – Proposta de fragmentação do íon m/z 206.....	94
Figura B1 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> . – Ácido gálico.....	163
Figura B2 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido protocatéquico.....	164
Figura B3 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Catequina.....	167
Figura B4 –Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Epicatequina.....	168
Figura B5 –Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido gentísico.....	169

Figura B6 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido cafeico.....	170
Figura B7 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido vanilínico.....	172
Figura B8 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido p-cumarínico.....	172
Figura B9 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Ácido ferúlico.....	174
Figura B10 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Rutina.....	174
Figura B11 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – quercetina.....	176
Figura B12 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Naringenina.....	177
Figura B13 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Luteolina.....	179
Figura B14 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia pitanga</i> – Kampferol.....	180
Figura B15 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido gálico.....	182
Figura B16 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido protocatéuico.....	183
Figura B17 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido gentísico.....	185
Figura B18 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Catequina.....	186
Figura B19 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Epicatequina.....	188
Figura B20 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido cafeico.....	189
Figura B21 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido vanilínico.....	191

Figura B22 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido p-cumarínico.....	191
Figura B23 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Ácido ferúlico.....	193
Figura B24 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Rutina.....	193
Figura B25 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Quercetina.....	194
Figura B26 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Narigenina.....	195
Figura B27 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Luteolina.....	197
Figura B28 – Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> – Kampferol.....	198

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies da família Myrtaceae mais comumente descritas na literatura com propriedades farmacológicas.....	23
Tabela 2 – Datas e estações das coletas das folhas de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	39
Tabela 3 – Características das reações para a detecção das principais classes de metabólitos nos testes histoquímicos.....	44
Tabela 4 – Rendimento dos óleos essenciais obtido após hidrodestilação das folhas de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	58
Tabela 5 – Numeração das amostras demonstradas nas figuras 18, 19 e 21, geradas após análise quimiométrica.....	60
Tabela 6 – Resultados qualitativos da análise histoquímica de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	69
Tabela 7 – Características dos extratos metanólicos e frações obtidas das folhas de <i>E. dysenterica</i> e <i>E. pitanga</i>	76
Tabela 8 – Dados da triagem fitoquímica de extratos e frações de <i>E. pitanga</i> e <i>E. dysenterica</i>	76
Tabela 9 – Compostos identificados na espécie <i>E. pitanga</i> e suas características.....	79
Tabela 10 – Compostos identificados na espécie <i>E. dysenterica</i> e suas características.....	81
Tabela 11 – Fórmula molecular atribuída aos íons detectados na <i>E. pitanga</i>	89
Tabela 12 – Fórmula molecular atribuída aos íons detectados na <i>E. dysenterica</i>	89
Tabela A1 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (Fresca) na estação Verão.....	114
Tabela A2 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (Seca) na estação verão.....	118
Tabela A3 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (fresca) na estação outono.....	121
Tabela A4 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (Seca) na estação outono.....	123

Tabela A5 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (Fresca) na estação primavera.....	125
Tabela A6 - Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. dysenterica</i> (Seca) na estação primavera.....	129
Tabela A7 – Composição dos óleos essenciais de <i>E. dysenterica</i> (Fresca) na estação inverno.....	133
Tabela A8 – Composição dos óleos essenciais de <i>E. dysenterica</i> (Seca) na estação inverno.....	137
Tabela A9 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (Fresca) na estação inverno.....	141
Tabela A10 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (Seca) na estação inverno.....	143
Tabela A11 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (Fresca) na estação verão.....	147
Tabela A12 – Composição dos óleos essenciais de <i>E. pitanga</i> (SECA) – estação verão.....	149
Tabela A13 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (seca) na estação primavera.....	152
Tabela A14 - Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (Fresca) na estação primavera.....	155
Tabela A15 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (seca) na estação outono.....	158
Tabela A16 – Composição dos óleos essenciais da espécie <i>E. pitanga</i> (fresca) na estação outono.....	160

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD - cromatografia em camada delgada
CG - Cromatografia gasosa
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CID – Dissociação induzida por colisão
CLAE-EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
DMAP - Difosfato de dimetil-alila
DXP - Fosfato de desóxi-xilulose
E. dysenterica - *Eugenia dysenterica* DC
E. pitanga - *Eugenia pitanga* (O. Berg) Nierd
EM - Espectrometria de massas
EM/EM - Espectrometria de massas sequencial
ESI - *Electrospray ionization*
FAA 50 - formaldeído, álcool etílico 50% e ácido acético glacial
FPP - Difosfato de farnesila
GA-PLS – *Genetic analysis – partial least squares*
GPP - Difosfato de geranila
IKC - Índice de retenção de Kovats
INMET - Instituto Nacional de Meteorologia
IPP - Difosfato de isopentenila
KI - Iodeto de potássio
LS - *Leaf spray*
m/z - Razão massa/carga
MVA - Mevalonato
NPP - Difosfato de prenila
OE - Óleo essencial
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCA - Análise das componentes principais
PCO - Análise das coordenadas principais
UFG - Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O CERRADO	21
1.2 A FAMÍLIA MYRTACEAE	23
1.3 O GÊNERO <i>EUGENIA</i> E AS ESPÉCIES <i>E. DYSENTERICA</i> DC. E <i>E. PITANGA</i> (O. BERG) NIED	25
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	27
1.5 TÉCNICAS PARA ESTUDOS QUÍMICOS E HISTOQUÍMICOS DE PLANTAS	30
1.5.1 Histoquímica de tecidos plantares	31
1.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas	33
1.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	34
1.5.4 Análises quimiométricas	34
1.5.5 Leaf spray	36
2 OBJETIVO GERAL	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 ETAPA PRÉVIA: COLETA, OBTENÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i>	39
3.1.1 Coleta do material vegetal	40
3.1.2 Obtenção dos óleos essenciais	41
3.1.3 Análise dos OE obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas	41
3.2 PRIMEIRA ETAPA: IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i> ..	42
3.2.1 Identificação dos constituintes químicos	42
3.2.2 Análise quimiométrica dos compostos identificados	42
3.3 SEGUNDA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i>	43
3.3.1 Estudo da anatomia vegetal foliar	43
3.3.2 Histoquímica foliar	44
3.3.2.1 Obtenção de cortes histológicos	44
3.3.2.2 Análise histoquímica	44
3.3.2.3 Fotomicrografias em microscópio óptico	51

3.5 TERCEIRA ETAPA: ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i> POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICA	54
3.5.1 Preparo dos extratos metanólicos brutos das folhas	54
3.5.2 Obtenção de frações básicas dos extratos metanólicos das folhas	54
3.5.3 Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	55
3.5.4 Análise dos extratos e frações por CLAE-EM.....	56
3.5.5 Análise por <i>Leaf Spray</i>.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
4.1 ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i>.....	59
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS OE.....	60
4.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS.....	60
4.4 ESTUDO DA ANATOMIA VEGETAL FOLIAR.....	66
4.5 ANÁLISE HISTOQUÍMICA.....	70
4.6 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE <i>E. PITANGA</i> E <i>E. DYSENTERICA</i> POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICA	76
4.6.1 Extratos metanólicos e frações obtidas das folhas	77
4.6.2 Classes químicas identificadas por CCD	77
4.6.3 Compostos identificados por CLAE-EM.....	78
4.6.4 Compostos identificados por <i>Leaf Spray</i>.....	85
5. CONCLUSÃO	97
6 REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A – Tabelas obtidas da identificação dos óleos essenciais de <i>Eugenia Pitanga</i> e <i>Eugenia Dysenterica</i>.....	114
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS E Espectros obtidos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas de <i>Eugenia Pitanga</i> e <i>Eugenia Dysenterica</i>.....	163
Anexo A – Temperaturas médias.....	202

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CERRADO

O Cerrado é um domínio brasileiro. Geograficamente, domínios são definidos como subdivisões biológicas que refletem as características funcionais e fisionômicas da vegetação (OXFORD, 2004). O Brasil possui cinco domínios, todos com grande biodiversidade, expressa por sua rica biota e grande sistema fluvial, também presentes no Cerrado (RYLANDS E BRANDON, 2005; MITTERMEIER et al., 1997; LEWINSOHN; PRADO, 2006).

O Cerrado está majoritariamente inserido no território nacional, o que o torna o mais brasileiro dos cinco domínios (MYERS et al., 2000). Ele possui pequenas áreas no norte do Paraguai e Nordeste da Bolívia e região do Alto Rio Paraguai (PROENÇA et al., 2000; FRANCO, 2008). No Brasil, o Cerrado ocupa o Planalto Central, as regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, prolongando-se por cerca de um quarto do território do país, sendo o segundo maior em extensão, superado apenas pela Floresta Amazônica (WALTER et al., 2008; BRASIL, 2018).

O Cerrado possui diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo. Ele abriga mais de 11.000 espécies de plantas nativas, incluindo 4.400 espécies endêmicas (MARRIS, 2005). A biodiversidade do Cerrado pode ser atribuída, entre outros fatores, ao seu clima predominantemente tropical sazonal (ADÁMOLI et al., 1986). Esse bioma apresenta basicamente duas estações: a estação seca, com duração de três a sete meses e a chuvosa, que dura o restante do ano, sendo que as chuvas acontecem de forma regular, com média anual entre 800-1800mm. Há grandes discrepâncias nas médias anuais de temperatura, sendo a variação diária entre 20 °C e 27 °C (NIMER; BRANDÃO, 1989; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004). Essas condições, associadas aos fatores edáficos, à ação do fogo, à topografia e à drenagem, são refletidas na grande variedade fisionômica desse domínio (FURLEY; RATTER, 1988).

A vegetação do Cerrado se apresenta como um tipo de cobertura vegetal bastante característico: rasteira, constituída principalmente por gramíneas, coexistindo com arbustos e árvores esparsas, baixas, tortuosas, de casca grossa, folhas largas e sistema radicular profundo (RODRIGUES; CARVALHO, 2001), como

pode ser observado na Figura 1. Essa vegetação está condicionada à fertilidade do solo, à irregularidade dos regimes pluviais e à frequência das queimadas. Ela é xeromorfa, ocorrendo preferencialmente em clima estacional (seis meses secos), podendo, não obstante, ser encontrada também em clima ombrófilo (muita chuva) (PEDRALI, 1997; FELFILI, 2003).

Figura 21 – Paisagem típica do domínio Cerrado.



Fonte: Calil Souza, Pensamento Verde, 2018.

A partir da década de 1970, houve a expansão da fronteira agrícola, o aumento do número de queimadas e do uso de defensivos agrícolas, prejudicando todos os domínios, inclusive o Cerrado, sendo que 48% de sua vegetação atualmente dá lugar a pastagens e lavouras, e cerca de 67% de toda a área foi altamente modificada (MITTERMEIER et al., 2005). Dessa forma, depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o que sofre o maior impacto humano e um dos mais ameaçados do mundo, fatores que o classificaram como um *hotspot*, isto é, uma região com alta concentração de espécies endêmicas ameaçadas de extinção (MYERS et al., 1988).

Em contrapartida, surge uma tendência de conservação dos recursos naturais que emerge mundialmente e passa pela conservação dos recursos do Cerrado (MYERS et al., 2000; KLINK; MACHADO, 2005; DINIZ et al., 2009). Nesse sentido, componentes da biodiversidade passaram a ser vistos como “tesouros de valor ainda

desconhecido”, refletindo uma carência de estudos científicos voltados à identificação de plantas medicinais no Cerrado (DURIGAN et al., 2011).

1.2 A FAMÍLIA MYRTACEAE

Dentre as diversas famílias de plantas que habitam o Cerrado, tem-se a Myrtaceae, a qual pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida e ordem Myrtales. Ela também se distribui pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América tropical e Austrália e poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas. É a oitava maior família de plantas com flores aromáticas (BARROSO, 1984).

Na América, esta família está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae, a primeira incluindo os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseudocaryophyllus* e *Syzygium*; e a segunda incluindo os gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Malaleuca* (THORNE, 1992; TYLER, 1999). A família Myrtaceae possui aproximadamente 140 gêneros e cerca de 3.600 espécies de arbustos e árvores. É uma das famílias mais importantes nas diferentes comunidades neotropicais (MORI et al., 1983) é frequentemente citada em estudos florísticos e fitossociológicos realizados nas diversas formações florestais do sudeste (RODRIGUES et al., 1989; PEIXOTO; GENTRY, 1990; FABRIS; CESAR, 1996), e em quase todas as formações vegetais relacionadas ao domínio Cerrado (KAWASAKI, 1989; PROENÇA, 1991; NIC LUGHADHA, 1996).

Várias espécies dessa família são conhecidas na cultura popular e algumas delas são mencionadas em monografias da Farmacopéia Brasileira IV e/ou da Organização Mundial de Saúde (OMS). Na Tabela 1, são mostradas espécies da família Myrtaceae mais comumente descritas na literatura como tendo propriedades farmacológicas, de acordo com levantamento bibliográfico realizado em artigos científicos nas bases de fonte Pubmed e Scielo realizado em 2019.

Tabela 5 – Espécies da família Myrtaceae mais comumente descritas na literatura com propriedades farmacológicas.

Espécie	Nome popular	Parte da planta e composição química	Propriedade farmacológica	Referência
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto	As folhas são ricas em óleo essencial (70% cineol)	Afecções do trato respiratório, expectorantes	FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2002; WHO, 2002.
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)	Cravo-da-índia	Os botões florais são ricos em eugenol	Aplicações externas ou locais - dor de dente e infecções na pele; Pastilhas - dor de garganta e tosses associadas ao resfriado comum	CHAIEB et al., 2007; FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2002; WHO, 2002.
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiabeira	As folhas jovens são ricas em taninos e óleo essencial	Diarreia infantil	FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2002; LORENZI; MATOS, 2002.
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitangueira	As folhas são ricas em taninos e óleo essencial	Febrífuga, antireumática e antidisentérica	FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003; LORENZI; MATOS, 2002.
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche)	Maleleuca	Óleo de melaleuca	Aplicações tópicas - desordens comuns da pele como, acne, furúnculos e micoses	WHO, 2002.

Fonte: elaborado pelo autor.

A composição química majoritária, encontrada nestas espécies, é formada por óleo essencial (OE) (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). No entanto, algumas espécies apresentam também taninos e flavonoides (OKAMURA et al., 1993), aos quais são atribuídas propriedades farmacológicas. Vários trabalhos têm relatado a presença de OE em diversas espécies de Myrtaceae, assim como suas atividades antifúngica (LEE et al., 2008), antimicrobiana (CORREA et al., 2019), cicatrizante (MAZZUTI et al., 2019), antioxidante (FIGUEIREDO et al., 2018), e para artrite e doenças autoimunes (COCK et al., 2019). Um estudo recente mostrou a toxicidade de uma espécie contra formas do mosquito *Aedes Aegypt* (BENELLI et al., 2018).

Aproximadamente um terço das espécies que compõem a família Myrtaceae pertencem ao gênero *Eugenia* e *Eucalyptus*, que são os mais estudados dessa família, principalmente no Brasil (GRATTAPAGLIA; VAILLANCOURT; MYBURG,

2012). No entanto, embora existam investigações em andamento, esses gêneros ainda apresentam espécies bastante ricas e com elevado potencial químico-biológico a serem investigadas.

1.3 O GÊNERO *EUGENIA* E AS ESPÉCIES *E. DYSENTERICA* DC. E *E. PITANGA* (O. BERG)

NIED

O gênero *Eugenia* é constituído por espécies de distribuição neotropical, as quais são encontradas desde o México e Flórida até o noroeste da Argentina, além de regiões da África e Austrália (DE SOUZA et al., 2018). No Brasil, há ocorrência, principalmente, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, com 350 espécies de árvores e arbustos (MCVAUGH, 1968; SOUZA et al., 2018).

Das espécies desse gênero, foram obtidos óleos essenciais, substâncias fenólicas, incluindo flavonoides e taninos, além de substâncias terpênicas (MAGINA, 2008). O gênero *Eugenia* é o quarto mais importante para o estudo dos óleos essenciais dentro da família Myrtaceae, após *Eucalyptus*, *Malaleuca* e *Psidium* (SOUZA et al., 2018).

Popularmente, as espécies desse gênero são utilizadas como antidiabética, antirreumática, antipirética, anti-inflamatória, antidiarreica, antifúngica e antibacteriana (SOUZA et al., 2018). A espécie *Eugenia dysenterica* DC. (Figura 2) é uma planta conhecida popularmente como cagaita ou cagaiteira, sendo utilizada para ornamentação, fornecimento de madeira, forrageira (DUARTE et al., 2006).

Figura 22 – *Eugenia dysenterica* DC.



Fonte: <http://www.viveiroipe.com.br/?mudas=cagaita-brava>

As folhas da *E. dysenterica* são empregadas na medicina popular como anti-diarréico (GALHEIGO et al., 2016; DE MORAIS CARDOSO et al., 2011). Um extenso espectro de atividades biológicas tem sido atribuído a essa espécie, sobressaindo a ação antioxidante (FIDELIS et al., 2018; DE ALMEIDA SIQUEIRA et al., 2013; CLEMENTINO et al., 2016), citotoxicidade (ROESLER et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; CECÍLIO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013), atividade anti-helmíntica (FONSECA et al., 2014), ação laxante (LIMA et al., 2010), antiviral (CECÍLIO et al., 2012), genotóxica (VIEIRA et al., 2012), gastroprotetora (PRADO et al., 2014) e atividade antifúngica associada à presença dos terpenos (*E*)-cariofileno, α -humuleno, limoneno, α -tujeno, α -terpinol e óxido de cariofileno de óleos essenciais (COSTA et al., 2000; SOUZA et al., 2002).

Os estudos químicos da *E. dysenterica* enfatizam tanto os polifénóis (DAS et al., 2014; BAILÃO et al., 2015; ÁVILA et al., 2016), com destaque para a variabilidade química, quanto os óleos essenciais das folhas (DUARTE et al., 2009; DUARTE et al., 2010; VILELA et al., 2012). Nos OE de *E. dysenterica* prevalecem os terpenos, cuja via biossintética é bem compreendida (LICHTENTHALER et al., 1999; DUDAREVA et al., 2005; KULHEIM et al., 2011; PADOVAN et al., 2014).

A composição de OE de *E. dysenterica* sofre variações influenciadas pelo ambiente, pela genética, sazonalidade e localização geográfica (DUARTE et al., 2009; DUARTE et al., 2010; VILELA et al., 2012). Estudos relataram a presença de linalool, α -terpineol, α -copaeno, γ -cadineno, β -cariofileno, δ -cadineno, α -humuleno, α -bulneseno, α -calacoreno, entre outros constituintes (OLIVEIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

Outra espécie do gênero *Eugenia* não tão estudada quanto a *E. dysenterica* é a *Eugenia pitanga* (O.Berg) Nied (Figura 3), conhecida popularmente como pitanga, que apresenta como sinônimos *Luma pitanga* (O.Berg) Nied Herter, *Eugenia dolichophylla* Kiaersk, *Eugenia montigena* Barb. Rodr., *Myrtus pitanga* (O.Berg) Kuntze *Eugenia camporum* Morong e *Stenocalyx pitanga* (O.Berg) (SOBRAL et al., 2015). A *E. pitanga* é habitualmente empregada para fins terapêuticos, em função de suas propriedades estimulante, antipirética, anti-diarréica e anti-reumática (LORENZI et al., 2002; FLORA DIGITAL, 2010).

Figura 23 – *Eugenia pitanga* (O.Berg) Nied.



Fonte: Foto cedida em cortesia pelo Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro

Até o momento foram encontrados apenas dois trabalhos com *E. pitanga*, sendo que no primeiro é investigada a composição monoterpênica das folhas frescas da planta, cujas sementes são oriundas do Paraguai, porém o cultivo se deu no Arizona (TUCKER et al., 2011). No segundo estudo, foi avaliada a composição do óleo essencial, também de folhas frescas, e sua atividade anti-leishimânica *in vitro* (KAUFFMANN et al., 2017).

Nesse contexto, há um campo aberto a novos estudos de *E. pitanga*, como, por exemplo, de identificação dos metabólitos secundários de acordo com a sazonalidade, o local de cultivo, a relação com a histoquímica, bem como da atividade biológica, dentre outros. Algumas destas lacunas foram contempladas neste trabalho.

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas produzem metabólitos primários e secundários, sendo que os primários são essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. Os secundários são produtos com estruturas altamente diversificada que expressam a individualidade de cada espécie e podem ser classificados em quatro grupos diferentes, de acordo com sua origem biossintética: alcaloides, fenilpropanoides, policetídeos e terpenoides (OSBOURN; LANZOTTI, 2009; DEWICK, 2009).

Os óleos essenciais (OE), componentes do metabolismo secundário, fazem parte da classe dos terpenoides e são produzidos por outras necessidades que não a nutrição, como, por exemplo, a atração de insetos para polinização (SANGWAN et al., 2001; SIQUI et al., 2000). Com base na Norma ISO 9235:2013 (NSAI, 2013), define-se OE como o produto obtido a partir de matéria-prima natural, por arraste a vapor, hidrodestilação ou, ainda, por processos mecânicos como a prensagem, dentre outros.

A produção de OE está incorporada à fisiologia do vegetal. Assim, a sua constituição e abundância dependem das ações de enzimas específicas que catalisam a formação dos compostos voláteis em um órgão, da fase de desenvolvimento e do estresse biótico e abiótico, como a relação ecológica onde a planta serve de alimento para um animal (herbivoria), ataques de fungos, bactérias, características do solo (acidez, basicidade e salinidade), umidade e temperatura, entre outros (SANGWAN et al., 2001).

Os óleos essenciais são gerados em sítios, no íntimo das células oleíferas, compartilhados pelas folhas da planta e acondicionados nos vacúolos, onde se localiza uma fração média de 0,26% do peso das folhas (BRAGA, 1971). São considerados constituintes sem alvo celular particular, ocorrendo em função de sua composição e diversidade molecular. Seu dispositivo de ação, por englobar moléculas lipofílicas, consiste em romper e/ou atravessar a membrana plasmática (KNOBLOCH et al., 1989; SIKKEMA et al., 1994; HELANDER et al., 1998). A concentração varia durante o ciclo circadiano e sazonal, órgão da planta, composição do solo, entre outros fatores abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2004; BAKKALI et al., 2008; TABASSUM; VIDYSAGAR, 2013). Os OE são constituídos por combinações que compreendem de diversos compostos orgânicos, de caráter lipofílico, voláteis, em alguns casos odoríferos e líquidos. Os componentes encontrados em maior concentração são os terpenoides e fenilterpenoides. Porém, podem ser encontrados fenóis, álcoois simples, cetonas, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre (SIMÕES-PIRES et al., 2005; TUREK; STINTZING, 2013).

Os terpenoides são compostos originários pela junção de duas ou três unidades de isopreno, formando compostos com 10 (monoterpenos), 15 (sesquiterpenos) e/ou 20 (diterpenos) átomos de carbono. Anteriormente, acreditava-se que existia somente uma via biossintética responsável pela formação de

precursores de terpenos, como o isopreno, ou seja, a via do mevalonato que envolve o ácido mevalônico como intermediário (SIMÕES et al., 2005; BAKKALI et al., 2008). Porém, foi descoberto que existe também a via do fosfato de desóxi-xilulose, que é preferencialmente utilizada para a síntese de hemiterpenoides (como o isopreno, por exemplo), monoterpênicos, diterpenoides, carotenoides e seus produtos, como citocinas, clorofila, tocoferóis e plastoquinonas (THOLL, 2015).

Em síntese, as vias do mevalonato (MVA) e a do fosfato de desóxi-xilulose (DXP) ocasionam a produção de difosfato de isopentenila (IPP), o precursor global dos terpenos (LICHTENTHALER, 1999; DUDAREVA et al., 2005). O IPP é isomerizado para difosfato de dimetil-alila (DMAP). Posteriormente, DMAP e IPP se aderem para formar difosfato de prenila (NPP). A rota MVA fornece IPP que é empregado na síntese do difosfato de farnesila (FPP), sendo empregados por sesqui- e triterpenos sintases, e posteriormente se estabelece no citosol (DUDAREVA et al., 2005).

A via do DXP gera IPP que é usado na síntese de difosfato de geranila e geranylgeranila, empregados por mono-, di- tetra-terpenos sintases, na devida ordem, e está situado no cloroplasto (LICHTENTHALER, 1999). Os difosfatos de prenila, originados pela conexão do DMAP e IPP, são bases das enzimas terpenos sintases, as quais integram uma grande categoria e catalisam a transformação de um conjunto de substratos em milhares de terpenos (WISE et al., 1998).

Na via biossintética, existem dois pontos que interferem no delineamento dos terpenos nos OE. Inicialmente, a fração de mono e sesquiterpenos é influenciada pela síntese de difosfato de geranila (GPP) e difosfato de farnesila, os precursores de mono e sesquiterpenos, respectivamente. Ambos são produzidos da mesma matriz, porém por enzimas específicas em diferentes seções celulares (DUDAREVA et al., 2005; KULHEIM et al., 2011; LICHTENTHALER, 1999). A variabilidade da eficácia dessas enzimas pode alterar a razão mono/sesquiterpenos (DEGENHARDT et al., 2009; MCCASKILL; CROTEAU, 1995). Posteriormente, o delineamento qualitativo dos terpenos pode sofrer influência da ação de terpenos sintases, com sítios catalíticos diferentes para a geração de uma cadeia de esqueletos terpênicos, e ainda algumas enzimas têm duas zonas envoltas em etapas diferentes na sequência de reações (KOLLNER et al., 2006), que são dependentes da concentração de metais bivalentes como cofatores enzimáticos (CROTEAU et al., 2005).

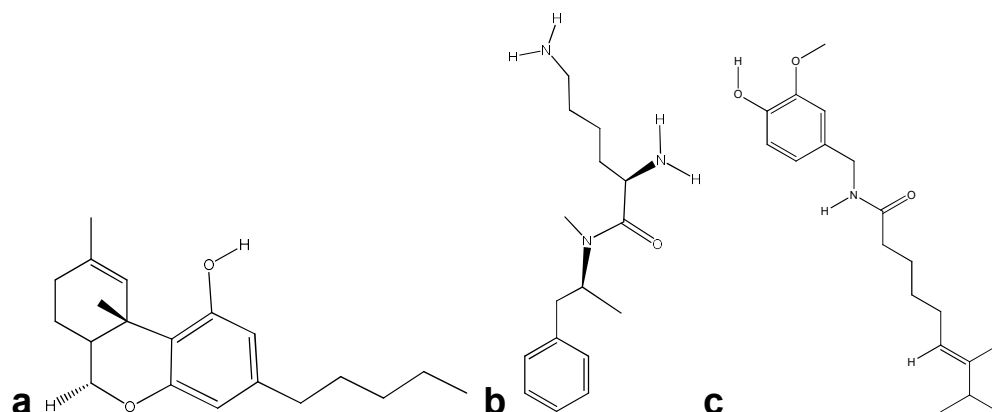
Os óleos essenciais e outros metabólitos das plantas são alvo de estudos e pesquisas em diversas áreas dentro da química e da biologia. Seu estudo é importante para a descoberta de novas atividades farmacológicas, assim como para a exploração comercial (WINK, 2015; ISMAN, 2011). Assim, desenvolveram-se técnicas aprimoradas de estudos químicos e histoquímicos de plantas, visando à averiguação da presença ou da ausência de determinados componentes, seu isolamento e identificação com detalhamento da estrutura molecular (BOURGAUD et al., 2001). Por meio desse detalhamento é possível saber exatamente quais são os metabólitos presentes em determinada planta e, assim, explorá-los do ponto de vista farmacológico e comercial.

1.5 TÉCNICAS PARA ESTUDOS QUÍMICOS E HISTOQUÍMICOS DE PLANTAS

Os metabólitos secundários são alvos de pesquisas que buscam conhecer e compreender os compostos bioativos e sua relação com as propriedades biológicas. Originários de formas de vida diversificadas, muitos apresentam ação biológica potente e fornecem ativos de medicamentos para o tratamento de doenças como o câncer, infecções microbianas, inflamação, rejeição de tecidos em transplante de órgãos, dentre outros. Apesar da sua importância, os constituintes químicos presentes em plantas medicinais nem sempre são conhecidos, o que desperta o interesse de pesquisadores de várias áreas como a Química de Produtos Naturais, a Botânica, a Farmacologia, dentre outras (MACIEL et al., 2002).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectrométricas, é possível identificar estruturas moleculares complexas de plantas, as quais eram difíceis de serem elucidadas. Assim, dispondo de ferramentas modernas, novas moléculas surgem na literatura, algumas com importante ação farmacológica, como, por exemplo, o dronabinol, a lisdexanfetamina e a capsaicina (Figura 4) (MISHRA; TIWARI, 2011).

Figura 24 – Estruturas químicas de a) dronabinol; b) lisdexanfetamina; e c) capsaicina



Fonte: PUBCHEM, 2018.

1.5.1 Histoquímica de tecidos plantares

A histoquímica é uma técnica de triagem *in situ* de compostos químicos em tecidos e células. Por ser uma técnica histológica que faz interface com a química, é amplamente utilizada em estudos de plantas medicinais, sendo útil para a triagem dos compostos em diversas partes da planta (HASSAN, 2013; FIGUEIREDO et al., 2007).

A aplicabilidade da histoquímica é ampla, variando desde avaliações de expressão de genes em plantas, de transformações enzimáticas a detecção da localização de compostos em tecidos de diversas partes da planta. No entanto, não é possível, por meio da histoquímica, identificar os compostos encontrados, mas apenas algumas de suas características, sendo necessária a aplicação de outras técnicas para a identificação (HASSAN, 2013; FIGUEIREDO et al., 2007).

Basicamente, as técnicas histoquímicas possuem duas etapas:

- Primeira: o material é preparado para atingir as características necessárias para a visualização das estruturas desejadas em microscópio óptico. Na maioria das vezes, o material não possui a espessura adequada para visualização, como, por exemplo, no caso das folhas de *E. dysenterica* e *E. pitanga*, as quais precisam ser submetidas a cortes de espessura fina para possibilitar a visualização em microscópio. Além disso, o material precisa ser fixado para a estabilização das moléculas, impedindo deslocamentos ou perdas;

- Segunda: procede-se à visualização das estruturas em microscópio óptico. Em alguns casos, as estruturas desejadas possuem coloração natural, mas, na maioria das vezes, como no caso dos lipídeos, necessita-se da aplicação de um corante biológico para que seja possível a visualização (FIGUEIREDO et al., 2007).

O corante biológico pode ser incolor ou possuir cor, orgânico ou inorgânico. Sua função é se ligar ao composto desejado e emitir uma coloração específica. A coloração ocorre devido à presença de um grupo cromóforo, que pode ser formado em uma ou duas etapas (FIGUEIREDO et al., 2007). Grupo cromóforo pode ser definido como um grupamento presente na molécula que é capaz de absorver seletivamente a radiação, ou seja, a luz transmitida corresponde àquela não absorvida e, por isso, a visualização de uma cor (FIGUEIREDO et al., 2007).

Cabe ressaltar que nem todos os processos pelos quais a cor é formada estão inteiramente elucidados; contudo, sabe-se que alguns grupos cromóforos atuam, possivelmente, como um sistema de ressonância, que vibra ao mesmo ritmo do comprimento de onda absorvido. Isso ocorre devido à presença de ligações duplas que apresentam maior tendência à ressonância (FIGUEIREDO et al., 2007).

Alguns grupos cromóforos já identificados possuem em comum a capacidade de se reduzirem, como, por exemplo, C=C, C=O, C=S, C=N, N=N, N=O e NO₂. Quanto maior a quantidade destes grupamentos presente na molécula, maior será a intensidade da cor e, conseqüentemente, quanto mais insaturado o composto, maior a variação do espectro de absorção (FIGUEIREDO et al., 2007).

Um grupamento importante na histoquímica são os auxocromos. Os auxocromos são capazes de intensificar a cor da molécula à qual se ligam. Eles são grupos funcionais com elétrons não ligantes na camada de valência, que normalmente não absorvem significativamente na região entre 200 e 800nm, mas que irão afetar o espectro do cromóforo ao qual se ligam (VERMA, 2018). Os auxocromos conhecidos atualmente são: -OH, -NH₂, -Cl, -COOH, -SO₃H. Quando os auxocromos se ligam ao cromóforo, há deslocamento da banda de absorção do cromóforo para comprimentos de onda mais elevados. Para a histoquímica, os auxocromos mais comuns são os ácidos sulfônico e carboxílico, os quais se ligam eletrostaticamente às bases, presentes nos tecidos (FIGUEIREDO et al., 2007).

Ao final da aplicação dos corantes e suas reações com as estruturas esperadas, pode-se observar a coloração emitida ao microscópio óptico e proceder

com as demais análises para identificação dos compostos presentes, sendo que a não emissão da cor significa ausência de determinado constituinte na planta, de acordo com a técnica (FIGUEIREDO et al., 2007).

1.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação muito útil e amplamente utilizada devido a sua sensibilidade e efetividade em separar componentes de misturas complexas (AL-RUBAYE et al., 2017). Nos últimos anos, a CG é amplamente utilizada em estudos de plantas medicinais e seu emprego nessa área se demonstrou interessante devido à característica volátil e de mistura complexa de OE, características que se adequam à técnica (AL-RUBAYE; HAMEED; KADHIM, 2017).

A cromatografia, sendo uma técnica de separação de misturas, precisa ser complementada por uma técnica de identificação de compostos, quando se deseja saber a estrutura do composto. Ela pode ser combinada com diversos sistemas de detecção, mas sua combinação com o espectrômetro de massas alia as vantagens da cromatografia, como seletividade e eficiência de separação, com aquelas da espectrometria de massas (EM), como obtenção de informação estrutural (CHIARADIA et al., 2008).

Vários estudos com plantas da família Myrtaceae utilizaram a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para a detecção de OE (BENELLI et al., 2018; GOODGER et al., 2018; DJEBIR et al., 2019; PETRACHAIANAN et al., 2019; TIETBOHL et al., 2019). Alguns estudos empregaram esta técnica para a análise de OE do gênero *Eugenia* (SANTOS, dos et al., 2018; BIDA et al., 2019)

Portanto, a CG-EM permite a separação de constituintes químicos presentes em uma amostra em mistura, bem como fornece picos referentes à razão massa/carga, que direcionam a identificação dos compostos. Tal fato torna a técnica bastante útil para análise de óleos essenciais. No entanto, a limitação desta técnica consiste em não ser aplicável à análise de compostos não derivatizados, como fenóis e flavonoides. Assim, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) é uma ferramenta relevante para a elucidação de compostos com tais características (GANZERA et al., 2018).

1.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

A CLAE-EM possui uma variabilidade de fases estacionárias e solventes e, por isso, se aplica à solução de quase todos os problemas. A utilização de um espectrômetro de massas acoplado, independentemente do tipo, aumenta a margem de especificidade, confere mais sensibilidade e possibilita a caracterização estrutural dos analitos. Assim, esta técnica pode ser utilizada para análises qualitativas e quantitativas de compostos conhecidos ou desconhecidos (GANZERA et al., 2018).

Apesar de já existirem alguns tipos de detectores aliados a *softwares* de CLAE que permitem a análise quantitativa dos componentes de misturas em concentrações extremamente baixas, essa análise é baseada nos índices de retenção. Assim, como o índice de retenção é característico de um composto, mas não é único, o ideal é a utilização de um sistema de identificação e análise qualitativa com espectrometria de massas acoplado (LANÇAS, 2009).

A utilização de CLAE-EM para análise de flavonoides e fenóis está bem estabelecida e foi descrita em diversas revisões (CHEN et al., 2011; SMYTH et al., 2012; TAYLOR et al., 2014; DE VILLIERS et al., 2016). Na família Myrtaceae, essa técnica foi utilizada para a detecção de fenóis antioxidantes em vinhos de frutas (NUENGCHAMNONG et al., 2009); e compostos antioxidantes (FIDELIS et al., 2018). Para o gênero *Eugenia*, a maioria dos estudos publicados identificou fenóis e flavonoides, em particular de *E. uniflora* (TAMBARA et al., 2018).

Assim, CLAE-EM se estabeleceu como um método que atende às necessidades de análise de extratos de plantas para análises de flavonoides e fenóis, que é um dos focos deste trabalho.

1.5.4 Análises quimiométricas

Frequentemente, a análise de OE de plantas por CG-EM ou outras técnicas análogas gera uma matriz de dados complexa e com grande quantidade de informações que, por vezes, obscurecem os dados relevantes para aquela amostra (PIERCE et al., 2012). Esses estudos resultam em matrizes, com a presença e possível abundância de cada componente, em uma determinada espécie, estação,

característica de extração, entre outras, formando, assim, uma enormidade de dados com maior e menor importância.

A exploração dessa matriz de dados complexa e extensa se dá por meio de ferramentas estatísticas, como as análises multivariadas (JONGMAN et. al.,1995), que reduzem os números de variáveis, com o mínimo de perdas, tornando possível detectar padrões de similaridade, entre as espécies, estações, forma da coleta e também classes de compostos. Os métodos multivariados são escolhidos com base nos objetivos intrínsecos da pesquisa. Assim, a escolha do método é crucial para otimizar os resultados, que são gerados na forma de hipóteses e não confirmações a respeito da amostra em análise.

A ordenação é um método, de redefinição de dados complexos (multivariados), no qual se organizam os dados de forma a mostrá-los em um número mínimo de dimensões, tornando palpável a identificação de padrões. Em uma análise das componentes principais (PCA) é possível interpretar a composição de um conjunto de dados multivariados, a partir das matrizes de variâncias-covariâncias ou de correlação entre os parâmetros considerados. Dessa forma, usando uma PCA, é possível otimizar dados qualitativos e quantitativos da amostra a fim de obter simplificada e as melhores respostas para o conjunto dos dados (PRADO et.al.,2002).

A análise das coordenadas principais (PCO) é uma difusão da PCA, em que os valores são obtidos de dados binários, como, por exemplo, o fato de ter ou não ter um determinado componente em uma amostra. Sua principal vantagem é que pode ser usada quando o conjunto de dados da matriz não é linear (JONGMAN et. al.,1995). Outro benefício do uso da técnica está em utilizar de medidas não necessariamente originais, mas de uma matriz de similaridade que pode respeitar dados qualitativos (MANLY et.al.,1994). Dessa forma, a PCO apresenta-se para o presente trabalho como uma excelente opção para gerar de forma minimalista condições de comparar diversos aspectos da amostra (presença de componentes em cada estação, em cada tipo de folhas seca ou fresca, classes de compostos e outras) (VICINI, 2005). Nesse sentido, a utilização da quimiometria tendo como base a análise multivariada é de extrema importância, pois contribui no tratamento dos dados para o melhor entendimento da relevância de cada variável (PIERCE et al., 2012).

A análise quimiométrica é dividida em várias etapas: a) processamento dos dados, com o objetivo de melhorar a acurácia e precisão da análise quantitativa e qualitativa; b) análise de alvos, que visa definir um pequeno número de analitos

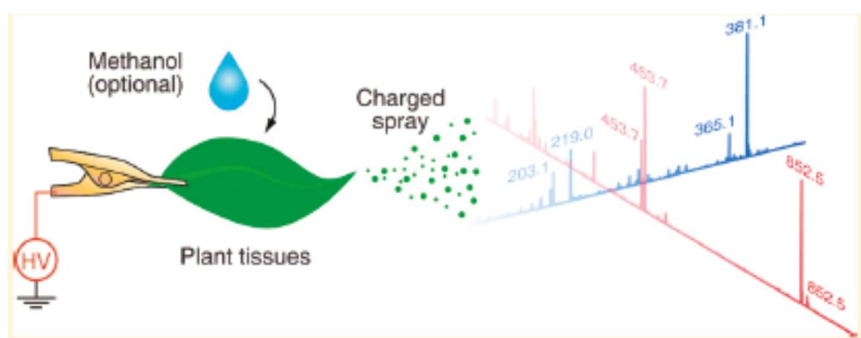
relevantes quimicamente, possibilitando, assim, o descarte dos demais dados. Porém, caso seja de interesse, pode-se utilizar um *software* que analisa todos os dados sem a exclusão de nenhum, o que é chamado de análise sem alvo (PIERCE et al., 2012).

1.5.5 Leaf spray

Leaf spray (LS) é uma técnica de ionização ambiente em que não há necessidade de processamento da amostra previa à sua análise. Essa técnica é considerada relativamente recente e se originou de outra técnica de ionização ambiente, chamada de *paper spray*, em que analitos ionizados são liberados em um *electrospray* quando um potencial elétrico é aplicado a um papel triangular umedecido com solvente, contendo a amostra (PEREIRA, 2017) (LIU et al., 2011).

Comparativamente, *leaf spray* é considerada mais simples que *paper spray*, já que não há a necessidade de adicionar a amostra a um substrato. Esta técnica tem alta aplicabilidade para plantas, principalmente folhas, de onde deriva-se o termo *leaf*, pois esta parte vegetal pode ser analisada diretamente, além de servir tanto como amostra quanto substrato (Figura 5).

Figura 25 – Esquema do *Leaf spray*



Fonte: Liu et al. (2011)

A emissão de partículas contendo compostos endógenos é adquirida cortando uma ponta do material plantar e aplicando um potencial elétrico. Se a planta possuir pontas naturais, como brotos ou espinhos, o corte não é necessário. O *spray* de gotículas carregadas transporta os compostos endógenos da planta para um espectrômetro de massas (LIU et al., 2011).

A vasta aplicabilidade da técnica de *leaf spray* a torna apropriada para análise de resíduos de pesticidas (MALAJ et al., 2012), tecidos biológicos (WANG et al., 2011), entre outras. Contudo, sua aplicação aos tecidos plantares é extremamente vantajosa devido a algumas características importantes da técnica, como operação contínua do equipamento por minutos, o que se adequa à instrumentação de espectrometria de massas (EM) *tandem* e medidas de massa exatas.

Diversos compostos já foram previamente identificados em plantas por meio de *leaf spray*, como aminoácidos, carboidratos, lipídios e alcaloides. Além disso, uma descrição da distribuição química de compostos em tecidos plantares já foi relatada (LIU et al., 2011; FREUND et al., 2018; ZHANG et al., 2013). Portanto, esta técnica tem se mostrado útil e aplicável à análise de metabólitos secundários, principalmente foliares, com resultados amplos e com alta resolutividade, e foi empregada neste estudo.

Diante do exposto, a utilização das técnicas químicas e biológicas disponíveis para o estudo das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* torna-se relevante, já que a primeira espécie não foi investigada da forma proposta aqui e a segunda comprovadamente apresenta riqueza de metabólitos secundários, pouco explorados até então.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral a análise química, histoquímica e anatomia das folhas de *Eugenia pitanga* (O. Berg) Nierd e de *Eugenia dysenterica* DC.

Como objetivos específicos, teve-se:

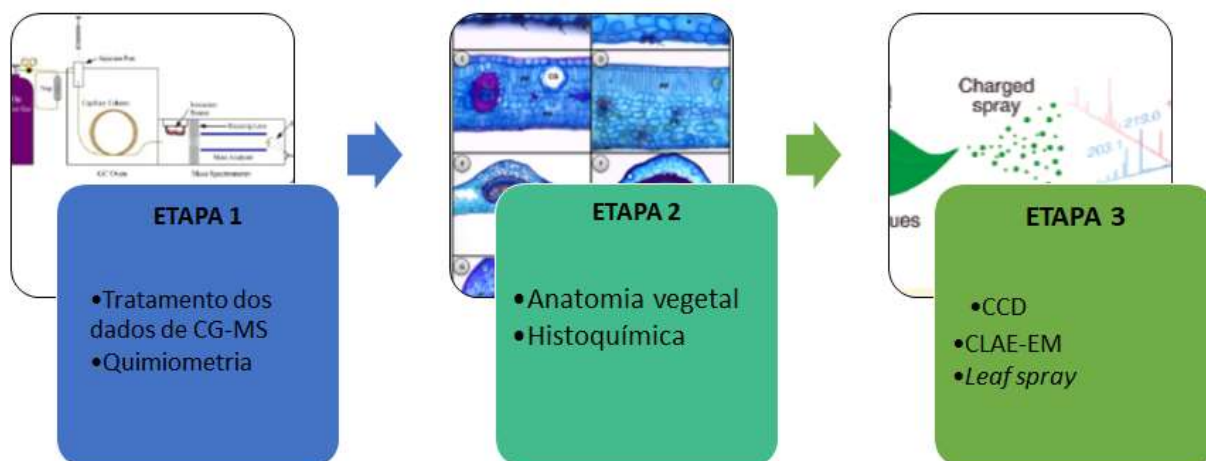
1. Avaliar a influência da sazonalidade na composição dos óleos essenciais de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.
2. Realizar estudos comparativos das classes químicas presentes em cada espécie, nas quatro estações e por meio dos métodos de extração (folhas frescas e secas).
3. Descrever a organização anatômica da lâmina foliar de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.
4. Identificar a posição das cavidades secretoras nas folhas das duas espécies, comparando-as em quantidade e tamanho.
5. Localizar *in situ*, os principais grupos químicos que ocorrem no tecido foliar de ambas as espécies.
6. Identificar os flavonoides presentes nas folhas de *E. dysenterica* e *E. pitanga*.
7. Identificar possíveis marcadores nas folhas e a similaridades dos compostos presentes nas espécies.

3 METODOLOGIA

Este estudo foi dividido em três etapas (Figura 6), as quais serão sumarizadas a seguir e detalhadas neste tópico. Previamente à realização do estudo, em uma etapa denominada de etapa prévia, foram realizadas coletas das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* nas quatro estações do ano, as quais foram extraídas, via hidrodestilação, e os OE foram obtidos e analisados por CG-EM.

Na primeira etapa, foi realizada a identificação dos constituintes presentes nos OE, bem como a análise quimiométrica e comparações pertinentes às espécies, aliadas às estações e modo de extração. Na segunda etapa, foi realizado o estudo da anatomia vegetal e histoquímica de *E. pitanga* e *E. dysenterica*. Os resultados encontrados na histoquímica motivaram a realização da terceira etapa, que consistiu no estudo químico das folhas por cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE-EM e *leaf spray*.

Figura 26 – Etapas de desenvolvimento do trabalho.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.1 ETAPA PRÉVIA: COLETA, OBTENÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA*

Esta parte do trabalho foi realizada nos anos de 2015 e 2016 no Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica (LaBiOrg) da UFG - *Campus* Catalão, pelas alunas

de Iniciação Científica Andréia Pereira dos Santos e Tainara da Fonseca Rosa, orientadas pela Profa. Dra. Vanessa G. P. Severino.

3.1.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram coletadas em Catalão (Goiás), sendo a primeira coletada na residência do Prof. Dr. Hélder N. Consolaro, botânico que identificou ambas as espécies, e a segunda nas dependências da Universidade Federal de Goiás. O cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado possui o número A844DD4. A exsicata de *E. pitanga* foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília, sob o código UB 297C; a exsicata de *E. dysenterica* foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás - Regional Goiânia.

Os dados das coletas das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 6 – Datas e estações das coletas das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.

Data da coleta	Temperatura média (°C) no momento da coleta	Estação do ano	Temperatura (°C) até ebulição (hidrodestilação)	Temperatura °C após ebulição (hidrodestilação)
30/03/15	25	Outono		
30/06/15	20	Inverno	95 a 98	80 a 85
05/10/15	27	Primavera		
22/01/16	24	Verão		

Fonte: elaborado pelo autor.

As variáveis climáticas foram representadas pelas médias mensais nos meses de coletas das amostras, de temperatura (°C) máxima, mínima e média, umidade relativa em (%), obtidas da Estação Catalão do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (Anexo A).

As amostras foram coletadas em quatro estágios fenológicos distintos: março de 2015, época em plena chuva e representando a fase vegetativa da planta; junho de 2015, época de seca em que a planta se encontra na fase de senescência; outubro de 2015, época de transição de clima seco-úmido, coincidente com a fase de frutificação; e janeiro de 2016, época em plena chuva com intensa fase vegetativa.

3.1.2 Obtenção dos óleos essenciais

As folhas coletadas nas condições descritas no item 3.1.1 foram limpas cuidadosamente com papel toalha e, posteriormente, picadas e pesadas. Uma quantidade de 70g foi imediatamente submetida à hidrodestilação para extração de OE; a outra parte foi levada à estufa para secagem a 40 °C por sete dias e, em seguida, 40g de material seco foi extraída por hidrodestilação.

O processo de hidrodestilação de cada amostra ocorreu em aparato do tipo Clevenger, utilizando-se 1L de água destilada, em um balão com capacidade de 2L. O sistema foi aquecido até entrar em ebulição com temperatura variando entre 95 e 98 °C; posteriormente, houve uma redução da temperatura do meio para 80 a 85 °C, mantendo-a nesta faixa por quatro horas. Cada hidrolato obtido foi submetido à extração líquido-líquido com diclorometano, na proporção de 1:1 v/v (solvente: hidrolato) por três vezes. O solvente foi volatilizado em capela de fluxo laminar e o OE armazenado em microtubo de polipropileno em local seco e refrigerado ao abrigo de luz até a análise. Desse processo, portanto, obteve-se OE de flores frescas e OE de folhas secas das quatro estações do ano.

3.1.3 Análise dos OE obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

Cada amostra obtida foi solubilizada em hexano e analisada em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies, 7820 A) acoplado ao espectrômetro de massas (MSD 5975, Agilent Technologies, EUA), utilizando coluna capilar de sílica fundida HP5 (0,25mm x 30m x 0,5µm de espessura do filme Agilent). O injetor, a interface e a fonte de ionização apresentaram, respectivamente, as seguintes temperaturas quadrupolares de 280, 230 e 150 °C. Gás hélio foi utilizado como transportador, apresentando fluxo de 1mL.min⁻¹. O volume de injeção de cada amostra foi de 1 µL. O gradiente de variação da temperatura da coluna foi 60°C por 4min, seguido de 3°C por min até 300 °C, com duração de corrida de 71 min. Os espectros de massas foram obtidos utilizando o modo de impacto de elétron a 70 eV. A análise foi conduzida em modo de varredura, com intervalo de massa/carga (m/z) de 40 a 450 e velocidade de 3,46 varreduras/s. Cada espectro de massas obtido foi armazenado no equipamento para posterior análise.

3.2 PRIMEIRA ETAPA: IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA*

Na primeira etapa do trabalho, os resultados obtidos na etapa prévia foram analisados e foi feita a identificação dos compostos desses óleos essenciais, assim como a análise quimiométrica. Essas etapas estão descritas nos itens seguintes.

3.2.1 Identificação dos constituintes químicos

Os constituintes químicos de cada amostra foram identificados por meio da comparação do seu espectro de massas com informações de referência do banco de dados do equipamento (NIST EPA/NIH), por meio do índice de retenção de Kovats (IKC), calculado a partir de uma série de *n*-alcanos C₈-C₃₀, e comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007; NIST virtual (<https://www.nist.gov/nist-virtual-library-0>), Pherobase (<http://www.pherobase.com/>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A quantidade de dados gerados foi extensa e por isso eles foram tabulados e submetidos à análise quimiométrica.

3.2.2 Análise quimiométrica dos compostos identificados

As análises quimiométricas foram realizadas pelo Prof. Dr. Anselmo Elcana de Oliveira, da Universidade Federal de Goiás (UFG) empregando o pacote *software* R versão 3.5.0.

Para melhor visualização dos dados, estes foram organizados em tabelas, em que identificaram-se todos os componentes da amostra em colunas e nas linhas foram distribuídas as espécies separadas em fresca e seca. Para a análise dos dados obtidos das amostras das folhas de ambas as espécies, com o objetivo de verificar as semelhanças e diferenças entre as amostras, aplicou-se o método quimiométrico de análise por coordenadas ordenadas principais.

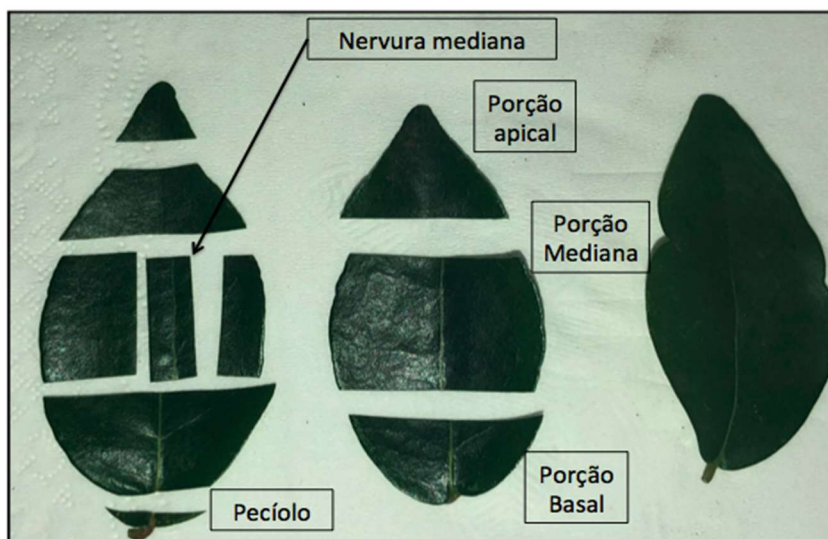
3.3 SEGUNDA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA*

Os estudos descritos neste tópico ocorreram no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas, sob a supervisão da Profa. Dra. Leticia de Almeida Gonçalves e contaram com a colaboração do discente Paulo Antônio Gonçalves de Jesus.

Inicialmente, a caracterização biológica das folhas de *E. dysenterica* e *E. pitanga* foi colocada como um dos objetivos deste trabalho com o intuito de conhecer as regiões das folhas de ambas as espécies que abrigam os óleos essenciais. No entanto, os resultados obtidos na histoquímica abriram caminho para novos horizontes e motivaram a realização da terceira etapa deste estudo.

Para todas as análises (anatômicas e histoquímicas), foram utilizadas as seguintes regiões da folha: mediana, borda central, mediana da base, borda da base, ápice e pecíolo (Figura 7).

Figura 27 – Regiões da folha utilizadas nas análises



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3.1 Estudo da anatomia vegetal foliar

Para a caracterização anatômica, as folhas de ambas as espécies foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, álcool etílico 50% e ácido acético glacial) por 48

horas (JOHANSEN, 1940) e estocadas em solução alcoólica 70% até o processamento.

Na caracterização anatômica, foram realizadas secções transversais à mão livre. Posteriormente, as folhas foram clarificadas em hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5% de cloro ativo) durante um intervalo de 5 a 7 min e, então, foi realizada a lavagem com água destilada por várias vezes. As secções transversais resultantes foram coradas com solução de azul de astra (0,3%) e fucsina básica (0,1%), de acordo com Kraus et al. (1997). As secções foram utilizadas para montagem de lâminas temporárias.

3.3.2 Histoquímica foliar

A histoquímica foliar de *E. dysenterica* e *E. pitanga* foi realizada em três etapas, quais sejam: obtenção das secções histológicas, análise histoquímica com os reagentes e posteriormente visualização e fotomicrografia no microscópio óptico. Essas etapas estão descritas a seguir.

3.3.2.1 Obtenção de cortes histológicos

Os testes histoquímicos foram aplicados em secções de amostra fresca, seccionadas transversalmente à mão livre, em pecíolo de embaúba ou isopor, selecionados com o auxílio de um pincel nº 2, marca tigre e/ ou pinça de aço inox, e colocados em placas de Petri de vidro (Ø5cm) juntamente com os reagentes previamente preparados para caracterização histoquímica.

3.3.2.2 Análise histoquímica

A análise histoquímica foi realizada com o intuito de observar de alguns metabólitos nas folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*. A metodologia utilizada nas análises foi realizada de acordo com Ascensão (2007), que ressalta a presença e averigua os sítios de reserva das substâncias químicas produzidas no metabolismo secundário das espécies.

Os metabólitos avaliados foram: lipídios, terpenoides, compostos fenólicos, alcaloides e polissacarídeos. A duração do contato entre as secções e os reagentes,

bem como a coloração esperada de cada reação, visando à detecção das principais classes de metabólitos, estão listadas na Tabela 3. Para todos os testes foi realizado um controle negativo em que a secção da folha era exposta à água para comparação com a secção exposta ao reagente, procedimento padrão.

Tabela 7 – Características das reações para a detecção das principais classes de metabólitos nos testes histoquímicos

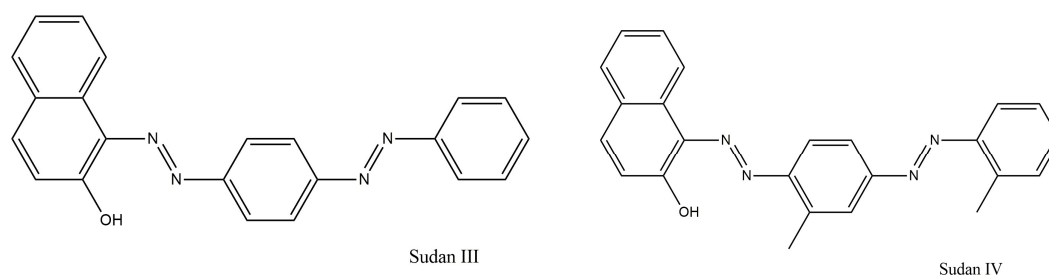
Classe de metabólito	Grupo de metabólito	Teste aplicado	Duração das secções nos reagentes	Coloração	Referência
Lipídios	Lipídios totais	Sudan III	15 a 30 minutos	Alaranjado	Pearse, 1982
		Sudan IV		Vermelho	
Terpenoides	Óleos essenciais e oleorresinas	Reagente de Nadi	1 hora	Azul (óleos essenciais) a vermelho oleorresinas	David e Carde, 1964
Compostos Fenólicos	Compostos fenólicos gerais	Cloreto férrico	15 a 30 minutos	Marrom a negro	Johansen, 1940
		Dicromato de potássio		Castanha	Gabe, 1968
	Taninos	Vanilina Clorídrica		Vermelho	Mace e Howell, 1974
	Lignina	Floro-glucinol	5 minutos	Rosa a vermelho	Johansen, 1940
Alcaloides	Alcaloides	Regente de Wagner	5 a 10 minutos	Castanho avermelhado	Furr e Mahlberg, 1981
		Regente de Dittmar			
Polissacarídeos	Amido	Lugol	5 a 10 minutos	Marrom, roxo ou negro	Johansen, 1940
	Pectinas	Vermelho de Rutênio	10 minutos	Rosa a vermelho	

Fonte: elaborado pelo autor.

A evidência de lipídios foi averiguada pela utilização de reagentes Sudan III e IV (naftóis arilazo-substituídos) (Figura 8) (JOHANSEN, 1940), e por não possuírem auxocromos, a coloração se deu por processo físico. Observou-se alto coeficiente de partição entre lipídio e solvente, devido à tensão superficial elevada da gordura, a qual

formou um bloqueio para reagentes aquosos, porém para os reagentes Sudan foi totalmente permeável.

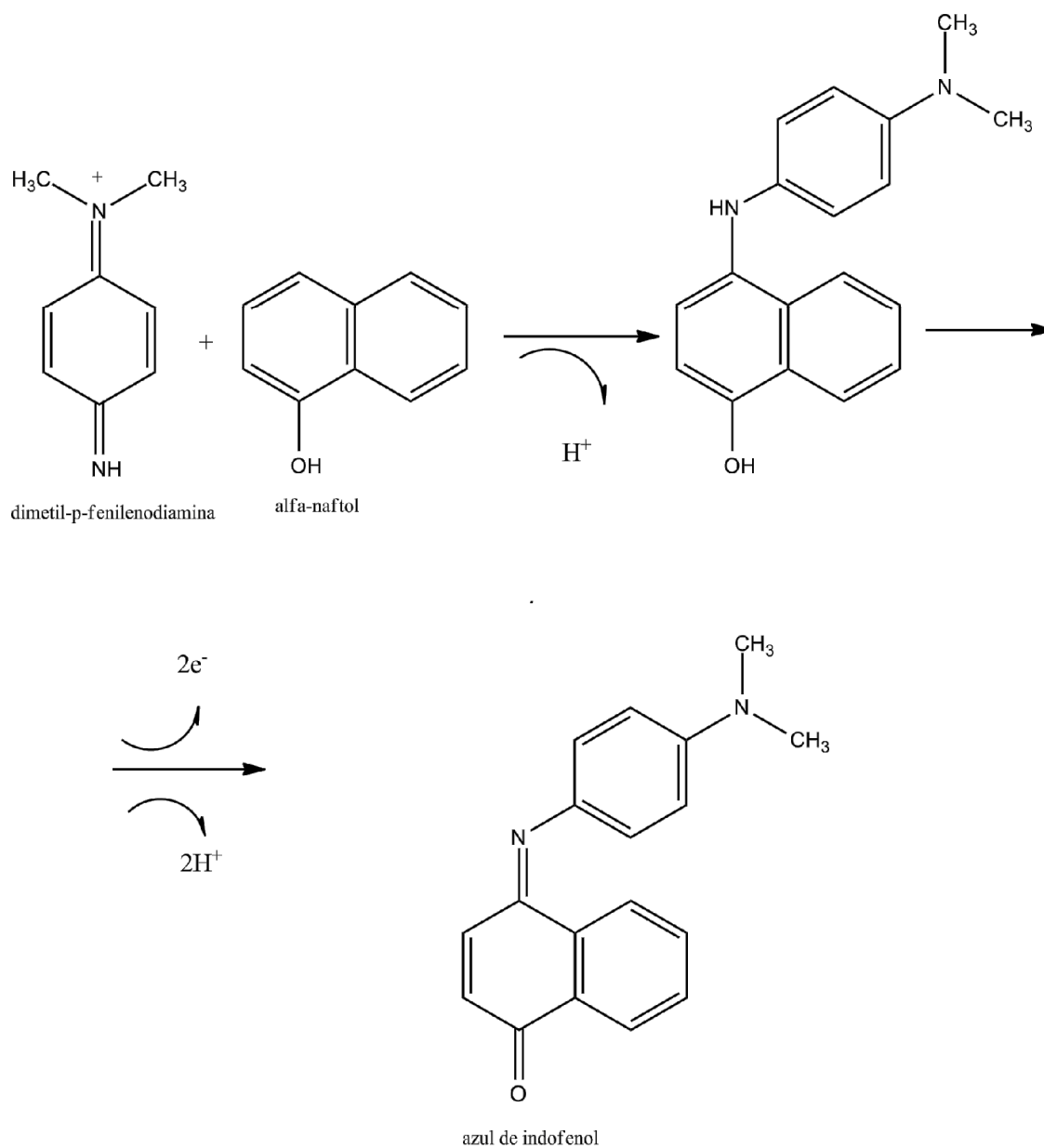
Figura 28 – Reagentes Sudan III e Sudan IV



Fonte: Ertas, OZer e Alasalva, (2007).

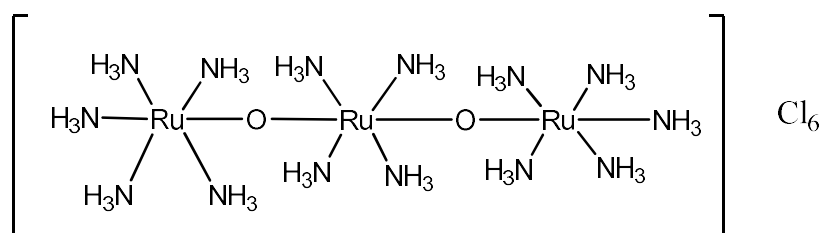
O reagente de NADI foi usado para evidenciar a presença de óleos essenciais e oleorresinas (DAVID; CARDE, 1964). Sua preparação ocorre pela mistura de α -naftol e o cloridrato de dimetil-*p*-fenilenodiamina, por reação de oxirredução, resultando em azul de indofenol (Figura 9), uma substância lipossolúvel que altera a coloração com a mudança de pH.

Figura 29 – Mecanismo da reação de formação do indofenol



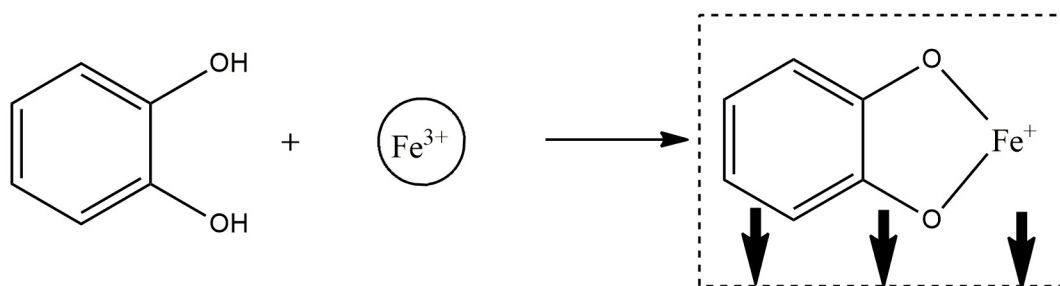
Fonte: Buchwalow, Boecker e Tiemann (2014)

O vermelho de rutênio (Figura 10) é um composto catiônico que reage com substâncias ácidas. Neste estudo, foi usado para constatação de pectinas e mucilagens (JOHANSEN, 1940).

Figura 30 – Vermelho de rutênio

Fonte: Silva e Guerra (2012).

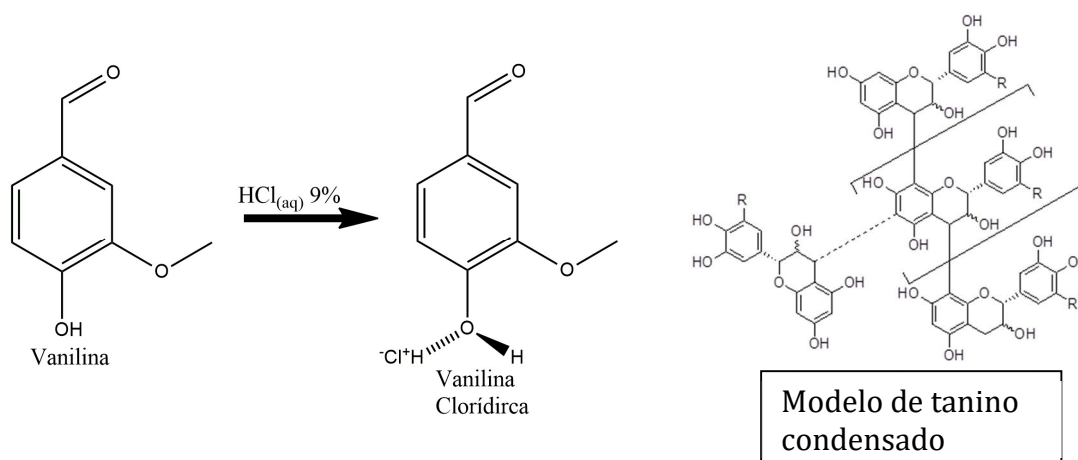
O cloreto férrico foi usado para detecção de fenóis, uma vez que compostos *orto*-diidroxifenóis se complexam na presença de Fe³⁺, formando precipitado (Figura 11). O dicromato de potássio também é usado para identificação de compostos fenólicos, o processo se dá pela liberação de íons de crômio em solução que, por meio do contato com as hidroxilas do meio sofrem uma condensação formando produto de coloração castanho-avermelhado (GABE et al., 1968).

Figura 31 – Mecanismo de detecção de fenóis

Fonte: Figueiredo et al. (2007).

A vanilina clorídrica foi usada para verificar a presença de taninos condensados (MACE; HOWELL, 1974) e seu mecanismo de ação se fundamenta na formação de uma estrutura condensada entre o aldeído, presente na vanilina, e os grupos fenóis dos taninos (Figura 12).

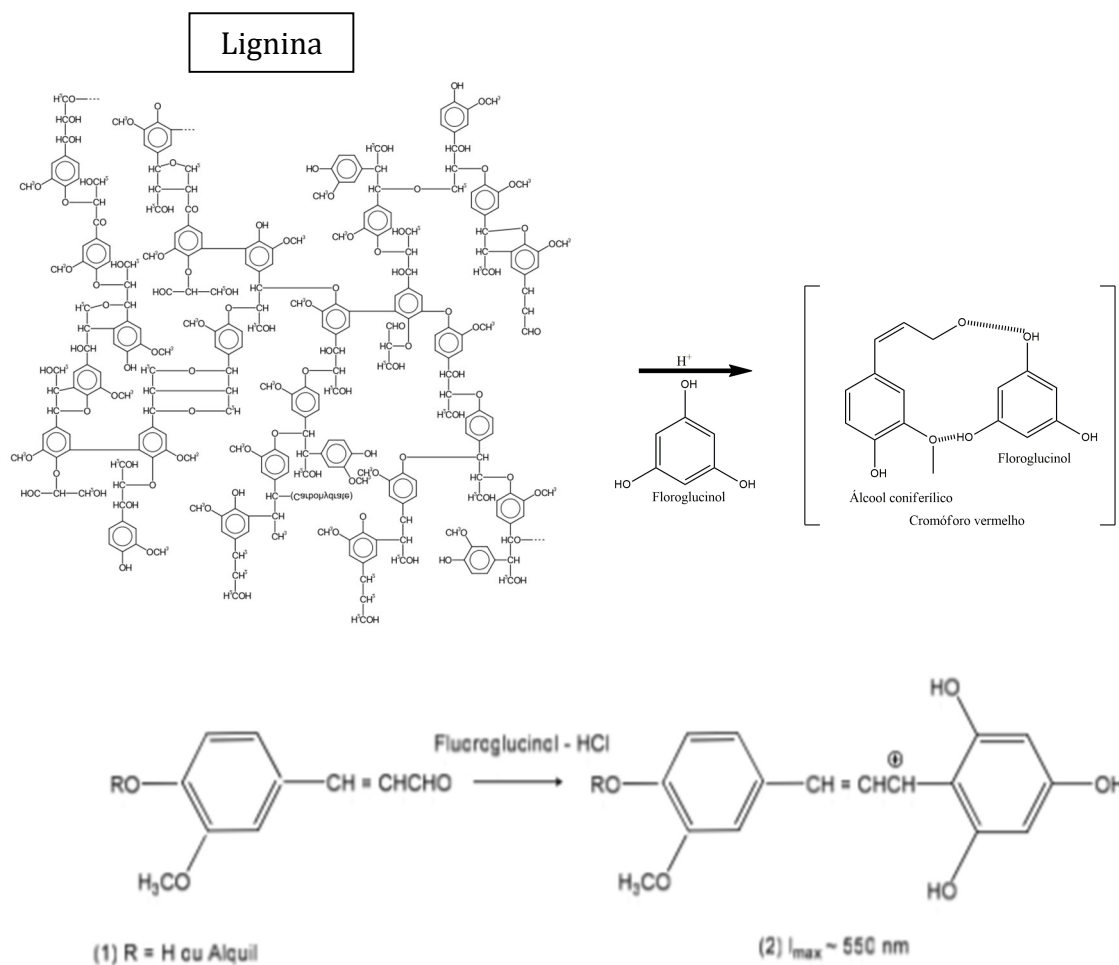
Figura 32 – Mecanismo para verificação de taninos condensados.



Fonte: Figueiredo et al. (2007).

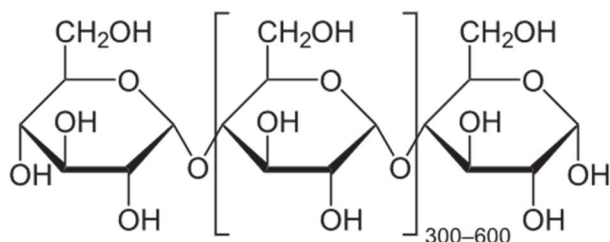
A lignina é um polímero de constituição baseada em unidades de fenilpropanoides (MORAIS, 1992) sendo um dos principais componentes dos tecidos dos vegetais. Os grupos coniferaldeído (1) estrutura constituinte da lignina reagem com o floroglucinol, em meio ácido, formando uma estrutura com coloração (2) (ADLER et al., 1948).

Figura 33 – Verificação de ligninas por floroglucinol.



Fonte: Figueiredo et al. (2007).

O amido é constituído por dois polímeros, a amilose e a amilopectina, sendo um dos principais compostos de reserva em plantas. Nas células vegetais, ele é armazenado em forma de grânulos insolúveis em água. Nas folhas, ele é sintetizado e armazenado nos cloroplastos e amiloplastos (AMARAL et al., 2007). Para sua identificação, foi utilizada solução de lugol, que é uma solução salina de iodeto de potássio (KI), (JOHANSEN, 1940). O processo de identificação se dá pela ruptura das interações por ligações de hidrogênio nas macromoléculas dos polímeros e subsequente separação de inúmeras unidades de glucose que reagem com o iodo na presença de iodeto, formando um complexo de cor azul intensa.

Figura 34 – Estrutura molecular do amido

Fonte: Figueiredo et al. (2007).

Os alcaloides fazem parte de um grande grupo de metabólitos secundários, acumulam-se nos vacúolos, das células epidérmicas e hipodérmicas e laticíferos (estruturas secretoras internas de uma planta). Podem se acumular longe do local onde foram sintetizadas, como a nicotina, que é sintetizada nas raízes, mas depois é transportada e acaba se acumulando nas folhas. Esses grupos sofrem precipitação por ação de oxiácidos, bases e sais de halogênio com metais pesados. Os reagentes de Wagner e Dittmar foram utilizados para verificar a presença de alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981).

3.3.2.3 Fotomicrografias em microscópio óptico

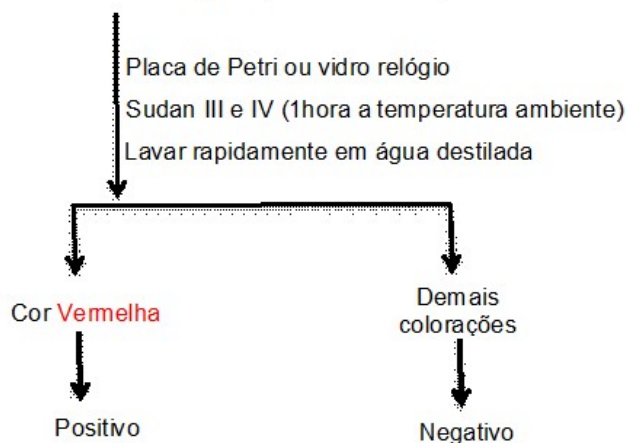
Após a inserção dos reagentes, as secções foram levadas ao microscópio óptico para realização das imagens. As fotomicrografias do material analisado em microscopia óptica foram realizadas em fotomicroscópio Leica, acoplado à câmera digital ICC50, com programa de captura LAZ EZ versão 3.4. As escalas presentes nas ilustrações foram obtidas nas mesmas condições ópticas.

Figura 35 – Representação esquemática da histoquímica

Esquema para metodologia de histoquímica

1º Detecção de lipídios (Sudan III e Sudan IV)

Cortes histológicos (material fresco)



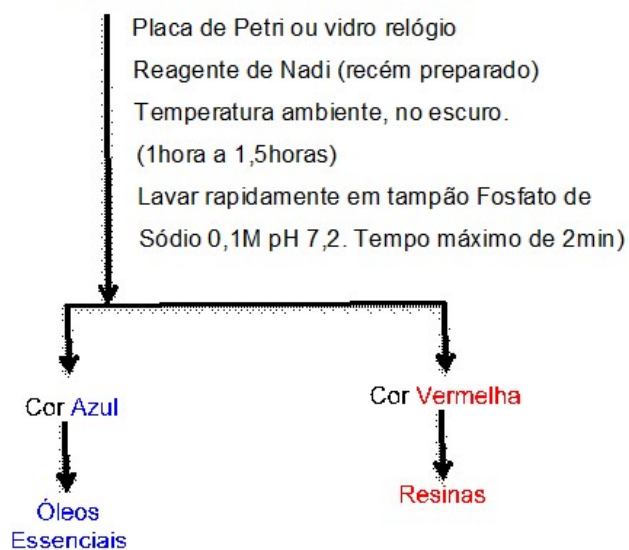
Preparo do Reagente:

Sudan III e IV - 3g
Etanol 70% - 100ml

- Aquecimento até a solução entrar em ebulição. Aguardar o resfriamento.
- Utilizar o sobrenadante.

2º Detecção de óleos essenciais e resinas (Reagente de Nadi)

Cortes histológicos (material fresco)



Soluções para preparo do Reagente:

Solução A: a-naftol 0,1% em etanol 40%.

Solução B: Cloridrato de dimetilparafenileno diamina 0,1% em água.

- Agitar a solução em agitador magnético, até a completa dissolução do reagente.

Solução C: tampão Fosfato de sódio 0,05M pH 7,2.

Solução D: tampão Fosfato de sódio

Reagente de Nadi:

Solução A: 0,5 ml

Solução B: 0,5ml

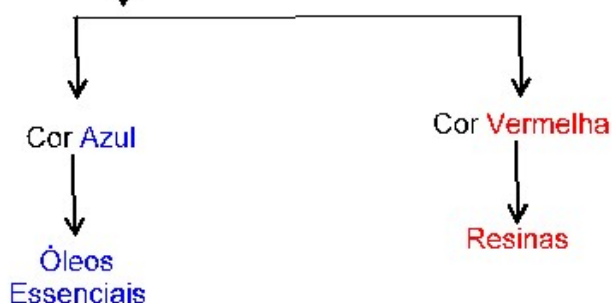
Solução C: 49ml

continua

3º Detecção de pectinas (Vermelho de Rutênio)

Cortes histológicos (material fresco)

Placa de Petri ou vidro relógio
Vermelho de Rutênio
Temperatura ambiente. (10min)
Lavar rapidamente em água.



Preparo do Reagente:

Vermelho de rutênio – 0,02g
Água - 100ml

- Agitar a solução em agitador magnético, até a completa dissolução do reagente.

4º Detecção de compostos fenólicos (Cloreto férrico, dicromato de potássio e vanilina clorídrica):

Cortes histológicos (material fresco)

Placa de Petri ou vidro relógio
Cloreto férrico a 10%.
Temperatura ambiente. (15 a 30 min)
Lavar rapidamente em água.



Preparo do Reagente:

Cloreto Férrico– 1g
Água - 10ml

- Agitar a solução, até a completa dissolução do reagente.

Cortes histológicos (material fresco)

Placa de Petri ou vidro relógio
Dicromato de Potássio a 10%.
Temperatura ambiente. (15 a 30 min)
Lavar rapidamente em água.

Castanho Avermelhado → Fenóis Cortes histológicos (material fresco)

Placa de Petri ou vidro relógio
Vanilina 5% em HCl a 9%.
Temperatura ambiente. (10 min)
Lavar rapidamente em água.

Taninos Condensados → **Vermelho a róseo**

Preparo do Reagente:

Dicromato de potássio– 1g
Água - 10ml

- Agitar a solução, até a completa dissolução do reagente.

Preparo do Reagente:

Vanilina– 0,5g
Ácido Clorídrico 9% – 100ml

- Agitar a solução, até a completa dissolução do reagente.

Fonte: elaborado pelo.

3.5 TERCEIRA ETAPA: ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA* POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICA

Após a realização da histoquímica, alguns resultados motivaram uma melhor investigação química dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*. Assim, procedeu-se com as fases descritas a seguir.

3.5.1 Preparo dos extratos metanólicos brutos das folhas

Para a realização desta etapa do trabalho, foram coletadas folhas dos mesmos indivíduos de *E. pitanga* e *E. dysenterica*, mencionados no tópico 3.2.1, no dia 05 de março de 2019. Em seguida, realizou-se a secagem do material vegetal de cada espécie, utilizando-se estufa de circulação, a 40 °C por 48h. Após este período, as folhas secas foram trituradas em liquidificador, pesadas e uma alíquota de 25g foi adicionada em um frasco de Erlenmeyer e extraída com 500 mL de metanol, em banho ultrassônico, a 45 °C, por 1h. Findado esse tempo, a amostra em metanol foi deixada em repouso por 23h, e posteriormente foi submetida ao banho ultrassônico por mais 1h. Após a extração, foi realizada a filtração a vácuo da solução, evaporação do solvente em rotaevaporador a baixa pressão, a 45 °C, obtendo-se o extrato metanólico das folhas para cada espécie vegetal.

3.5.2 Obtenção de frações básicas dos extratos metanólicos das folhas

Os extratos metanólicos de ambas as espécies foram submetidos à extração ácido-base (Figura 16) para obtenção de compostos nitrogenados, usando como base a metodologia descrita na Farmacognosia (2005).

A cada extrato foram adicionados 15 mL de uma solução de etanol absoluto/água (proporção de 1:1, v/v), seguido da adição de 5 mL de ácido clorídrico (1,0 mol/L), tornando o valor de pH próximo a 1. Depois de realizada a acidificação do meio, cada solução contendo o extrato bruto foi transferida para um funil de separação e extraída com 30 mL de cloreto de metileno, três vezes, obtendo-se a fração orgânica ácida após secagem do solvente.

Em seguida, a fração aquosa ácida resultante foi alcalinizada, empregando-se 100 mL de solução de hidróxido de amônio (1,0 mol/L), tornando a solução básica, com pH próximo a 11. Novamente, foi realizada a extração com cloreto de metileno, três vezes, obtendo-se a fração orgânica básica, após secagem do solvente.

Figura 36 – Extração líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*



Fonte: acervo do autor.

3.5.3 Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para prospecção dos compostos presentes em cada fração, em especial os nitrogenados, alíquotas destas amostras foram analisadas por CCD, empregando-se como fase estacionária a sílica gel com indicador de fluorescência e como fase móvel acetato/hexano (50v/v).

Após a eluição, as placas cromatográficas foram analisadas sob a radiação ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 365 nm, seguida pela revelação com reagente Dragendorff e cloreto férrico (1,5% em ácido clorídrico 0,5%). O reagente de Dragendorff foi preparado da seguinte maneira:

- Solução A: foram solubilizados 0,85 g de subnitrito de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água a temperatura ambiente.
- Solução B: foram solubilizados 20 g de iodeto de potássio em 50 mL de água.

Volumes iguais de solução de iodeto de potássio a 40% e de subnitrito de bismuto foram misturados; 1 mL dessa mistura foi diluído em 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água imediatamente antes do uso.

3.5.4 Análise dos extratos e frações por CLAE-EM

A análise dos extratos e frações de ambas as espécies foi realizada no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI), localizado no Parque Tecnológico Samambaia/UFG. Os espectros de massas foram obtidos no Cromatógrafo Líquido acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução, com coluna Agilent - C18 (4,6 x 100mm; 3 μ m), fonte H-ESI, operando em modo negativo e positivo, utilizando-se voltagem do *spray* de 3,5 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar de 350°C, temperatura de gás auxiliar de 250 °C, *tube lens* 55 e faixa de *m/z* de 150-700 e 250-1800.

A análise por CLAE foi realizada com água deionizada, acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (fase móvel A, v/v) e metanol acidificado com 0,1% ácido fórmico (fase móvel B – v/v).

A programação gradiente realizada iniciou com 93:07 (A:B %), 70:30 (A:B %) em 10 minutos, 50:50 (A:B %) em 5 minutos, 30:70 (A:B %) em 3 minutos, 20:80 (A:B %) em 2 minutos, 100 (B %) em 3 minutos, permanecendo por 3 minutos, 93:07 (A:B %) em 2 minutos, permanecendo por 2 minutos. O tempo de corrida foi 33 minutos com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹, volume injeção de 10 μ L e temperatura da coluna de 20 °C.

Para o estudo de fragmentação, foi utilizado o experimento de monitoramento de reações paralelas (do inglês *Parallel Reaction Monitoring – PRM*), com energias de colisão igual a 30 (NCE) no modo negativo, 30 e 50 (NCE) no modo positivo.

Para identificar compostos fenólicos, utilizou-se uma solução estoque com padrões em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹. A partir das soluções estoque, foi preparada a solução da mistura dos padrões na concentração de 50 μ g mL⁻¹. A análise para mistura dos padrões foi realizada nas mesmas condições das amostras. Os padrões de compostos fenólicos utilizados foram ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido elágico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, naringenina, luteolina e kaempferol, adquiridos da Sigma®. A tabela 4 (Anexo A) apresenta as

características dos padrões utilizados. Os dados foram processados no *software* Xcalibur™.

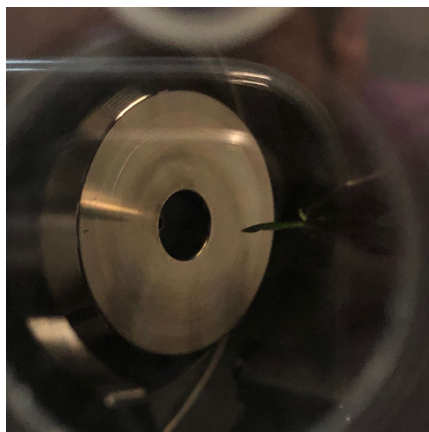
3.5.5 Análise por *Leaf Spray*

As análises foram realizadas no Grupo de Biossíntese do Instituto de Química da UNESP, em Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Maysa Furlan e contou com a colaboração do Me. João Luiz Bronzel Júnior.

Inicialmente, para a padronização do experimento, metade de uma folha (região central) de ambas as espécies, foi inserida em um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, ao tubo foi adicionado 1,0 mL de metanol grau de pureza HPLC. A folha foi macerada com o auxílio de uma ponteira de aço inox, previamente higienizada. Posteriormente, o tubo foi levado a uma mini-centrífuga (marca eppendorf, modelo mini Spin) por 30s, obtendo-se, assim, a solução de extrato metanólico, a qual foi diluída 50 vezes em metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. Após a padronização da análise, realizou-se o experimento de *leaf spray*, empregando-se o espectrômetro de massas ESI-IT-MS, em que a fonte de ESI foi modificada para permitir o experimento do *leaf spray* em modo positivo.

As folhas de cada espécie foram cuidadosamente selecionadas e limpas em ambos os lados, utilizando-se água Mili-Q, lenços de papel e etanol grau HPLC. Nessas folhas, foi realizado um corte, na forma de triângulo, de 1 cm de base e cerca de 1,1 a 1,5 cm de altura. O triângulo da amostra foi cuidadosamente segurado com uma garra adaptada e colocado a 8,0 mm da entrada do espectrômetro de massas (Figura 17). Em seguida, sobre a amostra, foram aplicados 10,0 µL de MeOH grau de pureza CLAE.

Figura 37 – Equipamento em operação com a amostra de *E. pitanga*.



Fonte: elaborado pelo autor.

A tensão aplicada na entrada do capilar de transferência foi de (-) 4500V com *end plate offset* de 500V. Na saída do capilar, foi utilizada uma voltagem de 140V. A faixa de aquisição dos espectros foi m/z 50-1000 Da. A vazão do gás responsável pela dessolvatação foi de $2,0 \text{ Lmin}^{-1}$, com temperatura de $250 \text{ }^\circ\text{C}$. O tempo máximo de acúmulo de íons no analisador foi de 50 ms.

Na aquisição dos espectros de EM/EM, realizada em modo Auto MS (exceto para infusão direta dos extratos nos quais a amplitude de fragmentação foi ajustada manualmente a fim de se obter maior intensidade dos íons produto), foi usada uma janela de isolamento $3,0 \text{ } m/z$ com *Target mass* de $500 \text{ } m/z$. A amplitude de fragmentação induzida por colisão (CID) foi variada de 0,4 a 4,0 V e o tempo de fragmentação foi de 200ms.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram identificados os compostos existentes nos óleos essenciais de *E. pitanga* e *E. dysenterica*, assim como realizada a histoquímica e anatomia vegetal dessas espécies, que demonstraram resultados motivadores à identificação de outros compostos por outras técnicas químicas. Os resultados encontrados em todas as etapas são expostos e discutidos nos itens a seguir.

4.1 ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA*

Após o processo de extração dos óleos essenciais a partir da massa inicial de 70g de folhas frescas e 20g de folhas secas de *E. dysenterica* e *E. pitanga* respectivamente, foi possível obter rendimento descrito na tabela 4 para as folhas coletadas em cada estação do ano.

Tabela 8 – Rendimento dos óleos essenciais obtido após hidrodestilação das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.

Estação da extração Data	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	30/03		30/06		05/10		22/01	
Folhas	Fresca	Seca	Fresca	Seca	Fresca	Seca	Fresca	Seca
<i>E. pitanga</i>	0,45	0,47	0,56	0,57	0,55	0,58	0,60	0,65
<i>E. dysenterica</i>	0,02	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	0,05

Fonte: elaborado pelo autor.

Tanto para *E. pitanga*, quanto para *E. dysenterica*, o maior rendimento encontrado ocorreu nas folhas secas coletadas no verão e o menor rendimento nas folhas frescas coletadas no outono. A *E. pitanga* apresentou rendimentos consideravelmente maiores que a *E. dysenterica* em todas as condições. Inúmeros fatores influenciam na produção de óleos essenciais por determinada planta. Entre esses fatores se encontram o estágio de desenvolvimento da planta, o sítio de produção do óleo essencial, a taxa de fotossíntese, a qualidade da luz recebida pela planta, as variações climáticas e sazonais e até mesmo fatores nutricionais da planta (SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, 2001).

Kauffman et al. encontraram um rendimento de 0,65% em folhas frescas de *E. pitanga* coletadas em março, que é exatamente o rendimento encontrado neste

trabalho, porém no mês de janeiro (KAUFFMANN et al., 2017). Costa et al. encontraram um rendimento de 0,15% de óleos essenciais extraídos de folhas frescas de *E. dysenterica*, corroborando com os dados deste trabalho.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS OE

Os compostos encontrados nos óleos essenciais de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram analisados por cromatografia gasosa, seguida de espectrometria de massas. Os compostos identificados para cada espécie foram separados dentre as quatro estações e encontram-se apresentados nas tabelas de A1 a A16 no Apêndice A.

4.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS

Os óleos obtidos das folhas da *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram caracterizados pela predominância de hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Também foram encontrados em quantidades relativamente baixas, quando comparado com as duas classes de hidrocarbonetos, monoterpenos, diterpenos, antraquinonas, cumarinas e naftoquinonas.

Tendo como base os dois grupos principais de compostos presentes nos óleos essenciais, foi possível encontrar pequenas características gerais de agrupamento. Em relação às folhas de *E. pitanga*, foi possível averiguar que em todas as estações a quantidade de sesquiterpenos identificados nas folhas frescas foi maior que nas folhas secas. Já nas folhas de *E. dysenterica* não houve uma frequência nos dados como relatado acima, porém as amostras destas folhas se mostraram mais ricas em variedades de classes.

Os dados obtidos foram compilados em planilhas, em que os componentes das amostras foram dispostos em coluna (respeitando a ordem alfabética) e nas linhas foram distribuídas as espécies separadas em frescas e secas (tabela 21). Uma matriz de 128 compostos diferentes (colunas) e 16 linhas foi gerada, dispondo as características de cada amostra (*E. pitanga* e *E. dysenterica*), dividida em quatro estações e dois tipos de folhas (fresca e seca).

Tabela 5 – Numeração das amostras demonstradas nas figuras 18, 19 e 21, geradas após análise quimiométrica.

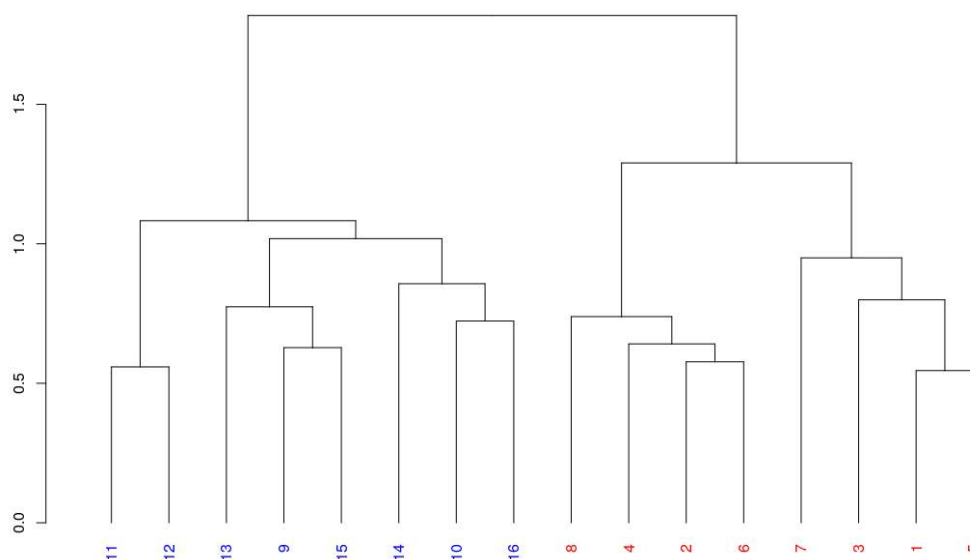
Amostra	Espécie – Estação de coleta – Tipo de Folha
1	<i>E. pitanga</i> – Primavera – Fresca
2	<i>E. pitanga</i> – Primavera – Seca
3	<i>E. pitanga</i> – Verão – Fresca
4	<i>E. pitanga</i> – Verão – Seca
5	<i>E. pitanga</i> – Outono – Fresca
6	<i>E. pitanga</i> – Outono – Seca
7	<i>E. pitanga</i> – Inverno – Fresca
8	<i>E. pitanga</i> – Inverno – Seca
9	<i>E. dysenterica</i> – Primavera – Fresca
10	<i>E. dysenterica</i> – Primavera – Seca
11	<i>E. dysenterica</i> – Verão – Fresca
12	<i>E. dysenterica</i> – Verão – Seca
13	<i>E. dysenterica</i> – Outono – Fresca
14	<i>E. dysenterica</i> – Outono – Seca
15	<i>E. dysenterica</i> – Inverno – Fresca
16	<i>E. dysenterica</i> – Inverno – Seca

Fonte: acervo do autor

A partir do tratamento dos dados, empregando-se um método quantitativo que levou ao agrupamento das espécies em função da similaridade dos compostos presentes na amostra, foram gerados dendogramas para exibir de forma simplificada e didática o comportamento das diferentes amostras.

O método foi escolhido por ser rápido, simples e suficiente para uma análise inicial dos dados. Gerando gráficos de simples análise, com um baixo nível de pré-processamento dos dados ou nenhum. O primeiro dendograma agrupou as espécies em dois grandes grupos separando a *E. pitanga* da *E. dysenterica* (Figura 18)

Figura 38 – Dendograma gerado com as similaridade entre as espécies *E. dysenterica* (azul) e *E. pitanga* (vermelho).



Fonte: Acervo do autor

O dendrograma foi formado após o agrupamento hierárquico das amostras. Cada traço vertical representa uma amostra. Cada traço vertical que conecta uma amostra a outra ou um grupo de amostra a outra, e assim sucessivamente, representa a semelhança entre essas amostras ou esses grupos, de forma que quanto menor o traço, maior é a semelhança. Essa semelhança foi designada de acordo com as características de cada amostra (composição dos óleos essenciais) avaliadas neste estudo. Assim, foi possível delimitar dois *clusters* (grupos) de amostras com características semelhantes.

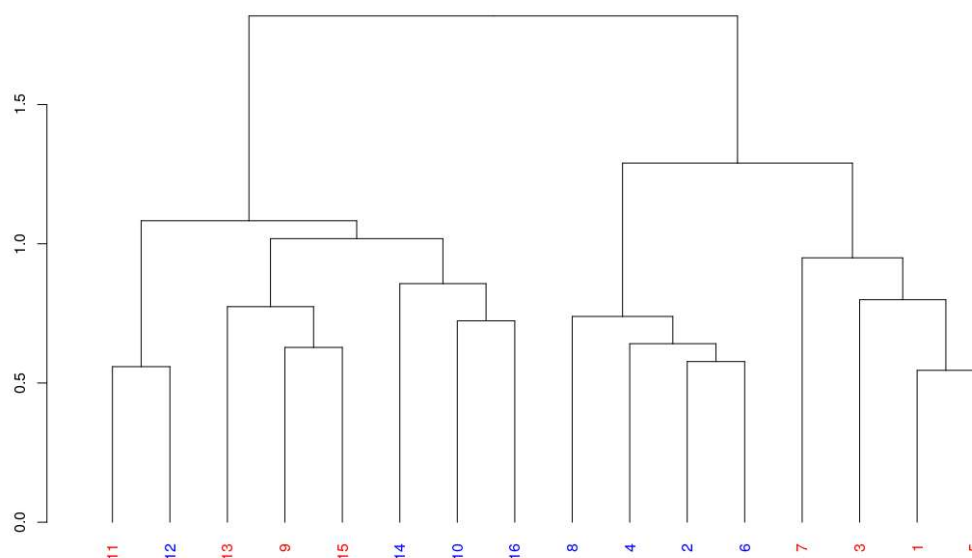
Com base nos dados analisados, foi possível estabelecer um padrão de similaridade entre as amostras de óleos essenciais. Houve divisão das duas espécies de plantas em dois eixos, demonstrando que cada uma se agrupava em um eixo, havendo assim uma considerável similaridade dentro de cada espécie. Para as amostras de *E. pitanga* houve uma divisão entre as folhas frescas (1, 3, 5 e 7) e as folhas secas (2, 4, 6 e 8). Porém, para as folhas de *E. pitanga* não houve a mesma similaridade, havendo a separação das folhas frescas e secas da estação verão. Contudo, foi mantido o padrão de agrupamento das folhas frescas (9, 13 e 15) e secas (14, 10 e 16) em dois grupos (cada um com três membros) das estações inverno, primavera e outono.

Analisando os dados de forma individualizada, para cada uma das espécies, primeiramente para as folhas da *E. pitanga*, foi possível perceber as seguintes relações. As folhas frescas, primavera (1) e outono (5) apresentaram maior similaridade dos compostos, em seguida o verão (3) agrupou a essas espécies e por último inverno (7). Nas folhas secas, foi respeitada a mesma sequência de agrupamento, houve uma maior similaridade entre as da primavera (2) e outono (6), em seguida houve o agrupamento do verão (4) e por último o inverno (8). Dessa forma, foi possível visualizar uma relação considerável entre os compostos presentes na primavera e outono independentemente do tipo de folha e que os compostos das folhas de inverno, independentemente do tipo de folha, são os mais discrepantes dos demais, tal fato pode ter ocorrido devido ao longo período de estiagem que o Cerrado é submetido nessa estação do ano.

Realizando a mesma análise para as folhas de *E. dysenterica*, foi possível verificar similaridade alta entre os componentes, nas amostras de folhas secas das estações primavera (10) e inverno (16), em seguida houve o acoplamento da amostra do outono (14). Nas folhas frescas, foi respeitado o mesmo padrão de agrupamento, houve uma maior similaridade entre as folhas das estações primavera (9) e inverno (15), em seguida houve o acoplamento da amostra do outono (14). A única amostra que extrapola o padrão, são as folhas frescas e secas da estação verão (11 e 12), que se apresentam mais similares entre si do que quando comparado as amostras de mesma característica (seca ou fresca) em outra estação de coleta, isso pode ter ocorrido devido ao aumento de forma significativa da pluviosidade nessa estação do ano.

Foi gerado um segundo dendograma para verificar a similaridade entre as folhas frescas e secas de ambas as espécies (Figura 19).

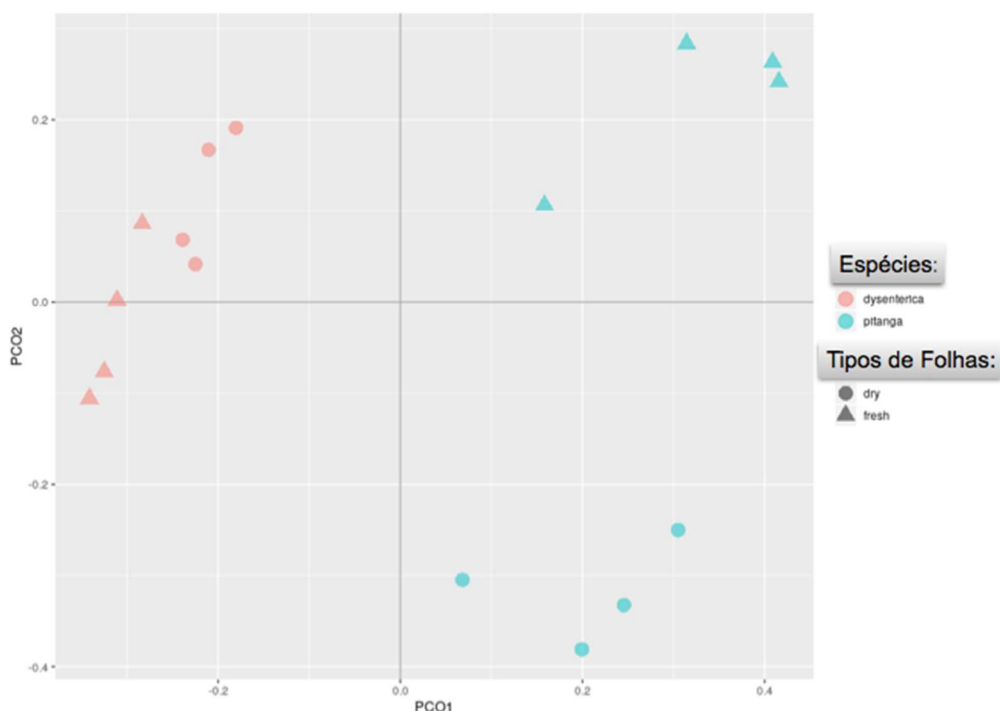
Figura 39 – Dendograma contendo as similaridade entre as folhas secas (azul) e frescas (vermelho) de ambas as espécies nas diferentes estações de coleta.



Fonte: acervo do autor

Por meio do dendrograma exposto acima, ficam mais evidentes as similaridades entre as folhas já descritas no texto. Considerando apenas as amostras da espécie *E. pitanga*, houve separação total em dois grandes grupos das folhas secas e folhas frescas. Já para as amostras da *E. dysenterica* essa separação não ocorreu da mesma forma, devido à alta similaridade dos compostos encontrados na estação verão independentemente do tipo de folha.

Aplicando o método PCO para a matriz de dados binária de cada conjunto de compostos de cada amostra, a separação entre as espécies e o tipo de folha pode ser melhor visualizada na figura 20.

Figura 40 – Agrupamento das espécies após a análise de PCO

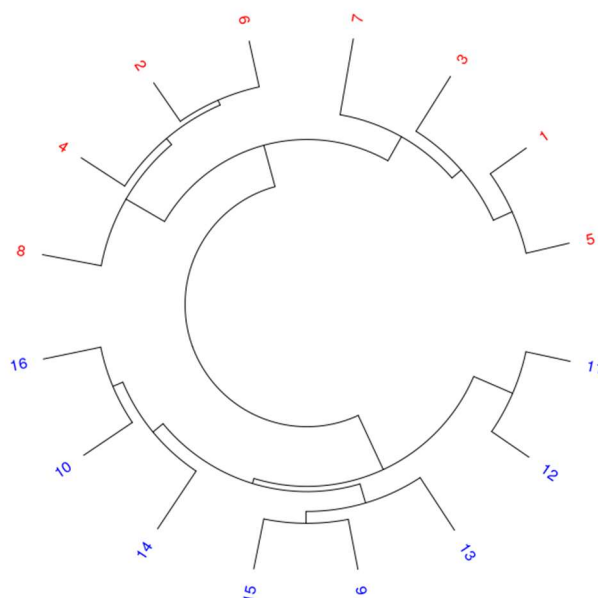
Fonte: acervo do autor

A análise de PCO, consiste em detectar dentro de um grande espaço amostral, uma direção que irá contemplar o maior número de informações referentes as amostras estudadas. Por meio das visualizações geradas em cada aspecto analítico da amostra no espaço formado pelas novas coordenadas principais, foi possível expressar as diferenças e semelhanças entre as amostras das espécies de *E. pitanga* e *E. dysenterica* com os dados das folhas secas e frescas.

Nas amostras das folhas de *E. pitanga* houve separação do tipo de folha, seca ou fresca, mostrando similaridade dentro de cada tipo de folha e divergências quando as folhas eram diferentes. Já para as amostras oriundas da *E. dysenterica*, não houve separação com a mesma precisão em duas partes do plano.

Usando o GA-PLS (análise genética do quadrado parcial mínimo) para a seleção de variáveis independentes, foram selecionados dez compostos, que funcionam como marcadores para as espécies, estação de coleta e tipo de folhas (Figura 21): (1) *apiole*, (2) *1,4-canadiene*, (3) *1-octadecanol, methyl ether*, (4) β -*elemene*, (5) *cadala-1(10),3,8-triene*, (6) *eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol*, (7) *geranyl- α -terpinene*, (8) *ledol*, (9) *murolan-3,9(11)-diene-10-peroxy* e (10) *nootkatone*.

Figura 21 - Seleção de variáveis independentes usando o GA-PLS (análise genética do quadrado parcial mínimo).



Fonte: acervo do autor

Pelo dendrograma apresentado, é demonstrada uma clara dependência dos compostos com as amostras das quatro estações e dos tipos de folha já relatados anteriormente.

Por meio do estudo quimiométrico dos óleos essenciais, foi possível visualizar um padrão de composição nas amostras em diferentes condições climáticas, principalmente na *E. pitanga*, uma vez que o padrão não se repetiu com a mesma acurácia com a *E. dysenterica*. Isso pode ter ocorrido devido as condições em que ambas as plantas estão submetidas, uma vez que a *E. pitanga* é uma planta domesticada e a outra não. Assim, efeitos como radiação solar, umidade e temperatura a que foram expostas são diferentes podendo ter influenciado na composição dos OEs das diferentes amostras.

4.4 ESTUDO DA ANATOMIA VEGETAL FOLIAR

As folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* possuem epiderme uniestratificada (Figuras 22A-B), recobertas por uma cutícula espessa em ambas as faces. Os

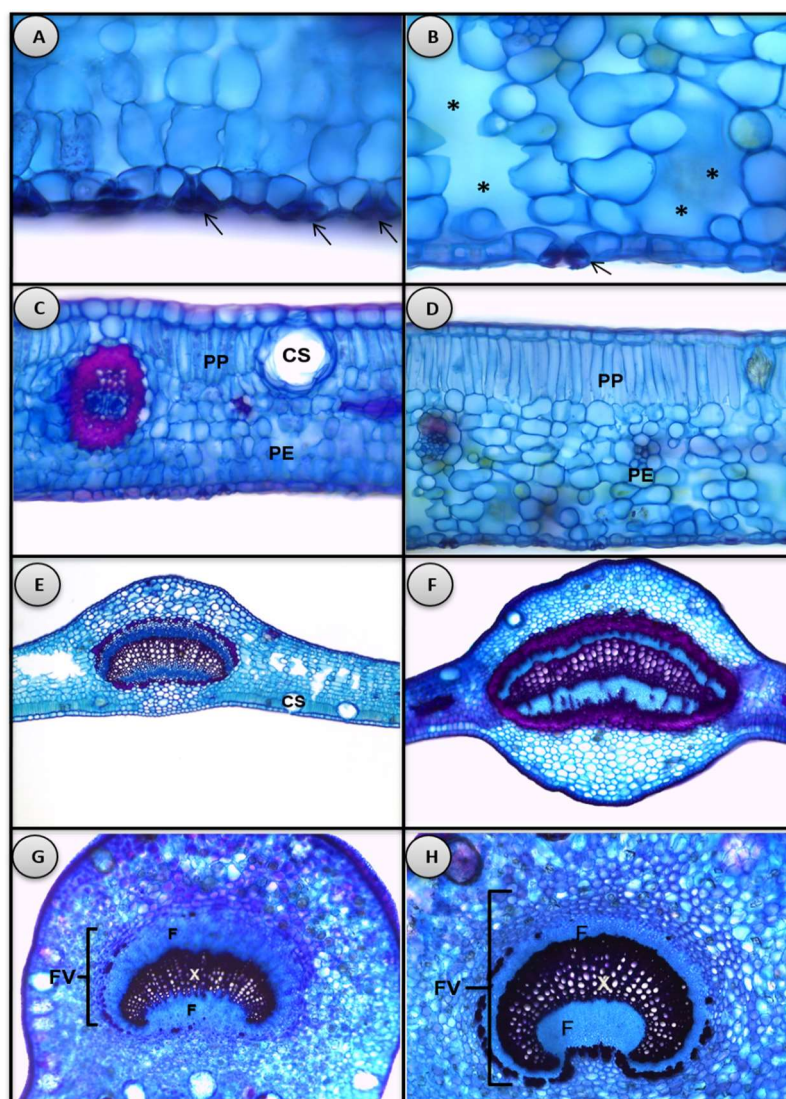
estômatos ocorrem apenas na face abaxial e localizam-se no mesmo nível das células epidérmicas (Figuras 22A-B). Ademais, estas folhas possuem mesofilo dorsiventral.

Entretanto, há a ocorrência de uma camada de parênquima paliádico na folha de *E. pitanga* e duas camadas nas folhas de *E. dysenterica*, sendo a primeira camada formada por células mais alongadas que a segunda (Figuras 22C-D). O parênquima esponjoso é formado por quatro a sete camadas de células em *E. dysenterica* e nove a onze camadas em *E. pitanga*, onde espaços intracelulares são visualmente maiores do que aqueles visualizados em *E. dysenterica* (Figuras 22CD). Cavidades secretoras ocorrem por toda a extensão do mesofilo (Figuras 22C-D).

Para ambas as espécies, a nervura central das folhas (Figuras 22E-F) é composta por parênquima, onde estão distribuídas cavidades secretoras, e por um feixe vascular na forma de um arco aberto. Em *E. dysenterica*, as fibras pericíclicas contornam completamente o feixe; em *E. pitanga* as fibras formam calotas associadas ao xilema e floema para dentro do parênquima (Figuras 22E-F).

No pecíolo de ambas as espécies há um único feixe vascular concêntrico (Figuras 22G-H), formando um arco em que as margens são dirigidas para o centro. Para dentro da epiderme ocorre parênquima e cavidades secretoras.

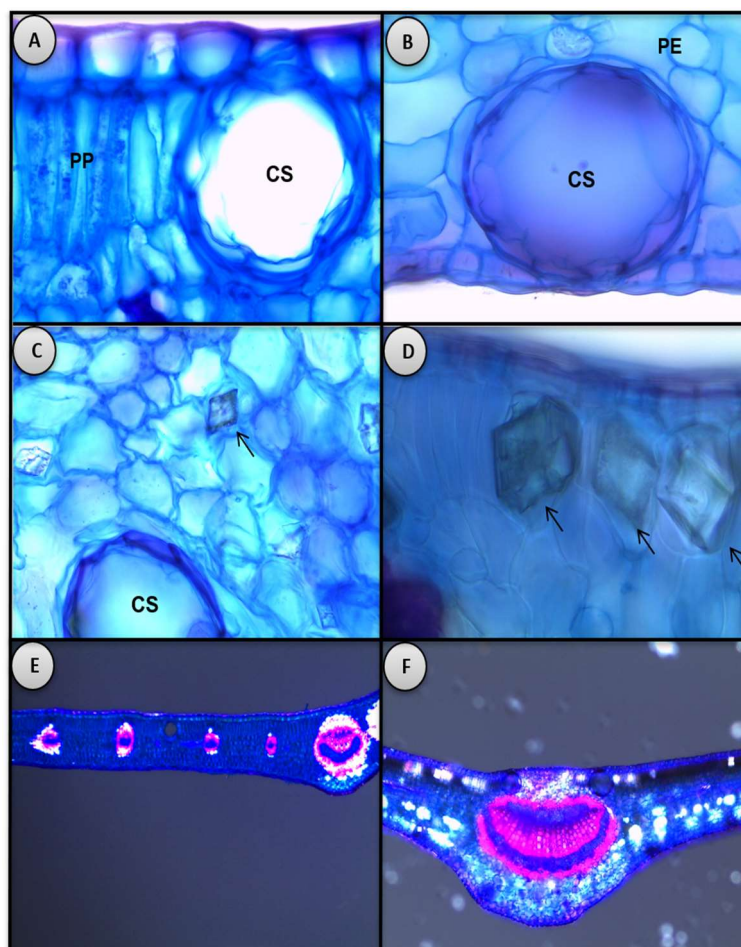
Figura 22 – Cortes transversais da folha da *E. dysenterica* (A C E G) e da *E. pitanga* (B D F G) submetidos à fucsina básica azul de astrá.



Legenda: (A e B) estômatos localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas (seta); (B) estômatos (seta) e câmara subestomática (asterisco); (C) mesófilo dorsiventral com cavidade secretora e feixe vascular; (D) detalhe do dorsiventral; (E) região central da lâmina foliar; (F) detalhe da região da nervura central, evidenciando o feixe bico mesófilo lateral; (G) região central do pecíolo evidenciando feixe vascular bicolateral; (H) detalhe do pecíolo com feixe vascular bicolateral. As setas e colchetes indicam as estruturas descritas. PP – parênquima paliçádico; PE - parênquima esponjoso; CS – cavidade secretora; X – xilema; F – floema; FV – feixe vascular. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As cavidades secretoras são formadas, nas folhas de ambas as espécies, por epitélio secretor unisseriado (Figuras 23A-B). Drusas e cristais prismáticos (Figuras 23C-D, setas) ocorrem em idioblastos presentes no mesófilo e, mais frequentemente, associados aos feixes vasculares (Figuras 23E-F), ocorrendo também em grande quantidade na nervura central e no pecíolo das folhas de ambas as espécies.

Figura 23 – Cortes transversais da folha de *E. dysenterica* (A, C, E, G) e *E. pitanga* (B, D, F, H) submetidos à fucsina básica azul de astra.



Legenda: (A-B) cavidade secretora; (C-D) cristais prismáticos (setas); (E-F) nervura central com luz polarizada indicando cristais. As setas indicam as estruturas descritas. PP – parênquima paliçádico, PE - parênquima esponjoso, C.S – cavidade secretora. As setas indicam as estruturas descritas anteriormente. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.5 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Os resultados da análise histoquímica de ambas as espécies são apresentados, de forma qualitativa, na Tabela 22.

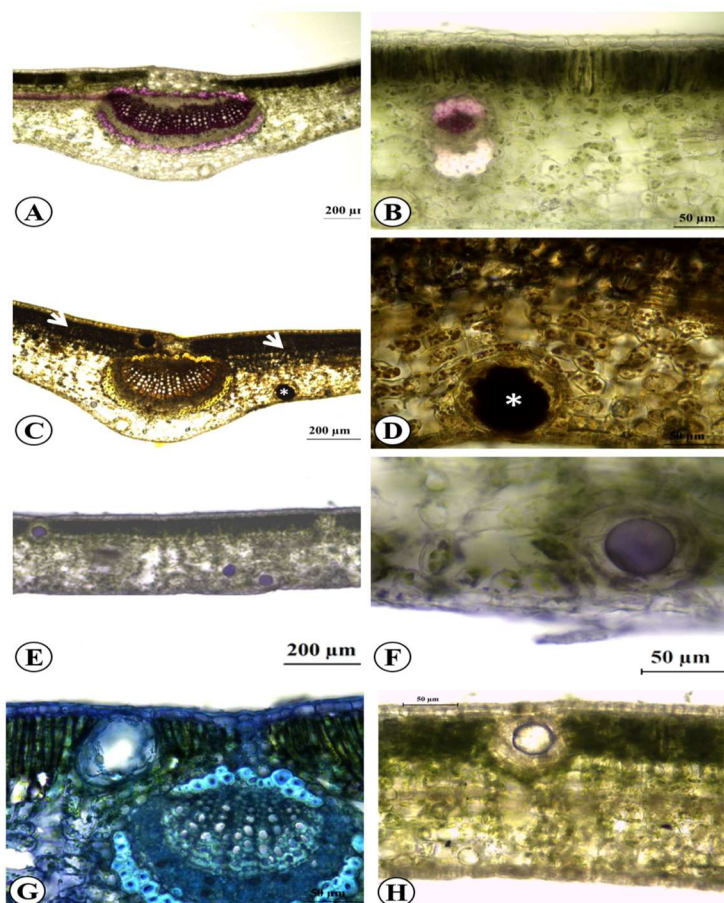
Tabela 6 – Resultados qualitativos da análise histoquímica de *E. pitanga* e *E. dysenterica*

Reagente	<i>Eugenia pitanga</i>	<i>Eugenia dysenterica</i>
Sudan III	+	+
Sudan IV	+	+
Reagente de NADI	+	+
Vermelho rutênio	-	-
Cloreto férrico	+	+
Dicromato de potássio	+	+
Vanilina clorídrica	-	-
Floroglucinol	+	+
Lugol	+	+
Reagente de Wagner	+	-
Reagente de Dittmar	+	-

Legenda: (+) - positivo, (-) – negativo. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As análises histoquímicas realizadas com a folha de *E. pitanga* evidenciaram a bainha esclerenquimática que circunda o feixe vascular principal da lâmina foliar lignificado, utilizando-se o floroglucinol ácido (Figura 24-A). Pelo emprego deste reagente, ainda foi possível evidenciar um conjunto de células lignificadas (Figura 24-B). Na lâmina foliar, detectou-se amido na região adaxial e dentro da cavidade secretora (Figuras 24-C e D), pelo uso do lugol. A presença de bolsas de óleos essenciais em ambas as faces da lâmina foliar foi comprovada pelo uso do reagente de Nadi (Figura 24-E). Com uma maior aproximação, foi possível evidenciar a presença das substâncias resiníferas na cavidade secretora (Figura 24-F). O azul de toluidina foi utilizado para evidenciar detalhe na cavidade secretora com epitélio secretor, bem como diferença nos compostos fenólicos, sendo que as ligninas, compostos estruturais e os compostos não estruturais apresentaram diferenças nas tonalidades do verde (Figura 24-G). O vermelho de rutênio foi utilizado para evidenciar pectinas e mucilagem, porém o resultado deu negativo para este teste (Figura 24-H).

Figura 24 – Fotomicrografias da lâmina foliar de *E. pitanga*.

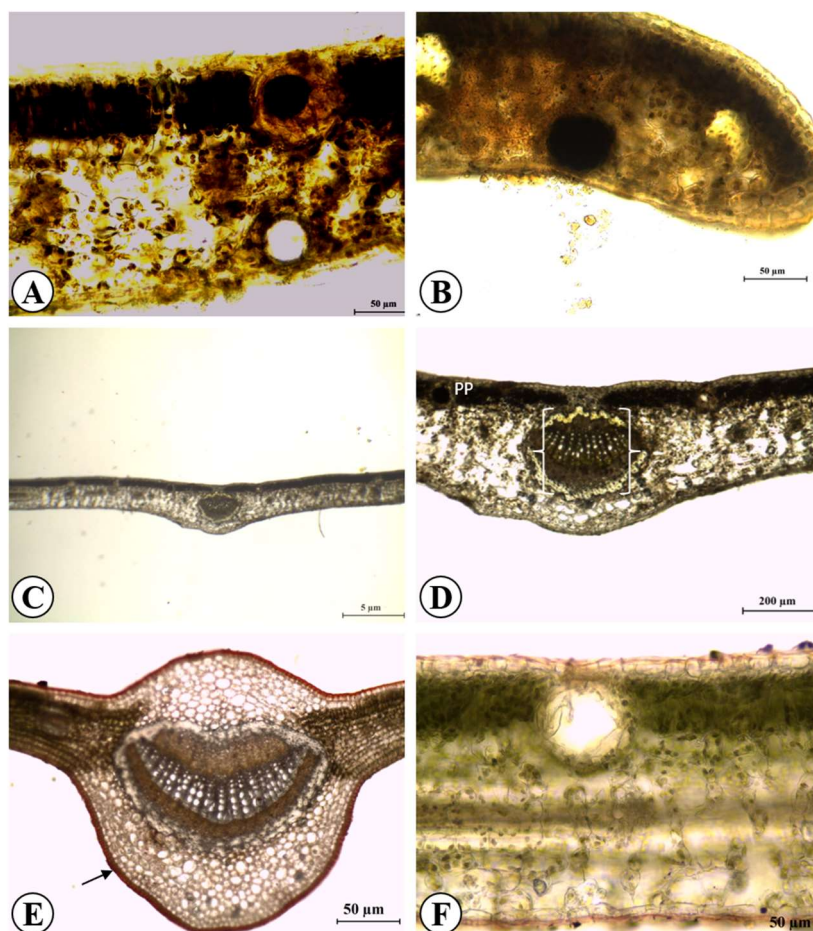


Legenda: A) bainha esclerenquimática que circunda o feixe vascular principal da lâmina foliar lignificado, evidenciada pelo reagente de floroglucinol ácido; B) conjunto de células lignificadas, evidenciado pelo reagente floroglucinol ácido; C) lâmina foliar com amido na região adaxial (seta) e dentro das cavidades secretoras (asterisco), evidenciado pelo reagente lugol; D) detalhe da cavidade secretora com grãos de amido (asterisco), evidenciado pelo reagente lugol; E) cavidades secretoras com substâncias resiníferas em ambas as faces da lâmina foliar, evidenciada pelo reagente de Nadi; F) maior aumento na cavidade secretora com resina, evidenciada pelo reagente de Nadi; G) azul de toluidina, evidenciando estruturas presentes na lâmina foliar (detalhe da cavidade secretora com epitélio secretor); H) lâmina foliar sob o reagente de vermelho de rutênio, resultando em detecção negativa para este teste. As setas e asteriscos indicam as estruturas descritas. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Foi dada continuidade nas análises histoquímicas na lâmina foliar de *E. pitanga*, realizando-se o teste com o reagente de Dittmar e de Wagner, os quais apresentaram resultados semelhantes na detecção de alcaloides dentro e fora da cavidade secretora (Figura 25 A-B Dittmar) e, na face adaxial (Figura 25-C Wagner). Com a aproximação da imagem da nervura central, foi possível detectar a presença de alcaloides no parênquima paliçádico (PP) e nos polos de floema do feixe vascular (Figura 25-D Wagner). Foram utilizados os reagentes Sudan III e Sudan IV para evidenciar estruturas lipídicas, as quais estavam presentes na região da nervura central, tendo

em destaque a cutícula repleta de substâncias lipídicas (Figura 25-E Sudan III) e, com uma aproximação maior, foi possível visualizar a ausência desses compostos nas cavidades secretoras de ambas as faces da folha. No entanto, a reação manteve em evidência a presença dos compostos lipídicos na cutícula (Figura 25-G Sudan IV).

Figura 25 – Histoquímica da lâmina foliar de *E. pitanga*.

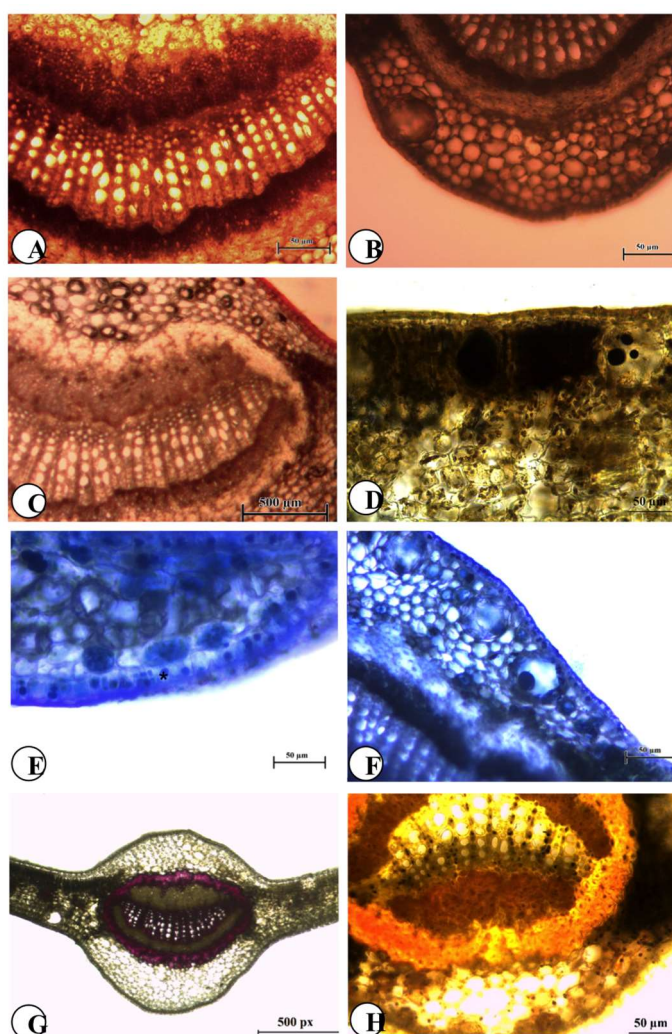


Legenda: A – B) cavidades secretoras com e sem alcaloides, evidenciado com o reagente de Dittmar; C) face adaxial evidenciando alcaloides pelo reagente de Wagner; D) região da nervura central com alcaloides na região do parênquima paliçádico (PP) e nos polos de floema do feixe vascular (colchetes); E) região da nervura central, em destaque a cutícula repleta de substâncias lipídicas (seta), evidenciado pelo reagente Sudan III; F) maior aumento na cavidade secretora com ausência de compostos lipídicos e ambas as faces revestimento da cutícula, evidenciado pelo reagente Sudan IV. As setas e colchetes indicam as estruturas descritas. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A análise histoquímica de *E. dysenterica* evidenciou a presença de compostos fenólicos nos polos de floema da região central da lamina foliar (Figura 26A). Por meio do uso do reagente cloreto férrico, e em teste similar com dicromato de potássio, foi possível detectar fenóis simples na cavidade secretora e na região de nervura central da lamina foliar (Figura 26B). Na região central da lâmina, foliar foi evidenciada a

presença de compostos lipídicos na cutícula, utilizando o reagente Sudan III (Figura 26C). Empregando-se o lugol, determinou-se a presença de amido no interior das células, na região central do pecíolo (Figura 26D). A presença de óleo essencial na epiderme do pecíolo, com gotas de óleos essenciais distribuídas (Figura 26E), e também na nervura central da lamina foliar, com uma gota de óleo essencial dentro da cavidade secretora (Figura 26F), foi constatada por meio do reagente de Nadi. A presença de ligninas foi detectada nas paredes secundárias, pelo uso do reagente floroglucinol (Figura 26G). Por fim, alcaloides não foram detectadas nesta análise, pelo uso do reagente de Vagner (Figura 26H).

Figura 26 – Fotomicrografias da folha da *E. dysenterica*



Legenda: A) compostos fenólicos nos polos de floema da região central da lâmina foliar; B) cavidade secretora, na região de nervura central da lâmina foliar, sob o reagente cloreto férrico; C) grãos de amido (seta) no interior das células na região central do pecíolo; D) nervura central da lâmina foliar, destacando a cavidade secretora com gota de óleo essencial evidenciado pelo reagente Nadi; E) epiderme com gotas de óleo essencial (asterisco) no pecíolo, evidenciado pelo reagente de Nadi; F) região central da lâmina foliar sob o reagente de Sudan III, evidenciando compostos lipídicos na

cutícula; G) região central da lâmina foliar sob o regente de floroglucinol; H) nervura central da lâmina foliar submetida ao regente de Vagner. **Fonte:** elaborado pelo autor.

No presente estudo, foram realizados apenas cortes à mão livre da lâmina foliar. Em outras pesquisas com plantas do Cerrado, em geral, a estrutura foliar é amolecida pós-inclusão em parafina, o que melhora significativamente os cortes. Contudo, os melhores resultados para anatomia foliar aparecem quando são feitas inclusões em historesina (PALHARES, 2003). No entanto, para histoquímica, a única forma possível é utilizar a folha recém-seccionada, sem nenhum tipo de preparo; por isso, em nosso estudo, foi feito dessa forma. Os estudos da anatomia foliar e histoquímica de plantas do cerrado apresentam particularidades, devido ao aspecto de couro das folhas, sua rigidez e tendência a rupturas. Dessa forma, faz-se necessário conhecer técnicas adequadas para um melhor resultado nas análises (PALHARES, 2003).

A anatomia foliar de ambas as espécies – *E. pitanga* e *E. dysenterica* – apresentou como resultados uma epiderme uniestratificada, recoberta por uma cutícula espessa em ambas as faces. Os estômatos foram encontrados apenas na face abaxial e estes estavam no mesmo nível das células epidérmicas. Essas características coincidem com as descrições prévias de *E. dysenterica* (PALHARES, 2003; SILVA et al., 2015). Trabalhos com as espécies *E. dysenterica* e *E. uniflora* L demonstraram a mesma característica anatômica foliar (RODRIGUES et al., 2010; ALVES et al., 2008). Já para *E. pitanga*, existem poucos trabalhos na literatura referentes e nosso trabalho é inovador no quesito da anatomia foliar e histoquímica, não havendo, até então, nenhum trabalho publicado para essa espécie com esse tema.

A anatomia da lâmina foliar de ambas as espécies indicou a presença do mesofilo dorsiventral, ocorrendo, entretanto, uma camada de parênquima paliçádico na folha de *E. pitanga* e duas camadas na folha de *E. dysenterica*, sendo a primeira camada formada por células mais alongadas que a segunda. O parênquima esponjoso é formado por quatro a sete camadas de células em *E. dysenterica* e por nove a onze camadas em *E. pitanga*, onde espaços intracelulares são visualmente maiores do que aqueles visualizados em *E. dysenterica*. Cavidades secretoras ocorrem por toda a extensão do mesofilo em ambas as espécies. Um trabalho realizado com as folhas da *E. uniflora* mostrou, por meio de cortes transversais, uma epiderme unisseriada em ambas as faces. Na face adaxial, observou-se a cutícula espessa, o mesofilo

dorsiventral com parênquima paliçádico unisseriado, parênquima lacunoso com várias camadas de células e grande quantidade de cavidades secretoras próximas à epiderme adaxial e abaxial (FIUZA et al., 2008).

A região da nervura central das folhas em ambas as espécies é composta por parênquima, onde estão distribuídas cavidades secretoras, e por um feixe vascular na forma de um arco aberto. Em *E. dysenterica*, as fibras pericíclicas contornam completamente o feixe. Em *E. pitanga*, as fibras formam calotas associadas ao xilema e floema para dentro do parênquima. Fiuza et al. (2008) destaca, em seu trabalho, que, em algumas regiões, o parênquima paliçádico é bisseriado e que o feixe vascular é bicolateral em forma de arco aberto, envolto por faixa esclerenquimática.

No pecíolo de ambas as espécies, há um feixe vascular único, concêntrico, formando um arco cujas margens são dirigidas para o centro. Para dentro da epiderme ocorrem parênquima e cavidades secretoras. Em outros trabalhos realizados com espécies do mesmo gênero, a região central da superfície é ligeiramente côncava e abaxial, convexa (DONATO et al., 2007). Apresentam epiderme unisseriada, parênquima cortical contendo grande quantidade de cristais (FIUZA et al., 2008).

As cavidades secretoras são formadas nas folhas de ambas as espécies, por epitélio secretor unisseriado. Drusas e cristais prismáticos ocorrem em idioblastos presentes no mesofilo e, mais frequentemente, associados aos feixes vasculares, ocorrendo também em grande quantidade na nervura central e no pecíolo das folhas de ambas as espécies. Para Callado (1993), em trabalho realizado com *E. cuprea*, as cavidades secretoras ocorrem ao longo de toda a lâmina foliar e pecíolo, apresentando conteúdo lipídico. Para Donato et al. (2007), as cavidades secretoras, de secção arredondada, estão situadas logo abaixo da epiderme, podendo ocorrer intercaladas nesse parênquima com os idioblastos cristalíferos. Cristais prismáticos e drusas são relatados em várias regiões da lâmina foliar, mas encontrados em maior quantidade nas regiões da nervura central e pecíolo, assim como neste trabalho.

Os testes histoquímicos de ambas as espécies foram bastante similares, sendo positivo para Sudan III, Sudan IV, reagente de Nadi, cloreto férrico, dicromato de potássio, floroglucinol e lugol para ambas as espécies e sendo negativo para vermelho de rutênio e vanilina clorídrica. Uma diferença foi encontrada quanto à presença de alcaloide na lâmina foliar, sendo negativo para *E. dysenterica* e positivo para *E. pitanga*.

Os testes com os reagentes de Sudan III e IV foram utilizados para

determinação da presença de lipídios. Esses reagentes não possuem auxocromo e, conseqüentemente, não são ionizados ou ionizáveis. Dessa forma, a coloração se dá por meio de um processo físico, em que os reagentes apresentam maior afinidade pelos compostos lipídicos do que pelo solvente, no meio em que estão diluídos. Palhares (2003) também realizou em seu trabalho testes histoquímicos com as folhas da *E. dysenterica*, utilizando Sudan, e detectou lipídios na cutícula e em glândulas, resultados similares àqueles encontrados neste trabalho.

As folhas das duas espécies estudadas apresentam um vasto número de cavidades secretoras próximas à epiderme e na área de conexão entre o parênquima lacunoso e paliçádico. As cavidades, quando seccionadas em transversal, apresentam lume circular que é delimitado pelo epitélio secretor, o que também foi observado em outros trabalhos de histoquímica de Myrtaceae, Metcalfe e Chalk (1983). Os componentes presentes dentro da cavidade secretora reagiram positivamente ao reagente de Nadi, indicado para detecção de terpenoides.

O Reagente de Nadi, extremamente apolar, tem sua cor alterada em função da variação do pH. Sendo assim, há a possibilidade de identificar óleo essencial e óleorresinas, em função da diferença de coloração do meio. Em outro trabalho presente na literatura, foi identificada a presença de óleos essenciais nas mesmas regiões das folhas da *E. pitanga* e *E. dysenterica*. O resultado positivo destes trabalhos, coloração violeta-rósea típico da mistura entre óleo essencial e resina é similar ao do presente trabalho indicando a presença de tais estruturas (SILVA et al., 2003). Sá (2016) em um trabalho mais recente com a *E. uniflora*, utilizando o mesmo reagente, determinou a presença de OE e óleorresinas nas cavidades secretoras, células epidérmicas e em células do parênquima.

4.6 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. PITANGA* E *E. DYSENTERICA* POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICA

Os estudos químicos das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram feitos com o objetivo de identificar os flavonoides e compostos nitrogenados previamente visualizados qualitativamente na análise histoquímica. Para tanto, utilizamos técnicas cromatográficas e espectrométricas, cujos resultados são descritos a seguir.

4.6.1 Extratos metanólicos e frações obtidas das folhas

As massas e os respectivos rendimentos dos extratos metanólicos obtidos das folhas das espécies de *E. dysenterica* e *E. pitanga* estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Características dos extratos metanólicos e frações obtidas das folhas de *E. dysenterica* e *E. pitanga*.

Espécies	Extrato metanólico Massa (g) (rendimento em %)	Fração básica Massa (g) (rendimento em %)	Fração ácida Massa (g) (rendimento em %)
<i>Eugenia dysenterica</i>	2,74 (10,96)	4,97 (19,86)	0,18 (0,72)
<i>Eugenia pitanga</i>	2,61 (10,44)	5,01 (20,04)	0,23 (0,92)

Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.2 Classes químicas identificadas por CCD

A prospecção química preliminar foi realizada, inicialmente, para servir de parâmetro para as próximas investigações por CLAE-EM e *Leaf Spray*. Os resultados da triagem fitoquímica são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados da triagem fitoquímica de extratos e frações de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.

Amostra	Compostos Fenólicos	Alcaloides
Extrato metanólico de <i>E. pitanga</i>	+	+
Fração ácida de <i>E. pitanga</i>	+	-
Fração básica de <i>E. pitanga</i>	+	+
Extrato metanólico de <i>E. dysenterica</i>	+	+
Fração ácida de <i>E. dysenterica</i>	+	-
Fração básica de <i>E. dysenterica</i>	+	+

Legenda: (+) - positivo, (-) – negativo. Fonte: elaborada pelo autor.

Compostos fenólicos e alcaloides foram encontrados em ambos os extratos, o que corrobora os dados oriundos da análise histoquímica.

Os fenóis são compostos orgânicos oxigenados que apresentam pelo menos uma hidroxila ligada a um anel aromático. São estruturas base para a formação dos flavonoides, apresentando alta capacidade antioxidante (SOBRATTE et al., 2005, MAJO et al., 2008). Estas estruturas apresentam propriedades biológicas como antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora (ANDREO et al., 2006).

Em extratos de diversas espécies do gênero *Eugenia* há relato de elevadas concentrações de compostos fenólicos, e ao utilizar etanol acidificado há um aumento na quantificação desses compostos no extrato (Souza, 2013).

4.6.3 Compostos identificados por CLAE-EM

Na família Myrtaceae é relatada, em diversos estudos, a presença de compostos fenólicos. Couto (2009) identificou quantidade considerável de compostos fenólicos nessa família. Desde então, há um número grande de estudos para identificação e caracterização desses compostos nas folhas dessa família. Em trabalhos mais recentes, como por exemplo, com as folhas de *E. flavescens*, os autores mostraram que a espécie é rica em triterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos, e que essas são classes de compostos comuns ao gênero *Eugenia* (ANTONIO et al., 2017).

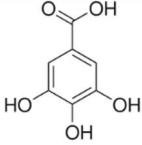
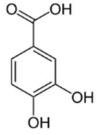
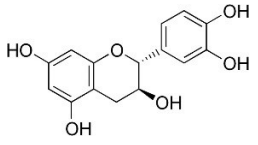
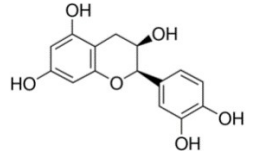
Nos últimos anos, o olhar científico tem se voltado para o estudo de substâncias com atividade antioxidante. Segundo Ramalho e Jorge (2016), os compostos fenólicos se destacam como antioxidantes naturais, sendo capazes de interagir com espécies radicalares. A classe dos compostos flavonoides é a maior dentro dos fenólicos presentes em vegetais e é possível encontrar nessa classe os seguintes subgrupos: flavonóis, flavonas e isoflavonas. As flavonas possuem os mais variados efeitos biológicos, que vão desde a atividade antioxidante até antitumoral. As antocianinas, que se destacam pela atividade antioxidante e as isoflavonas com efeito anticancerígeno (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

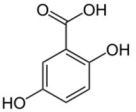
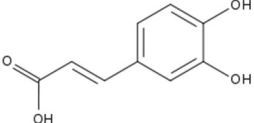
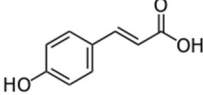
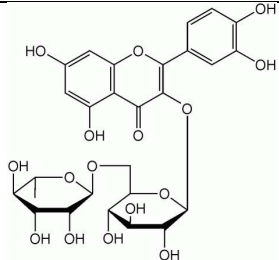
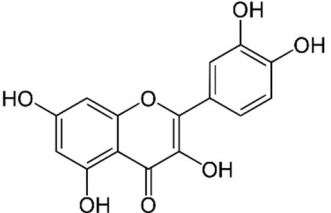
No presente trabalho, o método cromatográfico de comparação de padrão externo foi utilizado para determinar os compostos presentes nos extratos de ambas as espécies. Houve a injeção dos padrões no equipamento e, logo em seguida, foram injetadas as amostras e por meio da comparação dos tempos de retenção e perfil de fragmentação dos compostos foi possível identificar, de forma concisa, os

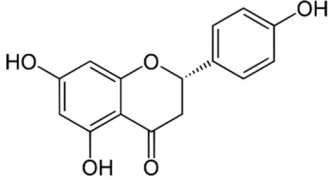
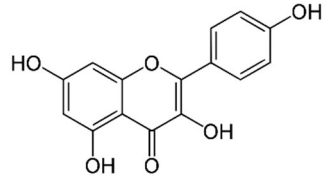
componentes presentes na amostra. Foram empregados os seguintes padrões comerciais: epicatequina, catequina, rutina, naringenina, quercetina, quercetina glucosilada, ácido elágico, ácido *p*-cumárico, luteolina e kaempferol, todos adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os espectros obtidos para os padrões e para a amostra são mostrados no apêndice B.

Com base, na comparação dos padrões e perfil de fragmentações, foi possível construir duas tabelas, uma para cada espécie dos compostos identificados nos extratos. Na tabela 9, são mostrados os compostos identificados em *E. pitanga* e na tabela 10, os compostos identificados em *E. dysenterica*.

Tabela 9 – Compostos identificados na espécie *E. pitanga* e suas características.

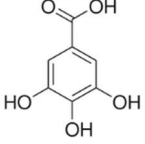
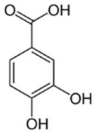
Tempo de Retenção (min)	Nome	Fórmula molecular	Massa molecular	Massa Detectada	Massa Calculada	Erro (ppm)	Estrutura	Fragmentos (m/z)
11,56	ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,021525	169,01343	169,01370	1,658		12,02337 169,01344
16,31	ácido protocatequico	C ₇ H ₆ O ₄	154,02661	153,01839	153,01879	1,012		109,02834 153,01840
17,84	catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07196	289,07122	4,481		269,07194 245,08184 205,05015 125,02335 151,03910 97,02829
20,22	epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07196	289,07122	4,481		269,07193 245,08180 205,05014 153,01837 125,02334 109,02838 97,02816

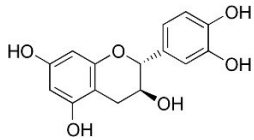
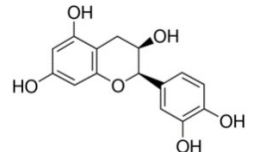
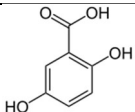
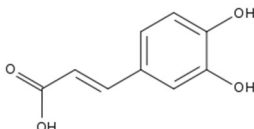
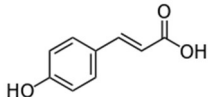
19,87	ácido gentísico	C ₇ H ₆ O ₄	154,02661	153,01840	153,01879	1,077		153,01839 109,02833 137,99481 123,00767 95,01263 71,01258
20,73	ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,04226	179,03421	179,03432	1,814		125,02338 169,01347
22,78	ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,047345	163,03920	163,03896	1,407		119,04913 163,03920
23,65	rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15339	609,14661	609,14557	2,625		300,02777 609,14661
25,92	quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,042655	301,03549	301,03483	4,023		301,03555 151,00276 178,99788 121,02843 273,04077 107,01271 193,01370

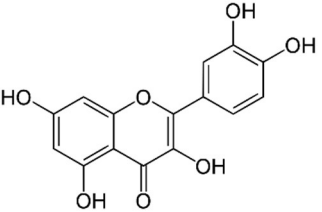
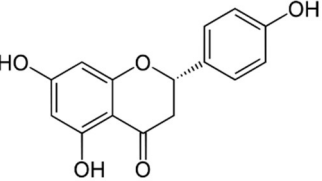
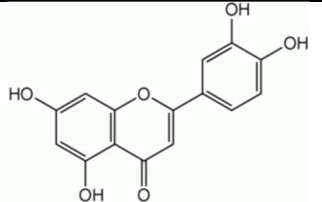
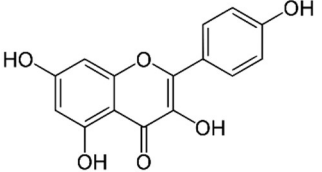
26,11	naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,068475	271,06140	271,06065	4,796		271,06146 151,00276 119,04916 177,01860 93,03338
26,79	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,04774	285,04053	285,03992	4,089		285,04068

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Compostos identificados na espécie *E. dysenterica* e suas características.

Tempo de Retenção (min)	Nome	Fórmula molecular	Massa molecular	Massa Detectada	Massa Calculada	Erro (ppm)	Estrutura	Fragmentos (m/z)
11,56	ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,021525	169,01343	169,01370	1,658		125,02 169,01
16,31	ácido protocatequico	C ₇ H ₆ O ₄	154,02661	153,01839	153,01879	1,012		109,03 153,02

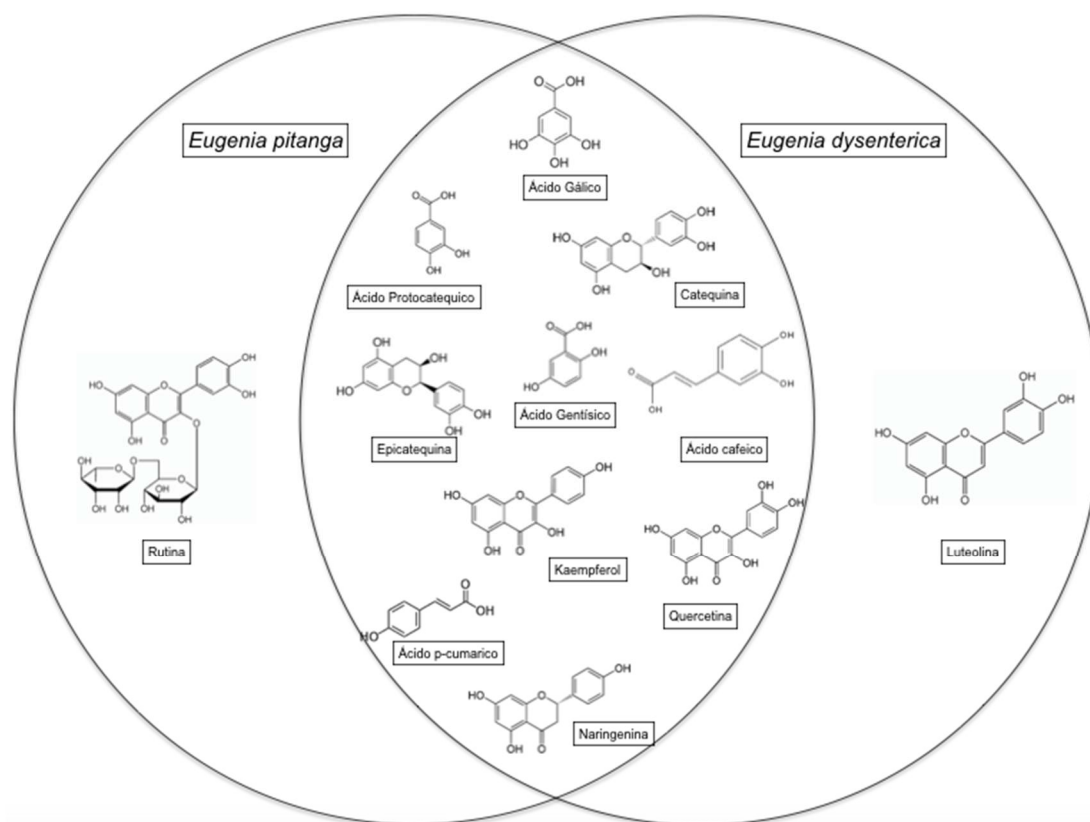
17,84	catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07196	289,07122	4,481		289,07 245,08 125,02 203,07 179,03 137,02
20,22	epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07196	289,07122	4,481		289,07 245,08 203,07 179,03 125,02 151,04 97,03
19,87	ácido gentísico	C ₇ H ₆ O ₄	154,02661	153,01840	153,01879	1,077		153,02 109,03 135,01
20,73	ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,04226	179,03421	179,03432	1,814		179,06 135,04 121,03 150,95 91,00 164,03
22,78	ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,047345	163,03920	163,03896	1,407		119,05 163,04

25,92	quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	302,042655	301,03549	301,03483	4,023		301,04 151,00 179,00
26,11	naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	272,068475	271,06140	271,06065	4,796		271,06 151,00 119,05 177,02 93,03
26,29	luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	286,04774	285,04050	285,03992	3,984		285,12
26,79	kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	286,04774	285,04053	285,03992	4,089		285,04

Fonte: elaborada pelo autor.

Tendo como base as tabelas, os flavonoides identificados em ambas as espécies foram: ácido gálico, ácido protocatequico, catequina, epicatequina, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido *p*-cumarico, quercetina, naringenina e kaempferol. Na figura 27 são mostrados os compostos identificados em cada espécie e aqueles que são comuns entre elas.

Figura 27 – Compostos identificados por CLAE-EM em *E. pitanga* e *E. dysenterica* e compostos comuns entre as espécies.



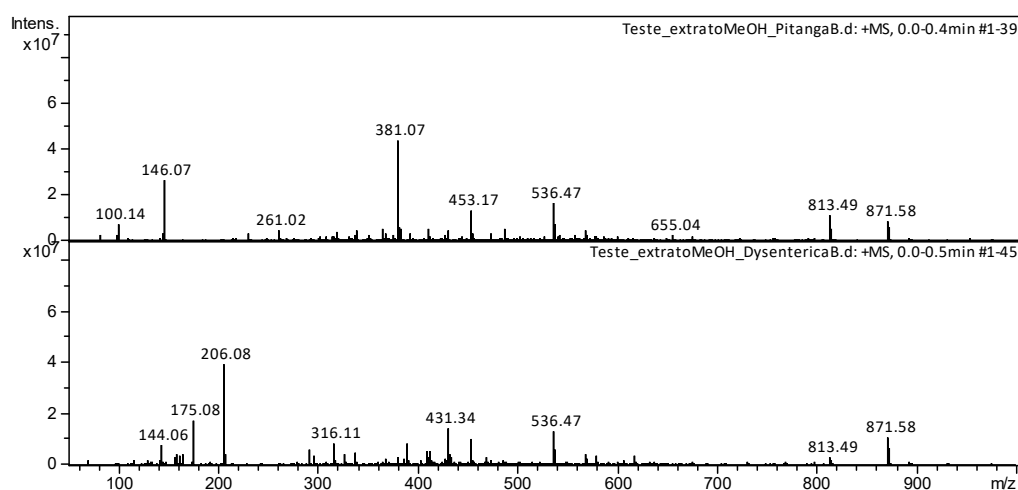
Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.4 Compostos identificados por Leaf Spray

Inicialmente, foi realizada uma infusão direta no espectrômetro de massas com extratos brutos em metanol de ambas as espécies, *E. pitanga* e *E. dysenterica*, recém-preparados conforme descrito previamente na metodologia (item 3.4.2). A solução de extrato gerou espectros (Figura 28) que serviram de apoio para a identificação das

melhores regiões das folhas para os cortes e as condições ideais para futuras aquisições.

Figura 28 – Espectros gerados por infusão direta dos extratos brutos recém-preparados das folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica*.



Fonte: elaborado pelo autor.

As folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foram então submetidas ao *leaf spray*, gerando íons diretamente do tecido foliar, o qual foi cortado previamente na forma de triângulo equilátero que respeitou as análises anteriores feitas na histoquímica, medida crucial para padronizar a região de corte e encontrar composto de interesse em maior concentração.

Diversos cortes em todas as regiões das folhas (base, mediana e ápice), cortes da borda para nervura central, nervura central para borda e também no interior da folha, da base para região mediana, região mediana para base, mediana para o ápice e ápice para mediana, todas tendo a ponta do triângulo equilátero como a nervura central de ambas as espécies foram realizados (figura 7).

A região utilizada nas folhas de ambas as espécies era a mediana, os cortes foram montados partindo das bordas da folha para a região da nervura central (Figura 29), em que, por meio dos testes histoquímicos cloreto férrico, dicromato de potássio e vanilina clorídrica, foi possível identificar maior concentração de composto fenólicos e também com base nos testes Dittmar e Wagner foi possível identificar a presença de compostos nitrogenados (possivelmente alcaloides).

Figura 29 – Localização dos cortes nas folhas de *E. pitanga* e *E. dysenterica* para a realização de *Leaf spray*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para ambas as espécies foram obtidos espectros em triplicata, mostrando a acurácia da técnica na geração de espectros com alta especificidade e complexidade. Na figura 30 são mostrados os espectros de uma única folha de *E. pitanga* em triplicata; na figura 31 são mostrados os espectros sob as mesmas condições para a *E. dysenterica*. Dois dos cortes foram realizados de forma simétrica em ambos os lados da lâmina foliar e o terceiro corte foi feito imediatamente em uma região superior ou inferior aos cortes realizados na região mediana da folha, porém mantido o local no qual ficaria a ponta para triângulo equilátero (nervura central).

Figura 30 – Espectros da *E. pitanga* em triplicata.

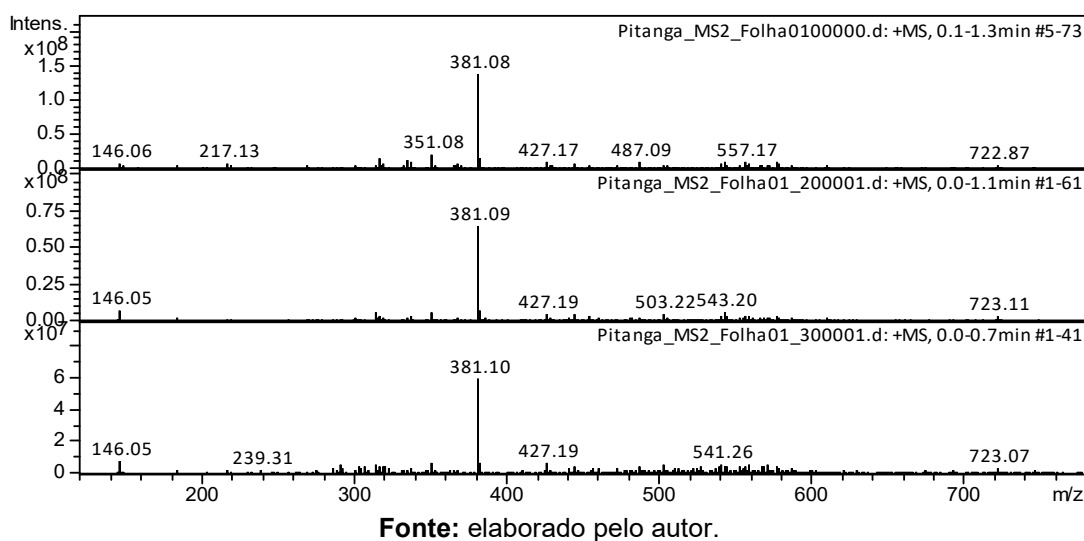
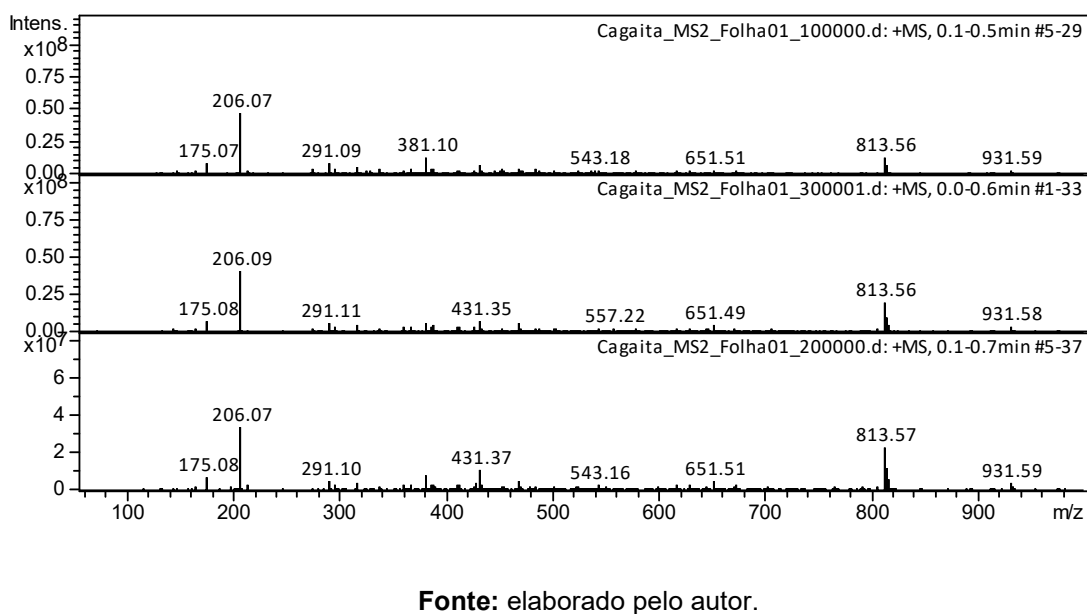


Figura 31 – Espectros da *E. dysenterica* em triplicata.



Para ambas as espécies também foram obtidos espectros em triplicata, utilizando folhas diferentes de cada espécie. Na figura 32 são mostrados os espectros de *E. pitanga* e na figura 33 são mostrados os espectros de *E. dysenterica*. Ambos os experimentos utilizaram a mesma região de corte nas lâminas foliares.

Figura 32 – Espectros de três folhas diferentes da *E. pitanga* em triplicata.

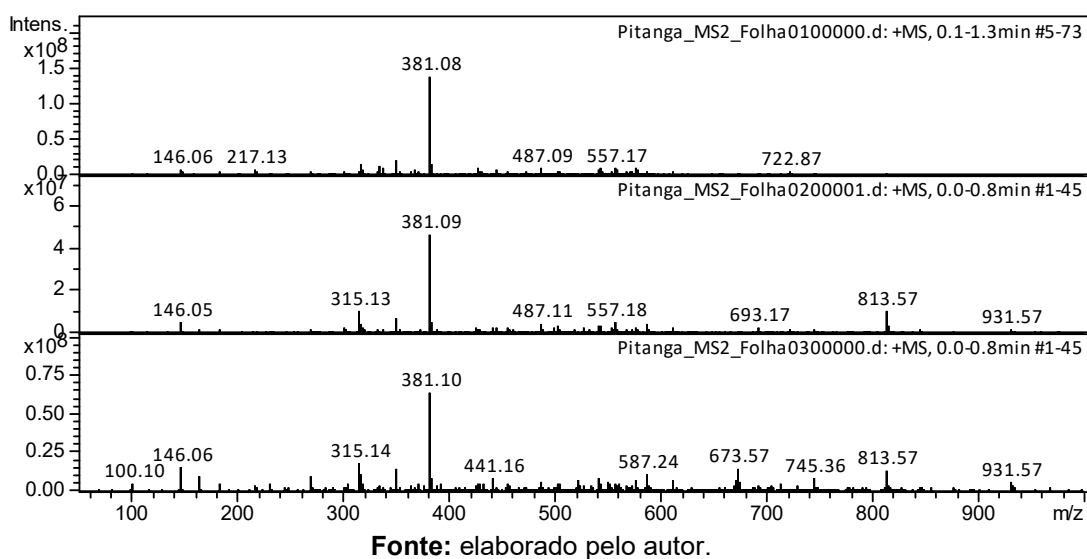
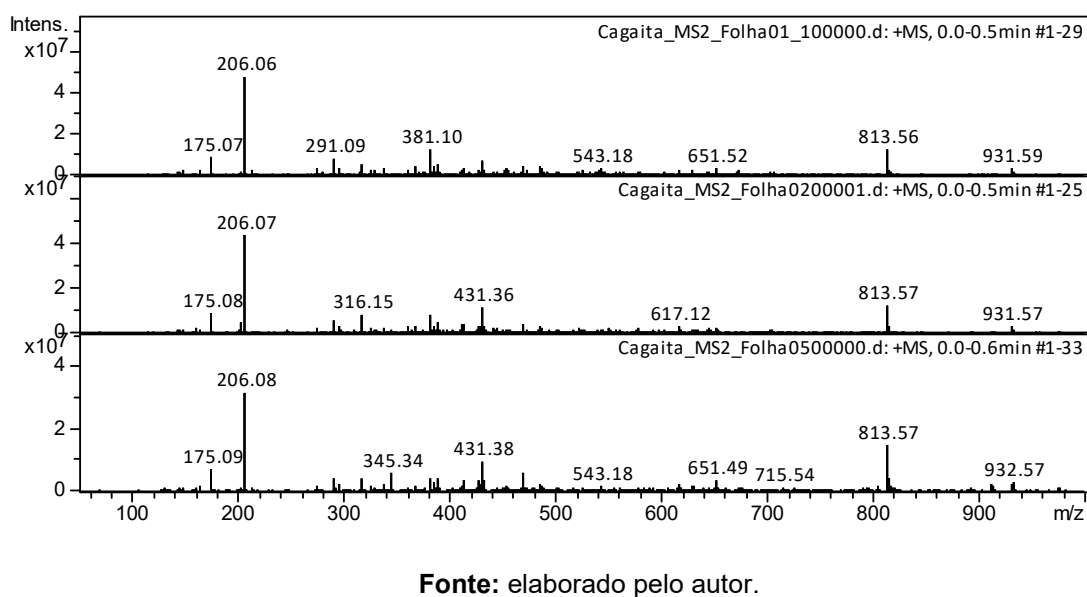


Figura 33 – Espectros de três folhas diferentes de *E. dysenterica* em triplicata



Nas tabelas 11 e 12 são apresentadas possíveis fórmulas moleculares para vários íons presentes na *E. pitanga* e *E. dysenterica*. Como o equipamento é de baixa resolução, para que as moléculas fossem certificadas, além da massa molecular, seria necessário analisar o perfil de fragmentação (EM/EM) de cada um dos íons mais intensos.

Tabela 11 – Fórmula molecular atribuída aos íons detectados na *E. pitanga*.

<i>m/z</i>	Erro / ppm	RDB^a	Fórmula molecular
146,06	2,3	4	C ₇ H ₉ NONa
315,14	0,1	6	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₆
381,08	-8,7	2	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ K
487,09	2,0	32	C ₃₈ H ₁₅ O
557,17	0,1	12	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₀ K
813,57	-0,6	3	C ₄₃ H ₈₂ O ₁₁ K
931,57	1,1	28	C ₆₄ H ₇₄ O ₃ K

Fonte: elaborada pelo autor.

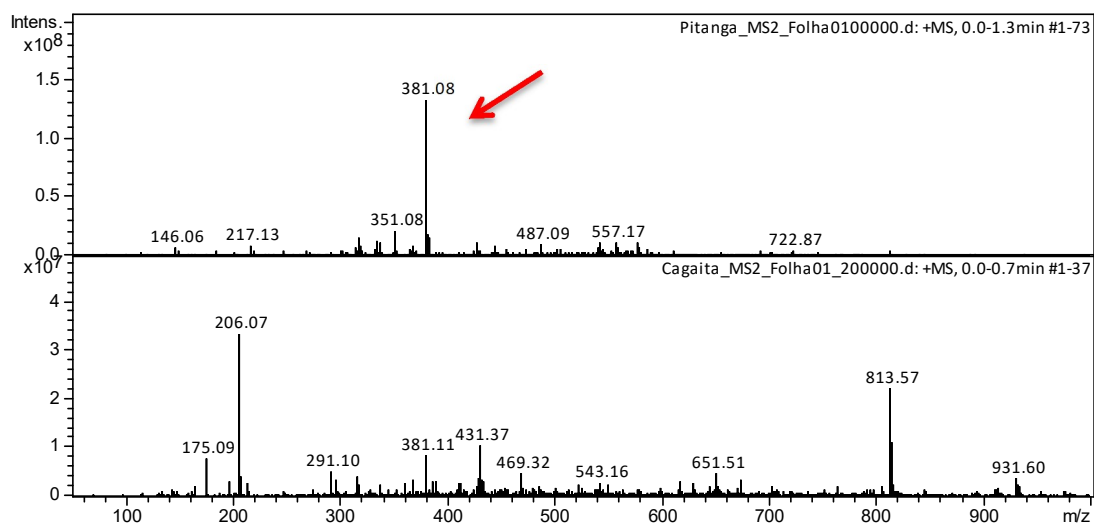
Tabela 12 – Fórmula molecular atribuída aos íons detectados na *E. dysenterica*.

<i>m/z</i>	Erro / ppm	RDB^a	Fórmula molecular
175,08	-3,6	3	C ₇ H ₁₁ O ₅
206,07	0,3	1	C ₈ H ₁₅ NO ₅
431,36	-4,1	3	C ₂₃ H ₄₅ N ₂ O ₅
543,13	-4,5	15	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₂
651,50	1,8	3	C ₂₅ H ₄₇ O ₁₉
813,57	-0,2	20	C ₅₆ H ₇₅ O ₄
931,57	1,1	28	C ₆₄ H ₇₄ O ₃ K

Fonte: elaborada pelo autor.

Após a análise de forma individualizada, foi feita uma comparação entre os espectros de ambas as espécies a fim de identificar íons de maior intensidade que seriam tratados como marcadores de cada planta (Figura 34). Para *E. pitanga*, o íon escolhido apresentou *m/z* 381; na *E. dysenterica* o íon apresentou *m/z* 206.

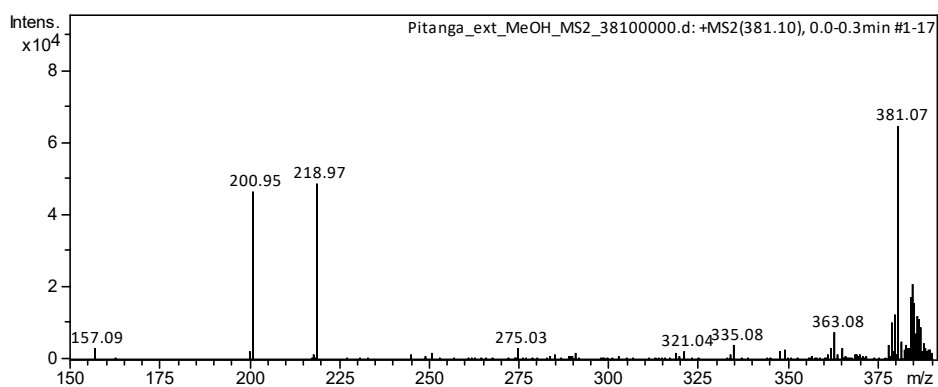
Figura 34 – Espectros de ambas as espécies *E. pitanga* e *E. dysenterica*



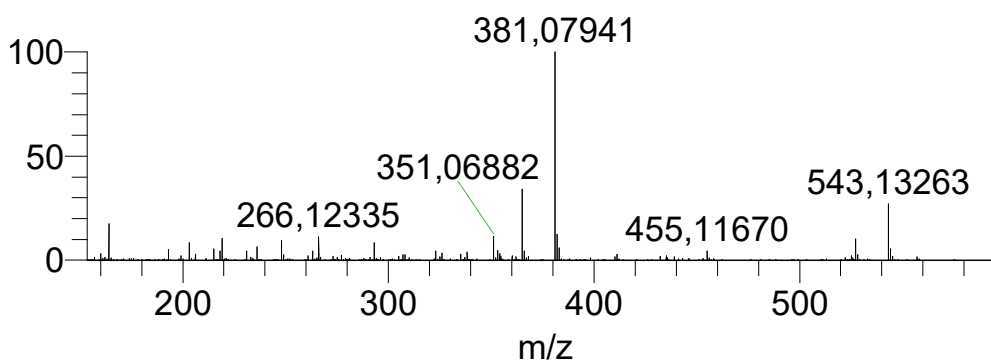
Fonte: elaborada pelo autor.

Os dois íons de maior intensidade, um em cada amostra das folhas, foram tratados como marcadores. Dessa forma, foram produzidas propostas de estruturas tendo como base as fragmentações geradas pelo EM/EM. Na *E. pitanga*, o sinal mais intenso obtido no modo positivo (Figura 35) indica a formação de um aduto de potássio com a sacarose presente na folha da planta. O pico base, m/z 381, é descrito na literatura como sendo aduto de potássio $[M + K]^+$ da sacarose (342 Da) (SANVIDO et al., 2010; AMORIM et al., 2009). Há outra referência que sugere os íons mais intensos com seus possíveis compostos para a maltose com potássio como aduto (MACHADO, 2018)

Figura 35 – Fragmentação do íon – m/z 381

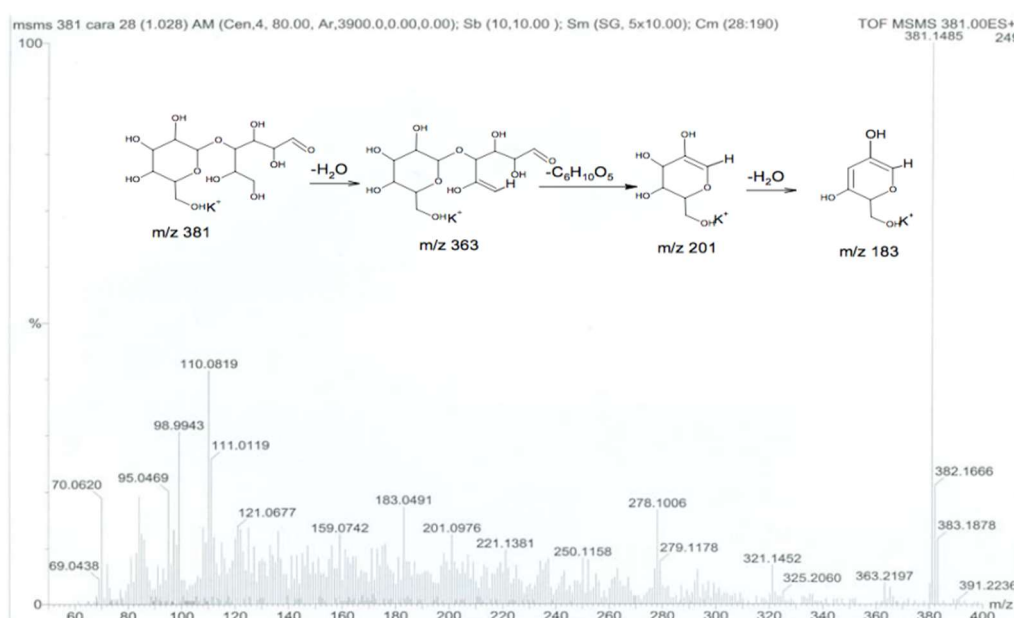


continua



Fonte: elaborado pelo autor.

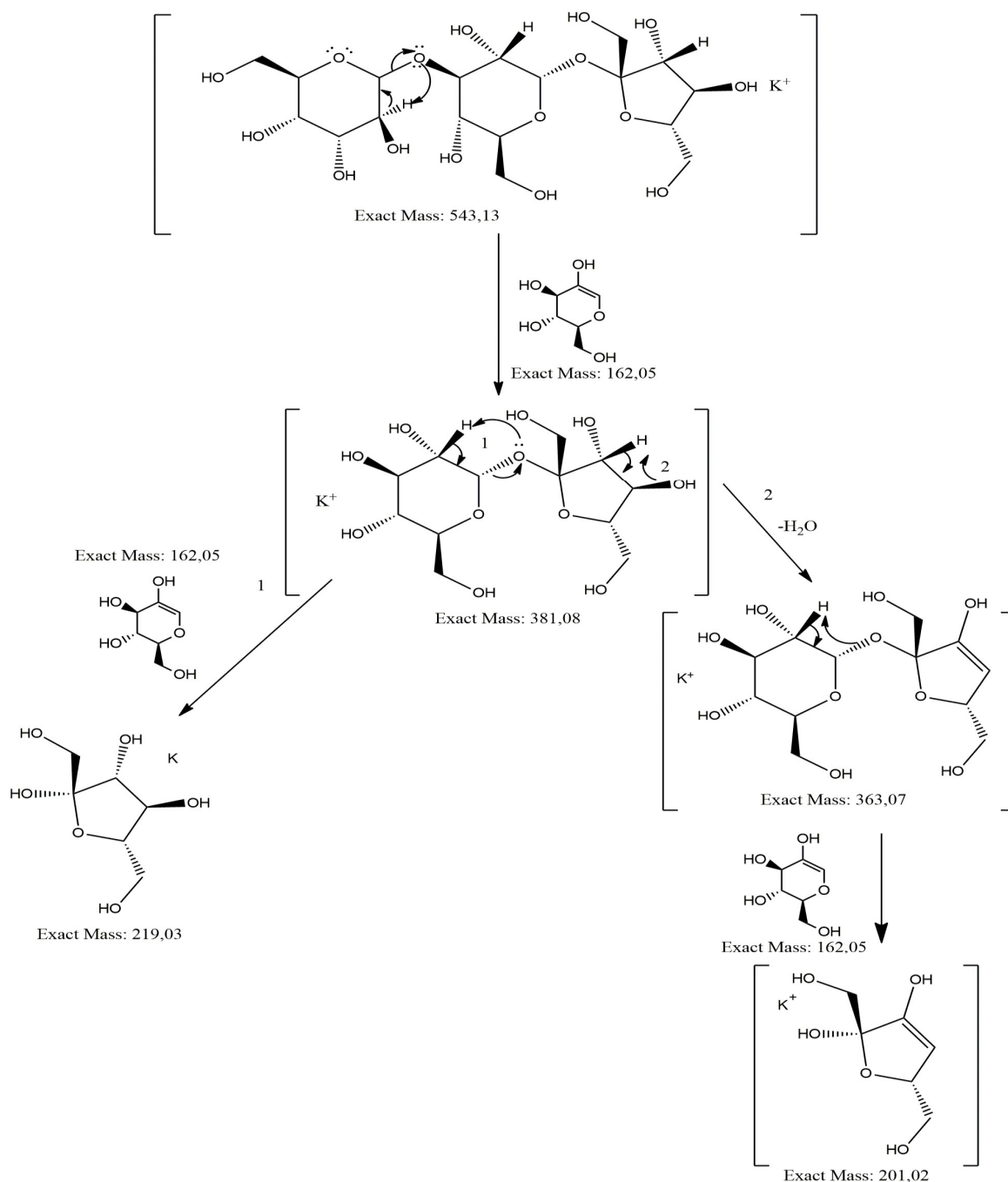
Figura 36 – Visão ampliada do pico m/z 381.



Machado (2018) mostra os íons mais intensos, tendo como base o espectro de fragmentação do íon m/z 381, sugerindo estruturas a partir da maltose com potássio como aduto.

Foram propostas, por meio do perfil de fragmentação, as seguintes estruturas que indicam que o pico base m/z 381 é aduto de potássio $[M + K]^+$ da sacarose (342Da).

Figura 37 – Proposta de fragmentação para o pico m/z 381

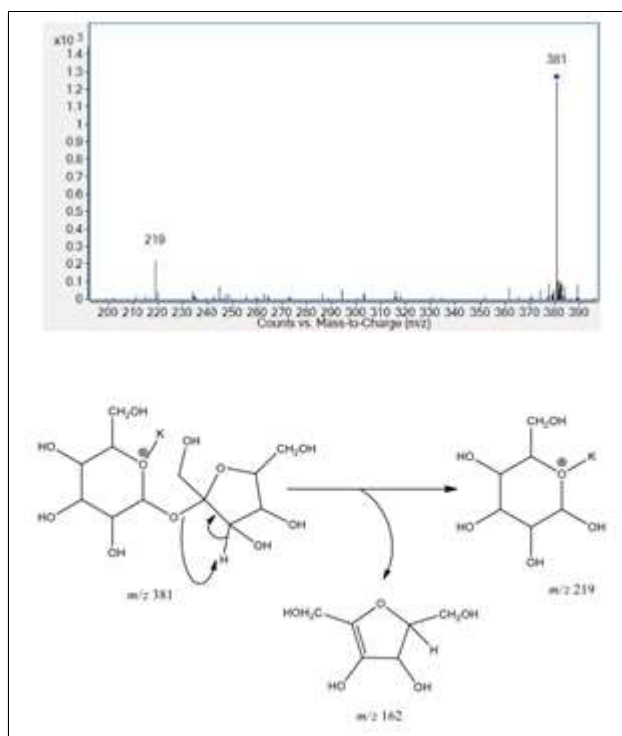


Fonte: elaborada pelo autor.

No trabalho descrito por Machado, 2018, o objetivo geral era estudar a composição química dos grãos de café (*Coffea arabica* L) e estabelecer uma relação entre a qualidade do café em função da forma que essas plantas receberiam água (regime de sequeiro e irrigação por gotejamento), por meio da espectrometria de massas com ionização por infusão direta. Nesse trabalho, o íon m/z 381 (sacarose + K)⁺ foi fundamental para estabelecer um padrão que avaliava a qualidade do café, em

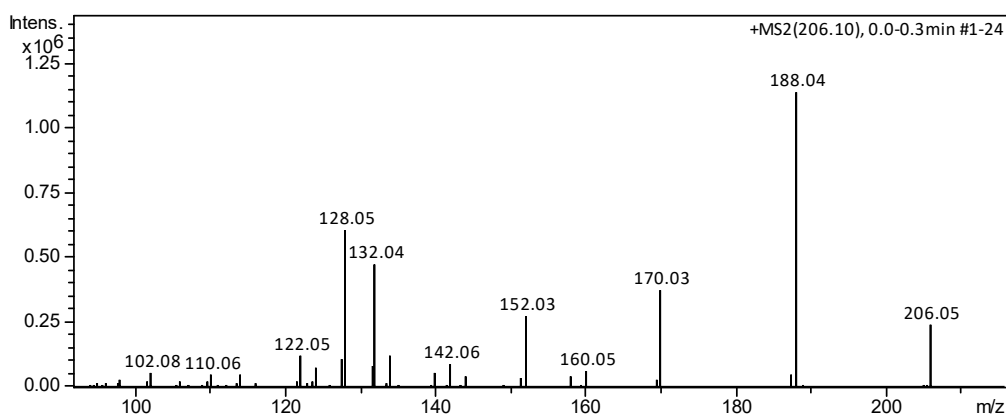
que, na planta que recebia água no regime de sequeiro, a influência dessa substancia foi positiva, gerando no teste de xícaras, um café com notas ligeiramente maiores, provavelmente por apresentar maior teor de sacarose (MACHADO, 2018)

Figura 38 – Proposta de fragmentação do pico m/z



O espectro de *E. dysenterica* apresenta um sinal intenso, obtido no modo positivo (Figura 39), indicando a presença de um alcaloide. O pico base, de maior intensidade $[M+H]^+$, apresenta m/z 206, e é descrito na literatura como sendo a uniflorina ($C_8H_{15}NO_5$) (BUCKINGHAM et al., 2010)

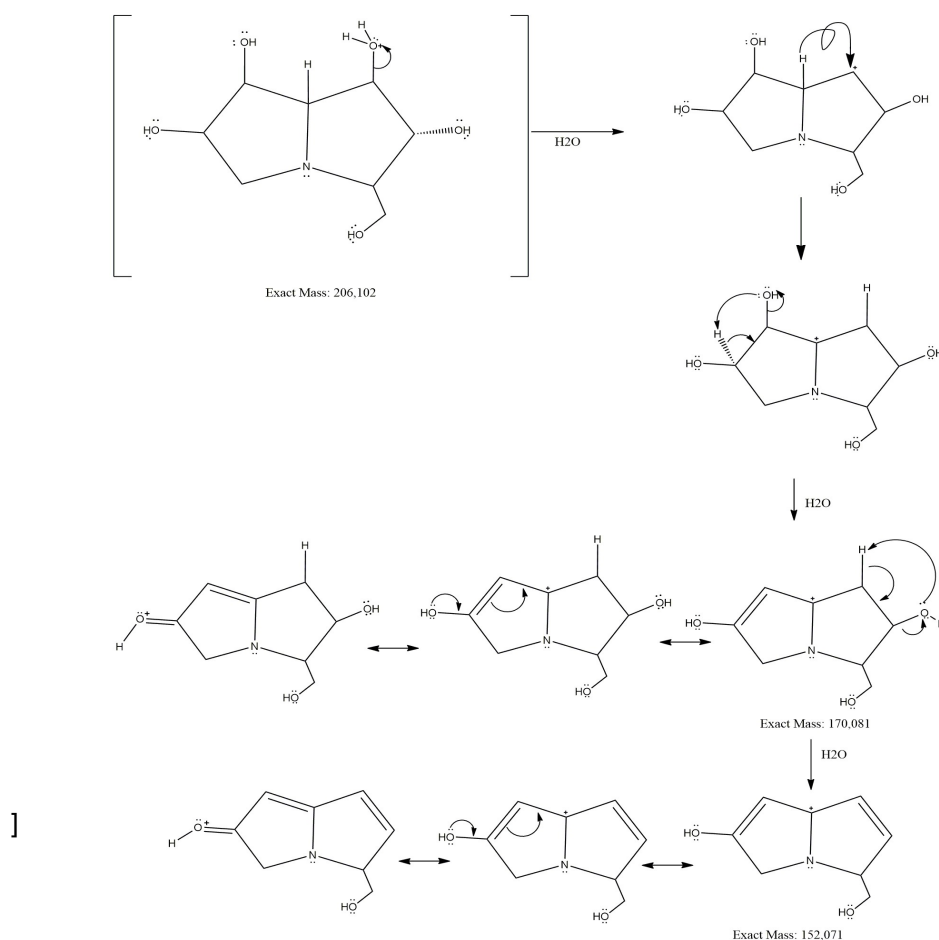
Figura 39 – Fragmentação do íon – m/z 206



Fonte: elaborada pelo autor.

Foi feita uma proposta fragmentação para o íon m/z 206 (figura 40), o que torna sustentável a proposição de que a esse sinal está associada à existência de um alcaloide na folha da planta.

Figura 40 – Proposta de fragmentação do íon m/z 206



Fonte: elaborada pelo autor.

Os alcaloides pirrolizidínicos são estruturas fechadas heterocíclicas, nas quais o átomo de nitrogênio característico da classe é comum a dois anéis de cinco componentes fundidos. Quase 700 alcaloides são conhecidos com essa classificação, encontrados em diversas famílias botânicas brasileiras, entre elas: Boraginaceae, Asteraceae e Fabaceae (CANTANHEDE FILHO, 2017).

Existem inúmeros trabalhos que estudam um medicamento natural paraguaio chamado Nangapiry. As infusões preparadas a partir das folhas da *E. uniflora* L. (Myrtaceae), árvore muito comum no Brasil e em outros países da América do Sul, são usadas de forma popular como diurético, antidiarreico, antirreumático, antifebril e antidiabético. No entanto, o efeito antidiabético instigado pela medicina popular foi estudado, por diversas vezes, sempre relacionado à presença do alcaloide uniflorina A e B (SANVIDO et al., 2010; AMORIM et al., 2009; MATSUMURA et al., 2000) MATSUMURA e colaboradores (2000) descreveram a atividade antidiabética da uniflorina, por meio de testes de tolerância à sacarose e à glicose em camundongos e atividades inibitórias α -glucosidase. Tendo como base a investigação da atividade inibitória, o isolamento dos constituintes do extrato levaram novamente ao alcaloide, uniflorina (MATSUMURA et al., 2000).

Em um dos artigos, foram estudados os extratos solúveis das folhas da *E. uniflora* que se mostraram capazes de inibir a α -glucosidase, a maltase e a sucrase. Esse efeito está associado à presença de um alcaloide que foi isolado, a uniflorina (PARMEGGIANI et al., 2009).

No entanto, é a primeira vez que é relatada a presença de uniflorina em *E. dysenterica*, o que abre caminho para novos estudos de avaliação do efeito antidiabético de *E. dysenterica* em testes *in vitro* e *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

A identificação dos compostos dos O.E. por CG-EM obtidos anteriormente de *E. pitanga* e *E. dysenterica* foi realizada neste estudo. Por meio da análise quimiométrico, identificou-se marcadores químicos na composição dos óleos essenciais de *E. pitanga* e *E. dysenterica*, em cada uma das estações e nos diferentes tipos de folhas (frescas e secas), sendo possível verificar similaridades e discrepâncias entre as amostras analisadas. Foi realizada a comparação entre as classes de constituintes dos óleos essenciais, não havendo diferenças significativas entre a composição química de cada amostra, encontrando de forma majoritária, em ambas as espécies, sesquiterpenos/sesquiterpenoides, assim como ocorre com outras espécies do gênero *Eugenia*.

O estudo da anatomia foliar foi de importância para identificar a posição das cavidades secretoras nas folhas das duas espécies, comparando-as em quantidade e tamanho. Para a espécie *E. pitanga* ocorreu de forma inédita e para a *E. dysenterica* serviu de base para a comparação com dados da literatura.

Por meio da histoquímica foi possível, localizar *in situ*, os principais grupos químicos que ocorrem no tecido foliar, como por exemplo, flavonoides e alcaloides. Assim, para que fossem identificados esses constituintes, foi realizada a análise via CLAE-EM, conduzindo a descrição de ácido gálico, ácido protocatequico, catequina, epicatequina, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido *p*-cumarico, quercetina, naringenina e kaempferol, em ambas as espécies.

A histoquímica também serviu de base para os experimentos de *Leaf spray*. A metodologia para os cortes dos triângulos que seriam utilizados na análise respeitou dados adquiridos com a histoquímica, e dessa forma, a análise ocorreu em menor tempo e levou à identificação de marcadores presentes na lâmina foliar, como a sacarose de *E. pitanga* e o alcaloide pirrolizidínico uniflorina de *E. dysenterica*.

Portanto, os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos e destaca-se que o trabalho foi se desenvolvendo à medida que os compostos voláteis foram caracterizados, a histoquímica e anatomia forneceram informações relevantes sobre as classes de compostos e as técnicas de CLAE-EM e *Leaf spray* contribuíram para a identificação dos constituintes químicos.

6 REFERÊNCIAS

ADÂMOLI, J. et al. Caracterização da região dos Cerrados. *In: GOEDERT, W. J. (Ed.). Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo.* Brasília, DF: Embrapa-CPAC, 1986. p. 33-74.

ADAMS, Robert P. et al. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.

ADLER, E.; ELLMER, L.; GJERTSEN, P. Coniferyl aldehyde groups in wood and in isolated lignin preparations. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 2, p. 839-840, 1948.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*, v.28, p.13-19, 1993.

ALMEIDA, M. P. et al. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: uma proposta de projeto para a Educação Básica. *Lat. Am. J. Sci. Educ.*, v. 2, p. 22059, 2015.

AL-RUBAYE, Abeer Fauzi; HAMEED, Imad Hadi; KADHIM, Mohanad Jawad. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, v. 9, n. 1, p. 81-85, 2017.

ALVES, Edenise Segala; TRESMONDI, Fernanda; LONGUI, Eduardo Luiz. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 22, n. 1, p. 241-248, 2008.

AMARAL, Lourdes Isabel Velho do et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.

AMORIM, Ana Carolina L. et al. Green and roasted arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 313- 321, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000200017> . Acesso em: JULHO DE 2019

ANDRADE, Wanessa Machado et al. Investigação da atividade antitumoral in vitro e in vivo da *Eugenia dysenterica* DC.(MYRTACEAE). 2011.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *CEPPA - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. v. 24, n.2, p. 319-336, 2006.

ANTONIO, J. et al. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). *Química Nova*, São Paulo, v.40, n.3, november, 2016.

ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatômica. Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Lisboa: Faculdade de Ciências de Lisboa, p. 19-28, 2007.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; *Química medicinal*. As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre, Artmed Editora, 2001.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil, V. 2. Imprensa Universitária: Viçosa, 1984, 377 p.

BASTOS, R. G. et al. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. *South African Journal of Botany*, v. 123, p. 317-332, 2019.

BENELLI, Giovanni; RAJESWARY, Mohan; GOVINDARAJAN, Marimuthu. Towards green oviposition deterrents? Effectiveness of *Syzygium lanceolatum* (Myrtaceae) essential oil against six mosquito vectors and impact on four aquatic biological control agents. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 11, p. 10218-10227, 2018.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

BIDA, Morgan R. et al. Essential oil compounds from the leaf of *Eugenia samanensis* Alain (Myrtaceae), a species endemic to the Samaná Peninsula, Dominican Republic. *Journal of Essential Oil Research*, v. 31, n. 2, p. 154-159, 2019.

BOURGAUD, Frederic et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BRAGA, Helson C. Os óleos essenciais do Brasil: estudo econômico. IO, 1971.

BRANDON, K.; G.A.B FONSECA; A.B. RYLANDS E J.M.C. SILVA. Conservação Brasileira: desafios e oportunidades. *Megadiversidade*, Belo Horizonte, v. 1, p.7-13, 2005.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. *O Bioma Cerrado*. Biomas. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acessado em: set. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Biodiversidade*. 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

BUCKINGHAM, J.; BAGGALEY, K. H.; ROBERTS, A. D.; SZABÓ, L. F. *Dictionary of alkaloids*, 2nd. ED, Boca Raton: CRC Press, 2010. Disponível em: <http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_resursu_biologija/gramatas/Alkaloids.pdf>

BUCHWALLOW, Igor; BOECKER, Werner; TIEMANN, Markus. The contribution of Paul Ehrlich to histochemistry: a tribute on the occasion of the centenary of his death. *Virchows Archive*, v. 466, n. 1, p. 111-116, 2015.

CALLADO, Cátia Henrique. Anatomia foliar de *Eugenia cuprea* (Berg) NDZ. e *Marlierea suaveolens* Gard.(Myrtaceae). *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 71-75, p. 25-37, 1993.

CANTANHEDE FILHO, Antonio J. et al . Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). *Quím. Nova*, São Paulo , v. 40, n. 3, p. 252-259, Apr. 2017 . Disponível em; <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422017000300252&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 Aug. 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160190>.

CECÍLIO, Alzira Batista et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of ethnopharmacology*, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

CHAIEB, Kamel et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHIARADIA, Mariza C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química nova*, 2008.

CLEMENTINO, Silva Elton et al. Voltammetric and spectrophotometric determination of antioxidant activity of *Eugenia dysenterica* DC leaves extracts. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, v. 29, n. 2, 2016.

COCK, Ian Edwin; CHEESMAN, Matthew. The potential of plants of the genus *Syzygium* (Myrtaceae) for the prevention and treatment of arthritic and autoimmune diseases. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, Second Edition, p. 401, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00023-4>> Acesso em: maio 2019.

CORREA, Marcos Saldanha et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 86, 2019.

COSTA, T. R., Fernandes, O. F. L., Santos, S. C., Oliveira, C. M. A., Lião, L. M., Ferri, P. H., ... Silva, M. do R. R. (2000). *Antifungal activity of volatile constituents of Eugenia dysenterica leaf oil*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 111–117. doi:10.1016/s0378-8741(00)00214-2

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

COUTO, Renê Oliveira do et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae). 2009.

CUNHA, Amanda Lima et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, Santana do Ipanema/AL, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Histochemie-coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, Paris, v. 258, n. 4, p. 1338-8, 1964.

DE ALMEIDA SIQUEIRA, Egle Machado et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PloS one*, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.

DE BRUYNE, Tess et al. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

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

DE MORAIS CARDOSO, Leandro et al. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.

DE SOUZA, Angela Maria et al. Traditional uses, Phytochemistry, and antimicrobial activities of *Eugenia* species—a review. *Planta medica*, v. 84, n. 17, p. 1232-1248, 2018.

DE VILLIERS, Andre; VENTER, Pieter; PASCH, Harald. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1430, p. 16-78, 2016.

DEWICK, Paul M. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, 2009.

DI STASI, Luis C. (org). *Plantas medicinais: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESCO, 1996.

DINIZ FILHO, José Alexandre Felizola et al. Macroecologia, biogeografia e áreas prioritárias para conservação no cerrado. *Oecol. Bras.*, v. 13, n.3, set., 2009.

DJEBIR, Somia et al. Chemical Composition and Acaricidal Activity of the Essential Oils of Some Plant Species of Lamiaceae and Myrtaceae against the Vector of Tropical Bovine Theileriosis: *Hyalomma scupense* (syn. *Hyalomma detritum*). *BioMed research international*, v. 2019, 2019.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. *Frutas brasileiras*. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002. 288p.

DONADIO, L.C.; MARTINS, A.B.G.; VALENTE, J.P. *Fruticultura tropical*: Jaboticabal: Funesp, 1992.

DONADIO, Luis C.; MORO, Fabiola V. Potential of Brazilian Eugenia Myrtaceae-as ornamental and as a fruit crop. *Acta Horticulturae* 632, p. 65-68, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.632.7>> Acesso em: maio 2019.

DONATO, Ana Maria; MORRETES, Berta Lange de. Foliar anatomy of Eugenia brasiliensis Lam.(Myrtaceae) from restinga and forest areas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa – PB, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

DOS SANTOS, Joycy Francely Sampaio et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the Eugenia uniflora essential oil against Candida spp. *Food chemistry*, v. 261, p. 233-239, 2018.

DUARTE, Alessandra R. et al. Seasonal influence on the essential oil variability of Eugenia dysenterica. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2009.

DUARTE, Alessandra R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of Eugenia dysenterica. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010.

DUARTE, E.F.; NAVES, R.V.; BORGES, J.D.; GUIMARAES, N.N.R. Germinação e vigor de sementes de cagaita (Eugenia dysenterica MART. ex DC.) em função do seu tamanho e tipo de coleta. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia – Go, v. 36, n.3, p.173-179, 2006.

DUBOC, Eny; GUERRINI, Iraê Amaral. *Desenvolvimento inicial e nutrição da cagaita em áreas de Cerrado degradado*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

DUDAREVA, Natalia et al. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 3, p. 933-938, 2005.

DUFRESNE, Christiane J.; FARNWORTH, Edward R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001.

DURIGAN, G et al. *Manual para recuperação da vegetação de cerrado*. 3.ed.rev. e atual. São Paulo: SMA, 2011.

ERTAŞ, Erdal; ÖZER, Hayrettin; ALASALVAR, Cesarettin. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry*, v. 105, n. 2, p. 756-760, 2007.

FABRIS, L. C.; CESAR, O. Estudos florísticos em uma mata litorânea no sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, Santa Teresa – ES, v.5, p. 15-46, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Fascículo II. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte 2. Fascículo V. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 2003.

FELFILI, J. M. Fragmentos de florestas estacionais do Brasil Central: diagnóstico e proposta de corredores ecológicos. In: COSTA, R. B. (Org.). *Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na Região Centro-Oeste*. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco, 2003. p. 195-263.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia uma área emergente da ecofisiologia. *Rev. bras. Fis. Veg.*, v.12, p. 175-204, 2000.

FIDELIS, Marina et al. In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camucamu (*Myrciaria dubia* McVaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. *Food and chemical toxicology*, v. 120, p. 479-490, 2018.

FIGUEIREDO, A. C. S. et al. *Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos*. Centro de Biotecnologia Vegetal: Lisboa, Portugal, 2007.

FIGUEIREDO, Pablo Luis B. et al. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *Journal of ethnopharmacology*, v. 232, p. 30-38, 2019.

FIUZA, Tatiana S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, Goiânia – Go, v. 5, n. 2, 2008.

FONSECA, Leydiana Duarte et al. Eficácia in vitro de extratos aquosos de plantas no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

FRANCO, A.C.; HARIDASAN, M.; SCARANO, F.R.; LUETTGE, U. Cerrado. *Tropical Biology and Conservation Management*, v. IV. UNESCO /EOLSS Publishers: Oxford, 2008.

FREUND, Dana M. et al. Direct detection of surface localized specialized metabolites from *Glycyrrhiza lepidota* (American licorice) by leaf spray mass spectrometry. *Planta*, v. 247, n. 1, p. 267-275, 2018.

FURLEY, P.A; RATTER, J.A. Soil resources and plant communities of central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography*, v. 15, p.97-108, 1988.

FURR, Marion; MAHLBERG, Paul G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981.

GABE, Manfred et al. *Techniques histologiques*. Paris: Masson, 1968.

GALHEIGO, Maria Raquel Unterkircher et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. *Natural product research*, v. 30, n. 10, p. 1182-1185, 2016.

GANZERA, Markus; STURM, Sonja. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 147, p. 211-233, 2018.

GIOTTO, Ani Cátia; OLIVEIRA, Sarah Christina Caldas; SILVA, Joelma Gardênia Pereira. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg.(Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. S2, p. 600-602, 2007.

GONZÁLEZ, Cynthia C. Arquitectura foliar de las especies de Myrtaceae nativas de la flora argentina II: Grupo "Eugenia". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 46, n. 1-2, p. 85-104, 2011.

GOODGER, Jason QD et al. Differential metabolic specialization of foliar oil glands in *Eucalyptus brevistylis* Brooker (Myrtaceae). *Tree physiology*, v. 38, n. 10, p. 1451-1460, 2018.

GUEDES, Mayara Neves Santos et al . Minerals and phenolic compounds of cagaita fruits at different maturation stages (*Eugenia dysenterica*). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal , v. 39, n. 1, e-360, 2017 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452017000100302&lng=en&nrm=iso>. access on 01 Aug. 2019. Epub Mar 30, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017360>.

HASLAM, Edwin. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HASSAN, Esmat A.; EL-AWADI, Mohamed E. Brief review on the application of histochemical methods in different aspects of plant research. *Nature and Science*, v. 11, n. 12, p. 54-67, 2013.

HELANDER, Ilkka M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Mapa de biomas brasileiros*. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Escala 1:5.000.000.

ISMAN, Murray B.; MIRESMALLI, Saber; MACHIAL, Cristina. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, v. 10, n. 2, p. 197-204, 2011.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Eugenia in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10499>. Acesso em: 04 Out. 2018

JOHANSEN, Donald Alexander. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.

JONGMAN, R.H.G.; TER BRAAK, C.J.F. & VAN TONGEREN, O.F.R. Data analysis in community and landscape ecology. 2nd ed., Cambridge, *Cambridge Univ. Press*, 1995.

KAUFFMANN, Carla et al. Chemical composition and evaluation preliminary of antileishmanial activity in vitro of essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of southern of Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 20, n. 2, p. 559-569, 2017.

KAWASAKI, M. L. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v.11, p.121- 170, 1989.

KIM, Sunghwan et al. PubChem 2018 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D1102-D1109, 2018.

KLINK, Carlos A.; MACHADO, Ricardo B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KNOBLOCH, Karl et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, v. 1, n. 3, p. 119-128, 1989.

KÖLLNER, Tobias G. et al. Two pockets in the active site of maize sesquiterpene synthase TPS4 carry out sequential parts of the reaction scheme resulting in multiple products. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 448, n. 1-2, p. 83-92, 2006.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. *Manual de Microtécnica Vegetal*. Seropédica, RJ: EDUR, 1997.

KÜLHEIM, Carsten et al. The molecular basis of quantitative variation in foliar secondary metabolites in *Eucalyptus globulus*. *New Phytologist*, v. 191, n. 4, p. 1041-1053, 2011.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis". *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEE, Yeon-Suk et al. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2008.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. *Mirtáceas*. Flora ilustrada catarinense. P. Raulino Reitz. I parte: Fascículo: Myrtaceae, 1969.

LEWINSOHN, Thomas Michael; PRADO, Paulo Inácio. Síntese do Conhecimento Atual da Biodiversidade Brasileira. *In*: LEWINSOHN, T.M. (coord.). Avaliação do Estado do Conhecimento da Biodiversidade Brasileira. v. I., Brasília, Ministério do Meio Ambiente, p.21-109, 2006. (Série Biodiversidade, 15).

LICHTENTHALER, Hartmut K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, v. 50, n. 1, p. 47-65, 1999.

LIMA, T.C. Modelagem dos vetores de mudanças na paisagem do bioma cerrado. *Boletim CEDECOM*, 1821. UFMG, 2013.

LINGARAJU, M. C. et al. Anti-inflammatory effect of dikampferol rhamnopyranoside, a diflavonoid from *Eugenia jambolana* Lam. Leaves. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.54, n.12, p.801-807, 2016.

LIU, Jiangjiang et al. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 83, n. 20, p. 7608-7613, 2011.

LORENZI, Harri. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany*, v. 52, n. 11, p. 2423-2426, 1974.

MACHADO, Leandro Batista et al. Uso da espectrometria de massas com ionização por eletrospray no estudo da influência da irrigação e da resistência ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. em grãos verdes de *Coffea arabica*. 2018.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGINA, Michele Debiasi Alberton . *Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero Eugenia*. 2008. Tese (Doutorado em Química)- Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MAJO, D. D.; GUARDIA, M. La; GIAMMANCO, S.; NEVE, L. La; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem.* v. 111, n. 1, p.45-49, 2008.

MALAJ, Naim et al. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 4, n. 7, p. 1913-1919, 2012.

MANLY, B.F.J. *Multivariate statistical methods: a primer*. 2nd ed., London, Chapman

& Hall, 1994.

MARRIS, E. Conservation in Brazil: the forgotten ecosystem. *Nature*, v. 437, p. 944-945, 2005.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. A-glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. *Pharm. Biol.*, v. 38, p.302-307, 2000.

MAZUTTI DA SILVA, Sandra et al. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 2, 2019.

MCCASKILL, David; CROTEAU, Rodney. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, v. 197, n. 1, p. 49-56, 1995.

MCVAUGH, Rogers. The genera of American Myrtaceae: an interim report. *Taxon*, p. 354-418, 1968.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon, Oxford, 1950.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P.; MITTERMEIER, C. G. (eds.). *Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations*. CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico, 1997.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMAN, H.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREUX, J.; FONSECA, G. A. B. *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. Arlington, VA, EUA: *Conservation international*, 2005.

MORAIS, S. A. L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: isolamento, quantificação e análise estrutural. 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) – ICEX, UFMG, Belo Horizonte, 1992.

MOREIRA, Larissa Cleres et al. Avaliação de alguns aspectos de toxicidade e eficácia do extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* DC para uso dermocosmético. 2013.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M.; SANTOS, T. S. Ecological importance of Myrtaceae in a eastern Brazilian wet forest. *Biotropica*, v. 15, p. 68-70, 1983.

MYERS, Norman. Threatened biotas: "hot spots" in tropical forests. *Environmentalist*, v. 8, n. 3, p. 187-208, 1988.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Natura*, v.403, p.853-845, 2000.

NIC LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 83, p.480-503, 1996.

NIMER, E.; BRANDÃO, A. M. P. M. *Balanço hídrico e clima da região dos Cerrados*. Rio de Janeiro: IBGE, 1989.

NSAI. Aromatic natural raw materials - Vocabulary. 2013.

NUENGCHAMNONG, Nitra; INGKANINAN, Kornkanok. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT-Food Science and Technology*, v. 42, n. 1, p. 297-302, 2009.

OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 9, p. 2587-2588, 2008.

OKAMURA, Hideo et al. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, v. 33, n. 3, p. 557-561, 1993.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. Caracterização química do solo, de folhas e de frutos de Cagaita (*Eugenia dysenterica*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. Informação, globalização, uso do solo. Anais [...] Rio de Janeiro: SBCS, 1997.

OSBOURN, A. E; LANZOTTI, V. *Plant-derived Natural Products - Synthesis, Function and Application*. Springer, 2009.

OXFORD. *A dictionary of Ecology*. Oxford University, Oxford, 2004.

PADOVAN, Amanda et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochemistry reviews*, v. 13, n. 3, p. 695-716, 2014.

PALHARES, Dario. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). *Lecta-USF*, v. 21, n. 1/2, p. 29-36, 2003.

PARMEGGIANI, Camilla et al. Total Synthesis of (-)-Uniflorine A. *Journal of natural products*, v. 72, n. 11, p. 2058-2060, 2009.

PEDRALI, G. Florestas secas sobre afloramentos de calcário em Minas Gerais: florística e fisionomia. *Bios*, Belo Horizonte, v. 5, n. 5, p. 81-89, 1997.

PEIXOTO, A. L.; GENTRY, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.13, p.19-25, 1990.

PEREIRA, Igor et al. Differentiation of toxic and non-toxic leaves of *Jatropha curcas* L. genotypes by leaf spray mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 8, p. 1461-1466, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. v. 3, n. 4, p.146-152, 2012. ISSN-2179-4804.

PETRACHAIANAN, Tipsara et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity in essential oil from Myrtaceae. *TJPS*, v. 43, n. 1, p. 63-68, 2019.

PIERCE, Karisa M. et al. Review of chemometric analysis techniques for comprehensive two dimensional separations data. *Journal of Chromatography A*, v. 1255, p. 3-11, 2012.

PRADO, Ligia Carolina da Silva et al. Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. e *Campomanesia pubescens* O. Berg. 2013.

PRADO, PAULO INÁCIO et al. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente & sociedade*, n. 10, p. 1-15, 2002.

PROENÇA, C. *The Reproductive Biology and the Myrtaceae of the Distrito Federal (Brazil)*. Ph.D. 1991.Thesis. University of St. Andrews. Escócia, 1991.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. *Flores e frutos do cerrado*. Brasília: Ed. UnB, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

RIZZINI, Carlos Toledo. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: III SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. FERRI, M. G. (Coord.). *Anais [...]* São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1971, p. 61-64.

RODRIGUES, Núbbya Macedo; SANDINI, Thaísa Meira; PEREZ, Elisa. Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. *Biosaúde*, v. 12, n. 1/2, p. 1-13, 2010.

RODRIGUES, R. R.; MORELLATO, L.P.C.; JOLY, C. A.; LEITÃO FILHO, H. F. Estudo florístico e fitossociológico em um gradi- ente altitudinal de mata estacional semidecídua, na Serra do Japí, Jundiaí, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, v.12, p. 71- 84, 1989.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. G. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: *UFLA*, 2001. p. 09-30.

ROESLER, Roberta; LORENCINI, Márcio; PASTORE, Gláucia. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Food Science and Technology*, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.

RYLANDS, Anthony B.; BRANDON, Katrina. Unidades de conservação brasileiras. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 27-35, 2005.

SÁ, Rafaela Damasceno; DE OLIVEIRA SANTANA, Asaph Santos Cabral; RANDAU, Karina Perrelli. Caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *Eugenia uniflora* L. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 1, n. 1, p. 96-105, 2016.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANVIDO, G. B.; GARCIA, J. S.; CORILO, Y. E.; VAZ, B. G.; ZACCA, J. J.; COSSO, R. G.; EBERLIN, M. N.; PETER, M.G. Fast screening and secure confirmation of milk powder adulteration with maltodextrin via Electrospray Ionization-Mass Spectrometry [ESI(+)-MS] and selective enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.58, p. 9407–9412, 2010.

SIKKEMA, Jan; DE BONT, Jan A.; POOLMAN, Bert. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos Constituintes Químicos e da atividade antimicrobiana de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, p. 63-70, 2003.

SILVA, Sandra Márcia Mazuti et al. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC.(cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. *Revista Infarma Ciências Farmacêuticas*, v. 27, n. 1, p. 49-95, 2015.

SILVA, Priscila Pereira; GUERRA, Wendell. Rutenio. *Química Nova na Escola*, v. 34, p. 99-100, 2012.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution*, v. 253, n. 1-4, p. 23-32, 2005.

SIQUI, A. et al. Essential oil-antiinflammatory potential. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOBRAL, M., *Fam. Myrtac*. Rio Grande do Sul, v. 70, 2003.

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. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10499>>. Acesso em: junho de 2019.

SOBRATTE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.*, v.579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, Lúcia Kioko Hasimoto et al. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002.

Souza W. *Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais*. Campo Mourão, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SOUZA, Eli Regina Barboza de et al. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) phenology in Goiás State. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 4, p. 1009-1014, 2008.

STEFANELLO, Maria Élide Alves; PASCOAL, Aislan CRF; SALVADOR, Marcos J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal investigations on plant essential oils: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 2, p. 19- 28, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, v. 719, 2004.

TAMBARA, Andréia Limana et al. Purple Pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. *Food and chemical toxicology*, v. 120, p. 639-650, 2018.

THOLL, Dorothea. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: *Biotechnology of isoprenoids*. Springer, Cham, 2015. p. 63-106.

THORNE R.F. Classification and Geography of Flowering Plants. *Bot Review*, v.58, p. 225-348, 1992.

TIETBOHL, Luis AC et al. Green insecticide against Chagas disease: effects of essential oil from *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphs. *Journal of Essential Oil Research*, p. 1-11, 2019.

TUCKER, Arthur O. et al. Essential oils from the leaves of *Eugenia pitanga* (O. Berg) Kiaersk.(Myrtaceae) of Paraguay cultivated in Arizona. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, n. 4, p. 43-45, 2011.

TUREK, Claudia; STINTZING, Florian C. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

TYLER, V.E. *Phytomedicines: back to the future*. *J. Nat. Prod.*, v.62, p.1589-1592, 1999.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria A. M. Plantas medicinais: Cura segura? *Quim. Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, 519-528, 2005.

VERMA, Govinda; MISHRA, Manish. DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF UV-VIS SPECTROSCOPY-A REVIEW. 2018.

VICINI, Lorena; SOUZA, Adriano Mendonça. Análise multivariada da teoria à prática. Santa Maria: UFSM, CCNE, p. 32, 2005.

VILELA, Eliane C. et al. Spatial structure of *Eugenia dysenterica* based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 10, p. 1776-1782, 2012.

ZHANG, Ning et al. Rapid detection of polyhydroxylated alkaloids in mulberry using leaf spray mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 5, n. 10, p. 2455-2460, 2013.

WALTER, B.M.T.; CARVALHO, A.M.; RIBEIRO, J.F.; SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. In: SANO, S. M., ALMEIDA, S.P. (eds). Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, cap. 1, 2008.

WALTER, Bruno Machado Teles; CARVALHO, Arminda M.; RIBEIRO, José F. O conceito de savana e de seu componente Cerrado. *Cerrado: ecologia e flora*, v. 1, p. 21-45, 2008.

WANG, He et al. Direct analysis of biological tissue by paper spray mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 83, n. 4, p. 1197-1201, 2011.

WHO, World Health Organization. Monographs on selected medicinal plants, v. 2, Geneva, 2002

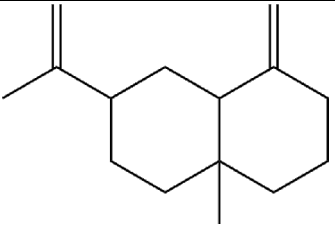
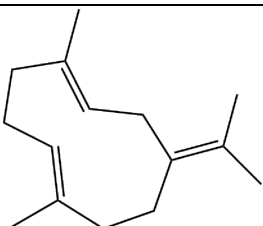
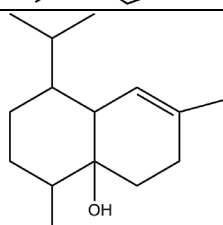
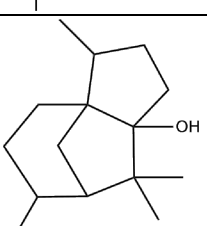
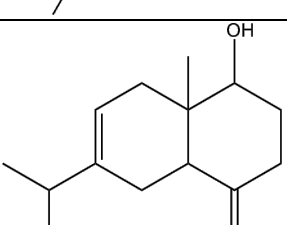
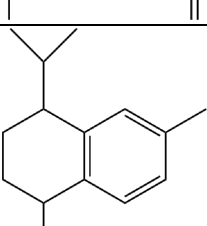
WINK, Michael. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015.

WISE, Mitchell L. et al. Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1, 8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 24, p. 14891-14899, 1998.

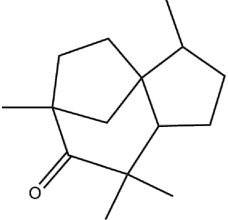
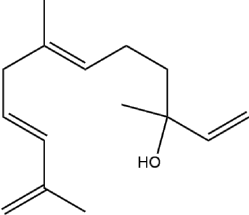
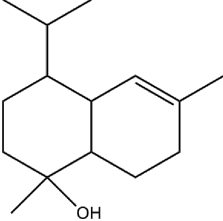
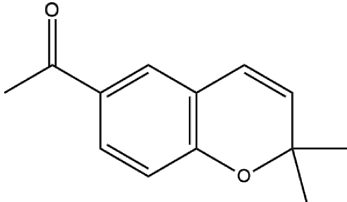
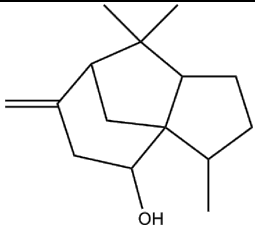
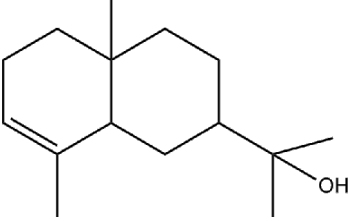
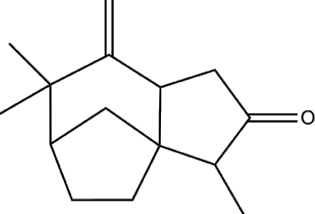
APÊNDICES

**APÊNDICE A – TABELAS OBTIDAS DA IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *EUGENIA PITANGA* E *EUGENIA DYSENTERICA***

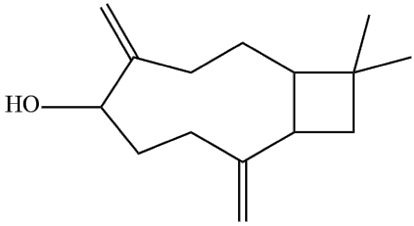
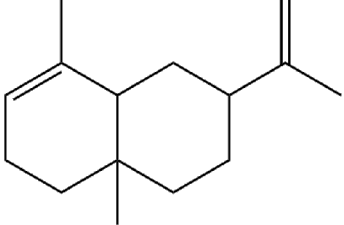
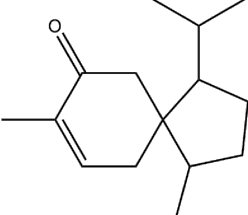
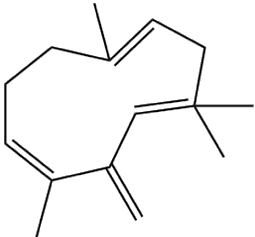
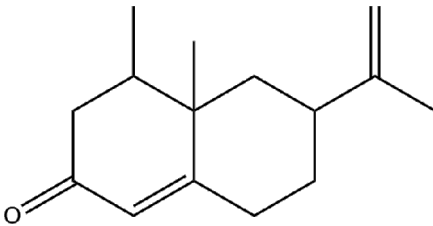
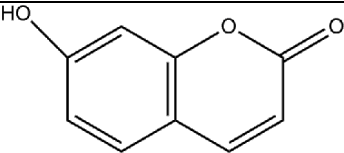
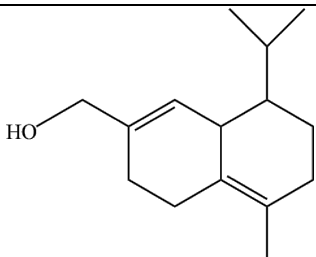
Tabela A1 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (Fresca) na estação Verão.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
22,36	β – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
25,907	Cubenol		1640	1642 ^{a,c,d} 1645 ^f
26,61	Cedranol-5-iso		1672	1672 ^{b,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
29.69	Tras-Calamenene		1520	1521 ^{b,f}

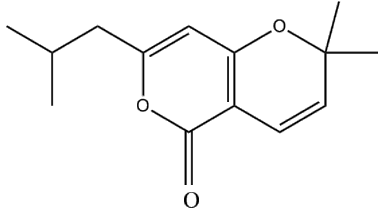
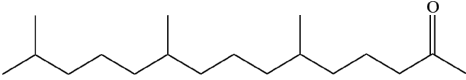
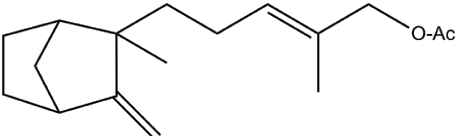
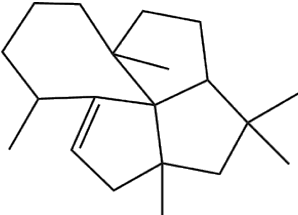
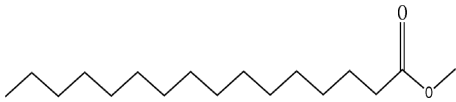
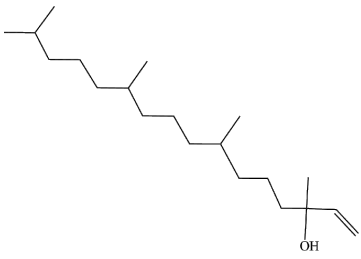
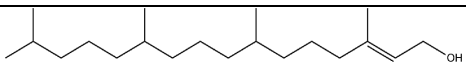
continua

31.22	Eremophila Ketone		1557	1558 ^{a,b,c}
32.73	Fokienol		1592	1596 ^{b,c}
34.38	Cadinol (epi- Alfa)		1637	1638 ^{a,f}
34.68	Desmethoxy Encecalin		1645	1646 ^{a,f}
34.85	Cedr-8(15)-en- 10-ol		1649	1650 ^f
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
35.54	Zizanone		1669	1670 ^{a,b,f}

continua

36,22	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol		1640	1640 ^{b,f}
36,38	Selina-3,11-dien-6- α -ol		1644	1644 ^f 1642 ^b
36.64	Acorenone B		1696	1697 ^{b,f}
37.94	Zerumbone		1772	1733 ^{c,f}
40.62	Nootkatone		1802	1806 ^{a,b,f}
41.69	Coumarin <7-hydroxy->		1834	1836 ^{b,f}
42,09	14-Hydroxy- δ -cadinene		1803	1803 ^{B,D,F}

continua

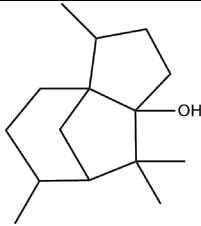
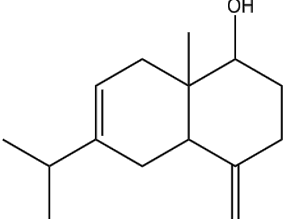
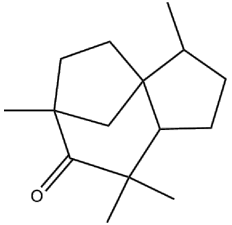
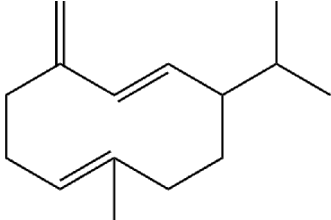
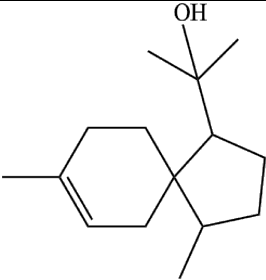
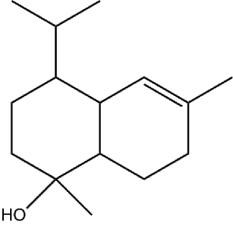
42,31	Pyran-5-one(2,20dimethyl-7-isobutyl-2H,5H-pyrano(4,3-b))		1808	1810 ^{a,b,f}
43,42	Hexahydrofarnesyl acetone		1844	1844 b,d
44,22	Sanlatol Acetate (E) beta		1868	1868 ^f 1869 ^d 1867 ^b
44,61	Laurenene		1880	1880 ^f 1872 ^{b,d}
45,9	Methyl hexadecanoate		1920	1921 ^f 1920 ^{b,c,d}
46,78	Isophytol		1947	1946 ^f 1949 ^b
51,88	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

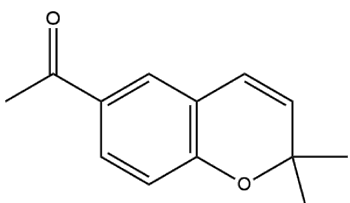
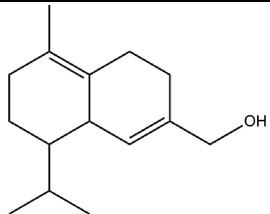
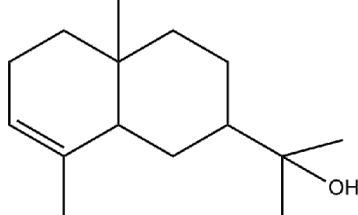
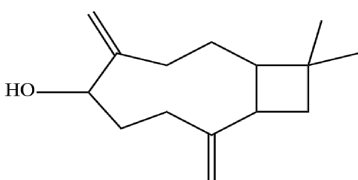
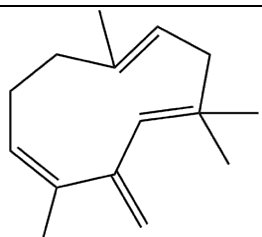
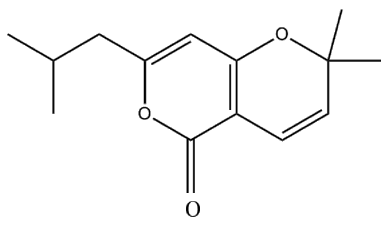
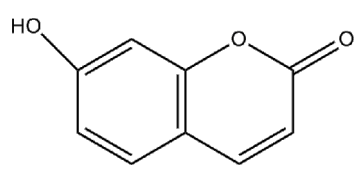
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

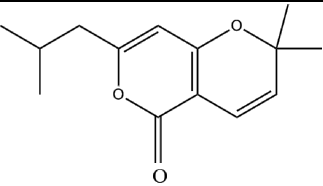
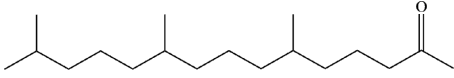
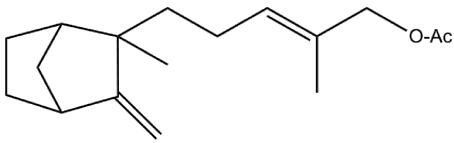
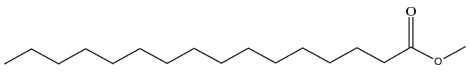
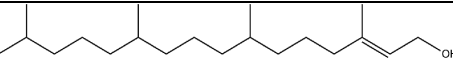
Tabela A2 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (Seca) na estação verão.

Tempo de Retenção (R.T)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
26,61	Cedranol-5-iso		1671	1672 ^{b,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
31.22	Eremophila Ketone		1557	1558 ^{a,b,c}
33,2	Germacrene D		1505	1560 ^f 1566 ^b
34.30	Acorenol < β ->		1630	1636 ^{a,b,f}
34.61	Muurolol < α ->		1643	1644 ^{b,c,f}

continua

34.68	Desmethoxy Encecalin		1645	1646 ^{b,f}
34.69	Cadinene (14- hydroxy- δ)		1803	1805 ^d 1803 ^{a,b,d,f}
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
36.22	Caryophylla- 4(12),8(13)- dien-5 α -ol		1640	1640 ^{b,f}
37.94	Zerumbone		1672	1733 ^{b,c}
40.74	Pyran-5- one(2,20dimet hyl-7-isobutyl- 2H,5H- pyrano(4,3-b))		1808	1810 ^{a,b,f}
41.69	Coumarin <7- hydroxy->		1834	1836 ^{b,f}

continua

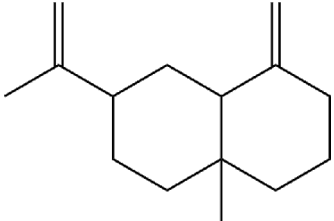
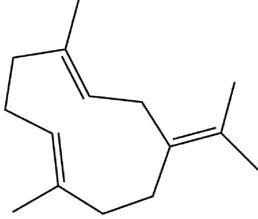
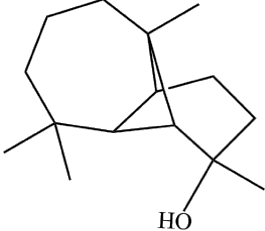
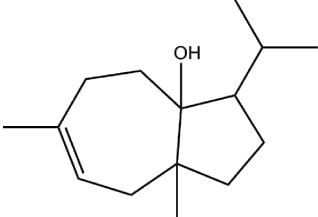
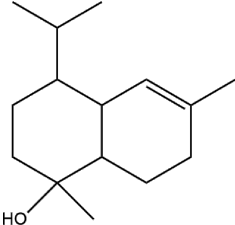
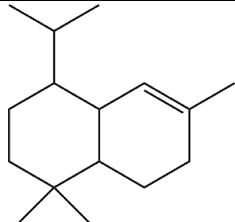
42,31	Pyran-5-one(2,20dimethyl-7-isobutyl-2H,5H-pyrano(4,3-b))		1808	1810 ^{a,b,f}
43,42	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl		1844	1844 ^{a,b,c,d}
44,22	Sanlatol Acetate (E) beta		1868	1868 ^f 1869 ^d 1867 ^b
45,9	Methyl hexadecanoate		1920	1921 ^f 1920 ^{b,c,d}
51,88	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

Tabela A3 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (fresca) na estação outono.

Tempo de Retenção (R.T)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovaks (K.I)	
			Calculado	Literatura
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24,18	Longipinanol		1564	1570 ^{a,c}
24,96	Carotol		1597	1600 ^{a,b,c,d,f}
25,74	Cadin-4-en-10-ol		1632	1635 ^{a,f}
26,01	T-Muurolol		1644	1644 ^f

continua

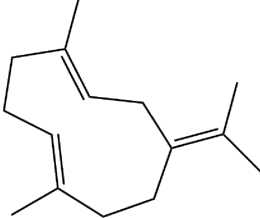
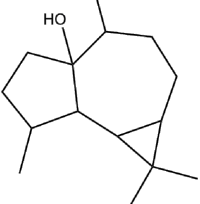
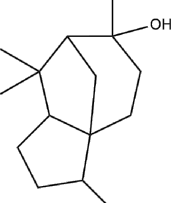
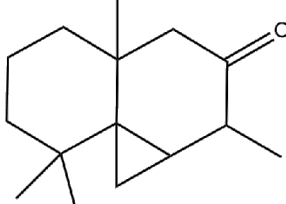
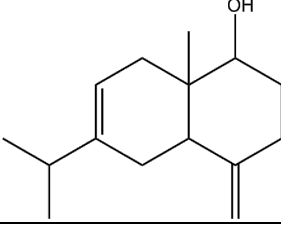
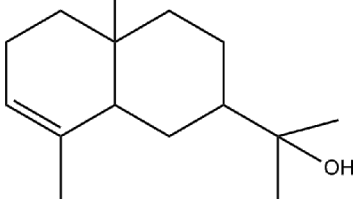
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
27,41	Eudesma-35-dien-1-alpha-ol		1708	1708 ^d
34.85	Cedr-8(15)-en-10-ol		1649	1650 ^f
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
36,39	Cadinol		1644	1650 ^{a,b,c,d,f}
36,55	Beta-eudesmol		1650	1654 ^{a,b,c,d,f}
36.64	Acorenone B		1696	1697 ^{b,f}
51,88	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

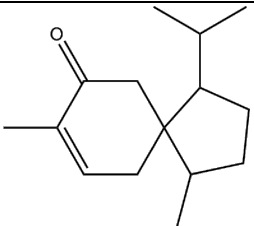
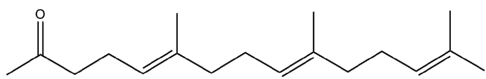
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

Tabela A4 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (Seca) na estação outono.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24,28	Palustrol		1568	1567 ^f
25.596	Epicedrol		1614	1611 ^{a,b,c,f}
25,96	3-iso-Thujopsanone		1643	1642 ^{a,b,c,d,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}

continua

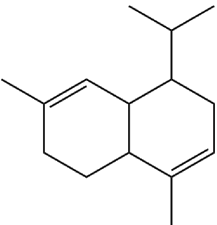
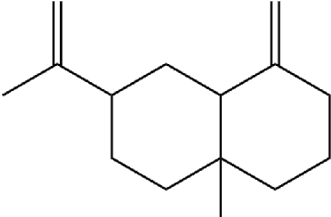
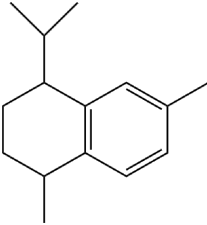
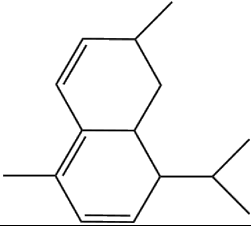
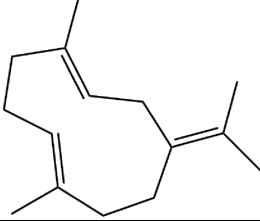
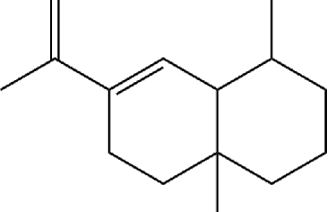
36.64	Acorenone B		1696	1697 ^{b,f}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

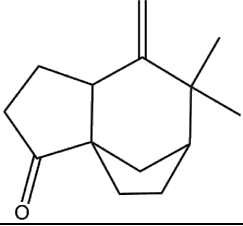
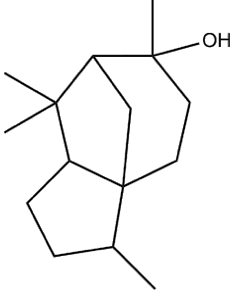
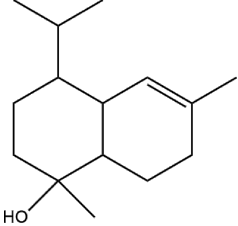
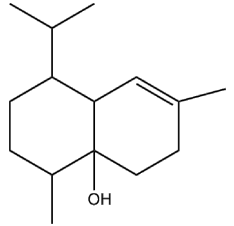
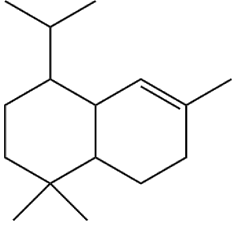
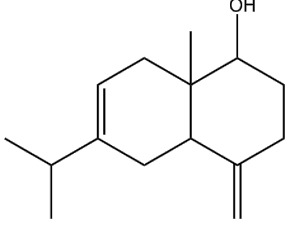
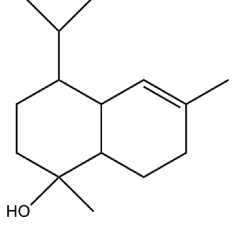
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

Tabela A5 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (Fresca) na estação primavera.

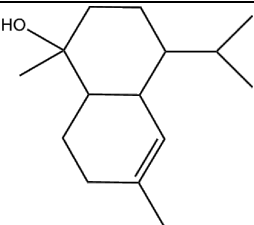
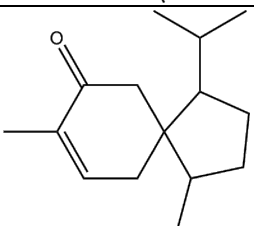
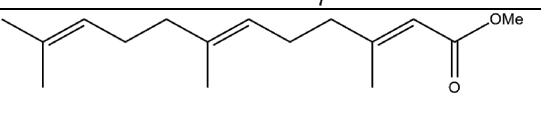
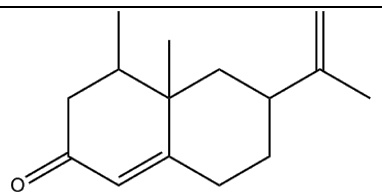
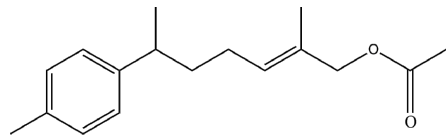
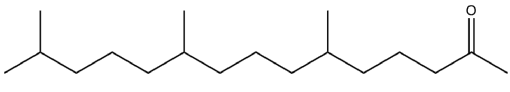
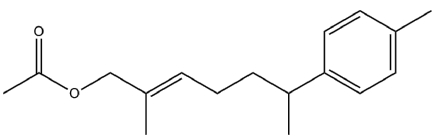
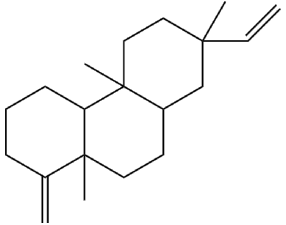
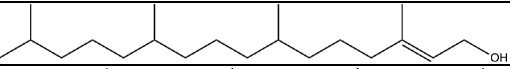
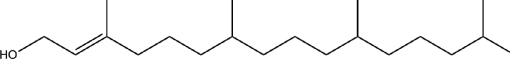
Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
22,272	α -Amorphene		1486	1486 ^{a,b,c,d}
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
23,13	Trans-Calamenene		1520	1521 ^f
23.830	Cadala-1(10),3,8-triene		1470	1469 ^f
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24.494	Eudesma-6,11-Diene		1490	1489 ^f

continua

25.219	Khusimone		1604	1604 ^{b,f,d}
25.596	Epicedrol		1614	1611 ^{a,b,c,f}
25,74	Cadin-4-en-10-ol		1632	1635 ^{a,f}
25,907	Cubenol		1640	1642 ^{a,c,d} 1645 ^f
26,01	T-Muurolol		1644	1644 ^f
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
27.070	Torreyol		1648	1646 ^{c,d,f}

27,41	Eudesma-35-dien-1- α -ol		1708	1708 ^d
30.351	6,10,14-trimethylpenta-decan-2-one		1825	1824 ^{a,b,d}
32,57	α -calacorene		1544	1544 ^{a,b,c,d,f}
34.38	Cadinol (epi-Alfa)		1637	1638 ^{a,f}
34,69	Cadinene (14-hydroxy- δ)		1803	1805 ^d 1803 ^{a,b,d,f}
34.85	Cedr-8(15)-en-10-ol		1649	1650 ^f
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
35,97	Eudesma-4,11-dien-2-ol		1632	1691 ^{a,b}

continua

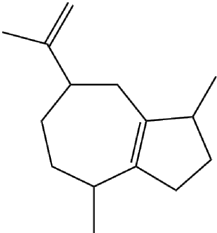
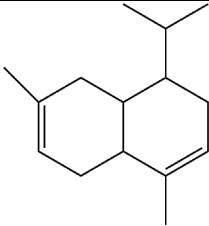
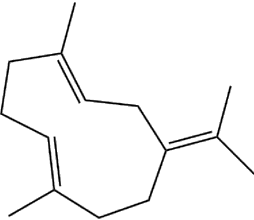
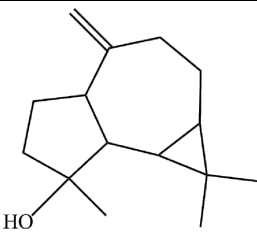
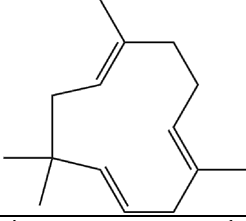
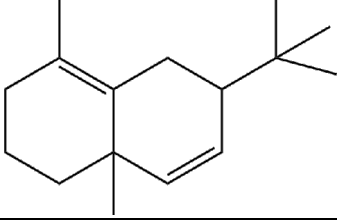
36,39	Cadinol		1644	1650 ^{a,b,c,d,f}
36,64	Acorenone B		1696	1697 ^{b,f}
39,79	Methyl Farnesoate		1782	1784 ^f
40,62	Nootkatone		1802	1806 ^{a,b,f}
43,32	Nuciferol acetate		1838	1838 ^f
43,52	2-Pentadecanon e-6,10,14-trimethyl		1847	1847 ^{b,c,d,f}
43,75	2-hepten-1-ol, 2-methyl-6-(4-methylphenyl)-acetate		1854	1838 ^{a,b,d}
48,57	13-epi-Dolabradiene		2002	2006 ^{b,d}
51,88	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}
52,01	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-		2117	2117 ^{b,c,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

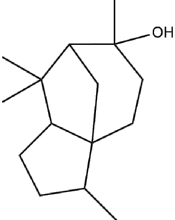
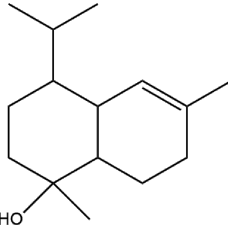
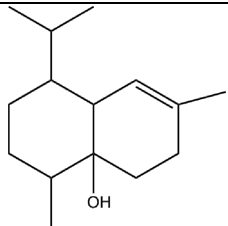
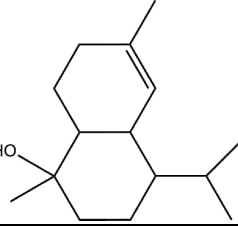
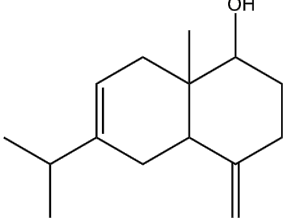
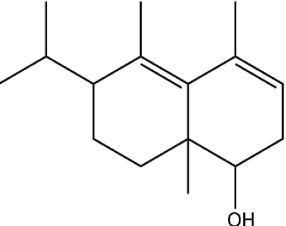
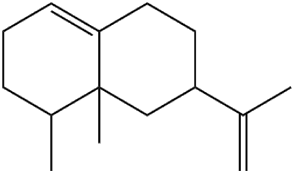
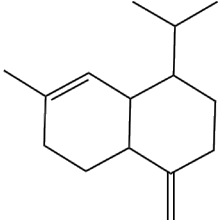
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

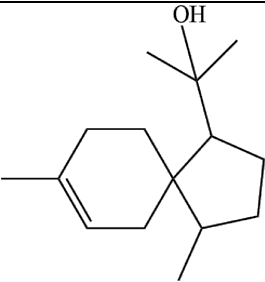
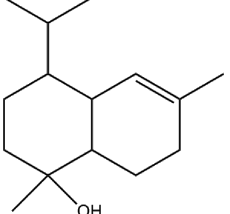
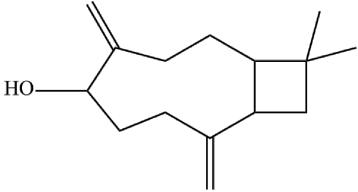
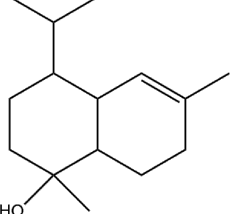
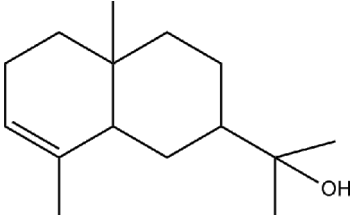
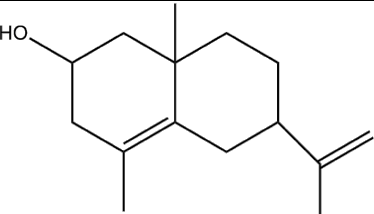
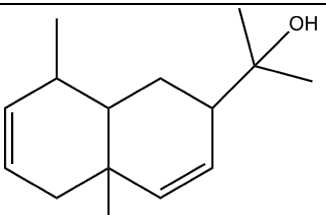
Tabela A6 - Composição dos óleos essenciais da espécie *E. dysenterica* (Seca) na estação primavera.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
21,339	α -Guaiene		1447	1447 ^{b,c,d}
23,11	β -Cadinene		1520	1518 ^{b,c} 1520 ^d (tem em b em DB-5)
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24.664	Spathulenol		1584	1578 ^{a,d,f}
25.36	α -Caryophyllene		1416	1417 ^{a,f}
25,591	γ -Eudesmol		1625	1625 ^{b,c,d}

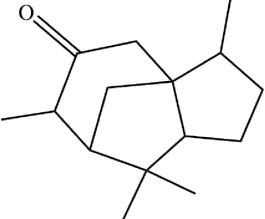
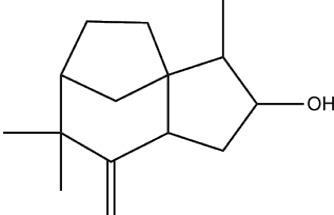
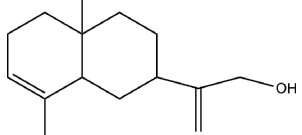
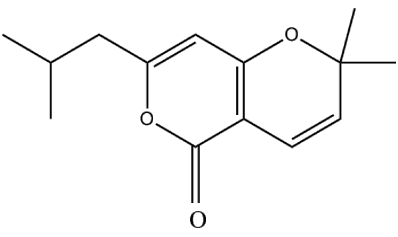
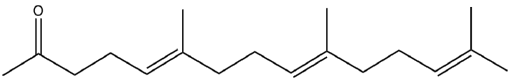
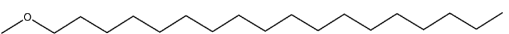
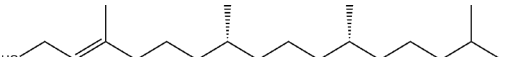
continua

25.596	Epicedrol		1614	1611 ^{a,b,c,f}
25,74	Cadin-4-en-10-ol		1632	1635 ^{a,f}
25,907	Cubenol		1640	1642 ^{a,c,d} 1645 ^f
26,095	t-cadinol		1646	1640 ^{c,d}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
27,41	Eudesma-35-dien-1- α -ol		1708	1708 ^d
28.66	Valencene		1493	1496 ^f
29.35	γ -Cadinene		1512	1513 ^{d,f}

continua

34.30	Acorenol β->		1630	1636 ^{a,b,f}
34.38	Cadinol (epi-Alfa)		1637	1638 ^{a,f}
36,22	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol		1640	1640 ^{b,f}
34.61	Muurolol α>		1643	1644 ^{b,c,f}
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
35,97	Eudesma-4,11-dien-2-ol		1632	1691 ^{a,b}
36,55	Beta-eudesmol		1650	1654 ^{a,b,c,d,f}

continua

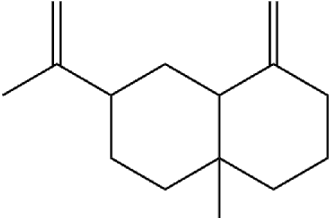
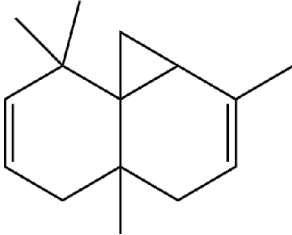
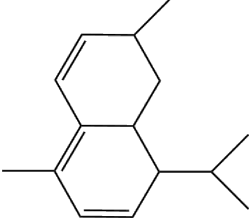
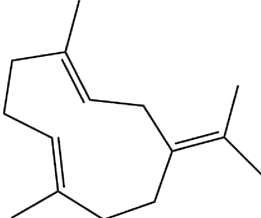
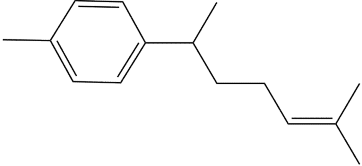
36,82	1H-3a,7-methanoazuleno-5(4H)-one, hexahidro-3,6,8,8-tetrametil		1656	1617 ^{b,d}
38.26	Zizanol		1740	1742 ^f
39.42	α Costol		1771	1773 ^{a,f}
40.74	Pyran-5-one(2,20dimetil-7-isobutil-2H,5H-pirano(4,3-b))		1808	1810 ^{a,b,f}
44.37	E-E farnesil Acetone		1911	1913 ^{a,f}
44,8	1-Octadecanol, metil eter		1886	2032 ^b
52,01	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-		2116	2117 ^{b,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

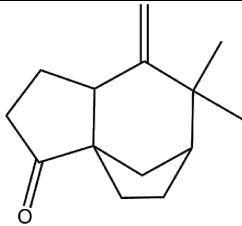
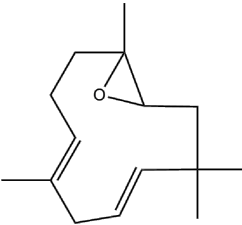
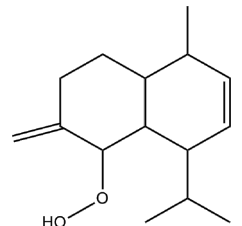
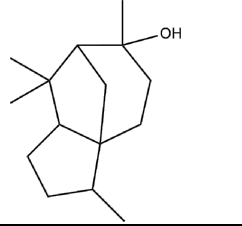
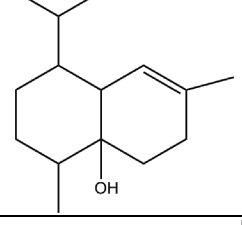
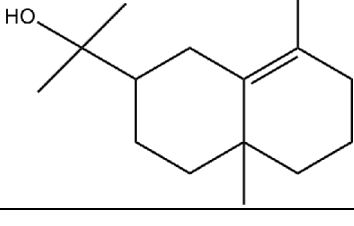
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

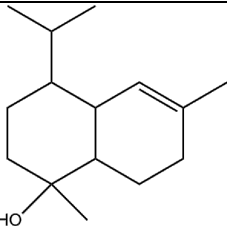
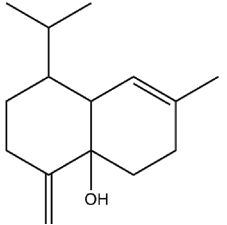
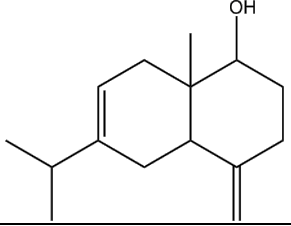
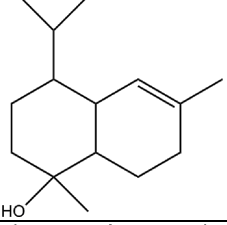
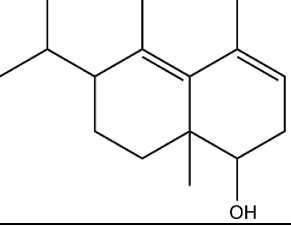
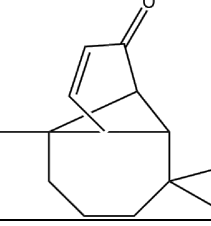
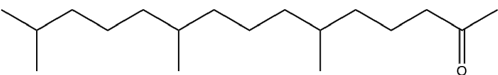
Tabela A7 – Composição dos óleos essenciais de *E. dysenterica* (Fresca) na estação inverno.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
23.345	Thujopsadiene		1467	1467 ^{b,c,d,f}
23.830	Cadala-1(10),3,8-triene		1470	1469 ^f
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24.226	Curcumene		1485	1485 ^{b,c,f}

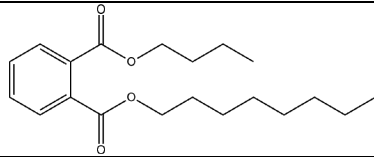
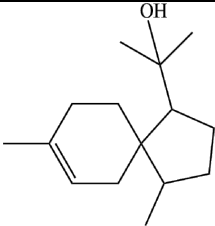
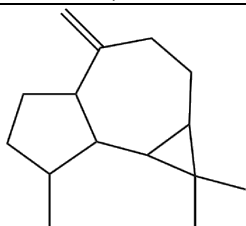
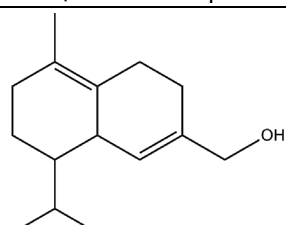
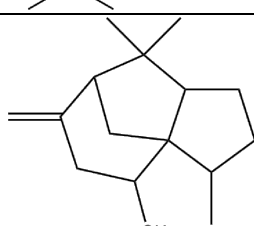
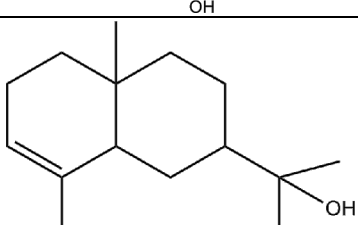
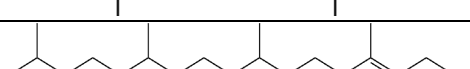
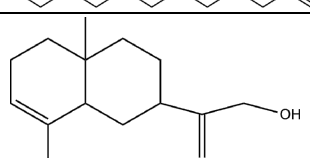
continua

25.219	Khusimone		1604	1604 ^{b,f,d}
25.407	Humulene Epoxide II		1609	1609 ^{b,d,f}
25.530	Murolan-3,9 (11)-diene- 10-peroxy		1612	1612 ^{a,d}
25.596	Epicedrol		1614	1611 ^{a,b,c,f}
25,907	Cubenol		1640	1642 ^{a,c,d} 1645 ^f
26.104	10-Epi- Gamma - Eudesmol		1626	1623 ^f

continua

26.217	Epi-cadinol		1628	1632
26.740	Muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol		1641	1635 ^b
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
27.070	Torreyol		1648	1646 ^{c,d,f}
27,41	Eudesma-35-dien-1-alpha-ol		1708	1708 ^d
27.211	Vulgarone B		1652	1651 ^f
30.351	6,10,14-trimethylpenta decan-2-one		1825	1824 ^{a,b,d}

continua

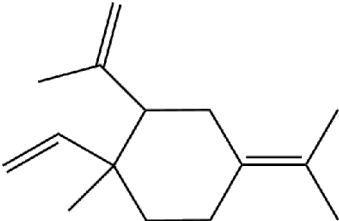
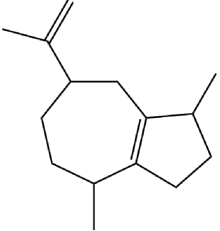
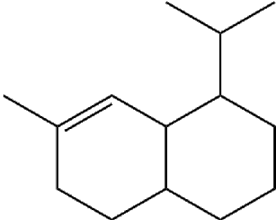
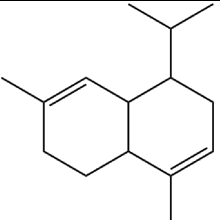
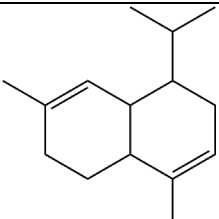
30,879	Butyl Octyl Phthalate		1874	1875 ^{a,b,c,d}
34.30	Acorenol β->		1630	1636 ^{a,b,f}
34.42	Alloaromadendrene		1635	1639 ^{a,d}
34,69	Cadinene (14-hydroxy- δ)		1803	1805 ^d 1803 ^{a,b,d,f}
34.85	Cedr-8(15)-en-10-ol		1649	1650 ^f
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
35.644	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}
39.42	α Costol		1771	1773 ^{a,f}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

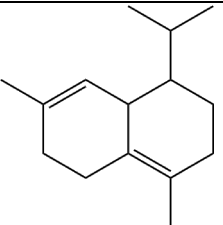
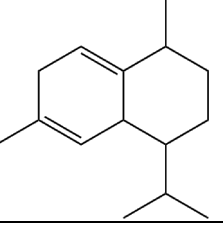
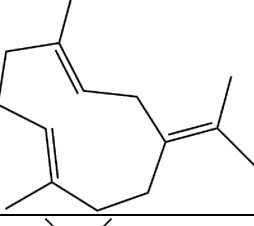
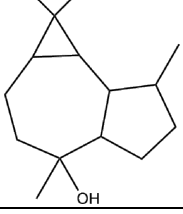
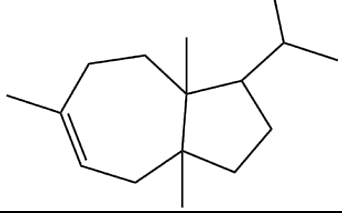
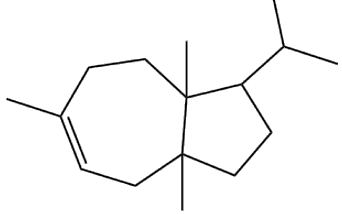
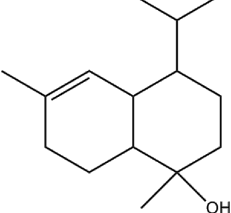
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

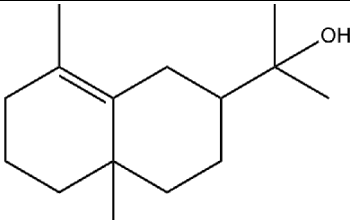
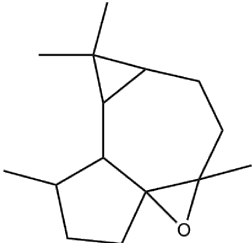
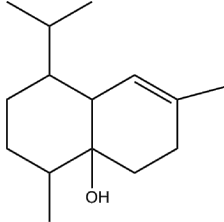
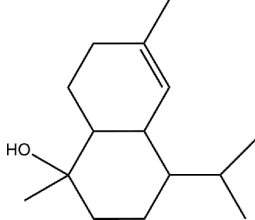
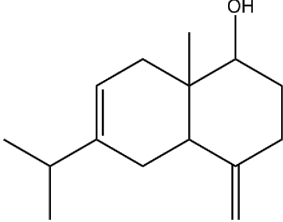
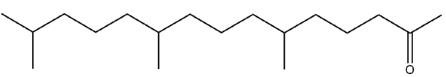
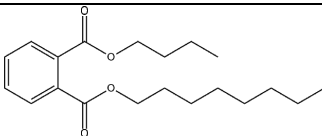

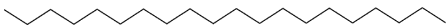
Tabela A8 – Composição dos óleos essenciais de *E. dysenterica* (Seca) na estação inverno.

Tempo de Retençã o (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
21,09	γ -Elemene		1437	1437 ^{a,b,c,d}
21,339	α -Guaiene		1447	1447 ^{b,c,d}
22,182	γ -Muurolene		1482	1482 ^{b,d}
22,272	α -Amorphene		1486	1486 ^{a,b,c,d}
22,761	α -Muurolene		1506	1506 ^{b,d}

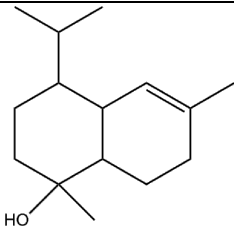
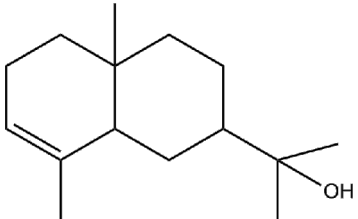
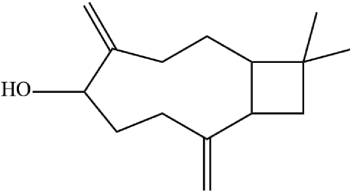
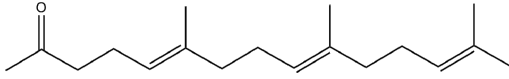
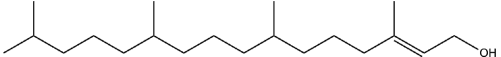
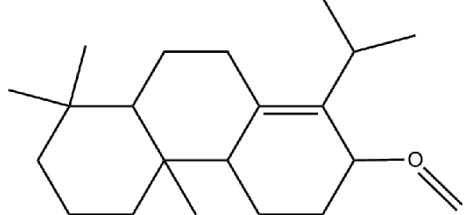
continua

23,32	Δ -Cadinene		1529 1529	1529 ^{b,d} 1530 ^c
23,538	1,4-Cadinadiene		1538	1539 ^{b,d}
24,08	Germacrene B		1560	1559 ^{d,f}
24,216	Ledol		1566	1566 ^{b,d}
24,96	Carotol		1597	1600 ^{a,b,c,d,f}
24,998	α -Guaiol		1598	1598 ^{b,d}
25,205	τ -Muurolol		1607	1608 ^{b,c,d} (HP-5) 1607 ^{b,d} (DB-1)

continua

25,591	γ -Eudesmol		1625	1625 ^{b,c,d}
25,803	Ledene Oxide-(II)		1635	1631 ^d
25,808	Beta-Acorenol		1635	1635 ^{a,c,d}
26,095	T-cadinol		1646	1640 ^{c,d}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
30,342	Phytone		1847	1849 ^{c,d}
30,879	Butyl Octyl Phthalate		1874	1875 ^{a,b,c,d}
31,416	Nonadecane		1901	1900 ^{a,b,c,d,f}
33,351	Eicosane		1999	2000 ^{a,b,c,d,f}

continua

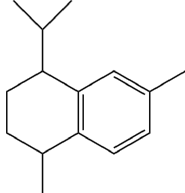
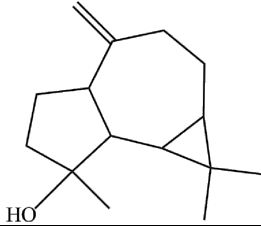
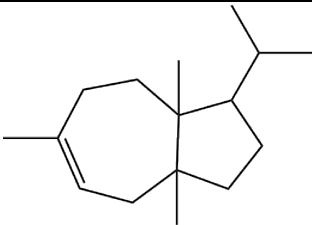
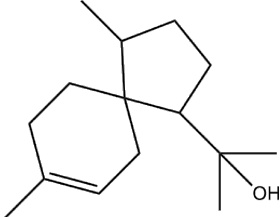
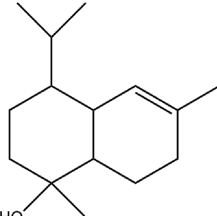
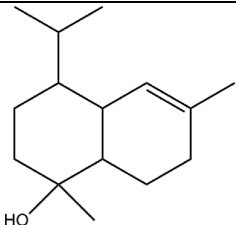
34.61	Muurolol < α >		1643	1644 ^{b,c,f}
34.91	Eudesmol (alfa)		1652	1653 ^{a,f}
36,22	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol		1640	1640 ^{b,f}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
51,88	Phytol		2064	2100 ^{a,b,c,d}
53.78	Totarol <cis->, methyl ether			2208

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

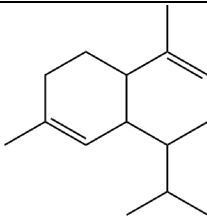
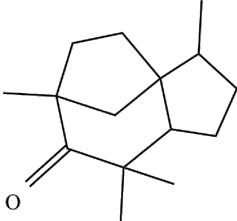
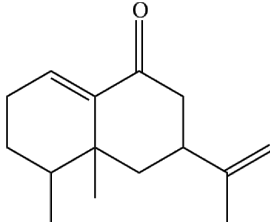
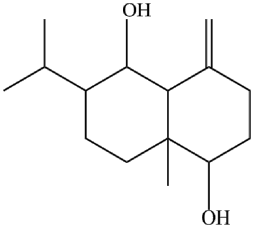
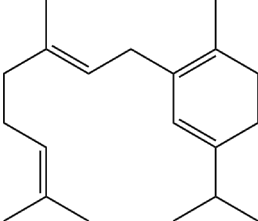
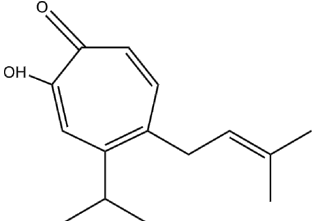
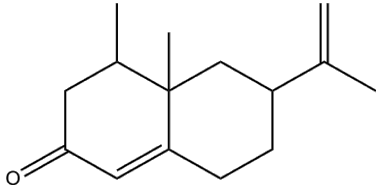
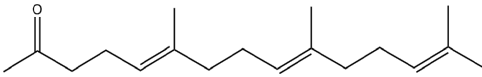
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadam

Fonte: próprio autor

Tabela A9 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (Fresca) na estação inverno.

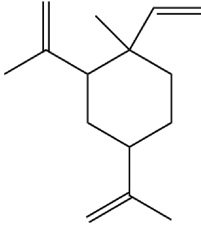
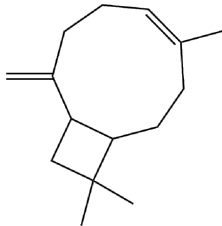
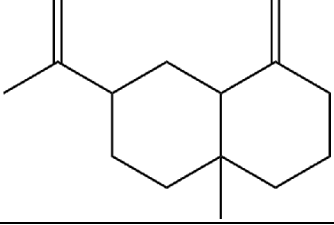
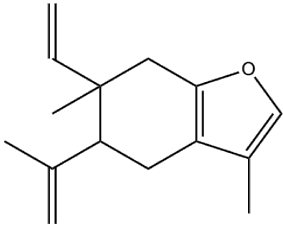
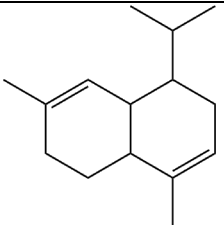
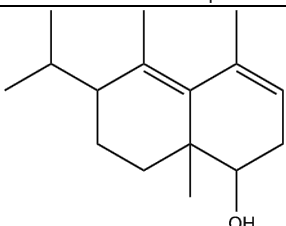
Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
23,13	Trans-Calamenene		1520	1521 ^f
24.664	Spathulenol		1584	1578 ^{a,d,f}
24,96	Carotol		1597	1600 ^{a,b,c,d,f}
26.434	α -acorenol		1634	1632 ^{a,d}
27.070	Torreyol		1648	1646 ^{c,d,f}
27.343	α -cadinol		1655	1652 1662

continua

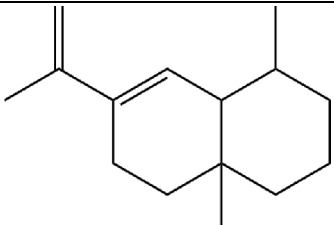
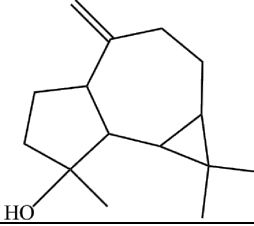
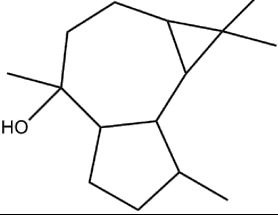
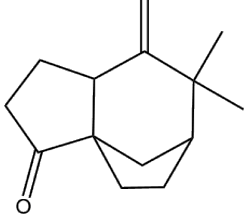
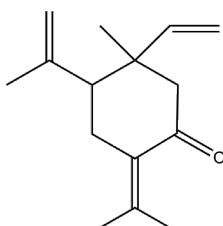
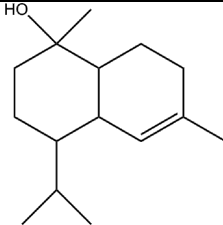
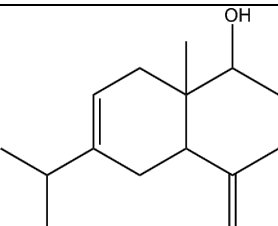
27.91	Muurolene		1476	1478 ^f
31.22	Eremophila Ketone		1557	1558 ^{a,b,c}
31.510	Eremophilone		1848	1847 ^f
31.915	Platambin		1865	1867
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}
33.987	Nootkatin		2018	1960
40.62	Nootkatone		1802	1806 ^{a,b,f}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams **Fonte:** próprio autor

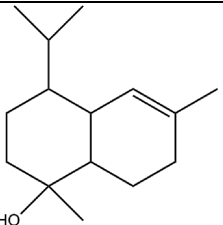
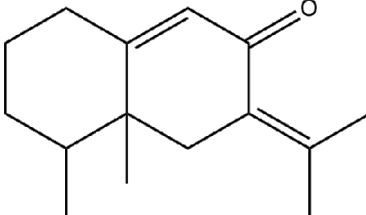
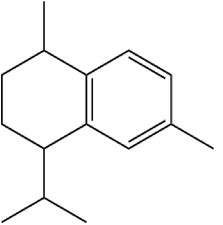
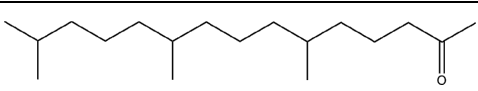
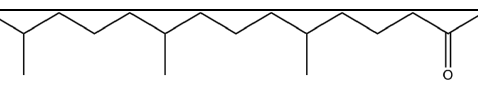
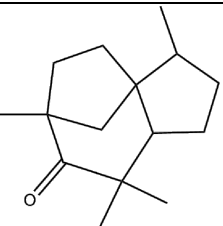
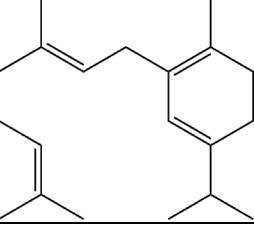
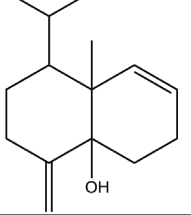
Tabela A10 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (Seca) na estação inverno.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
20.035	β - Elemene		1394	1393 ^{a,b,c,f}
20.760	E-Caryophyllene		1423	1419 ^{a,b,c,d,e}
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
22.695	Curzerene		1503	1499 ^{a,f}
22,761	α -Muurolene		1506	1506 ^{b,d}
23,68	Eudesma-3,5 dien- 1-ol		1544	1546 ^{a,d}

continua

24.494	Eudesma-6,11-Diene		1490	1489 ^f
24.664	Spathulenol		1584	1578 ^{a,d,f}
24.805	Globulol		1590	1590 ^b
25.219	Khusimone		1604	1604 ^{b,f,d}
25.262	β -Elemenone		1610	1590 ^{a,b}
26.420	Eudesmol		1663	1663 ^{b,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)

continua

27.070	Torreyol		1648	1646 ^f
29.655	Dehydrofukinone		1813	1813
29.810	Trans calamenene		1820	1816 ^{a,d}
30,342	Phytone		1847	1849 ^{c,d}
30.351	6,10,14-trimethylpentadecan-2-one		1825	1824 ^{a,b,d}
31.22	Eremophila Ketone		1557	1558 ^{a,b,c}
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}
34.06	Muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol		1628	1630 ^{a,f}

continua

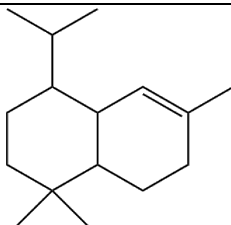
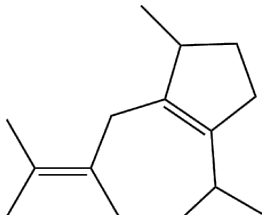
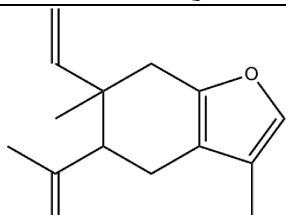
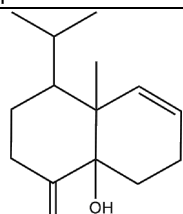
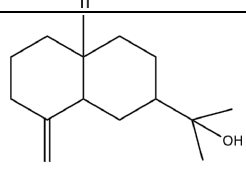
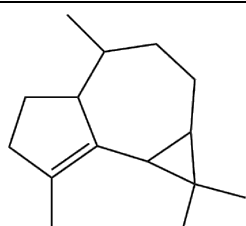
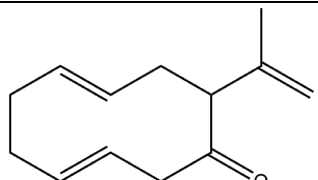
34.13	Acorenol < α ->		1630	1632 ^{a,f}
34.61	Muurolol < α >		1643	1644 ^{b,c,f}
34.93	α Cadinol		1654	1654 ^{a,f}
35.644	Phytol		2064	2100
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
44,61	Laurenene		1880	1880 ^f 1872 ^{b,d}
47.826	Muurol-4-en-3,8-dione		1780	1784 ^c

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

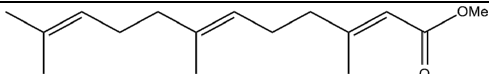
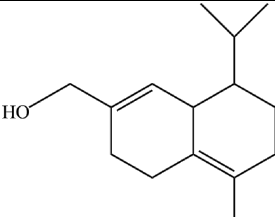
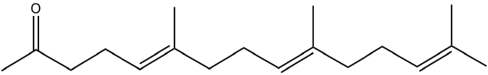
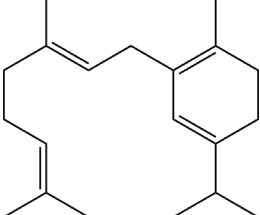
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

Tabela A11 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (Fresca) na estação verão.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
26,01	T-Muurolol		1644	1644 ^f
28.51	Beta Guaiene		1500	1502 ^f
22.695	Curzerene		1503	1499 ^{a,f}
34.06	Muurola-4,10(14)-dien-1β-ol		1628	1630 ^{a,f}
34.79	Eudesmol <β->		1646	1649 ^{a,f}
25.00	1-Epi-alpha-gurjunene		1408	1409 ^d
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}

continua

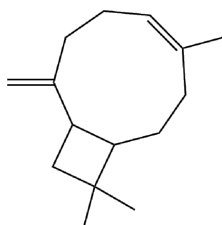
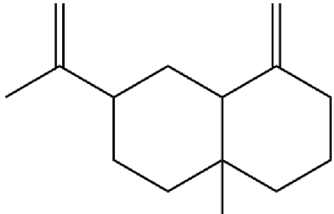
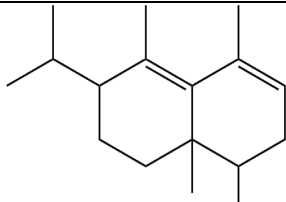
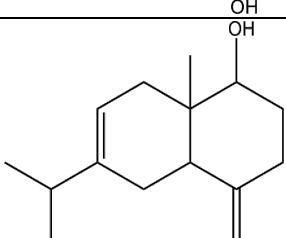
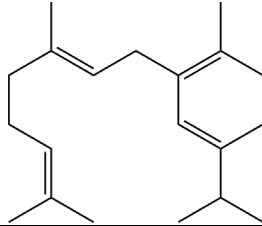
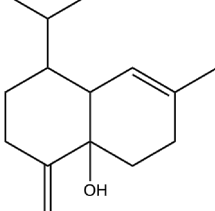
39.79	Methyl Farnesoate		1782	1784 ^f
42.09	14-Hydroxy- δ -cadinene		1803	1803 ^{B,D,F}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
33.38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

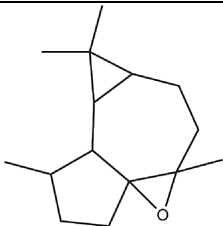
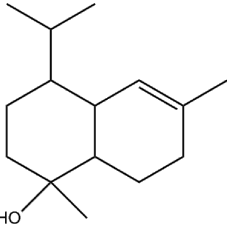
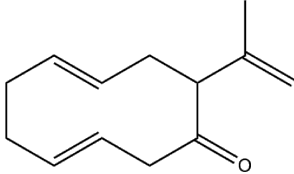
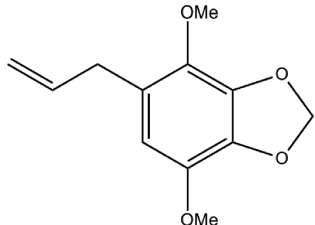
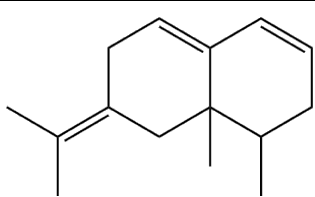
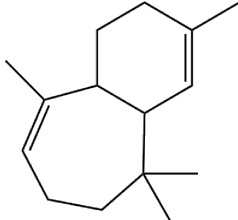
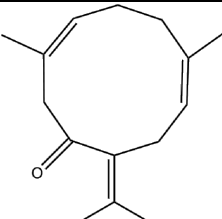
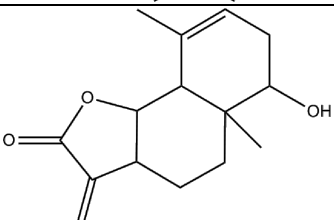
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

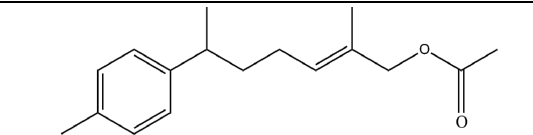
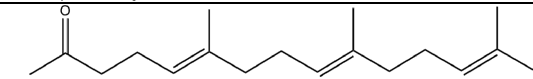
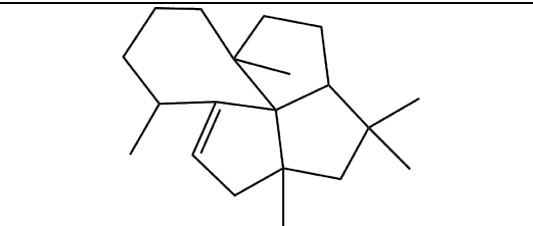
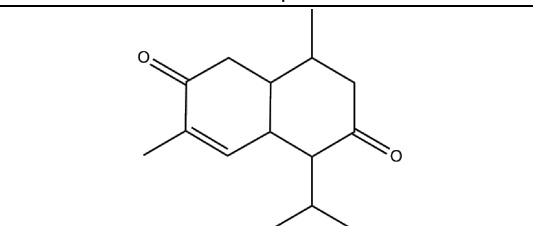
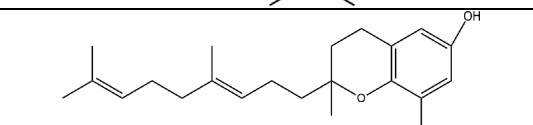
Tabela A12 – Composição dos óleos essenciais de *E. pitanga* (SECA) – estação verão

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
20,760	E-Caryophyllene		1423	1419 ^{a,b,c,d,e}
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
23,68	Eudesma-3,5 dien- 1-ol		1544	1546 ^{a,d}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}
34,06	Muurola-4,10(14) - dien-1β-ol		1628	1630 ^{a,f}

continua

34.081	Ledene Oxide II		2039	2040 ^d
34.61	Muurolol α		1643	1644 ^{b,c,f}
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}
35.87	Apiole		1680	1678
35.878	beta-Vatirene		2138	2138 ^{a,f}
36.805	gamma-Himachalene		2189	2189 ^{b,c}
38.259	Germacrol		1999	2001 ^a
42.075	Santamarin		2511	2227 ^b

continua

43,32	Nuciferol acetate		1838	1838 ^f
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
44,61	Laurenene		1880	1880 ^f 1872 ^{b,d}
47.826	Muurolo-4-en-3,8-dione		1780	1784 ^c
48.123	Oligandrol		2700	2710 ^f

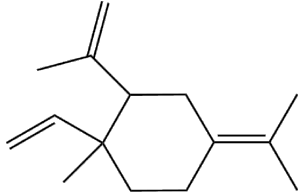
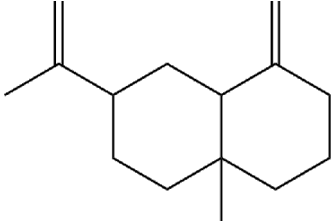
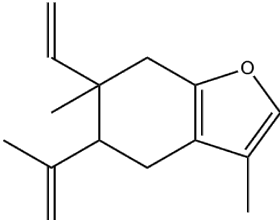
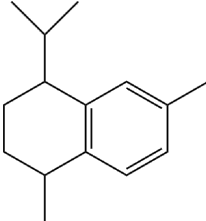
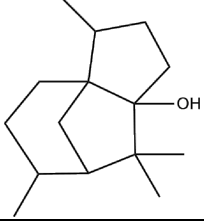
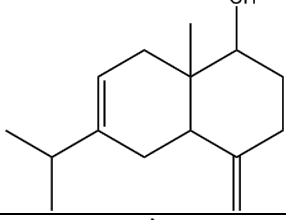
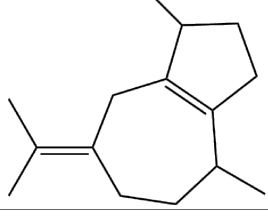
^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

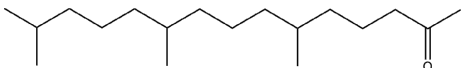
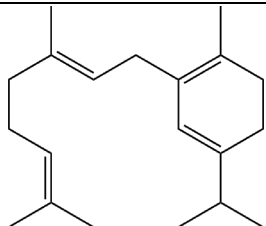
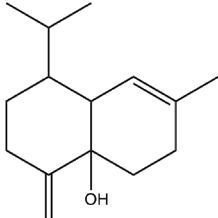
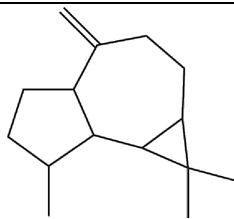
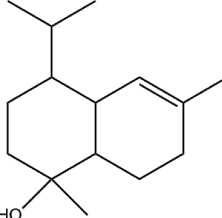
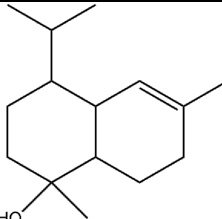
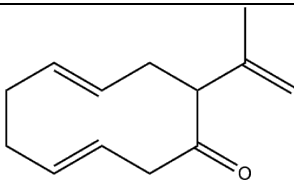
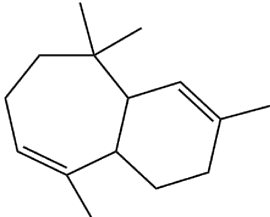
Fonte: próprio autor

Tabela A13 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (seca) na estação primavera.

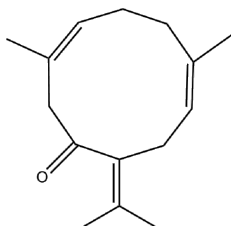
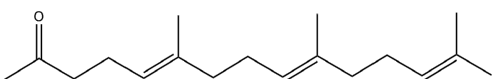
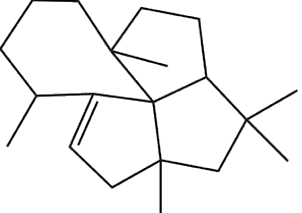
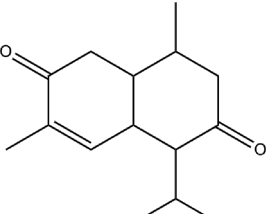
	Estrutura	Índice de
--	-----------	-----------

Tempo de Retençã o (T.R)	Compostos Isolados	Química	Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
21,09	γ -Elemene		1437	1437 ^{a,b,c,d}
22,36	Beta – Seliene		1489	1489 ^{a,b,f}
22.695	Curzerene		1503	1499 ^{a,f}
23,13	Trans-Calamenene		1520	1521 ^f
26,61	Cedranol-5-iso		1671	1672 ^{b,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
28.51	Beta Guaiene		1500	1502 ^f

continua

30,342	Phytone		1847	1849 ^{c,d}
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}
34.06	Muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol		1628	1630 ^{a,f}
34.42	Alloaromadendrene		1635	1639 ^{a,d}
34.61	Muurolol < α >		1643	1644 ^{b,c,f}
34.93	α Cadinol		1654	1654 ^{a,f}
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}
36.805	G-himachalene		2188	2188 ^b

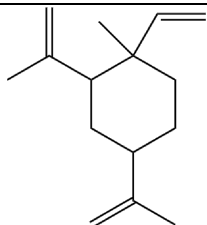
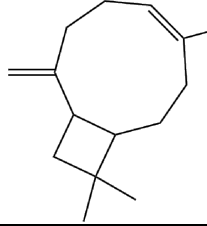
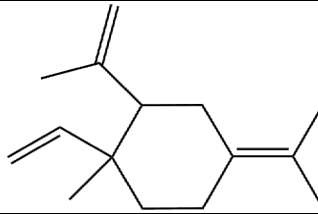
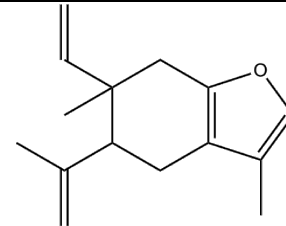
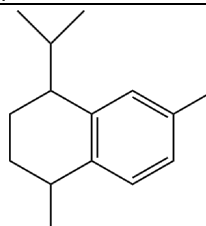
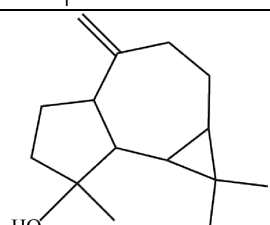
continua

38.259	Germacrol		1999	2001 ^a
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
44,61	Laurenene		1880	1880 ^f 1872 ^{b,d}
47.826	Muuroi-4-en- 3,8-dione		1780	1784 ^c

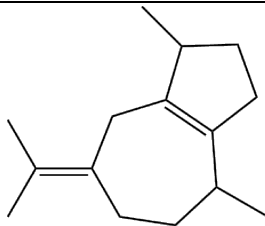
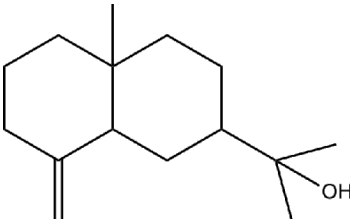
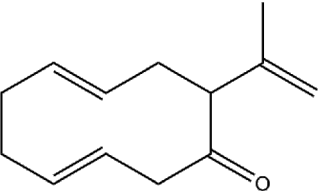
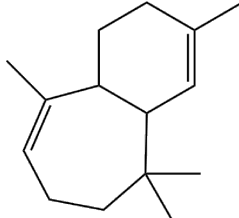
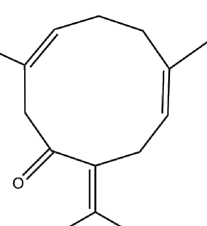
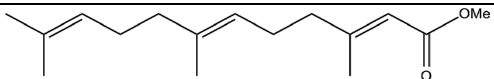
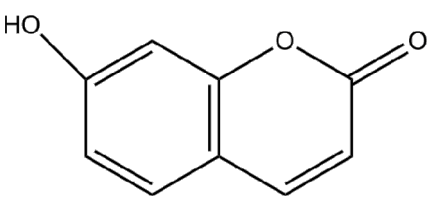
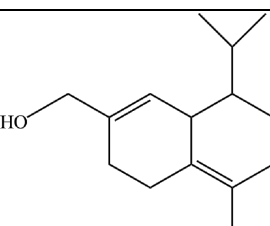
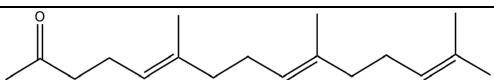
^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

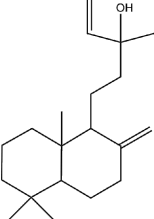
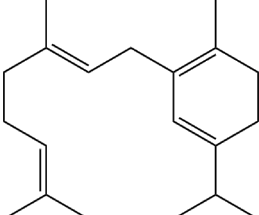
Fonte: próprio autor

Tabela A14 - Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (Fresca) na estação primavera.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
20.035	B- Elemene		1394	1393 ^{a,b,c,f}
20.760	E-Caryophyllene		1423	1419 ^{a,b,c,d,e}
21,09	γ-Elemene		1437	1437 ^{a,b,c,d}
22.695	Curzerene		1503	1499 ^{a,f}
23,13	Trans-Calamenene		1520	1521 ^f
24.664	Spathulenol		1584	1578 ^{a,d,f}

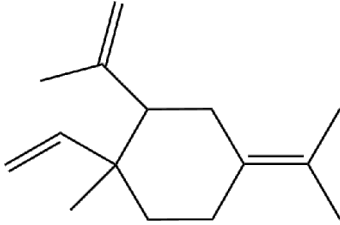
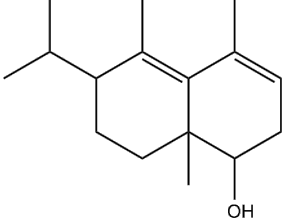
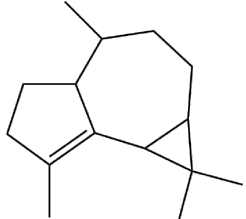
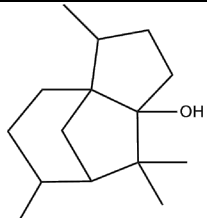
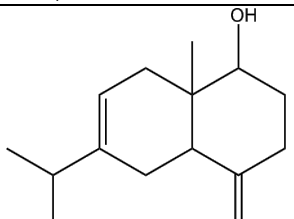
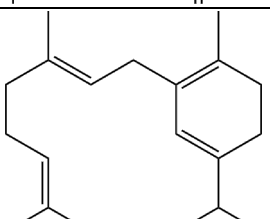
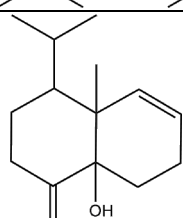
continua

28.51	Beta Guaiene		1500	1502 ^f
34.79	Eudesmol β		1646	1649 ^{a,f}
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}
36.805	γ -Himachalene		2190	
38.259	Germacrol		1999	2001 ^a
39.79	Methyl Farnesoate		1782	1784 ^f
41.69	Coumarin γ-hydroxy->		1834	1836 ^{b,f}
42,09	14-Hydroxy- δ -cadinene		1803	1803 ^{B,D,F}
continua				
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}

49.20	Manool <13-epi->		2050	2059 ^d
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams
Fonte: próprio autor

Tabela A15 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (seca) na estação outono.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
21,09	γ -Elemene		1437	1437 ^{a,b,c,d}
23,68	Eudesma-3,5 dien- 1-ol		1544	1546 ^{a,d}
25.00	1-Epi-alpha-gurjunene		1408	1409 ^d
26,61	Cedranol-5-iso		1671	1672 ^{b,f}
26,863	Eudesma-4(15),7-dien- 1 β -ol		1685	1685 ^{b,d,f} (DB-5)
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}
34.06	Muurola-4,10(14) -dien- 1 β -ol		1628	1630 ^{a,f}

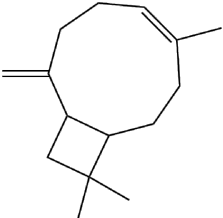
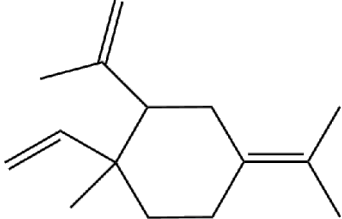
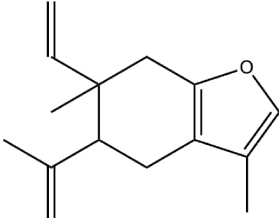
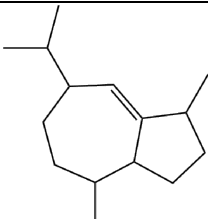
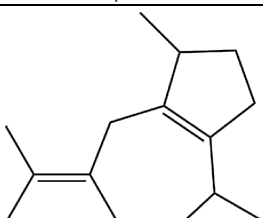
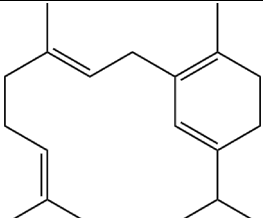
34.61	Muuroiol < α >		1643	1644 ^{b,c,f}
34.93	α Cadinol		1654	1654 ^{a,f}
34.963	(3E,7E)-10-Isopropenyl-3,7-cyclodecadien-1-one		2087	2088 ^{a,f}
42.075	Santamarin		2511	2227
44,61	Laurenene		1880	1880 ^f 1872 ^{b,d}
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
47.826	Muuroiol-4-en-3,8-dione		1780	1784 ^c
49.20	Manool <13-epi->		2050	2059 ^d

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

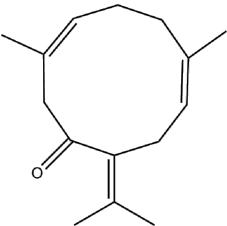
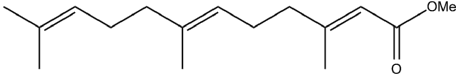
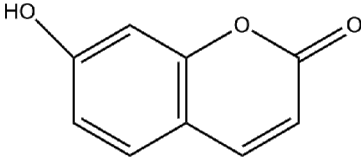
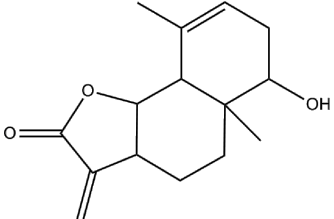
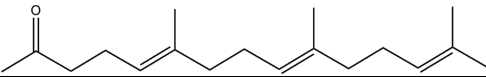
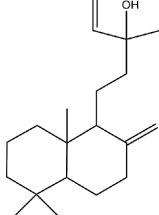
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

Tabela A16 – Composição dos óleos essenciais da espécie *E. pitanga* (fresca) – na estação outono.

Tempo de Retenção (T.R)	Compostos Isolados	Estrutura Química	Índice de Kovats (I.K)	
			Calculado	Literatura
20.760	E-Caryophyllene		1423	1419 ^{a,b,c,d,e}
21,09	γ -Elemene		1437	1437 ^{a,b,c,d}
22.695	Curzerene		1503	1499 ^{a,f}
27.80	Gama Gurjunene		1479	1477 ^{a,f}
28.51	Beta Guaiene		1500	1502 ^f
33,38	Geranyl α terpinene		1998	2000 ^{a,b,d}

continua

38.259	Germacrol		1999	2001 ^a
39.79	Methyl Farnesoate		1782	1784 ^f
41.69	Coumarin <7-hydroxy->		1834	1836 ^{b,f}
42.075	Santamarin		2511	2227
44.37	E-E farnesyl Acetone		1911	1913 ^{a,f}
49.20	Manool <13-epi->		2050	2059 ^d

^aNist equipamento; ^bNist virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>);

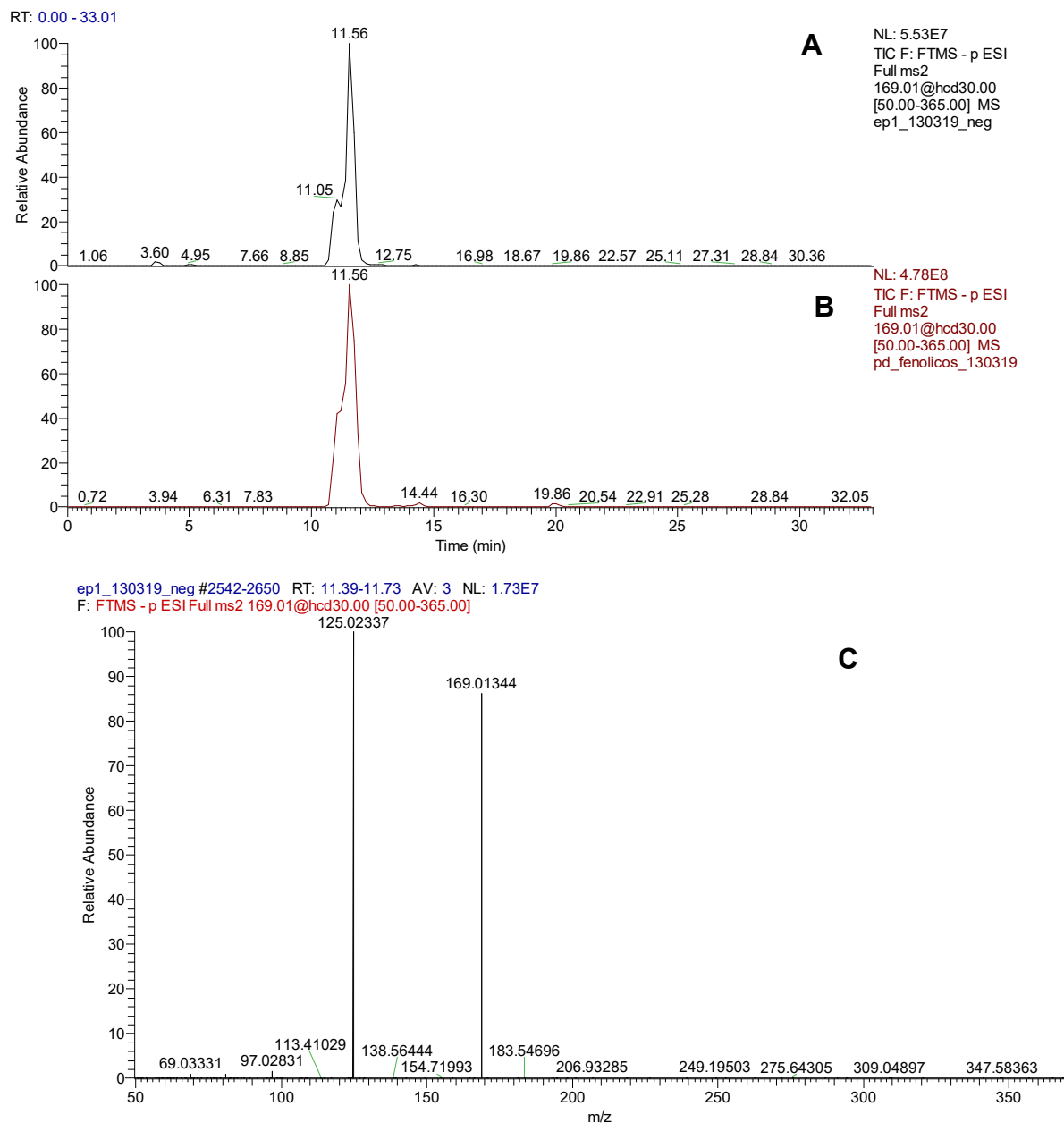
^cpherobase; ^dpubchem; ^epadrão comercial; ^fadams

Fonte: próprio autor

**APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS OBTIDOS DA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE *EUGENIA PITANGA* E *EUGENIA
DYSENTERICA***

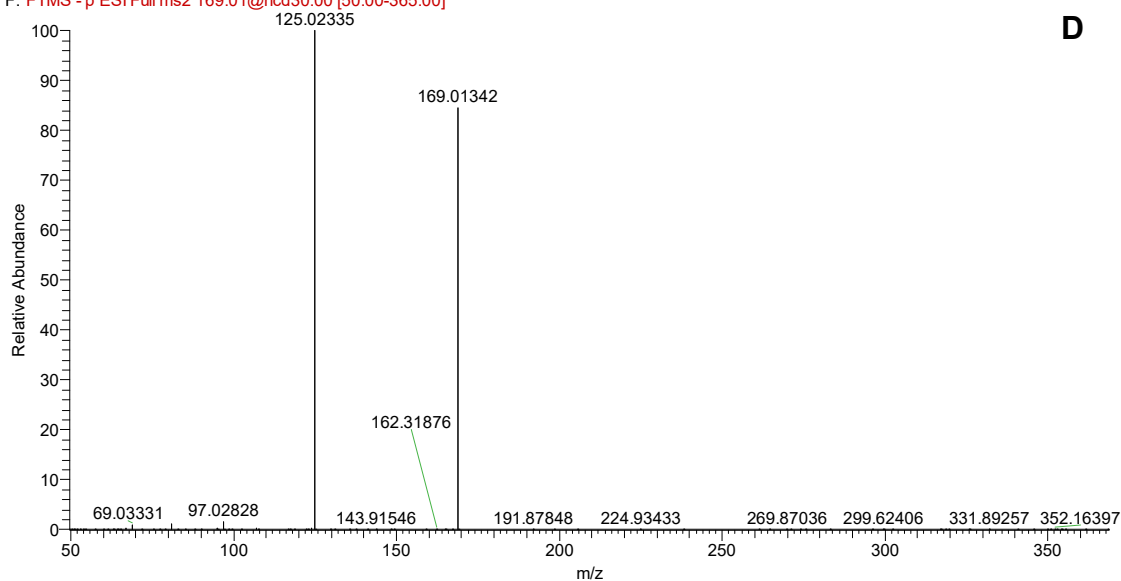
CROMATOGRAMAS E Espectros obtidos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas de *Eugenia Pitanga*

Figura B1 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*. – Ácido gálico



continua

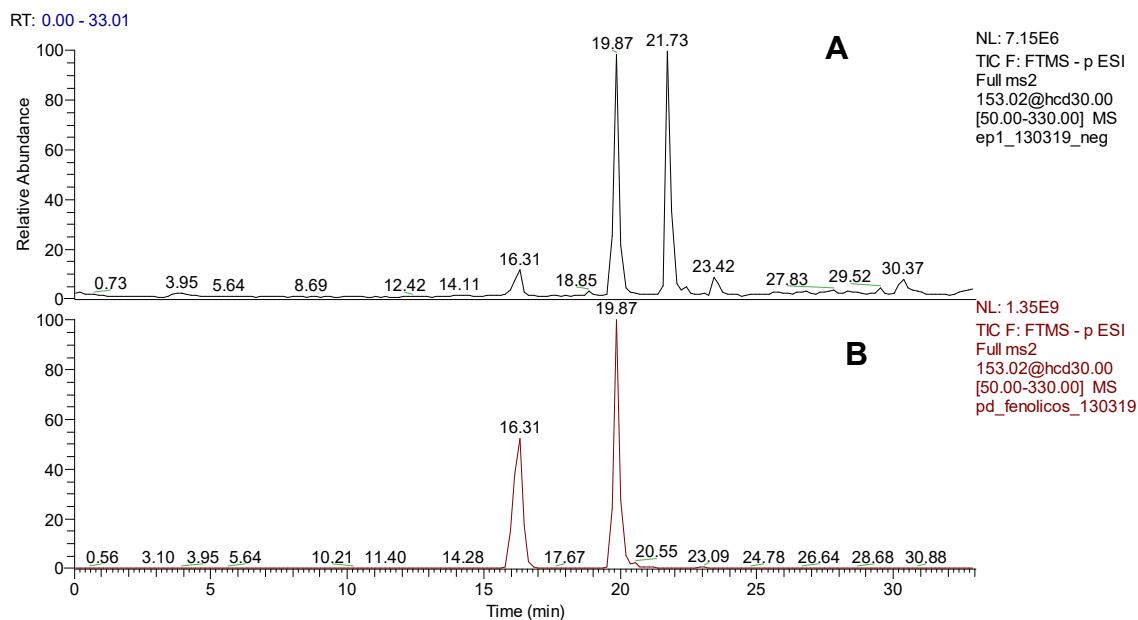
pd_fenolicos_130319 #2551-2650 RT: 11.39-11.73 AV: 3 NL: 1.76E8
 F: FTMS -p ESI Full ms2 169.01@hcd30.00 [50.00-365.00]



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido gálico. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de ácido gálico.

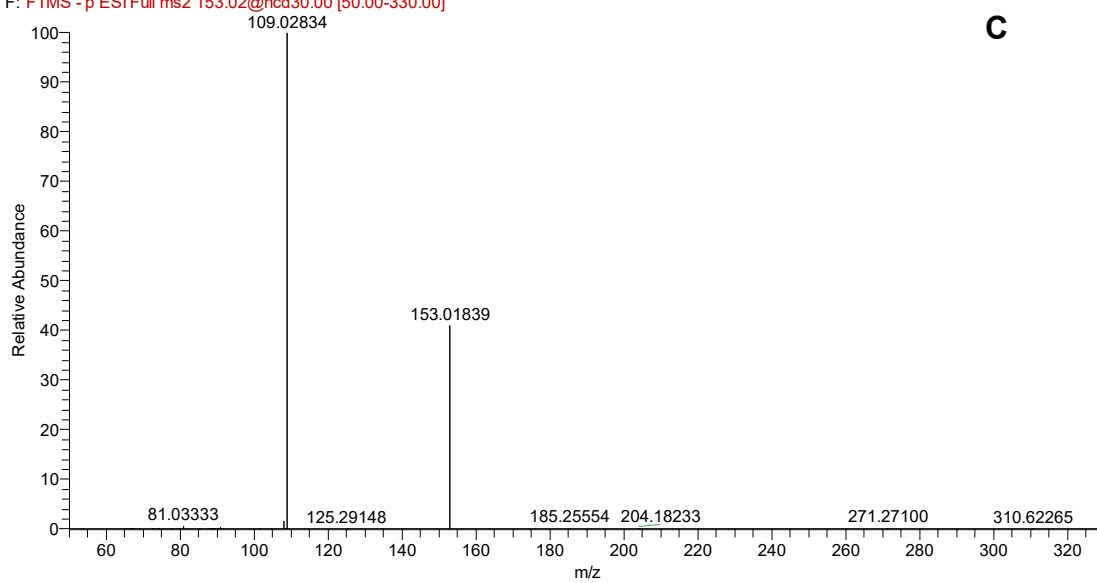
Fonte: acervo do autor

Figura B2 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Ácido protocatéquico

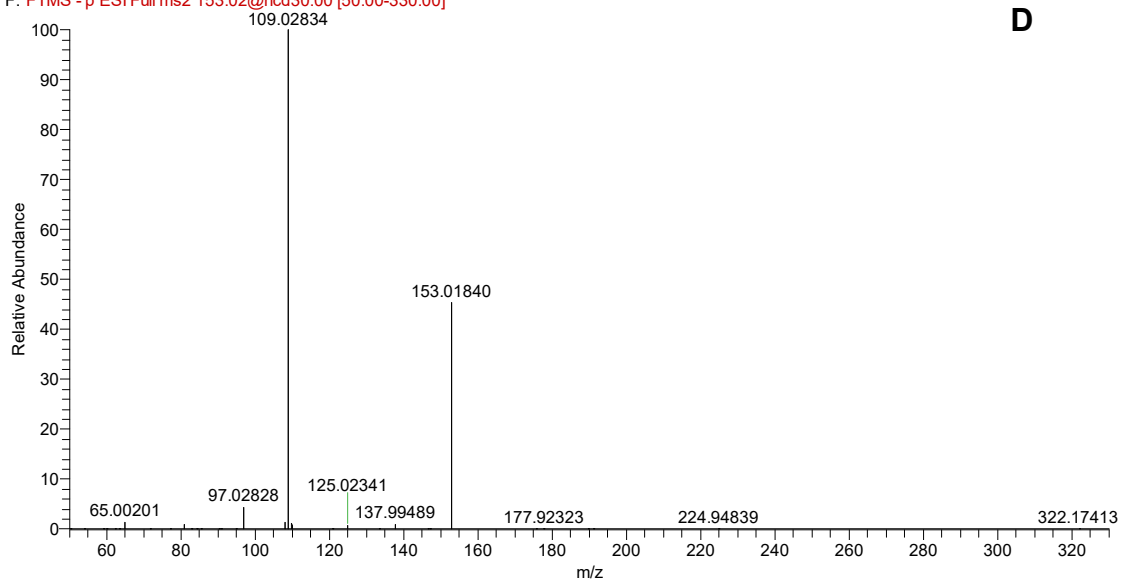


continua

pd_fenolicos_130319 #3659 RT: 16.31 AV: 1 NL: 4.78E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]

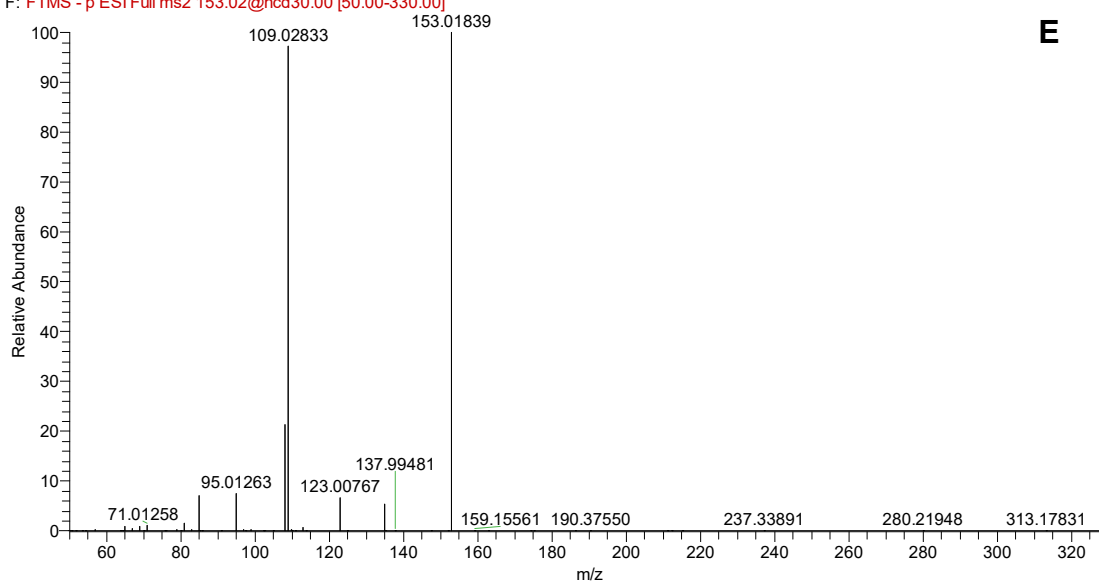


ep1_130319_neg #3659 RT: 16.31 AV: 1 NL: 5.07E5
F: FTMS -p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



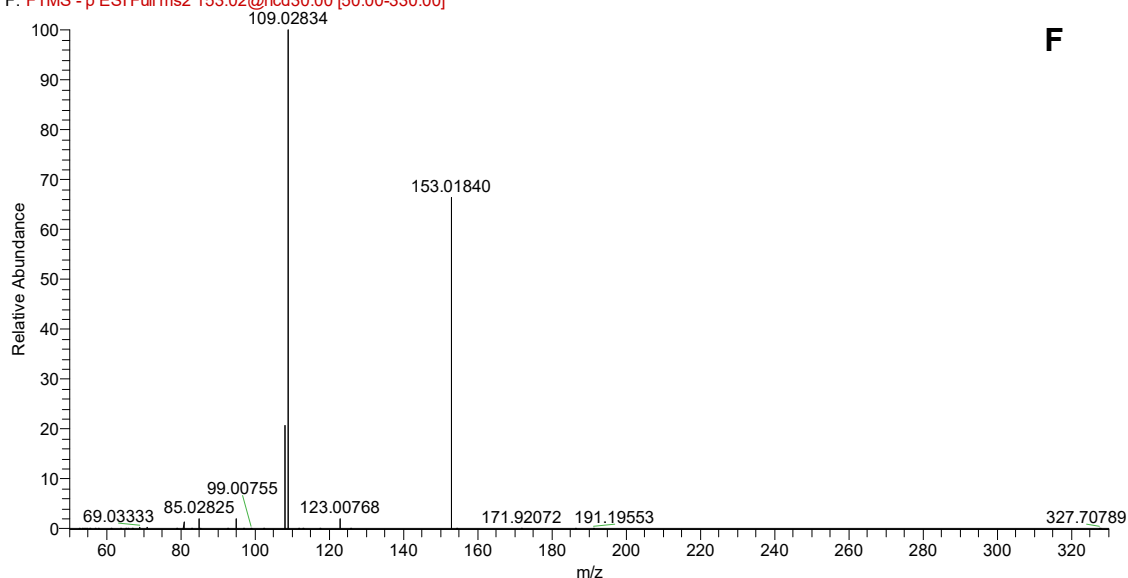
continua

ep1_130319_neg #4457 RT: 19.87 AV: 1 NL: 2.67E6
F: FTMS -p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



E

pd_fenolicos_130319 #4457 RT: 19.87 AV: 1 NL: 6.64E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]

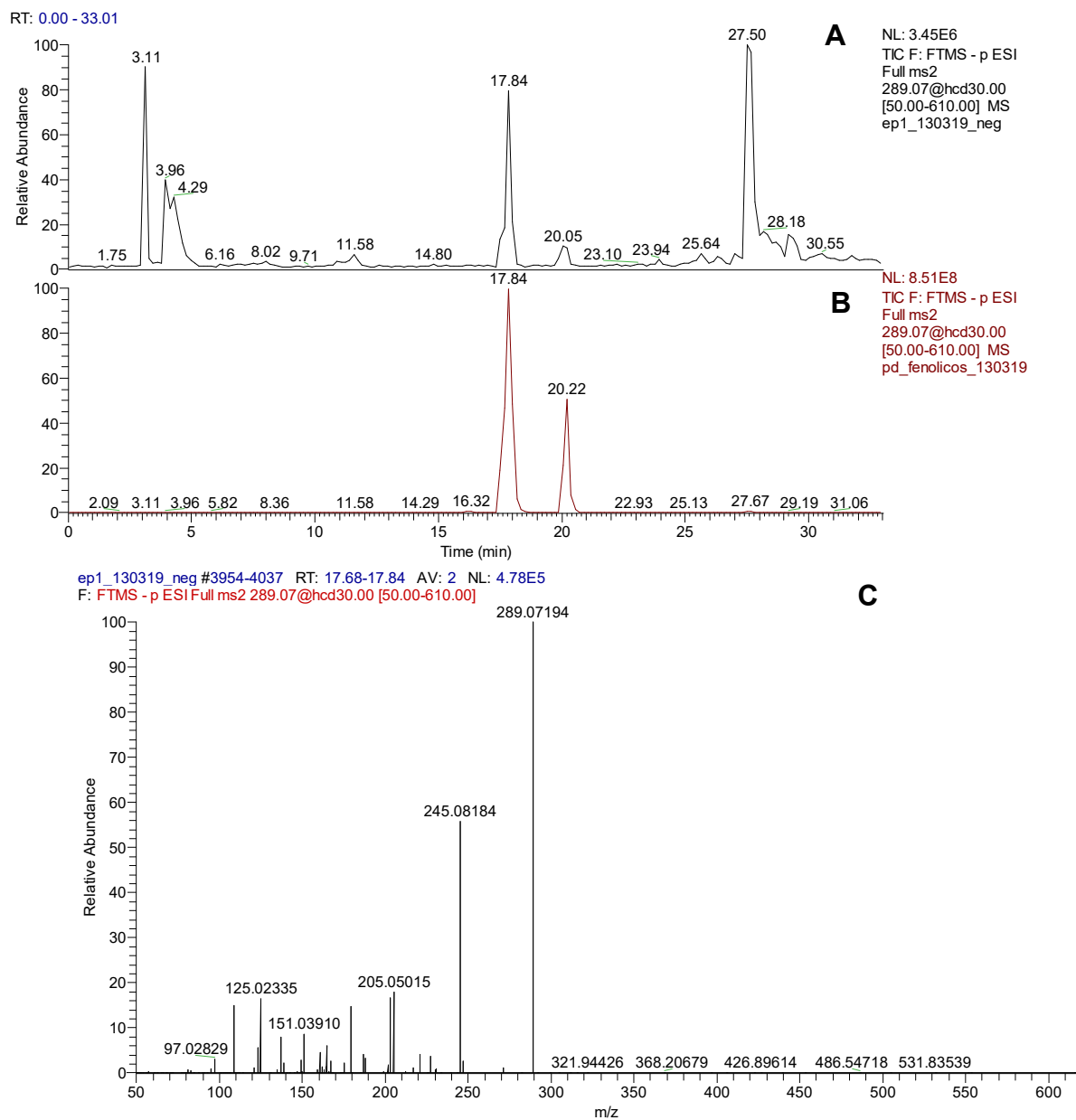


F

Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de ácido protocatéuico. C) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de ácido protocatéuico. E) Espectro da amostra. F) Espectro do padrão de ácido protocatéuico.

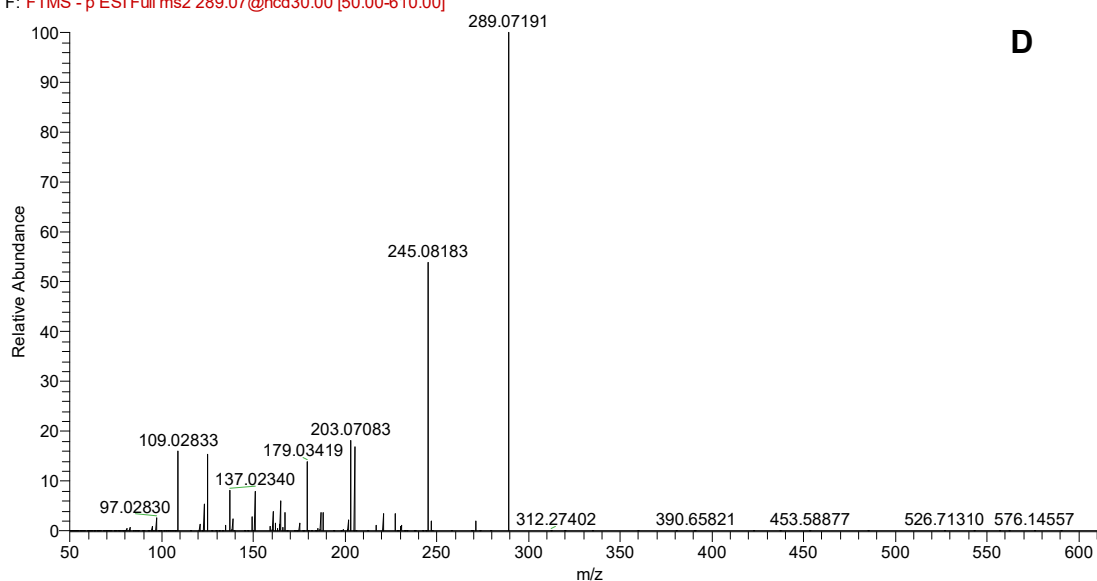
Fonte: acervo do autor

Figura B3 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Catequina



continua

pd_fenolicos_130319 #3946-4061 RT: 17.68-18.01 AV: 3 NL: 1.59E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]

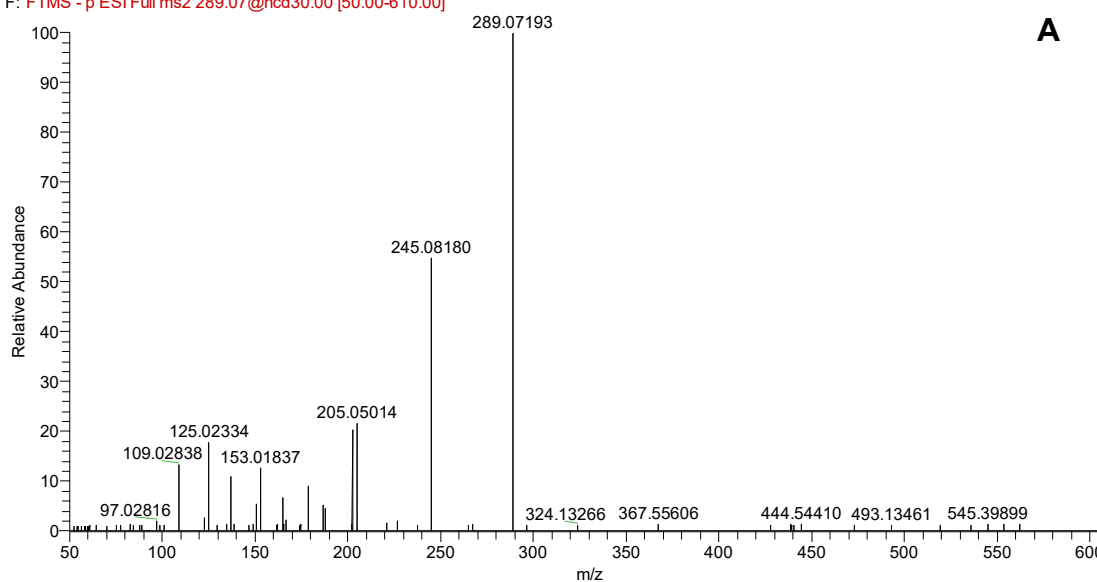


Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão catequina. C) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de catequina.

Fonte: acervo do autor

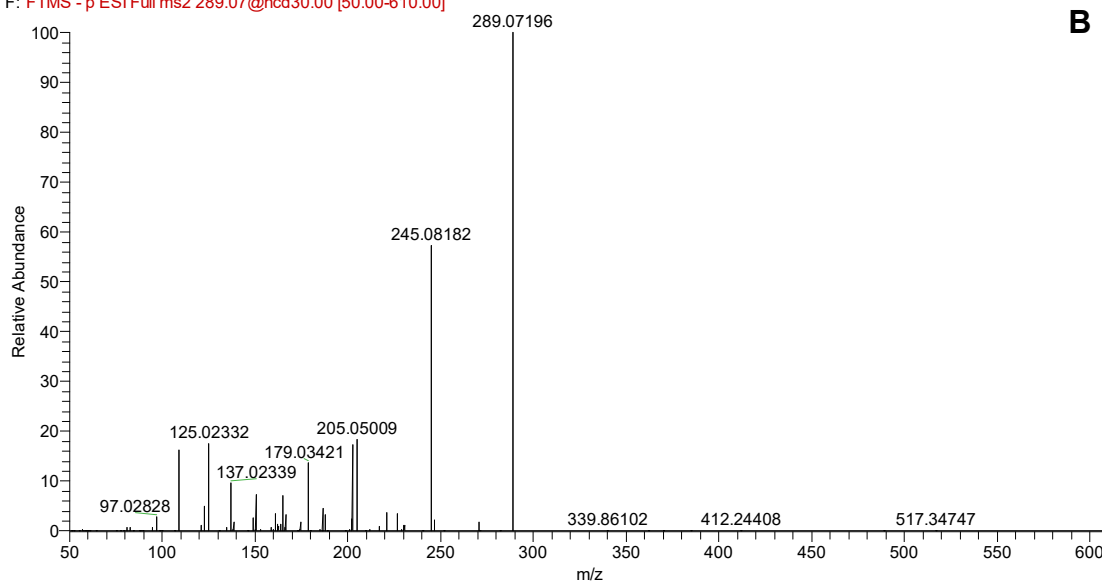
Figura B4 –Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*–
 Epicatequina

ep1_130319_neg #4497 RT: 20.05 AV: 1 NL: 9.84E4
 F: FTMS - p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]



continua

pd_fenolicos_130319 #4535 RT: 20.22 AV: 1 NL: 1.25E8
 F: FTMS -p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]

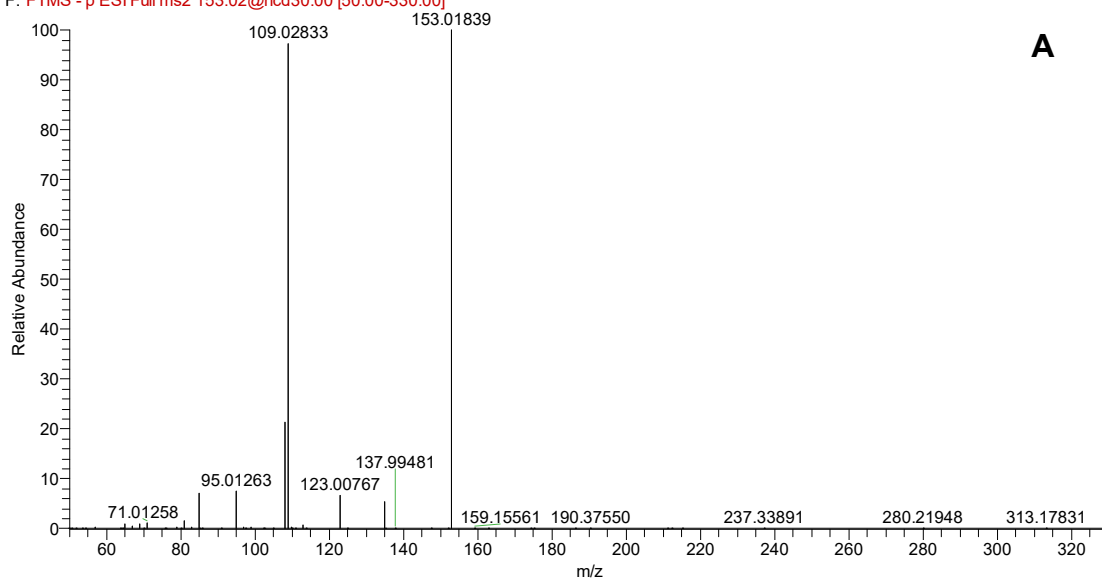


Legenda: A) Espectro da amostra. B) Espectro do padrão de epicatequina.

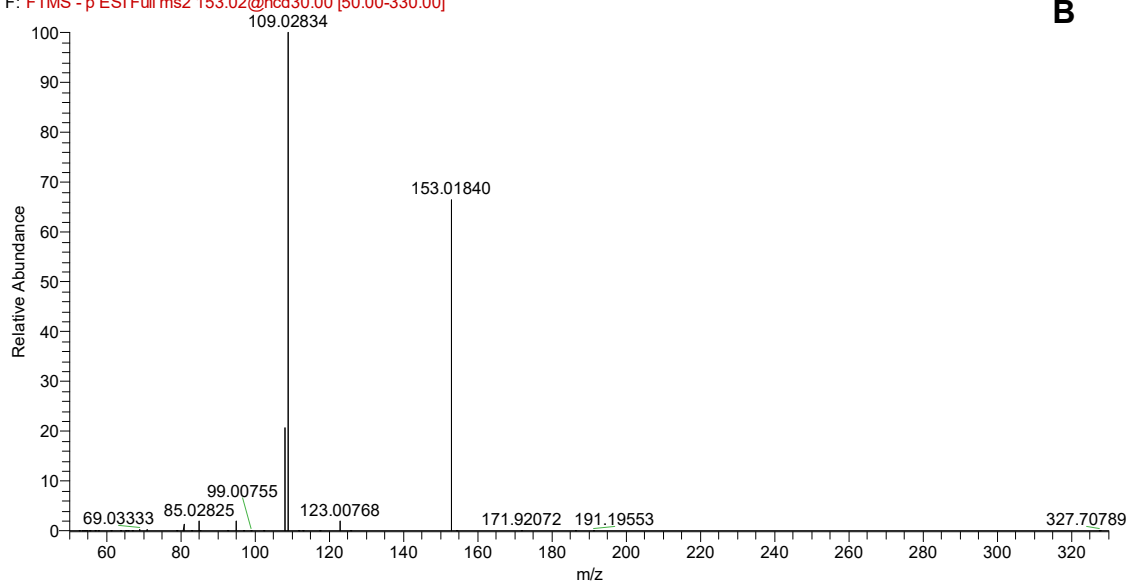
Fonte: acervo do autor

Figura B5 – Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Ácido gentísico

ep1_130319_neg #4457 RT: 19.87 AV: 1 NL: 2.67E6
 F: FTMS -p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



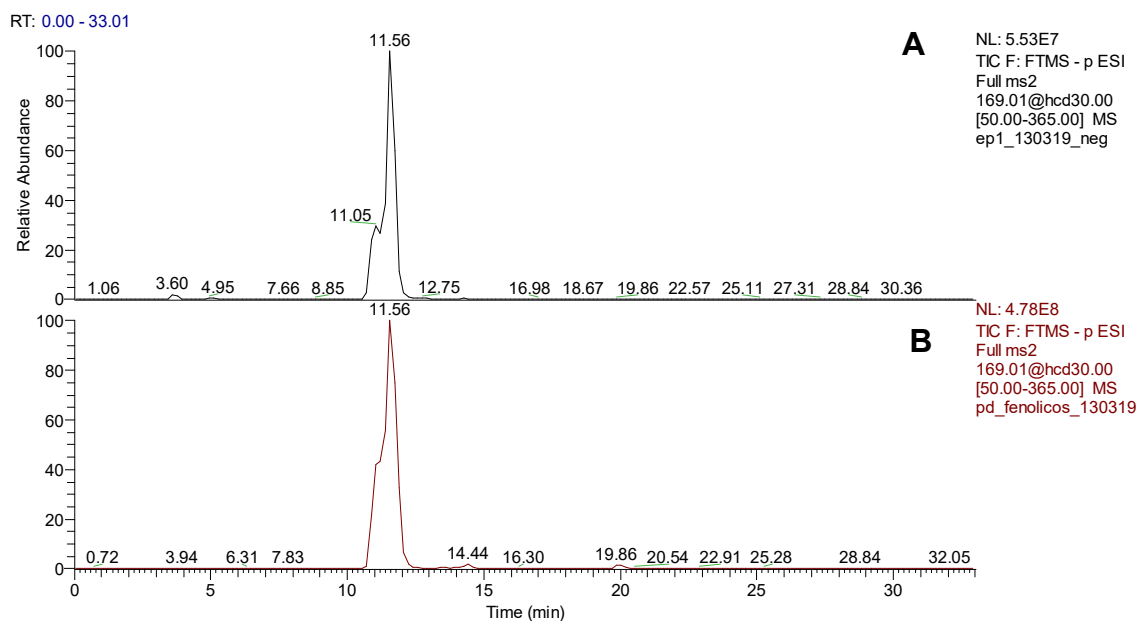
pd_fenolicos_130319 #4457 RT: 19.87 AV: 1 NL: 6.64E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



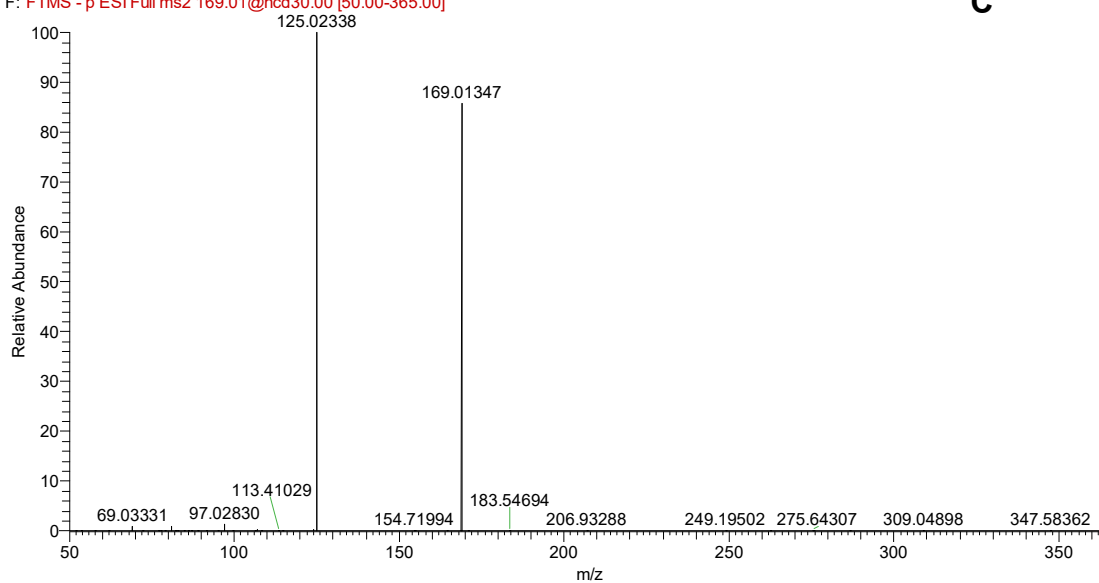
Legenda: A) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de ácido gentísico.

Fonte: acervo do autor

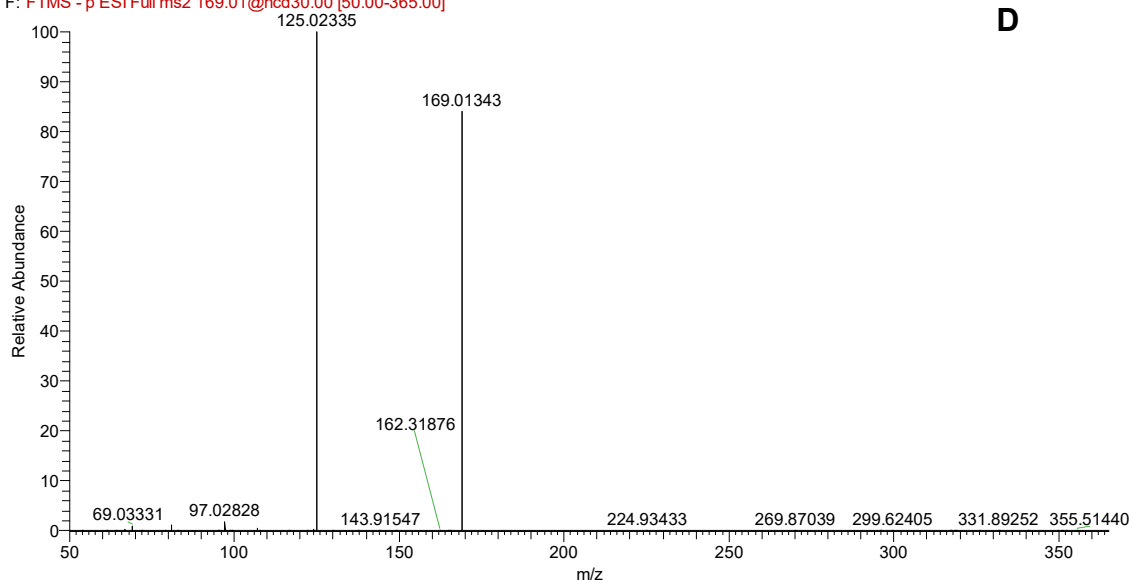
Figura B6 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Ácido cafeico



ep1_130319_neg #2593 RT: 11.56 AV: 1 NL: 2.69E7
F: FTMS - p ESI Full ms2 169.01@hcd30.00 [50.00-365.00]



pd_fenolicos_130319 #2593 RT: 11.56 AV: 1 NL: 2.33E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 169.01@hcd30.00 [50.00-365.00]

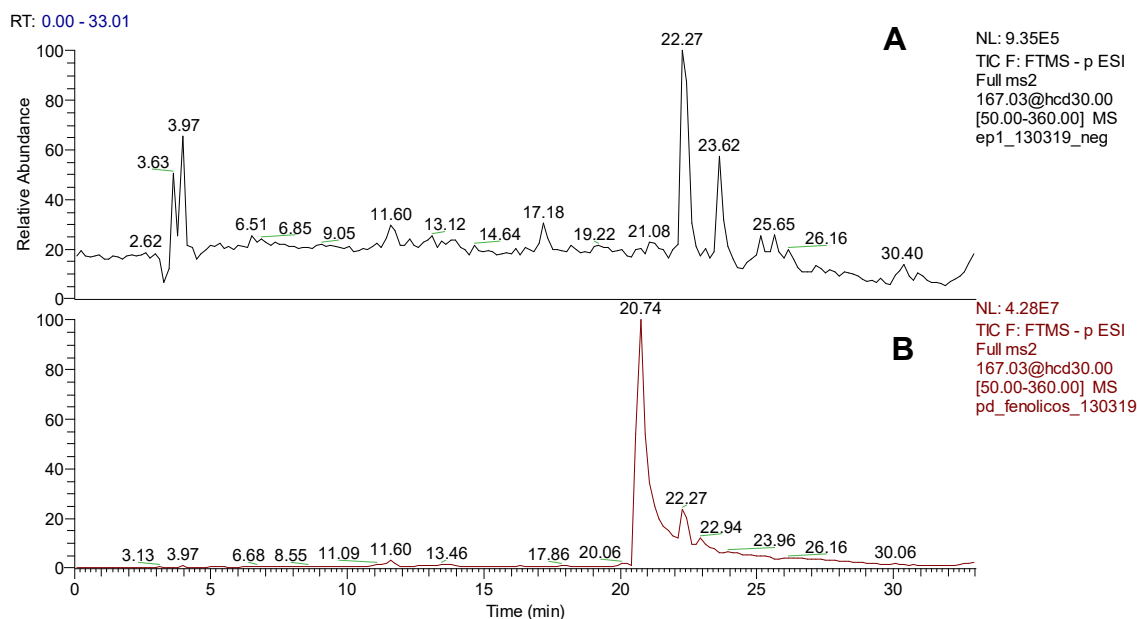


Legenda: A) Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido cafeico. **C)** Espectro da amostra.

D) Espectro do padrão de ácido cafeico.

Fonte: acervo do autor

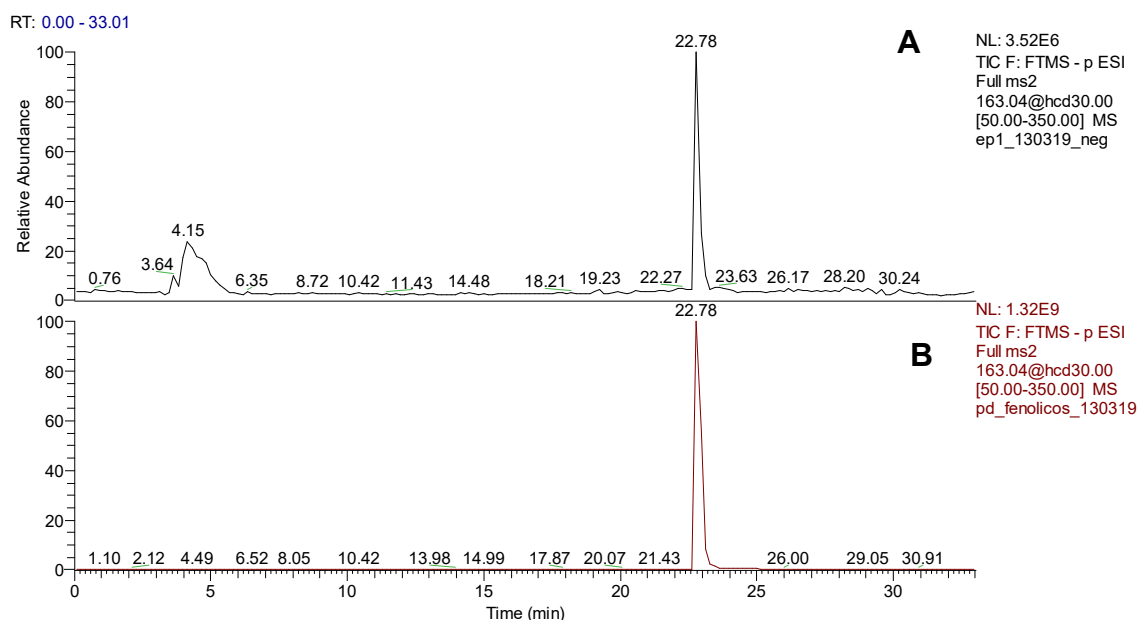
Figura B7 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*–
Ácido vanilínico



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido vanílico.

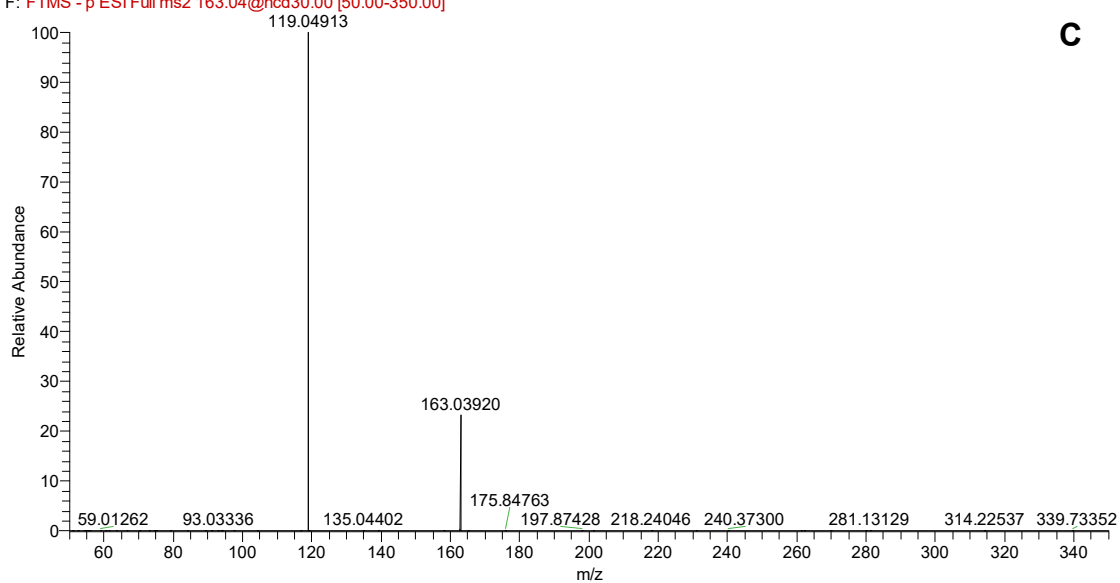
Fonte: acervo do autor

Figura B8 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Ácido p-cumarínico

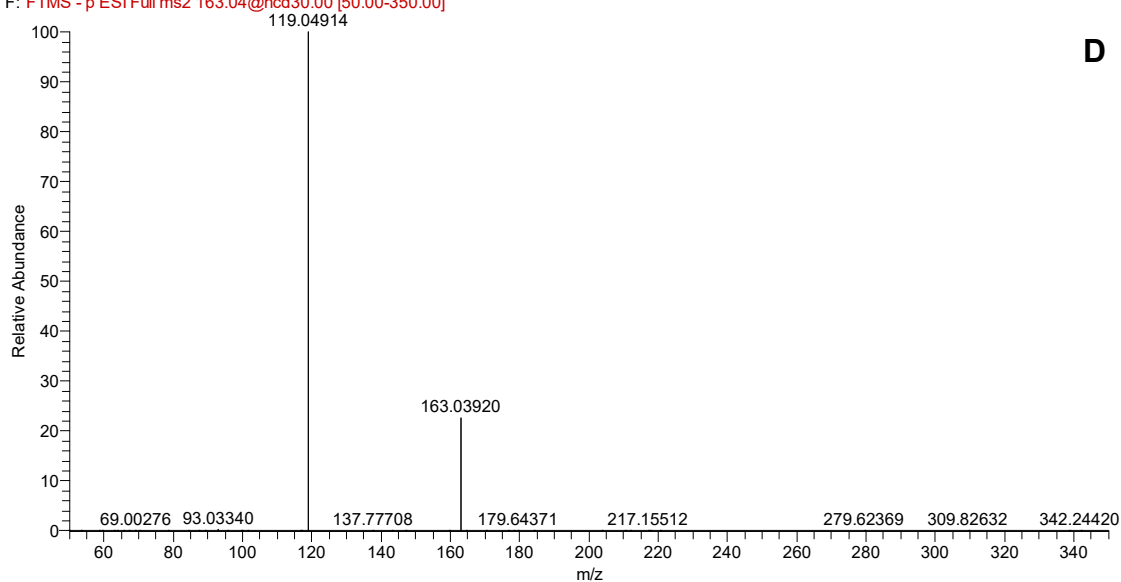


continua

ep1_130319_neg #5111 RT: 22.78 AV: 1 NL: 2.55E6
F: FTMS -p ESI Full ms2 163.04@hcd30.00 [50.00-350.00]

**C**

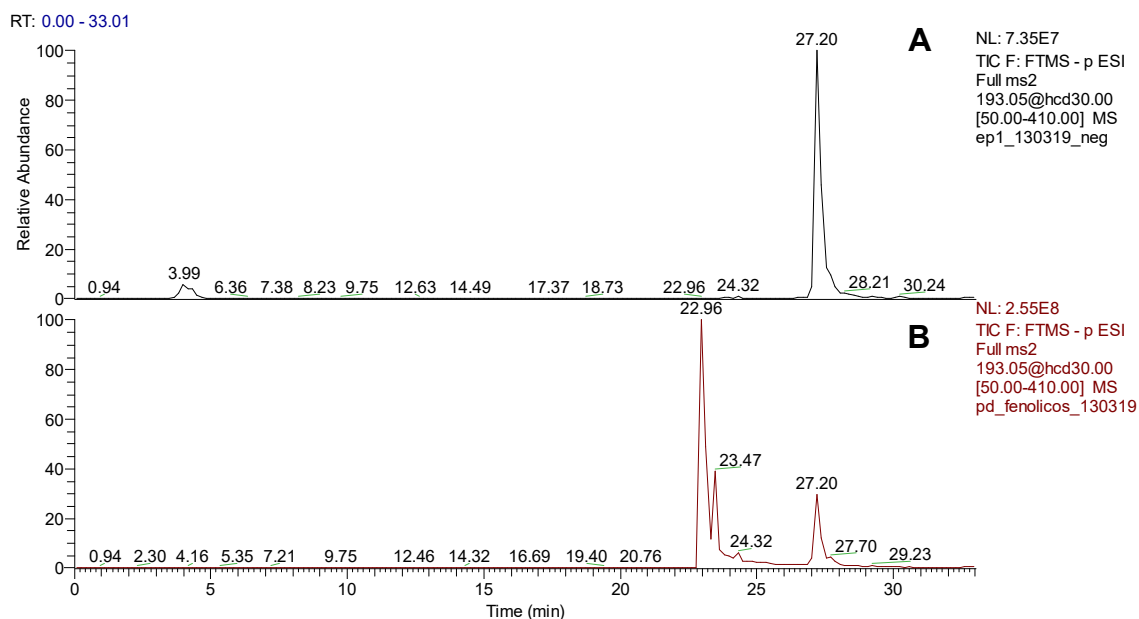
pd_fenolicos_130319 #5111 RT: 22.78 AV: 1 NL: 9.87E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 163.04@hcd30.00 [50.00-350.00]

**D**

Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido p-cumarínico. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de ácido p-cumarínico.

Fonte: acervo do autor

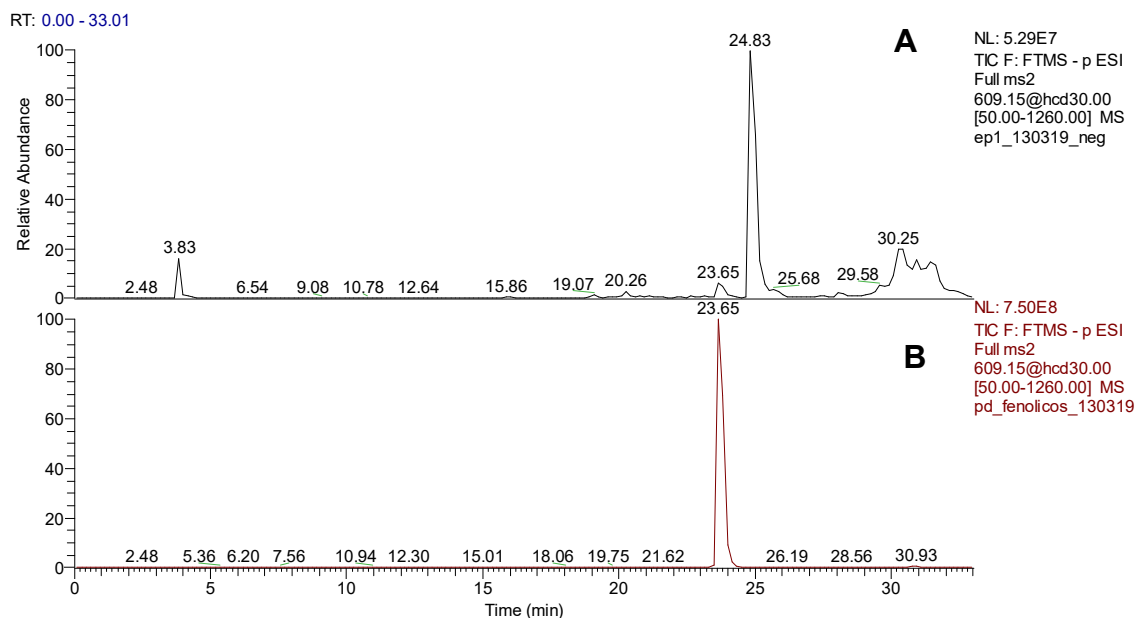
Figura B9 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*–
Ácido ferúlico



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido ferúlico.

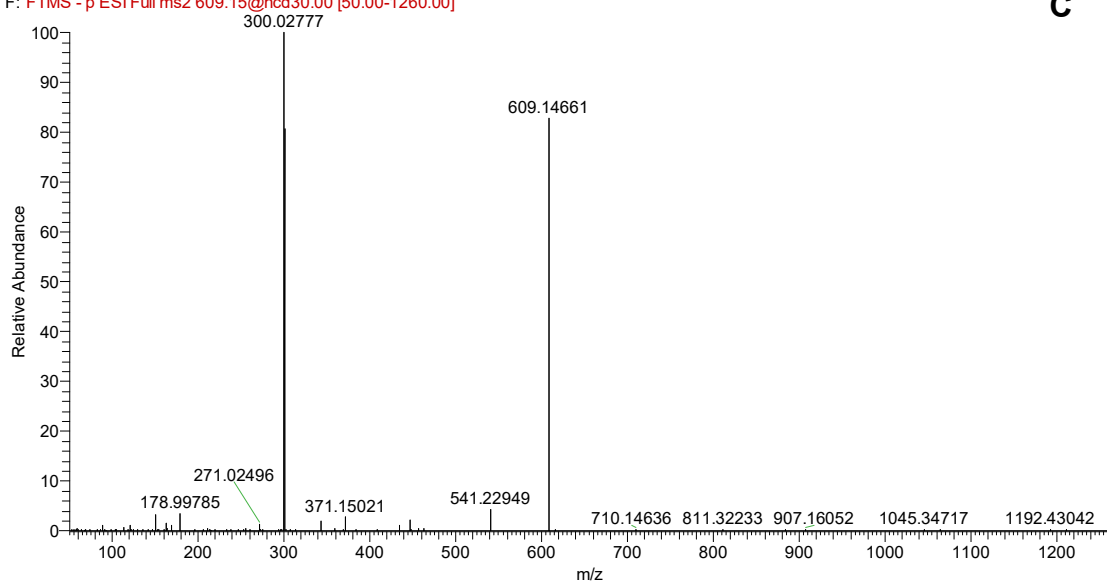
Fonte: acervo do autor

Figura B10 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Rutina

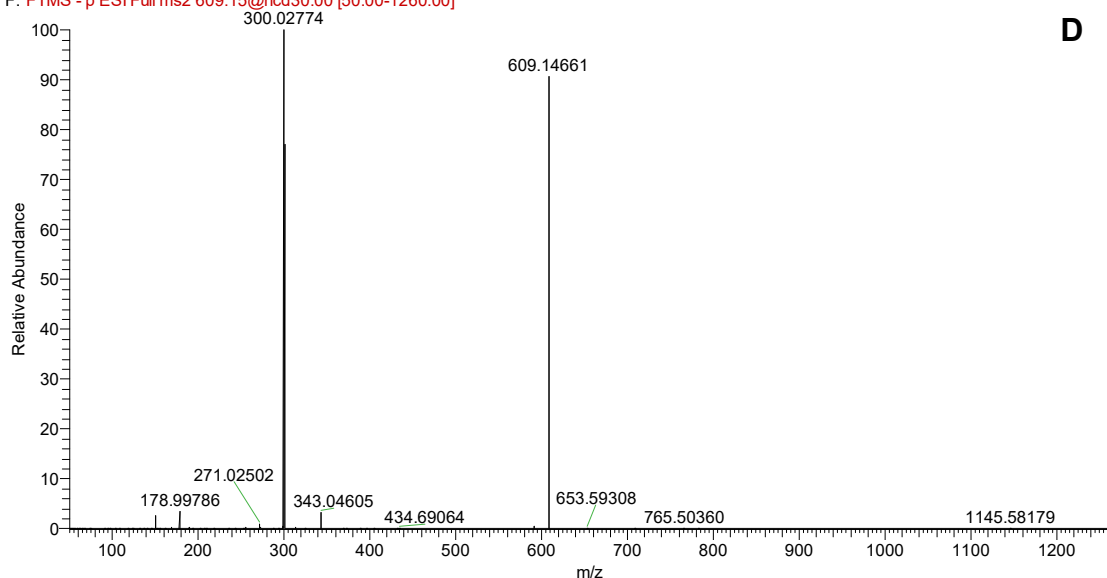


continua

ep1_130319_neg #5305 RT: 23.65 AV: 1 NL: 9.97E5
F: FTMS - p ESI Full ms2 609.15@hcd30.00 [50.00-1260.00]



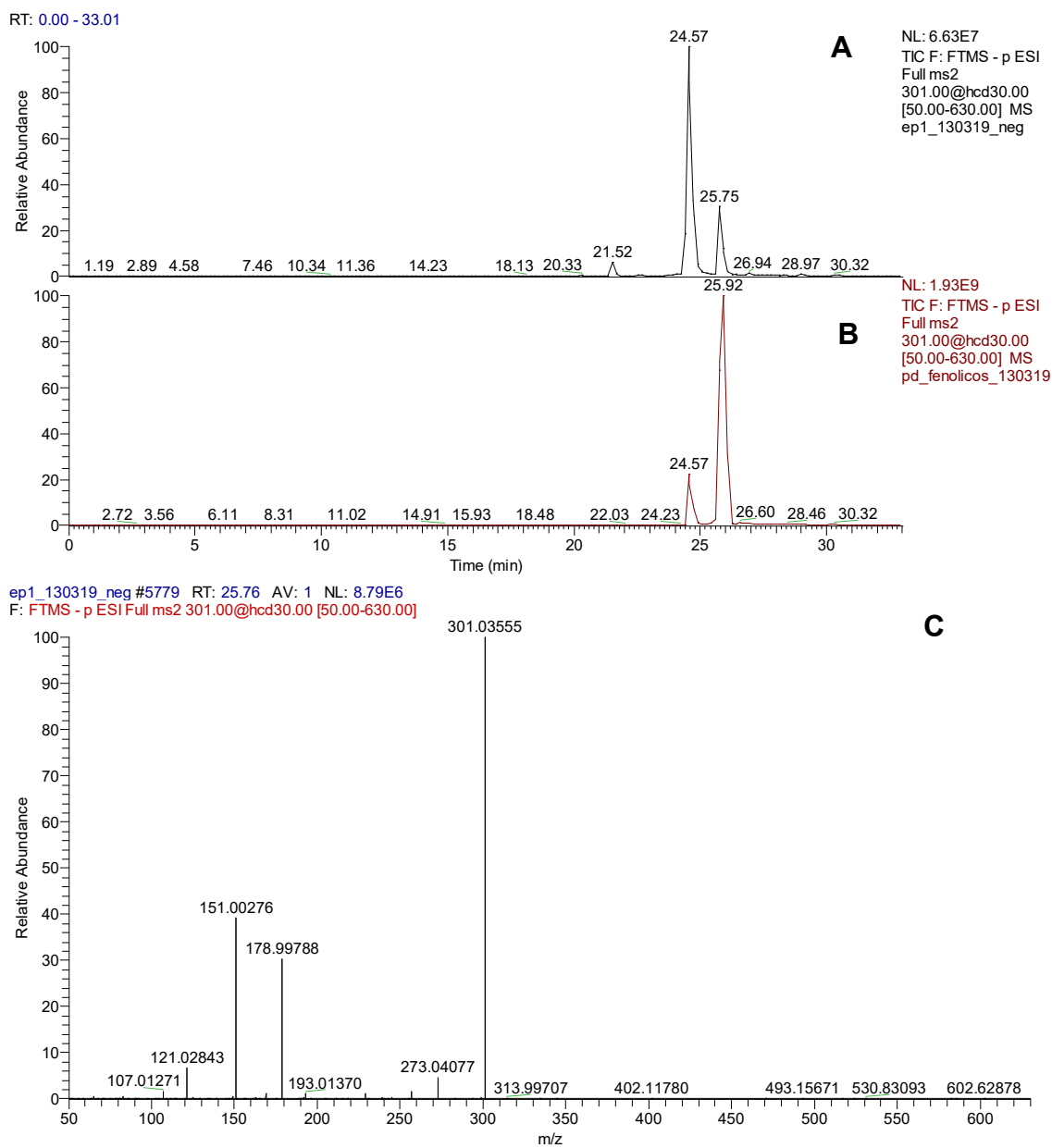
pd_fenolicos_130319 #5305 RT: 23.65 AV: 1 NL: 2.40E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 609.15@hcd30.00 [50.00-1260.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de rutina. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de rutina.

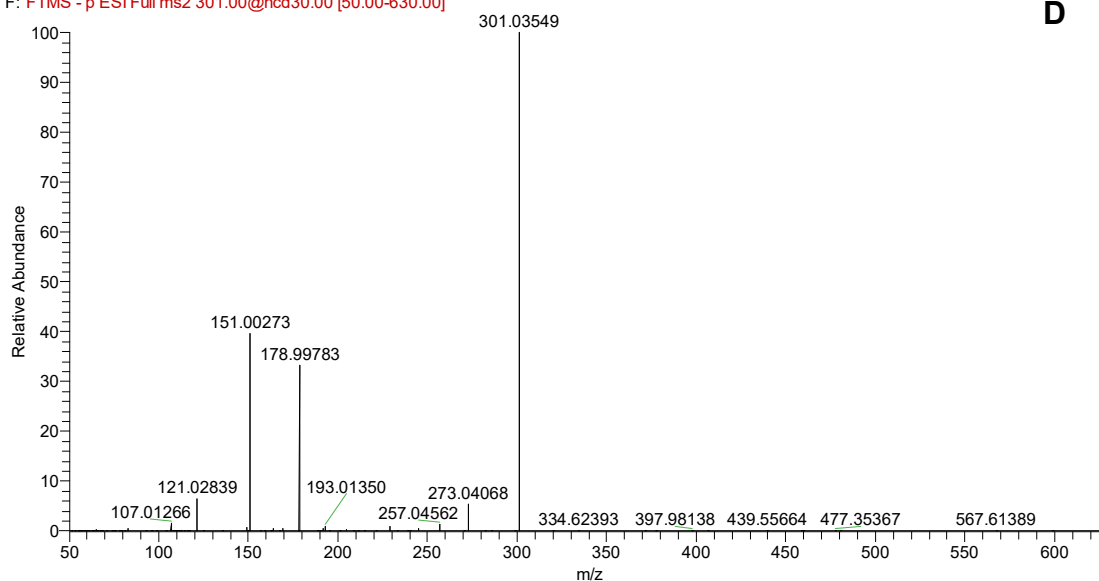
Fonte: acervo do autor

Figura B11 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– quercetina



continua

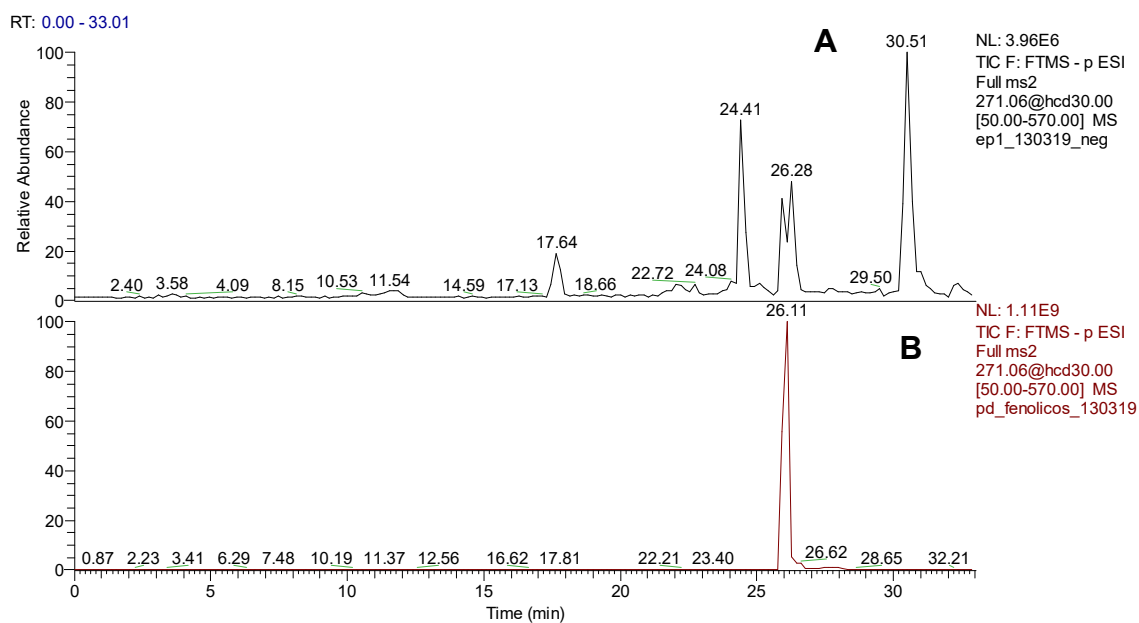
pd_fenolicos_130319 #5815 RT: 25.92 AV: 1 NL: 9.07E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 301.00@hcd30.00 [50.00-630.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de quercetina. C) Espectro da amostra.
 D) Espectro do padrão de quercetina.

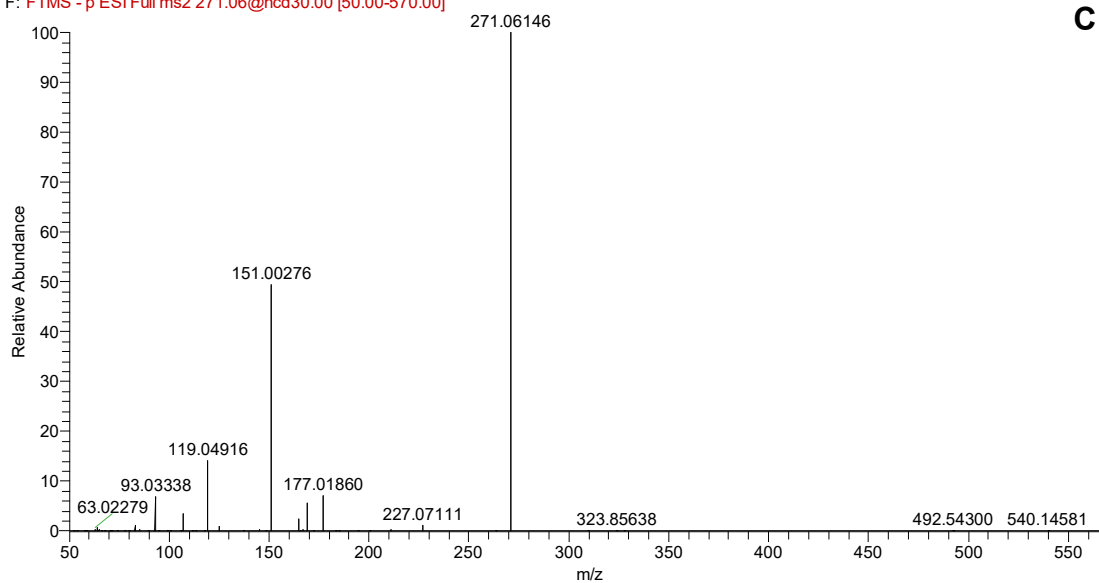
Fonte: acervo do autor

Figura B12 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Naringenina

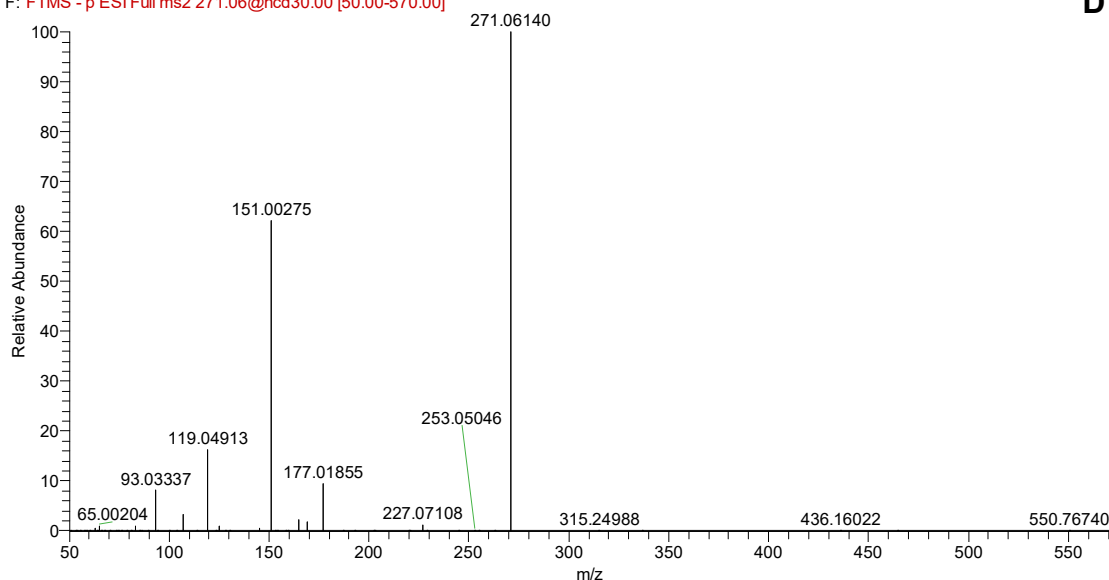


continua

ep1_130319_neg #5819 RT: 25.94 AV: 1 NL: 7.57E5
F: FTMS -p ESI Full ms2 271.06@hcd30.00 [50.00-570.00]



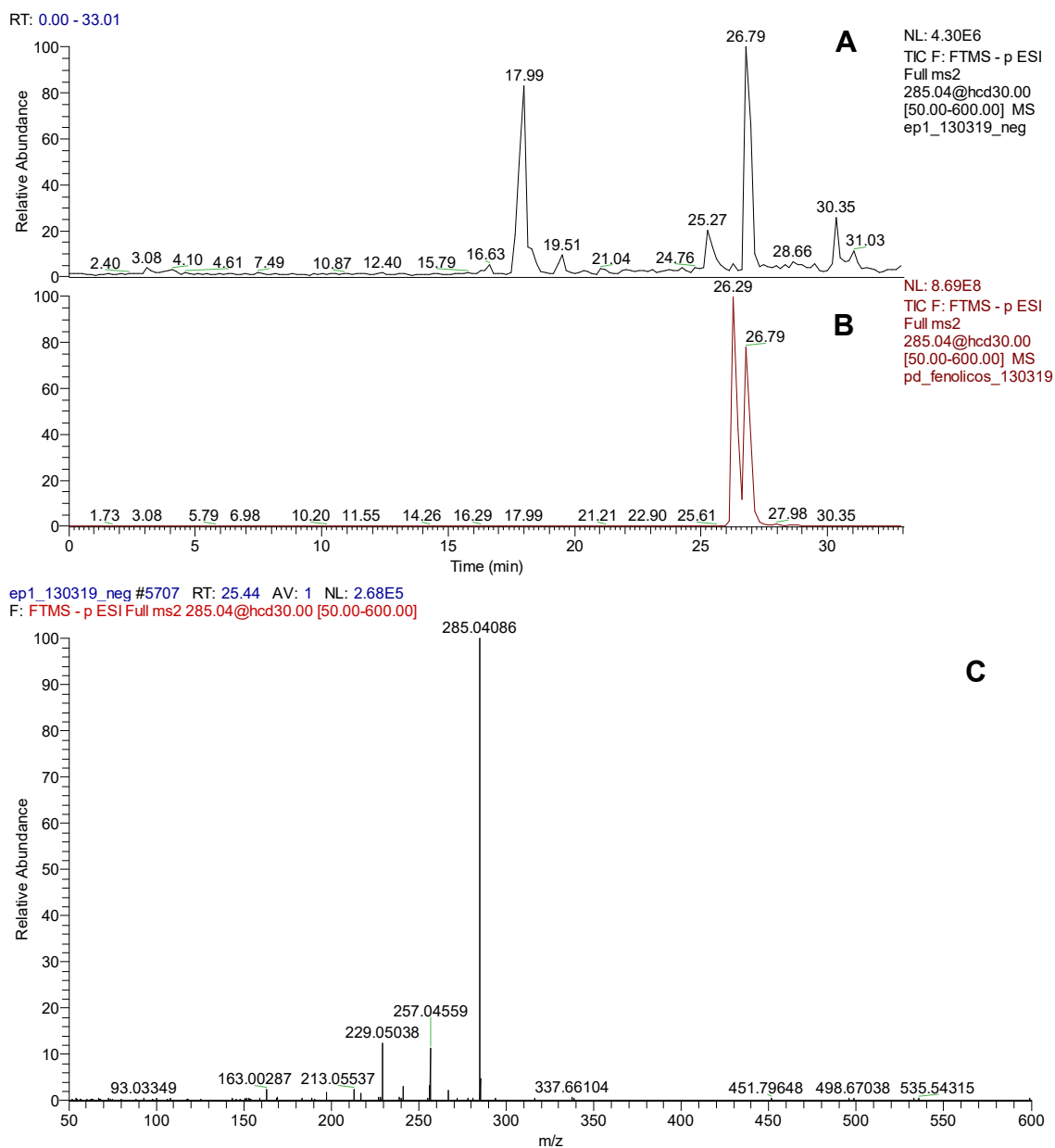
pd_fenolicos_130319 #5857 RT: 26.11 AV: 1 NL: 4.91E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 271.06@hcd30.00 [50.00-570.00]



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de narigenina. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de narigenina.

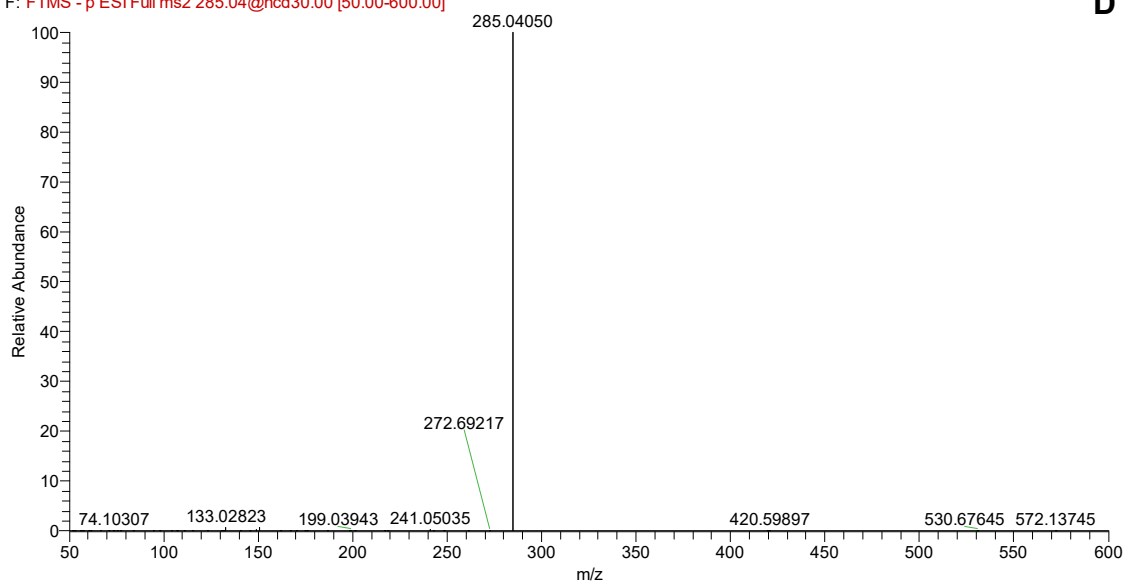
Fonte: acervo do autor

Figura B13 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Luteolina



continua

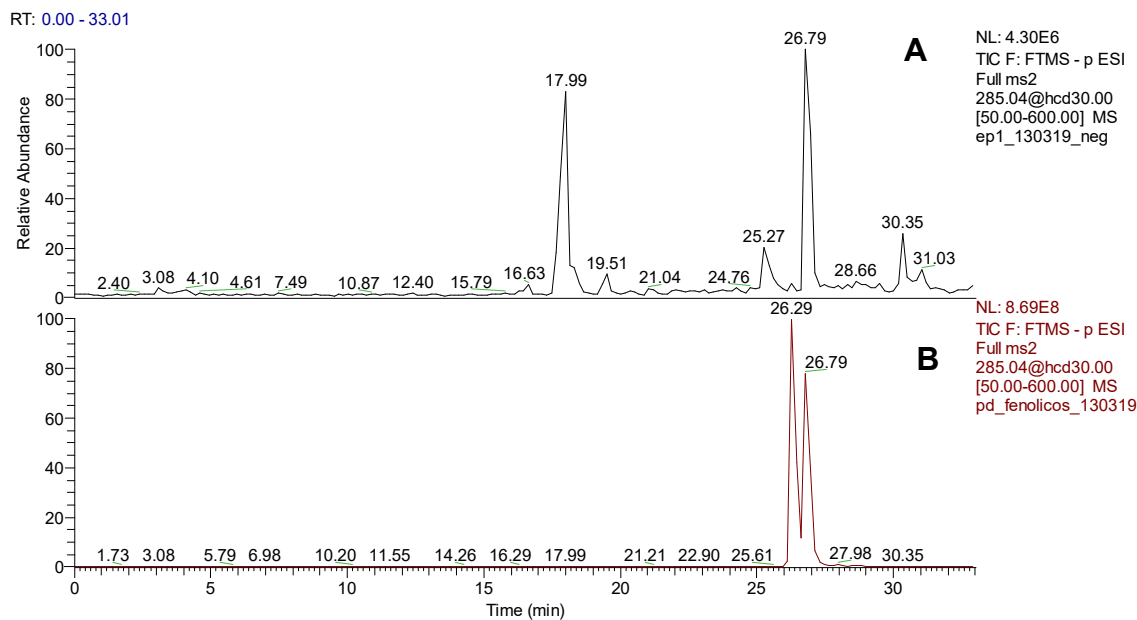
pd_fenolicos_130319 #5897 RT: 26.29 AV: 1 NL: 7.75E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de luteolina. C) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de luteolina.

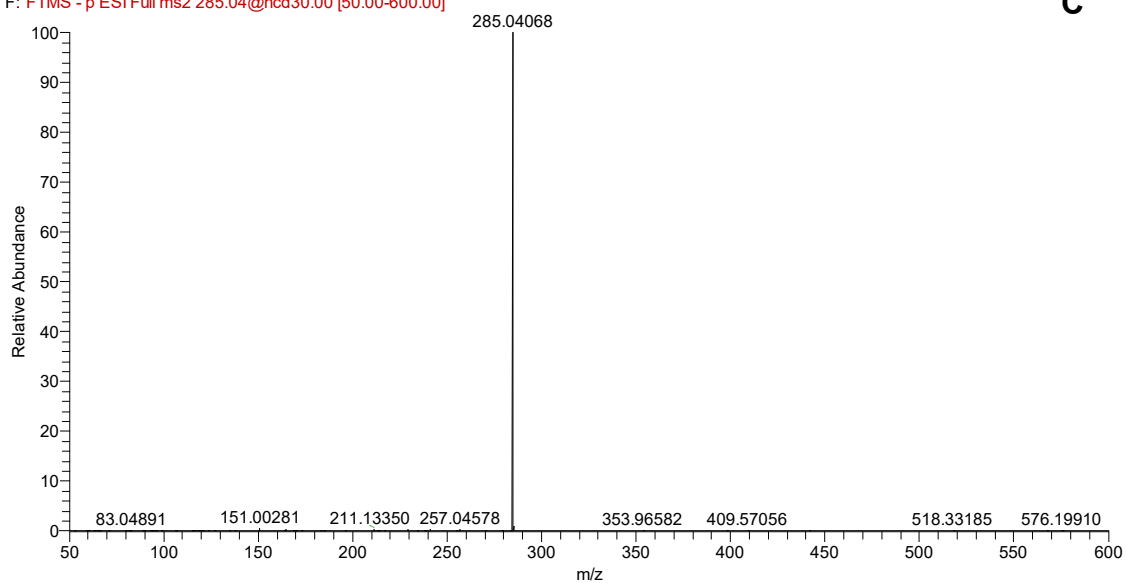
Fonte: acervo do autor

Figura B14 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia pitanga*– Kampferol

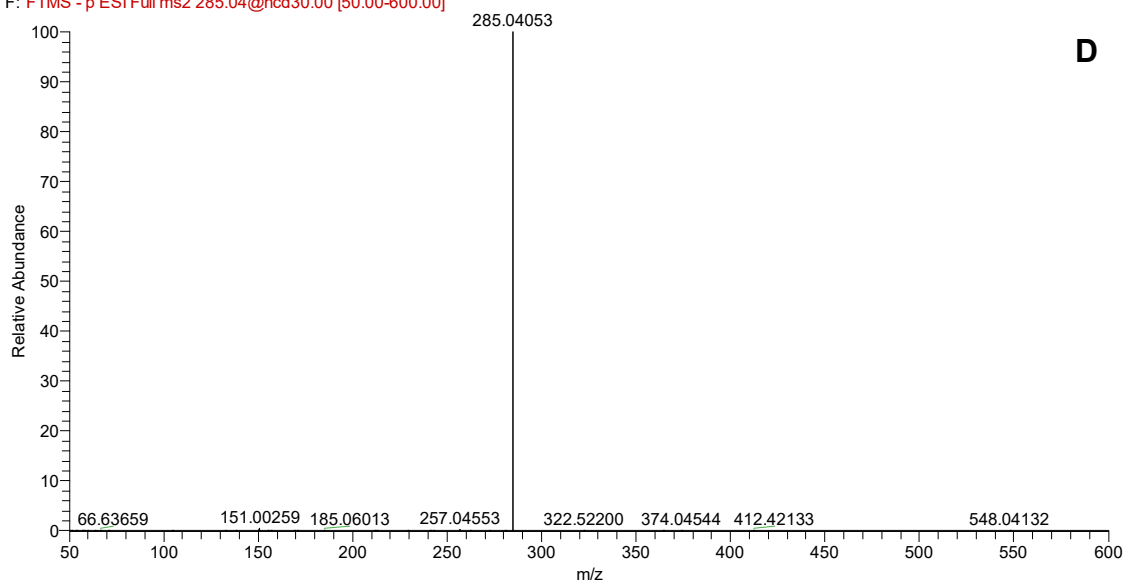


continua

ep1_130319_neg #6011 RT: 26.79 AV: 1 NL: 3.11E6
F: FTMS -p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]



pd_fenolicos_130319 #6011 RT: 26.79 AV: 1 NL: 6.13E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]

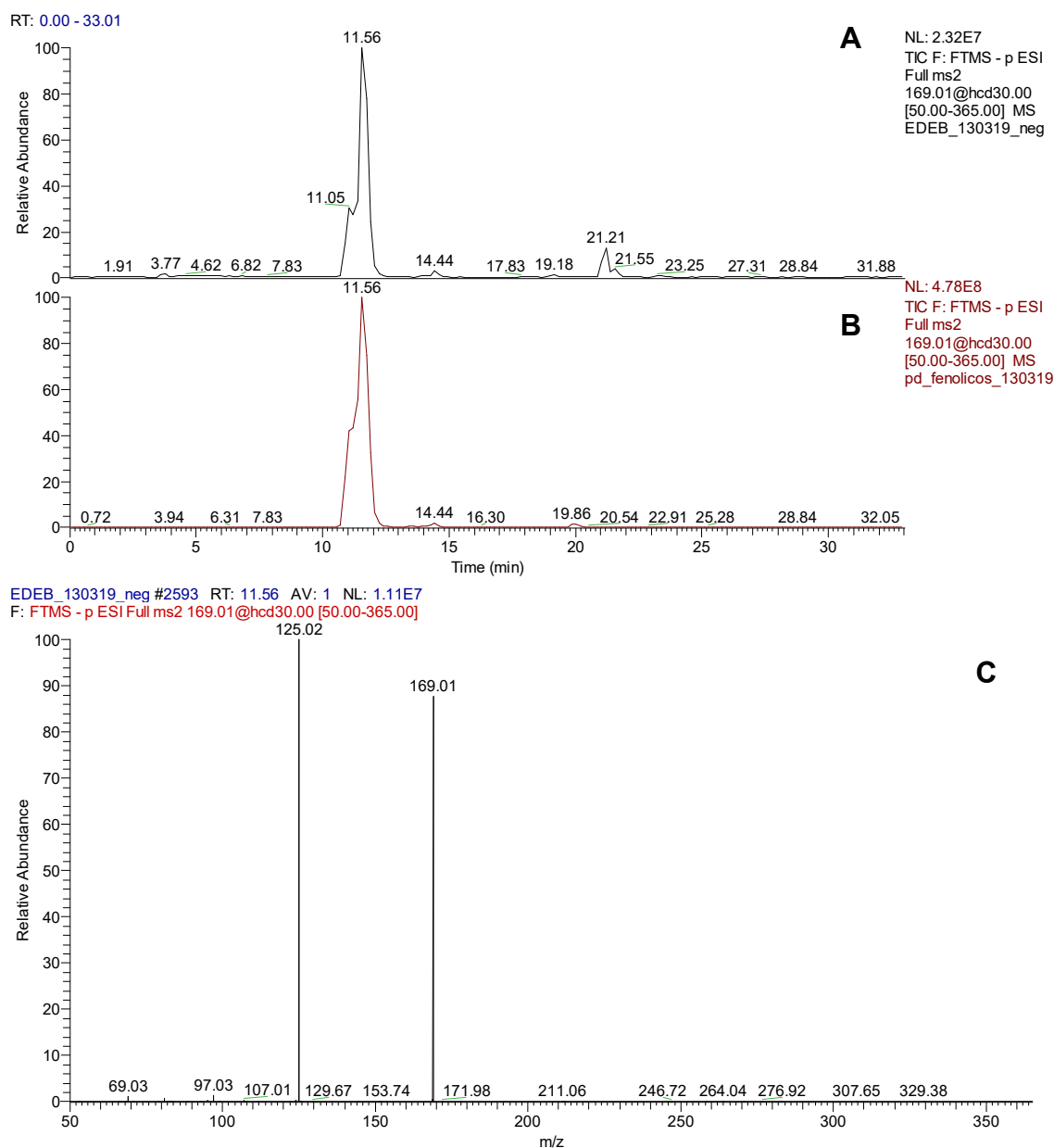


Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de kampferol. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de kampferol.

Fonte: acervo do autor

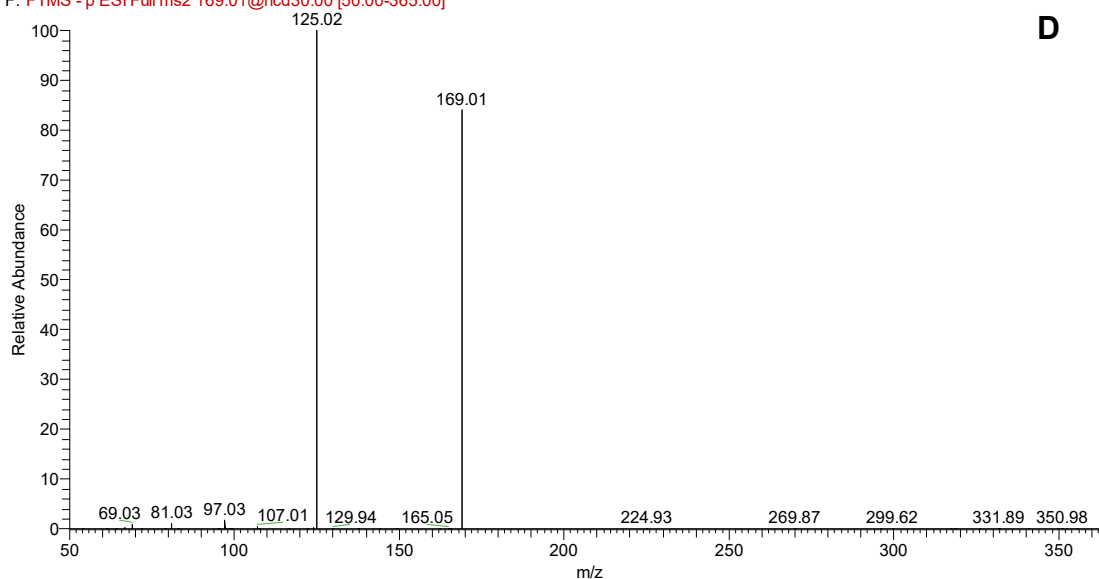
Espectros de massas obtidos da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*

Figura B15 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido gálico



continua

pd_fenolicos_130319 #2593 RT: 11.56 AV: 1 NL: 2.33E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 169.01@hcd30.00 [50.00-365.00]

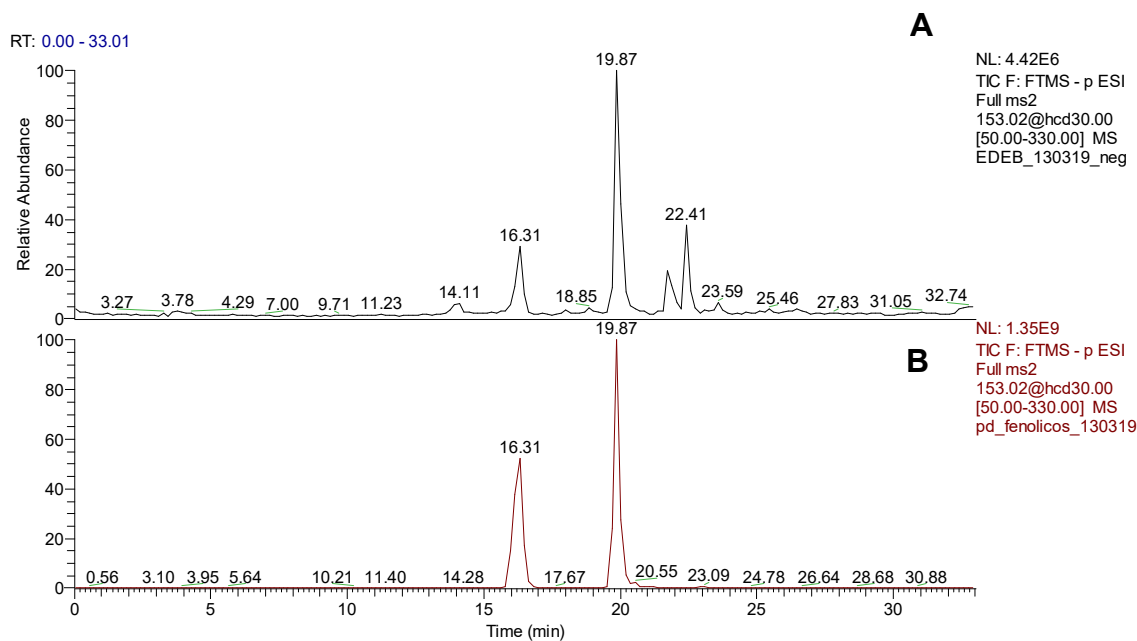


D

Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de ácido gálico. C) Espectro da amostra.
 D) Espectro do padrão de ácido gálico.

Fonte: acervo do autor

Figura B16 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido protocatéiquo

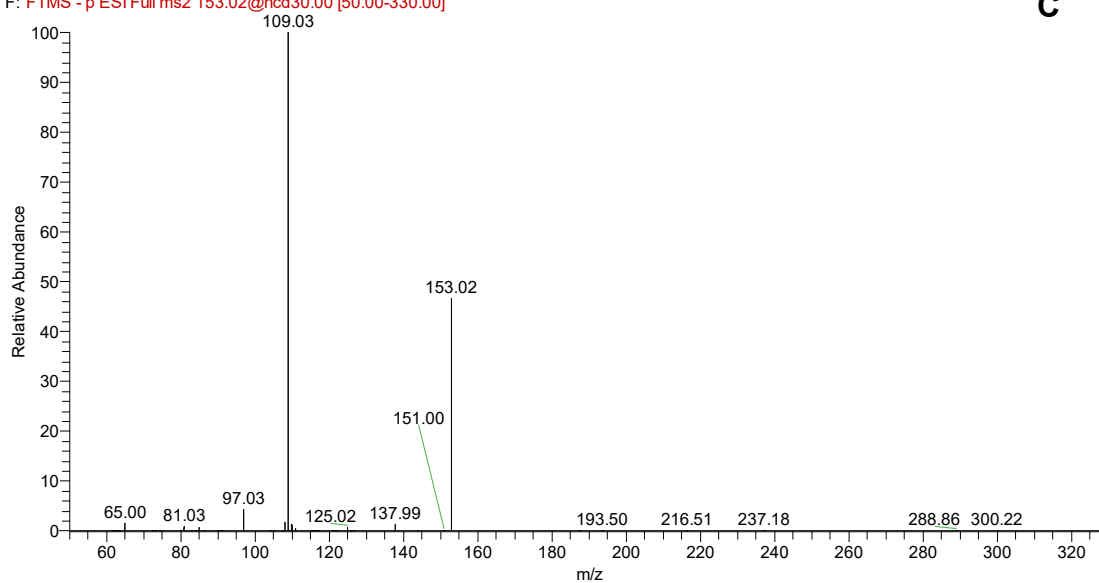


A

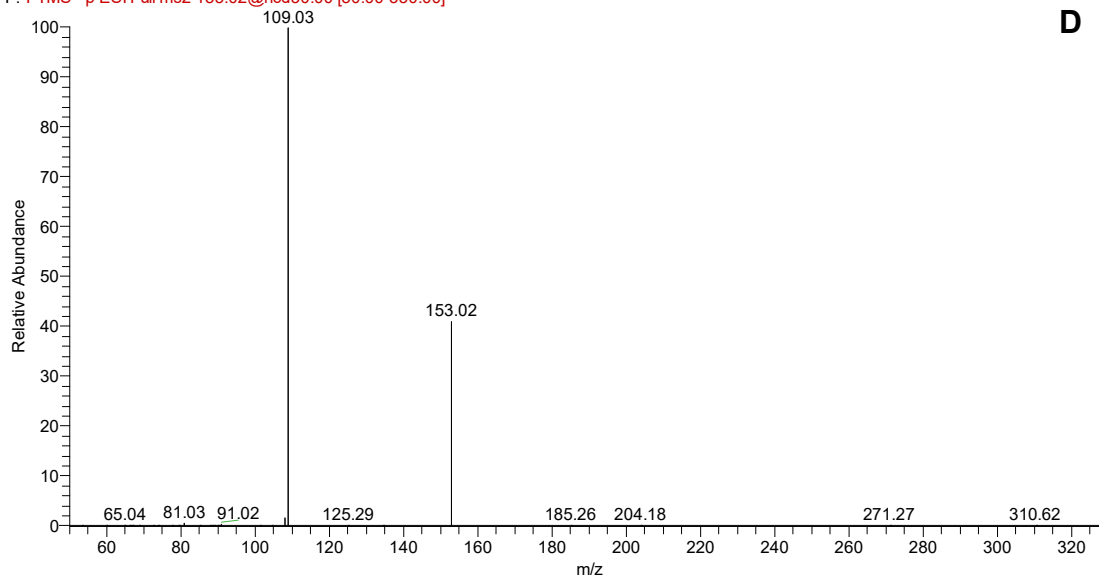
B

continua

EDEB_130319_neg #3659 RT: 16.31 AV: 1 NL: 7.71E5
F: FTMS - p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



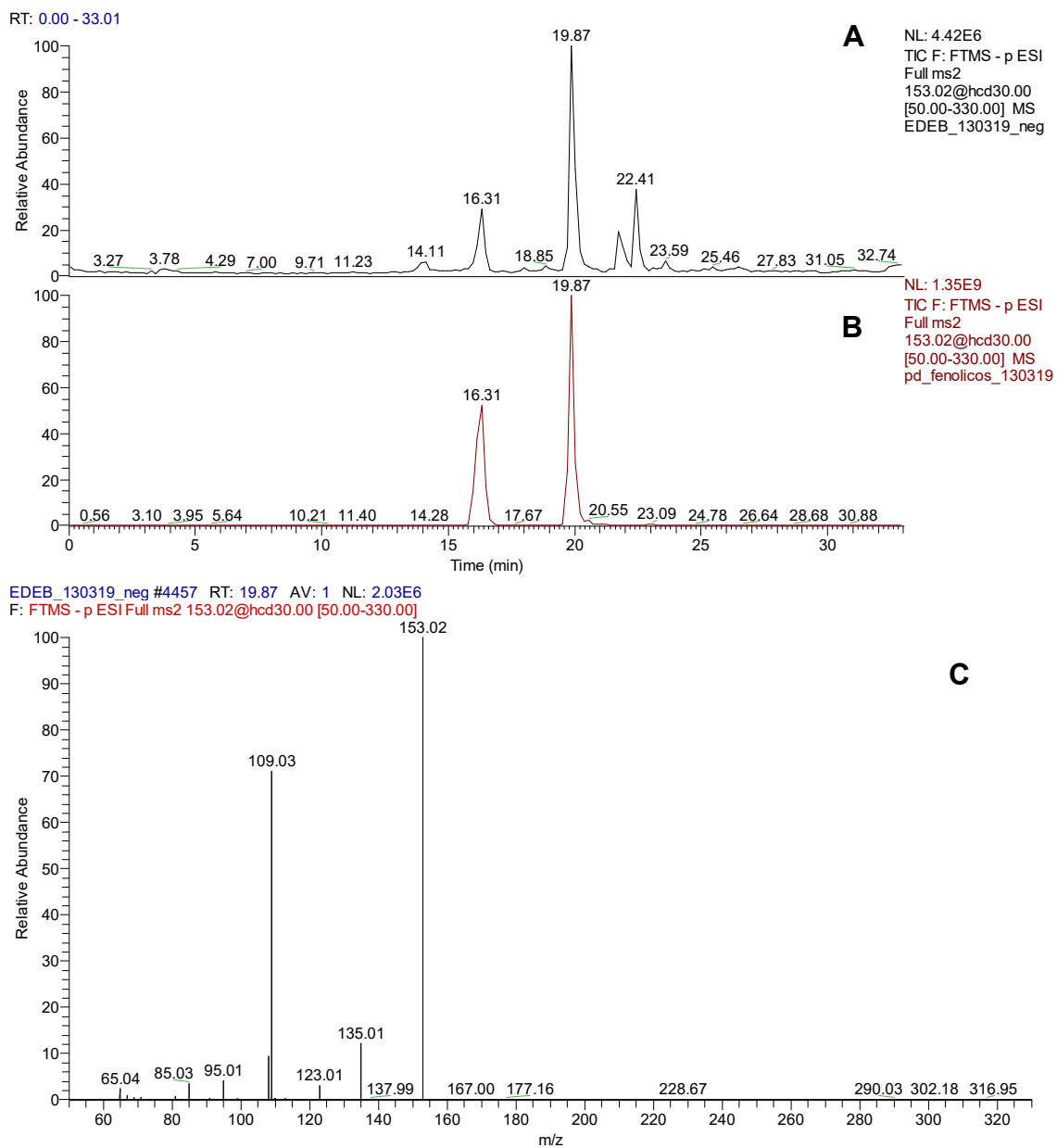
pd_fenolicos_130319 #3659 RT: 16.31 AV: 1 NL: 4.78E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido protocatéquico **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de ácido protocatéquico.

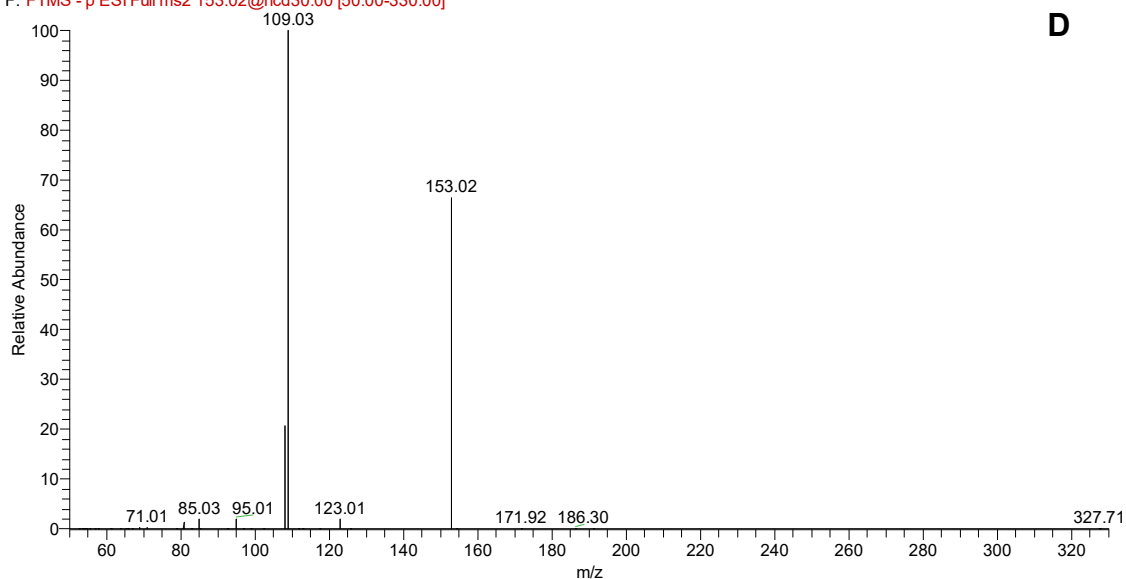
Fonte: acervo do autor

Figura B17 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido gentísico



continua

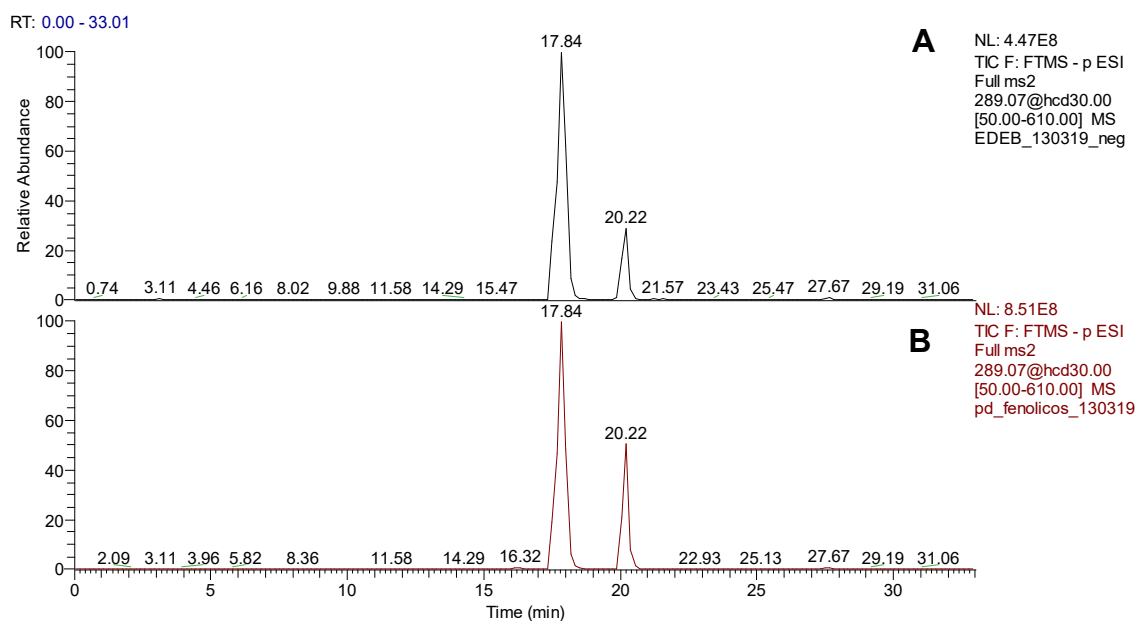
pd_fenolicos_130319 #4457 RT: 19.87 AV: 1 NL: 6.64E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 153.02@hcd30.00 [50.00-330.00]



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido gentísico **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de ácido gentísico

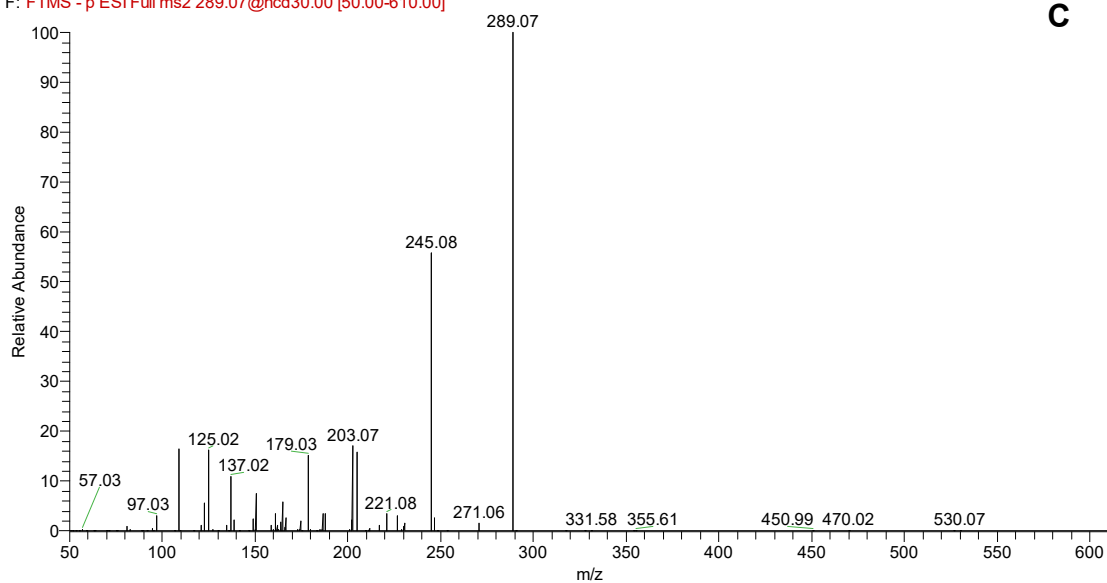
Fonte: acervo do autor

Figura B18 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Catequina

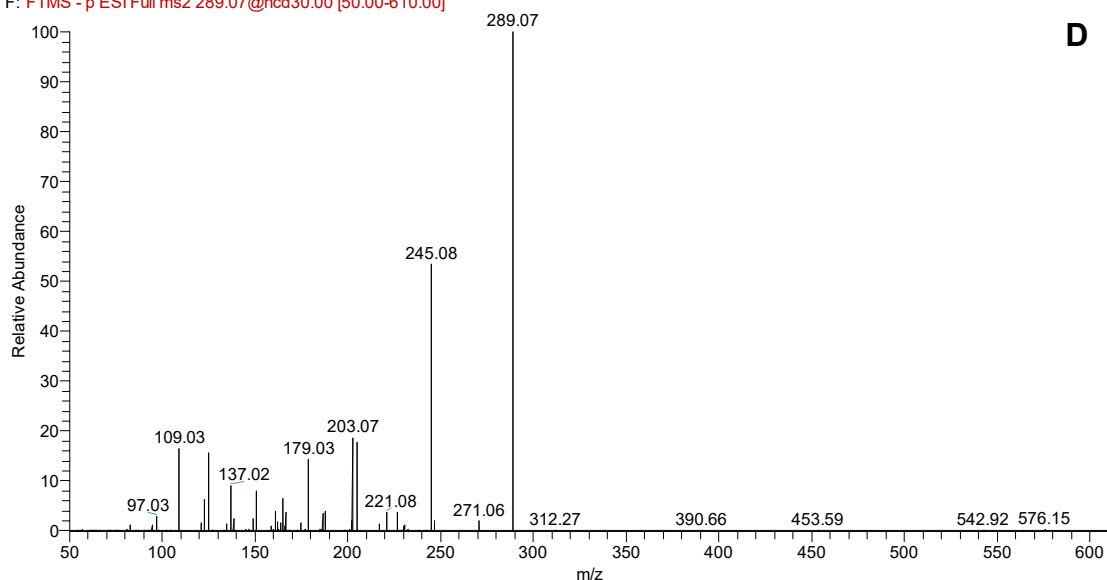


continua

EDEB_130319_neg #4003 RT: 17.84 AV: 1 NL: 1.32E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]



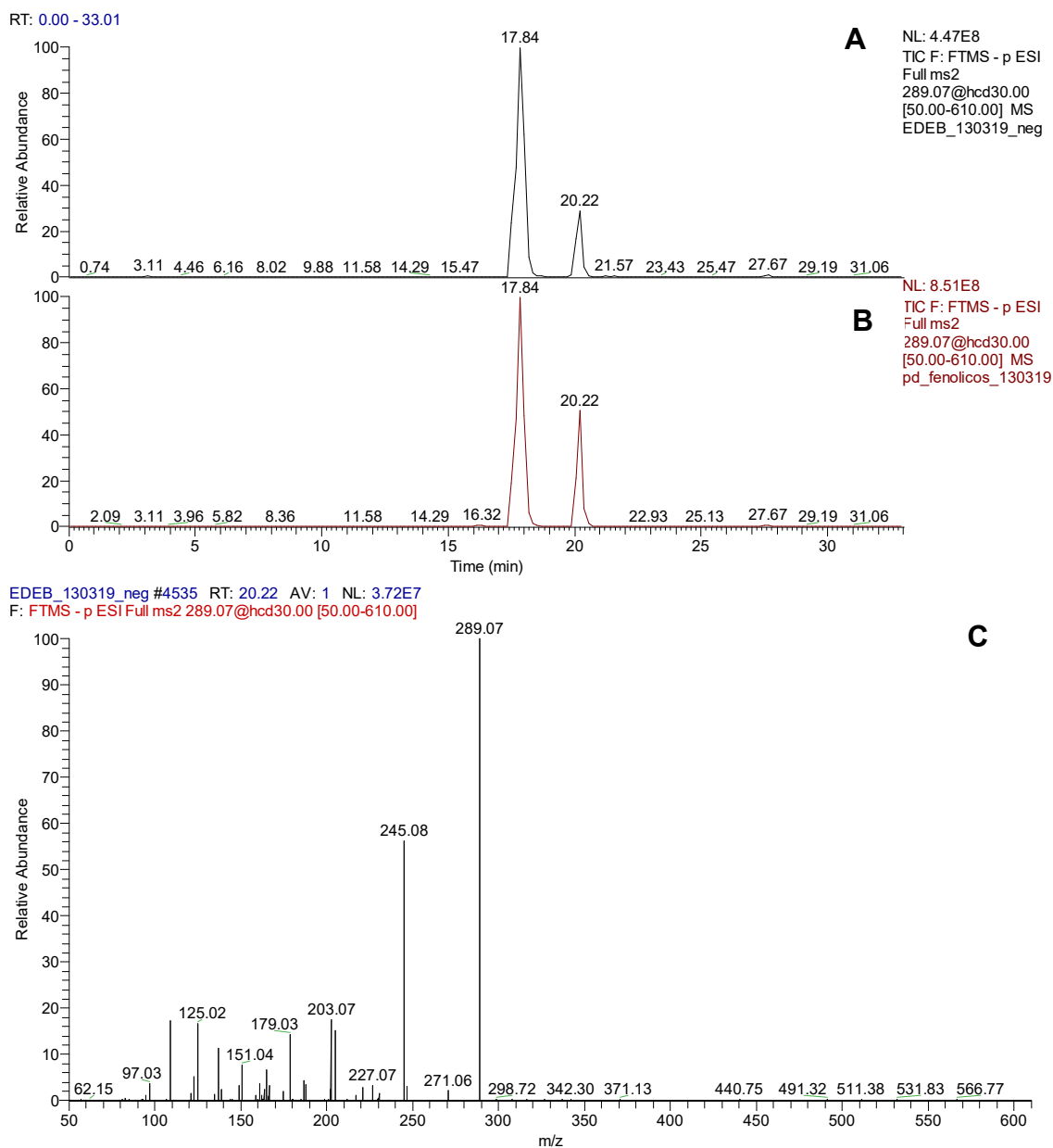
pd_fenolicos_130319 #4003 RT: 17.84 AV: 1 NL: 2.46E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de catequina **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de catequina

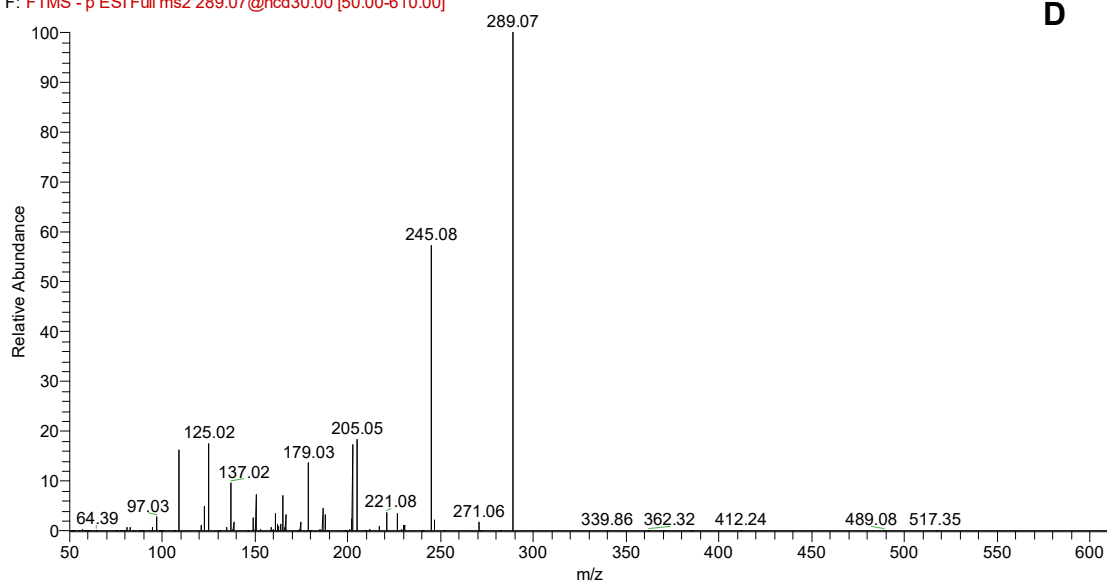
Fonte: acervo do autor

Figura B19 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Epicatequina



continua

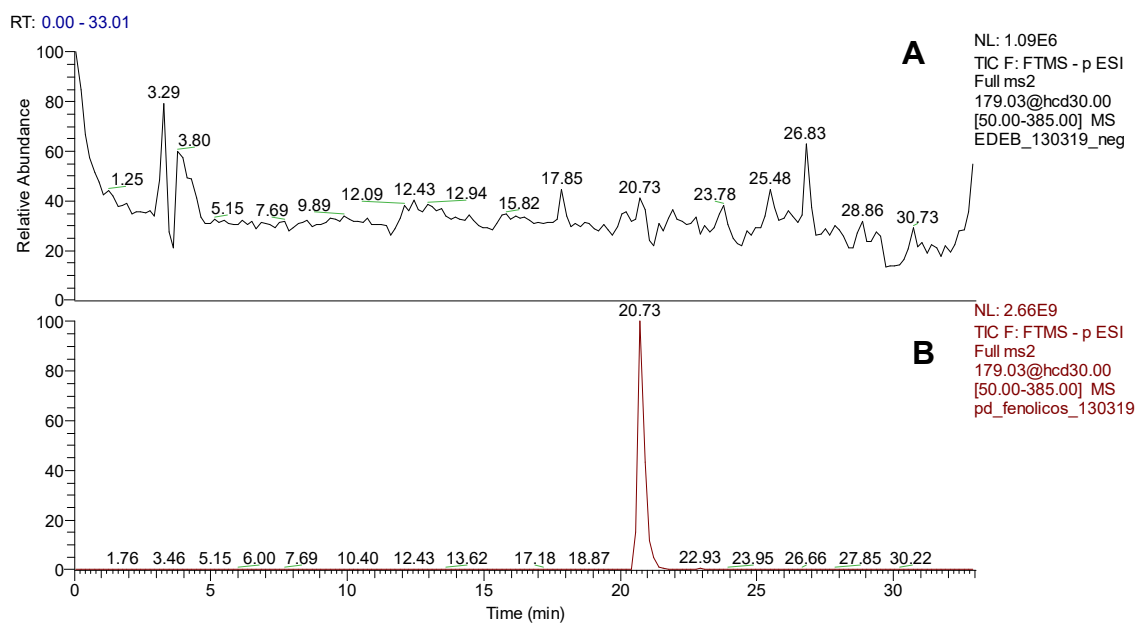
pd_fenolicos_130319 #4535 RT: 20.22 AV: 1 NL: 1.25E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 289.07@hcd30.00 [50.00-610.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de epicatequina. C) Espectro da amostra.
 D) Espectro do padrão de epicatequina.

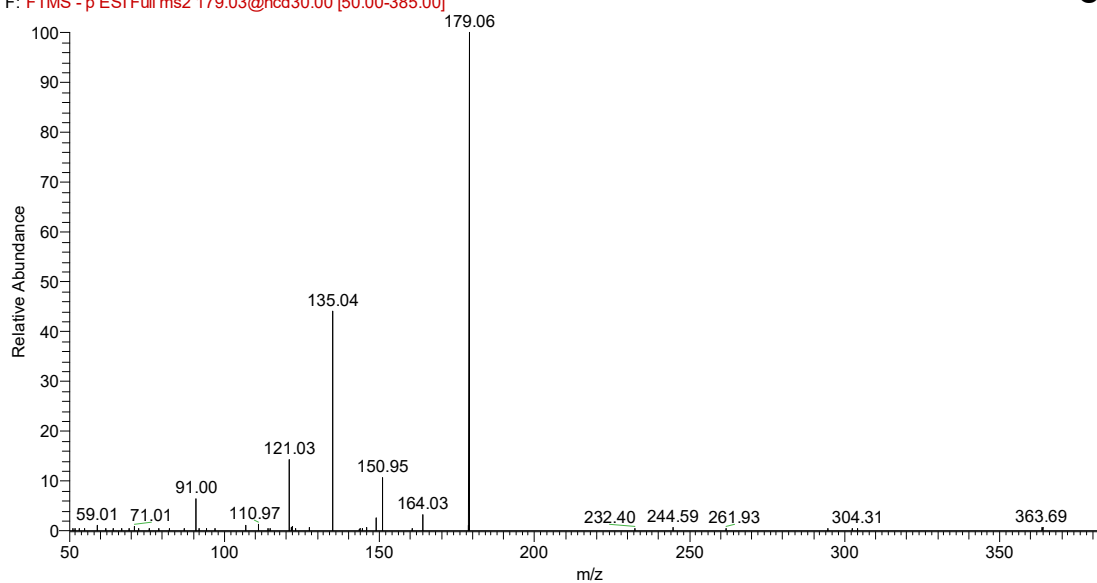
Fonte: acervo do autor

Figura B20 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido cafeico

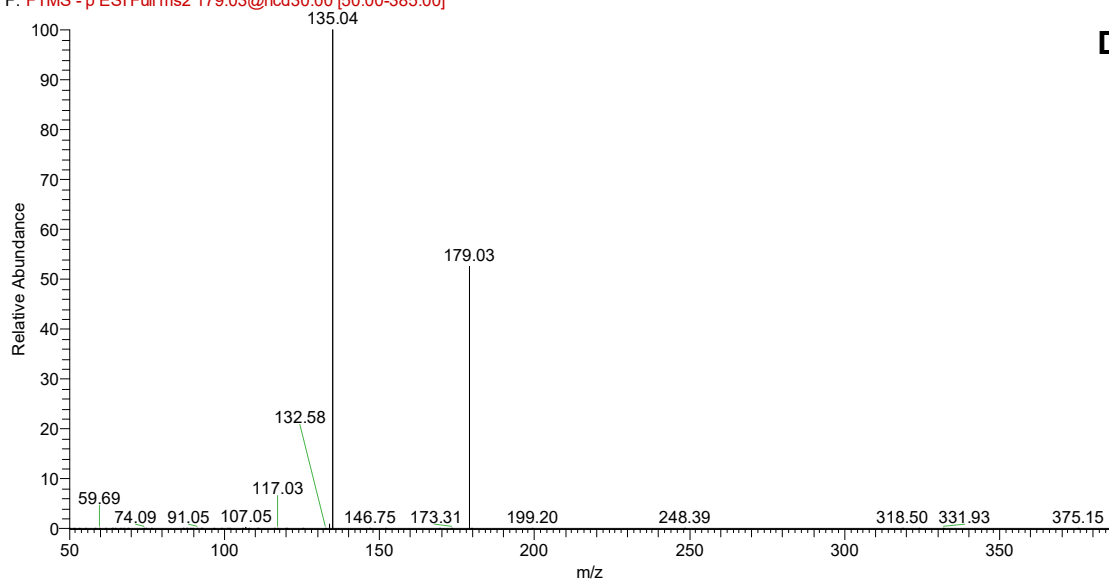


continua

EDEB_130319_neg #4651 RT: 20.73 AV: 1 NL: 1.39E5
F: FTMS -p ESI Full ms2 179.03@hcd30.00 [50.00-385.00]



pd_fenolicos_130319 #4651 RT: 20.73 AV: 1 NL: 1.63E9
F: FTMS -p ESI Full ms2 179.03@hcd30.00 [50.00-385.00]

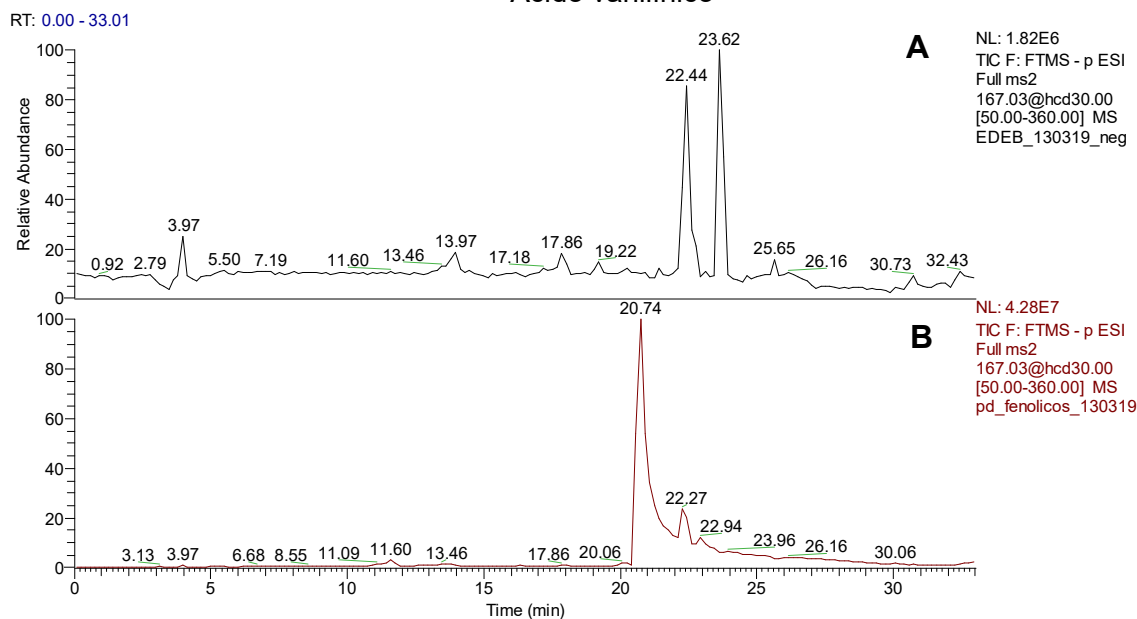


Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de ácido cafeico C) Espectro da amostra.

D) Espectro do padrão de ácido cafeico

Fonte: acervo do autor

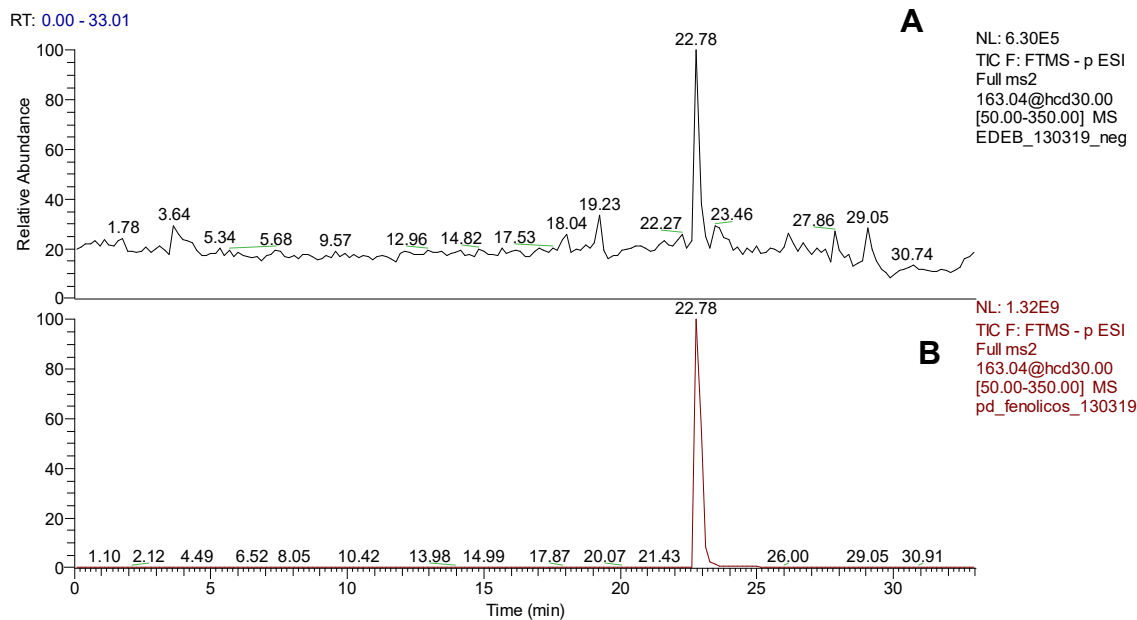
Figura B21 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido vanilínico



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido vanilínico.

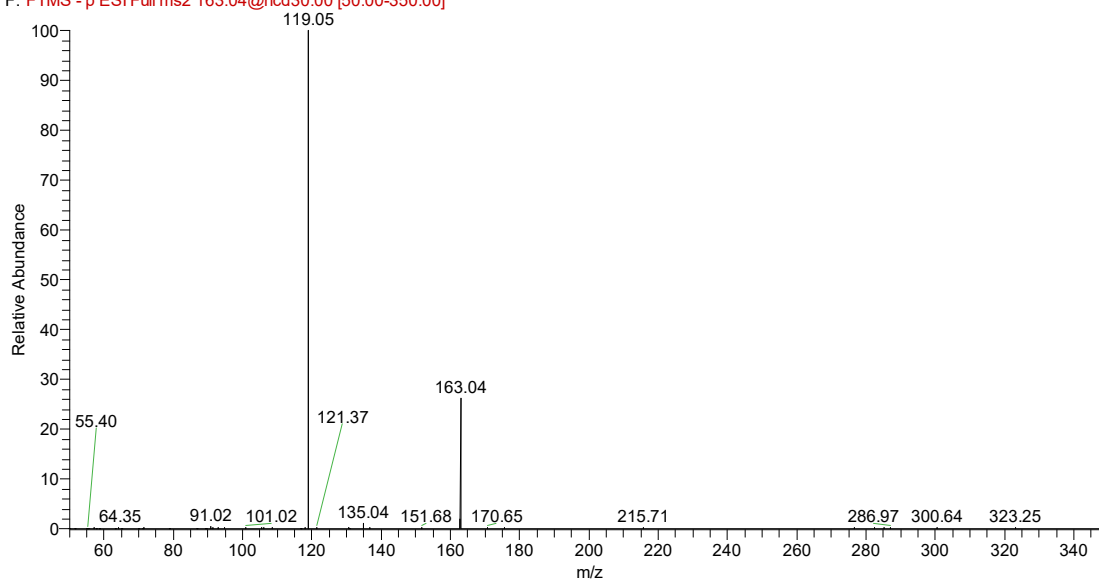
Fonte: acervo do autor

Figura B22 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Ácido p-cumarínico

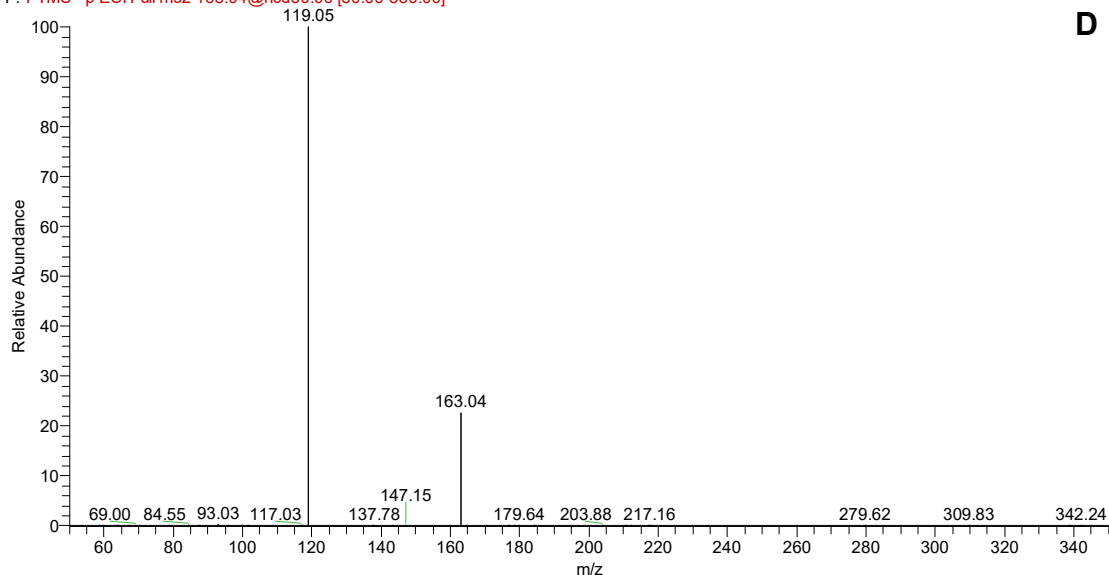


continua

EDEB_130319_neg #5111 RT: 22.78 AV: 1 NL: 3.76E5
F: FTMS -p ESI Full ms2 163.04@hcd30.00 [50.00-350.00]



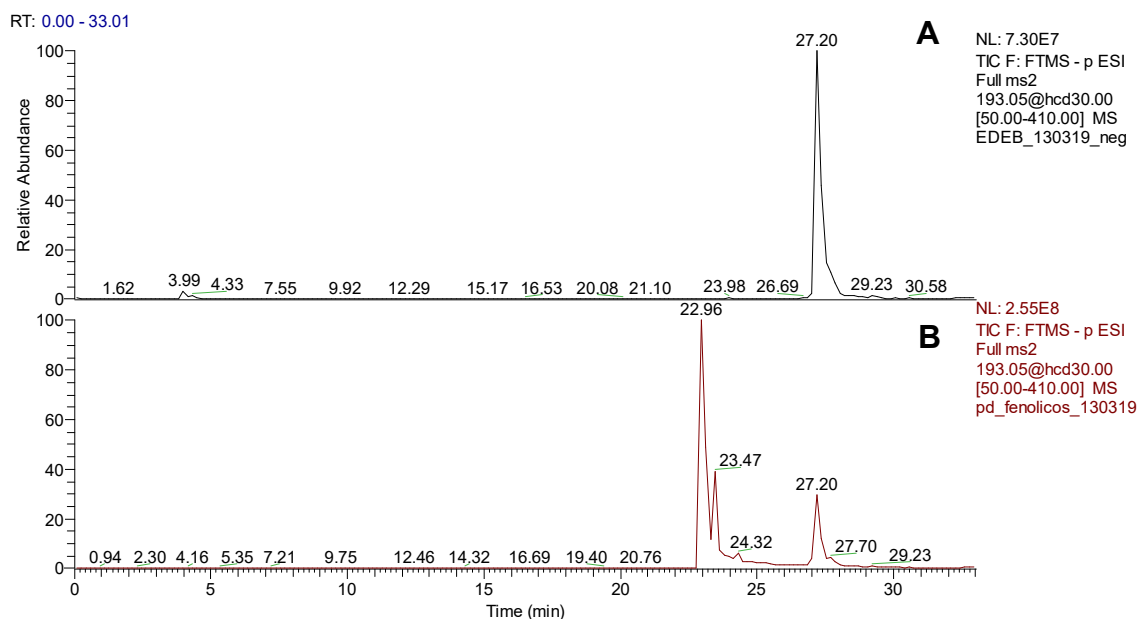
pd_fenolicos_130319 #5111 RT: 22.78 AV: 1 NL: 9.87E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 163.04@hcd30.00 [50.00-350.00]



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido p-cumarínico. **C)** Espectro da amostra. **D)** Espectro do padrão de ácido p-cumarínico

Fonte: acervo do autor

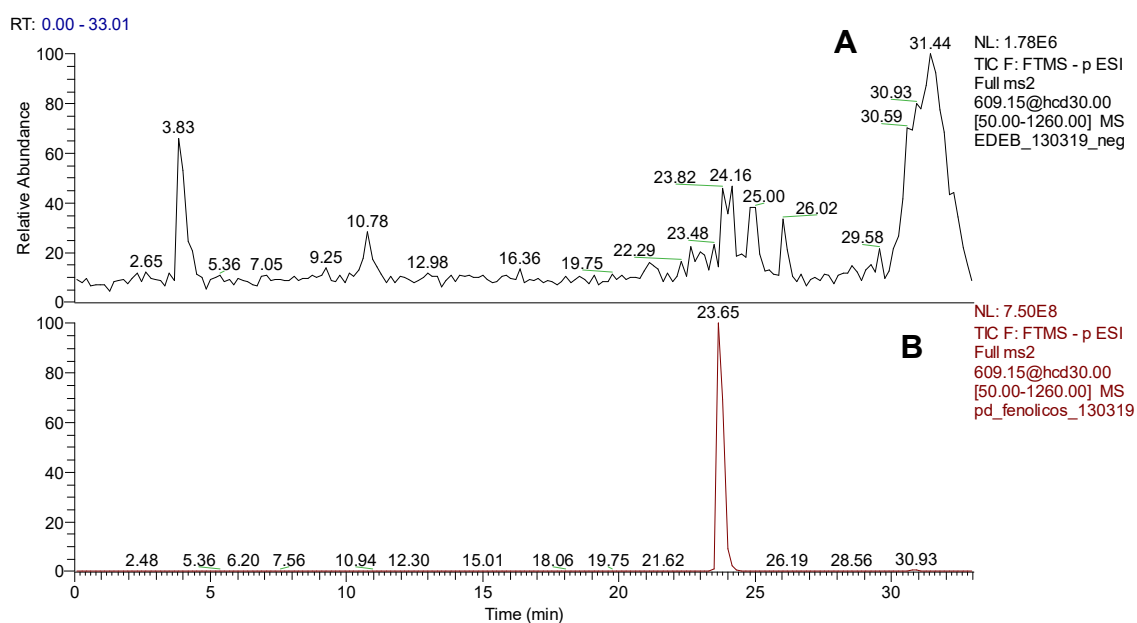
Figura B23 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*–
Ácido ferúlico



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de ácido ferúlico.

Fonte: acervo do autor

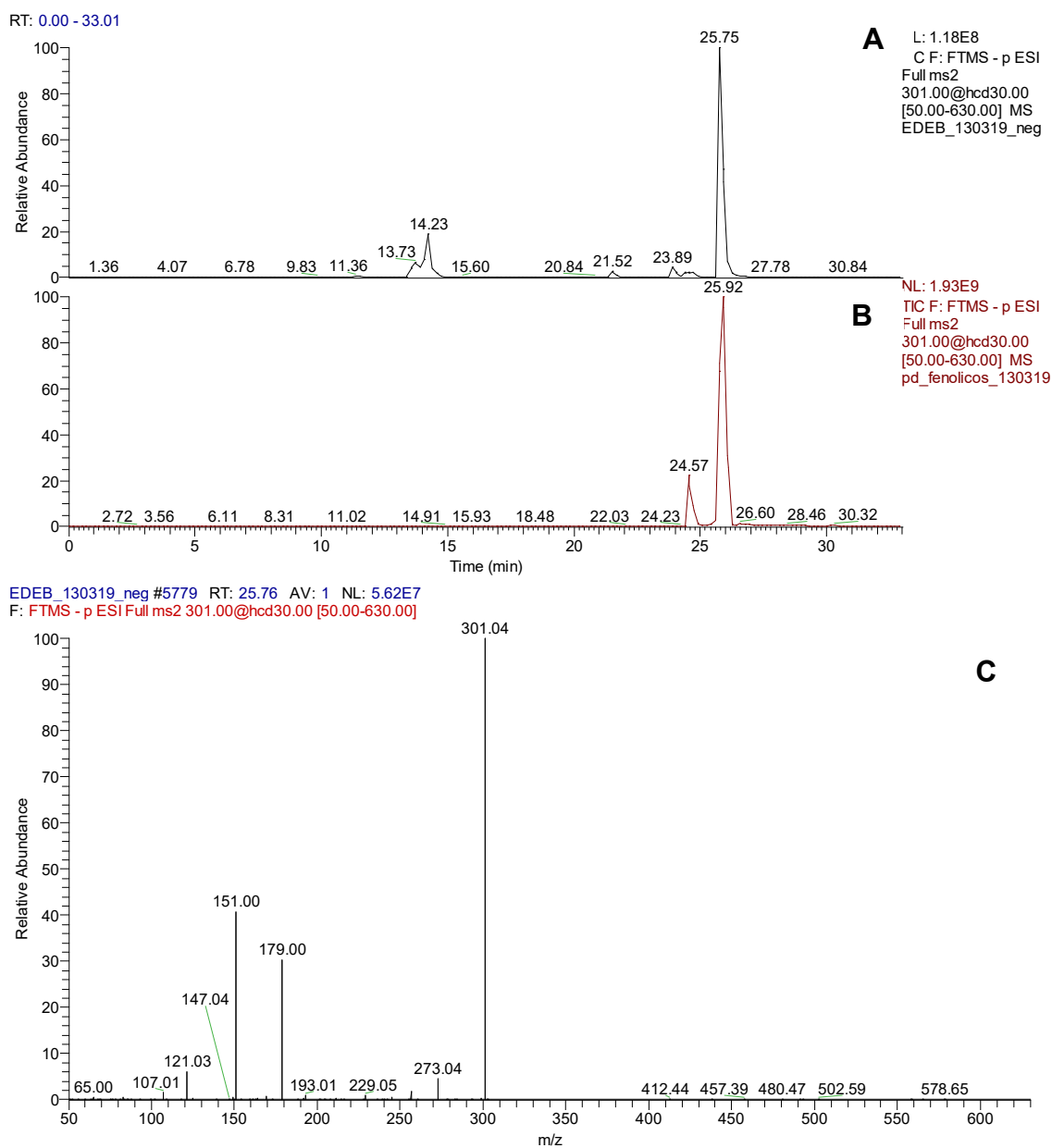
Figura B24 – Cromatogramas da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*–
Rutina



Legenda: **A)** Cromatograma da amostra. **B)** Cromatograma do padrão de rutina

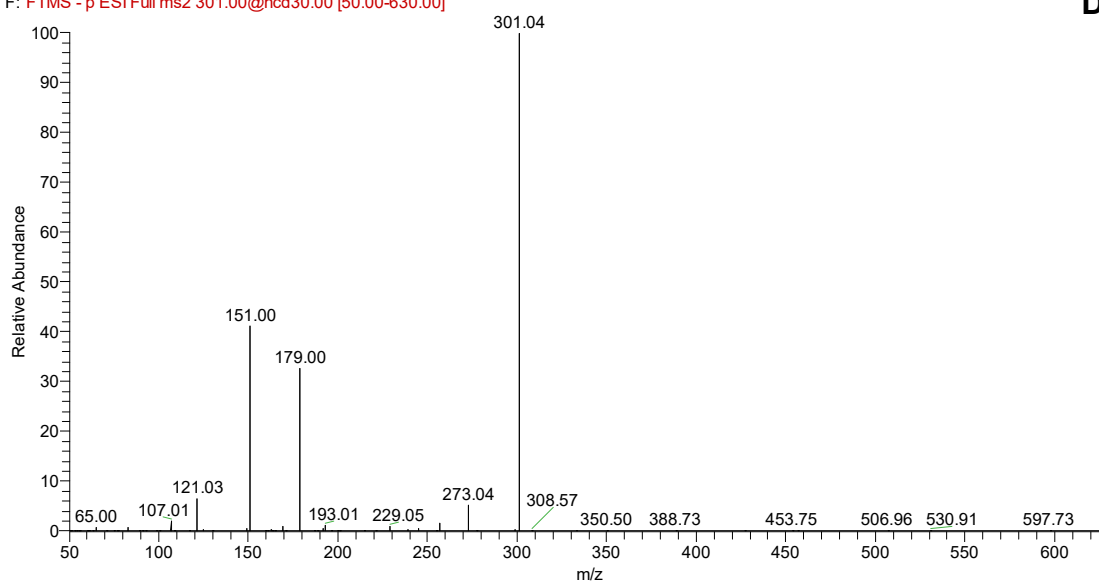
Fonte: acervo do autor

Figura B25 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Quercetina



continua

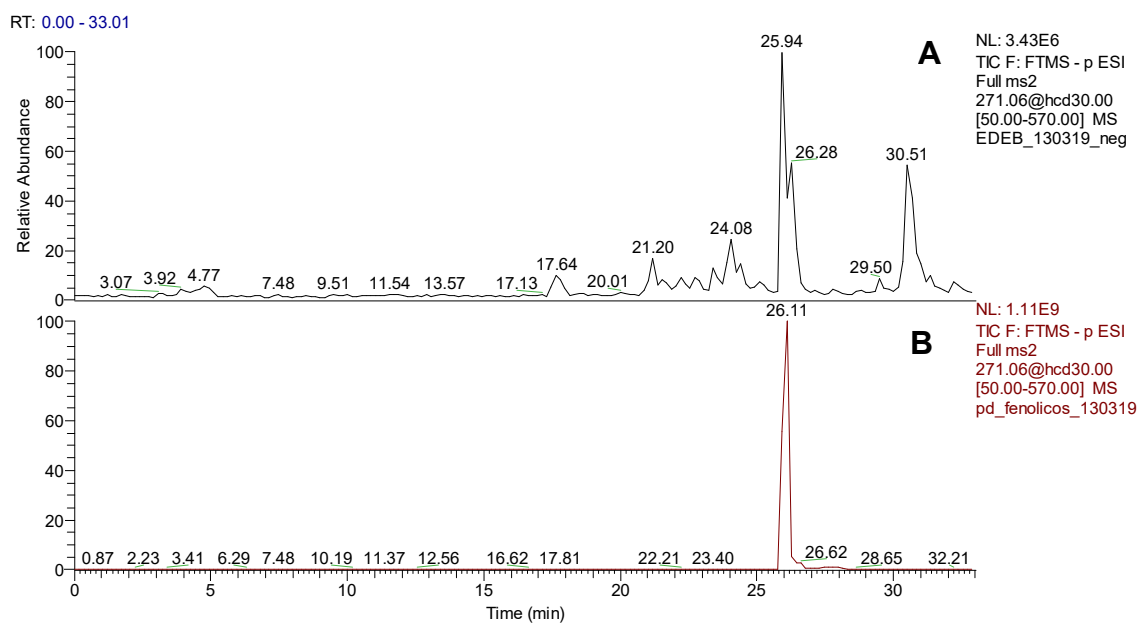
pd_fenolicos_130319 #5817 RT: 25.93 AV: 1 NL: 8.64E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 301.00@hcd30.00 [50.00-630.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de quercetina. C) Espectro da amostra.
 D) Espectro do padrão de quercetina.

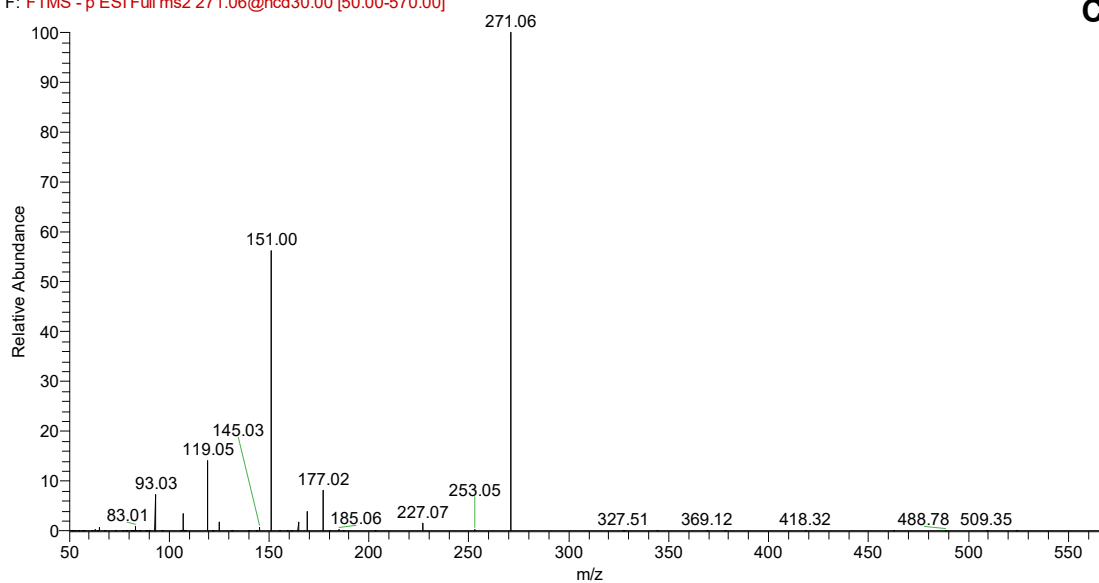
Fonte: acervo do autor

Figura B26 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Narigenina

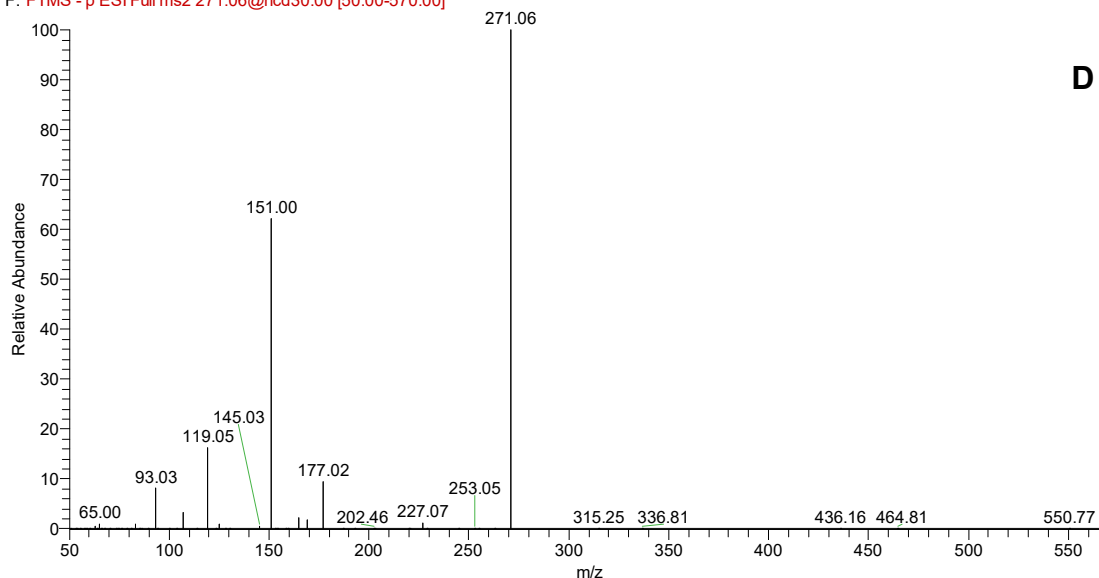


continua

EDEB_130319_neg #5819 RT: 25.94 AV: 1 NL: 1.56E6
F: FTMS - p ESI Full ms2 271.06@hcd30.00 [50.00-570.00]



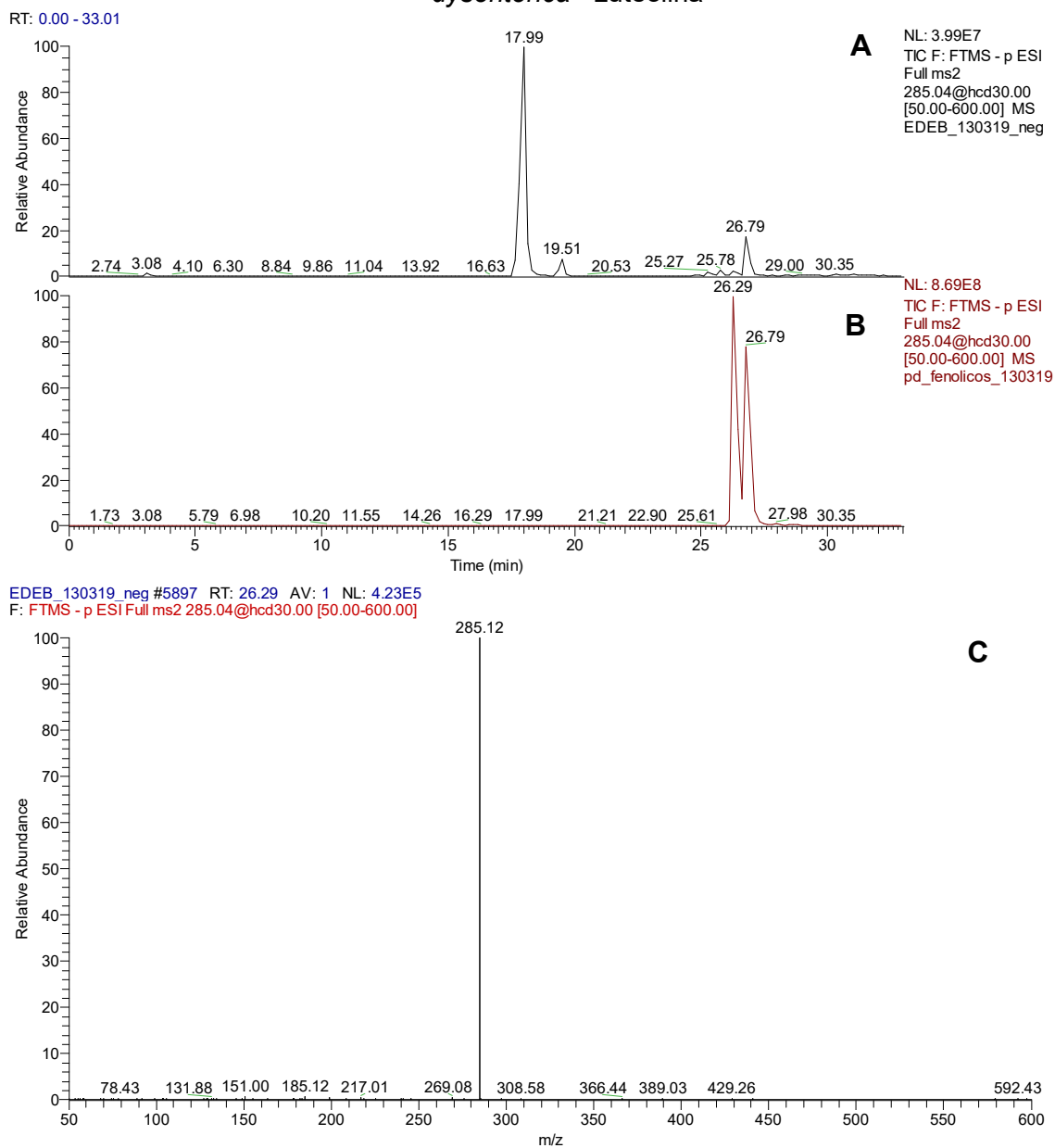
pd_fenolicos_130319 #5857 RT: 26.11 AV: 1 NL: 4.91E8
F: FTMS - p ESI Full ms2 271.06@hcd30.00 [50.00-570.00]



Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de narigenina C) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de narigenina

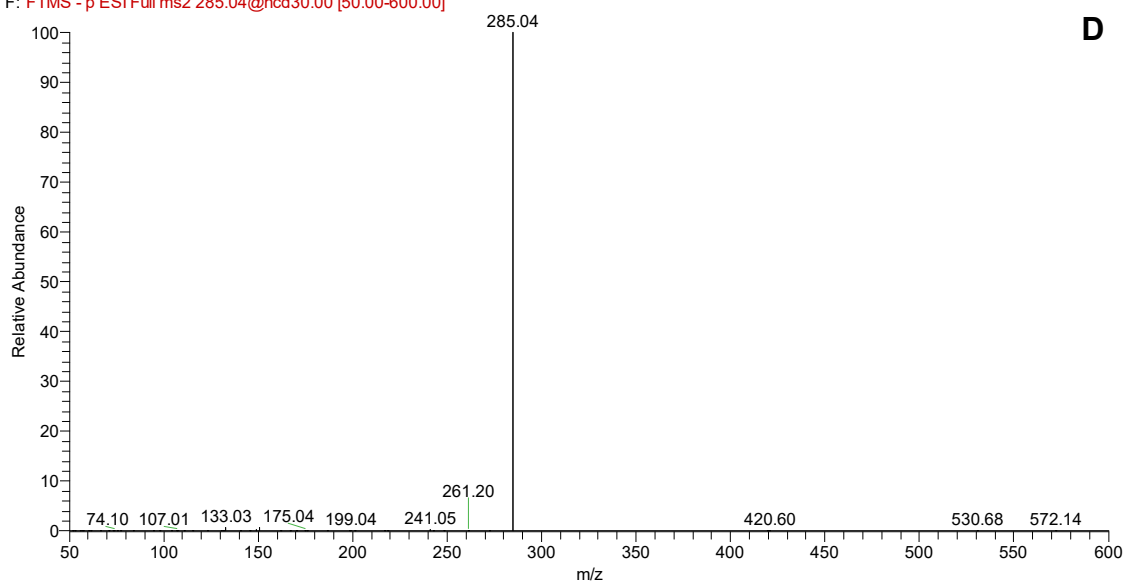
Fonte: acervo do autor

Figura B27 – Cromatogramas e espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*– Luteolina



continua

pd_fenolicos_130319 #5897 RT: 26.29 AV: 1 NL: 7.75E8
 F: FTMS -p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]

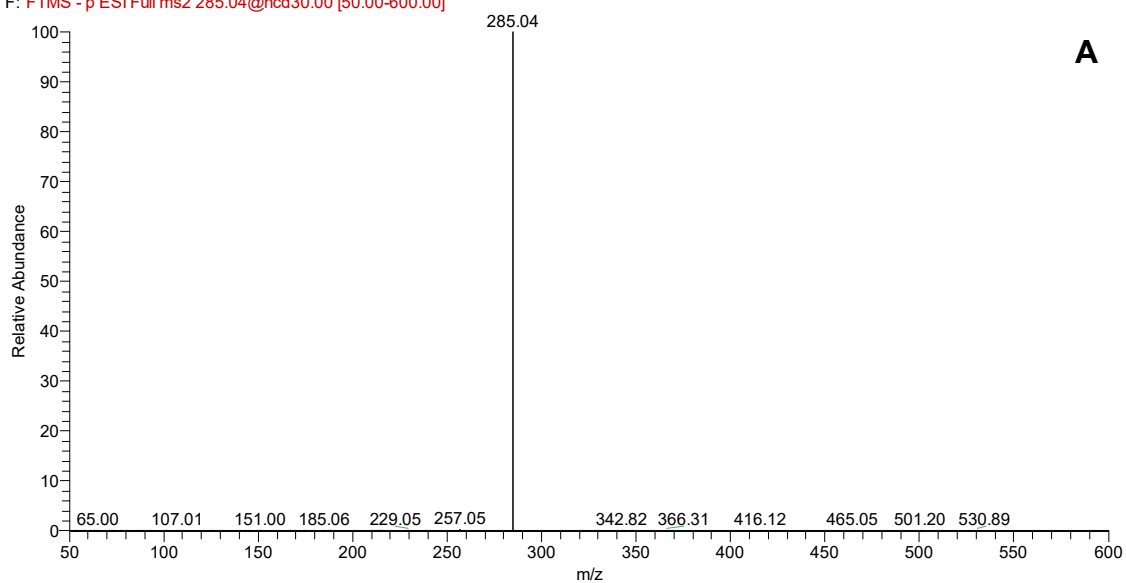


Legenda: A) Cromatograma da amostra. B) Cromatograma do padrão de luteolina. C) Espectro da amostra. D) Espectro do padrão de luteolina

Fonte: acervo do autor

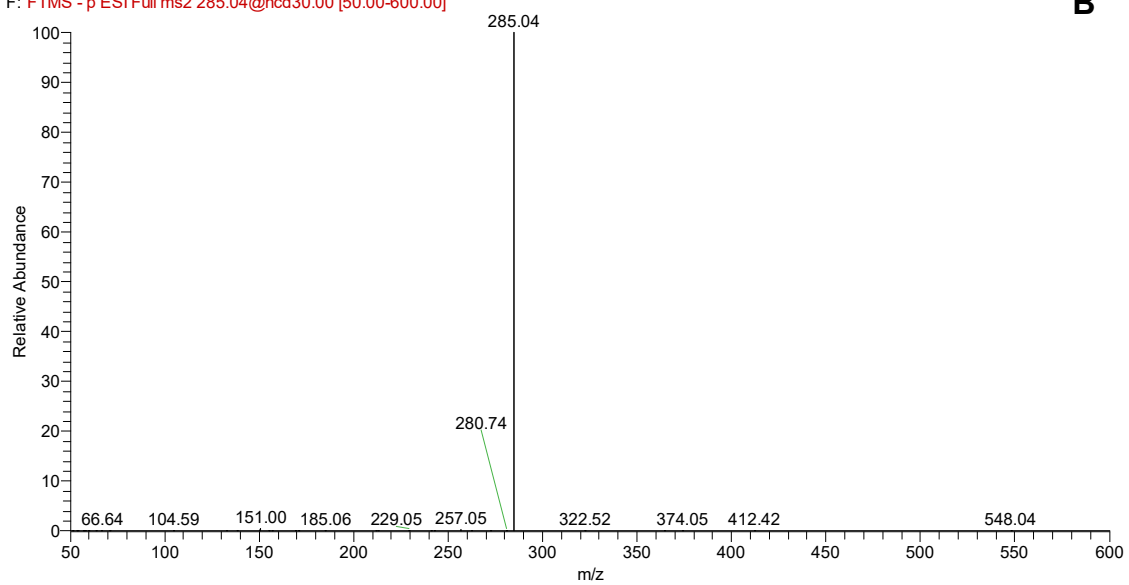
Figura B28 – Espectros da análise por CLAE-EM das folhas de *Eugenia dysenterica*–Kampferol

EDEB_130319_neg #6011 RT: 26.79 AV: 1 NL: 6.13E6
 F: FTMS -p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]



continua

pd_fenolicos_130319 #6011 RT: 26.79 AV: 1 NL: 6.13E8
F: FTMS -p ESI Full ms2 285.04@hcd30.00 [50.00-600.00]



Legenda: **A)** Espectro da amostra. **B)** Espectro do padrão de kampferol.

Fonte: acervo do autor

ANEXO

ANEXO A – Temperaturas médias

