

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Influência do biótipo de cor de fruto e da sazonalidade
no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora***

DEOMAR PLÁCIDO DA COSTA

Goiânia 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**Influência do biótipo de cor de fruto e da sazonalidade
no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora***

Dissertação apresentada no Programa de Mestrado em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química do Cerrado

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri

GOIÂNIA 2009

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)**

C837i Costa, Deomar Plácido da.
Influência do biótipo de cor de fruto e da sazonalidade no óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* [manuscrito] / Deomar Plácido da Costa. – 2009.
xiv,65 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2009.

Bibliografia: f.34-40.

Inclui lista de figuras, tabelas e de abreviaturas.

1. Óleos essenciais – Análise multivariável 2. *Eugenia uniflora*
3. Biótipo do fruto I. Ferri, Pedro Henrique II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Química**. III. Título.

CDU: 665.52/.54

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química,
apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em
27/08/2008.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Fari - IQ/FG

Prof. Dra. Suzel Márcia de Freitas Alves - IQ/FG

Prof. Dr. Roberto Ricardo de Almeida - IQ/FG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e mostrar que é nas dificuldades que realmente aprendemos.

Aos meus pais Eleuza e Deotil pelo incentivo e ensinamentos básicos e fundamentais para minha formação moral.

A meu irmão Renato pela alegria e confiança que depositou em mim.

A meu orientador, Pedro Henrique Ferri, pela confiança, orientação segura e disponibilidade, que sempre precisei.

Pela Prof : Dr. Suzana da Costa Santos pelas valiosas sugestões.

Ao Instituto de Química e Programa de Mestrado em Química da UFG pela formação e profissionalismo.

Pelos colegas de mestrado Pollyanna, Emiret, Fernando (Potter), Wesley (Leão Lobo), Gilmar, Daniella, Alessandra, Fábio, Cinara, Marcos, Monique e Larissa nos momentos de descontração, amizade e apoio.

Aos amigos de Laboratório pela ajuda e companheirismo Elenilson Lorena Mara, Ruver, Érica, quarteto (Gilmara, Fabiana, Ieda e Thaís).

Pela CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
ABSTRACT	lx
RESUMO	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIODIVERSIDADE E O BIOMA CERRADO	1
1.2. TERPENOS E ÓLEO ESSENCIAL	2
1.3. <i>Eugenia uniflora</i> L. (MYRTACEAE)	4
1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	7
2- ANÁLISE QUIMIOTIPOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DA <i>E. uniflora</i> EM DIFERENTES BIÓTIPOS DE COR DE FRUTO.	11
2.1. OBJETIVOS	11
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.2.1. MATERIAL BOTÂNICO	11
2.2.2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	12
2.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
2.4. CONCLUSÃO	24
3- INFLUÊNCIA SAZONAL SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE <i>Eugenia uniflora</i>	25
3.1. OBJETIVOS	25
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.2.1. MATERIAL BOTÂNICO E DADOS CLIMÁTICOS	25
3.2.2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	25
3.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

3.4. CONCLUSÃO	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICE 1	44
APÊNDICE 2	47
APÊNDICE 3	57
APÊNDICE 4	61
APÊNDICE 5	64

ABSTRACT

The multivariate chemical analysis of the essential oils from leaves of *Eugenia uniflora* with different fruit colour indicated the presence of three clusters of oils regarding sample biotypes. The first included yellowish-orange, purple, and dark red fruits with high percentages of germacrene B (11-31%), germacrone (9.8-54%) and atractylone (0-20%). In cluster II, with red bright fruit samples, the major constituents were curzerene (42-43%), germacrene D (8.7-9.0%) and germacrene A (5.9-8.9%), while cluster III included red-orange fruit samples containing a high content of selina-1,3,7(11)-trien-8-one (40-55%) and selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide (13-24%). All essential oils have predominantly sesquiterpenes, although sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes contents were majorities in the clusters I/II and III, respectively. In addition, seasonal influence on the chemical composition of essential oils of from leaves of red-orange fruit colour biotype has indicated the influence of seasons, which included samples collected during dry months (April-September) characterized by the highest percentages of spathulenol (10%) and caryophyllene oxide (4.1%), and samples collected during wet months (October-March), whose major constituent was selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide (29%). The canonical correlation indicated that spathulenol and caryophyllene oxide revealed a strong relationship with the phenolics and nutrient balance (S, Ca, Fe) in leaves, whereas selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide was related to (K, Cu, Mn), and precipitation during the months of the wet season. Oxygenated sesquiterpenes were predominant in all the sampling months and the oil chemovariation observed might be environmentally determined by a clear seasonal influence.

RESUMO

A análise multivariada da composição química dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* com diferentes cores de fruto indicou a presença de três grupos de óleos em relação ao biótipo do fruto das amostras. O primeiro grupo incluiu amostras de frutos amarelo-alaranjados, roxos e vermelhos escuros contendo altas percentagens de germacreno B (11-31%), germacrona (9,8-54%) e atractilona (0-20%). No grupo II, com amostras de frutos vermelhos claro, os constituintes majoritários foram o curzereno (42-43%), germacreno D (8,7-9,0%) e germacreno A (5,9-8,9%), enquanto que o grupo III incluiu amostras com frutos de cor vermelho-alaranjado, caracterizadas por um alto conteúdo de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (40-55%) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (13-24%). Em adição, a influência sazonal na composição química dos óleos essenciais de um biótipo de cor de fruto vermelho-alaranjado grupo III indicou a presença das duas estações do Cerrado brasileiro. As amostras coletadas na estação seca (abril-setembro) foram caracterizadas por conterem as mais altas percentagens de espatulenol (10%) e óxido de cariofileno (4,1%), enquanto que amostras coletadas na estação úmida (outubro-março), o constituinte majoritário foi o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (29%). A correlação canônica indicou que o espatulenol e o óxido de cariofileno apresentaram um forte relacionamento com o balanço de nutrientes (S, Ca, Fe) e os fenólicos foliares, enquanto o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona foi correlacionado ao conteúdo de K, Cu, Mn e a precipitação nos meses da estação úmida. Os sesquiterpenos oxigenados predominaram em todas as amostras e a variação química nos óleos essenciais parece ser determinada pelo ambiente com uma clara influência sazonal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1 -	Rota biossintética dos terpenos.	3
Figura 2.3.1. -	Diferentes biótipos de cor de fruto de <i>E. uniflora</i> .	14
Figura 2.3.2. -	Biplote da PCA dos óleos essenciais das folhas de <i>E. uniflora</i> de acordo com a cor de fruto: vermelho (círculo), amarelo-alaranjado (quadrado) e roxo (triângulo) e cujo grupo I (símbolos escuros) compreende os biótipos: vermelho escuro, amarelo-alaranjado e roxo; grupo II (símbolos não preenchidos) vermelho claro, e grupo III (símbolos cinza) frutos vermelho-alaranjados. ^a Eixo dos indivíduos (escores). ^b Eixo referente aos constituintes discriminantes dos óleos essenciais (loadings) representados por vetores a partir da origem. Os valores em parênteses se referem à variância retida sobre cada eixo da PCA e as cruzes o centróide de cada grupo.	15
Figura 2.3.3. -	Dendrograma de similaridade baseado na composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>E. uniflora</i> das amostras, vermelhas (círculo), amarelo-alaranjado (quadrado) e roxo (triângulo). As cores dos frutos se agrupam em: I (símbolos escuros: fruto vermelho escuro, amarelo-alaranjado e roxo); II (símbolos não preenchidos: fruto vermelho claro), e III (símbolos cinza: fruto vermelho-alaranjado).	16
Figura 2.3.4. -	Cromatograma total de íons do óleo essência das folhas de <i>E. uniflora</i> .	23
Figura 2.3.5. -	Espectro de massa do curzereno.	23
Figura 2.3.6. -	Espectro de massa da atractilona.	23
Figura 2.3.7. -	Mecanismo sugerido para a formação eletrocíclica de atractilona a partir do curzereno.	24

- Figura 3.3.1. - Gráfico da PCA dos óleos essenciais de *E. uniflora* de 28 uma população com biótipo de fruto vermelho-alaranjado, coletado na estação chuvosa (□) e durante a seca (●). ^aEixos referentes aos escores das amostras. ^bEixos referentes aos pesos (*loadings*) dos constituintes químicos discriminantes representados por vetores a partir da origem. Os valores entre parênteses representam a variância em cada PC. As cruzes indicam os baricentros das classes e as setas pequenas mostram os indivíduos mal classificadas.
- Figura 3.3.2. - Dendrograma de similaridade mostrando o nível de 29 agrupamento das amostras em períodos de seca (●) e na estação úmida (□).
- Figura 3.3.3. - Coordenação do metal por seis ligantes, com uma 35 molécula de água, dois de ácido aspártico e uma de fosfato. O Metal pode ser Mg, Mn, Zn ou Co.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1. -	Médias percentuais dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de diferentes biótipos de cor de frutos de <i>E. uniflora</i> .	18
Tabela 2.3.2. -	Sumário da análise de Discriminante dos biótipos de <i>E. uniflora</i> .	19
Tabela 3.3.1. -	Percentagem ^a média dos constituintes voláteis das folhas de <i>E. uniflora</i> de biótipo do fruto vermelho alaranjado coletado nas estações seca e úmida do Cerrado/GO.	30
Tabela 3.3.2. -	Sumário da análise discriminante canônica de <i>E. uniflora</i> .	31
Tabela 3.3.3. -	Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais de <i>E. uniflora</i> e as variáveis climáticas.	31
Tabela 3.3.4. -	Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais de <i>E. uniflora</i> e os constituintes fenólicos foliares.	32
Tabela 3.3.5. -	Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais das folhas de <i>E. uniflora</i> e seus nutrientes foliares.	33
Tabela 3.3.6. -	Relação entre abertura dos estômatos e a concentração de K foliar.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

EBV	Vírus de Herpes Humana-4
PCA	Análise de Componentes Principais
CA	Análise de Agrupamento
CDA	Análise Discriminante Canônica
CCA	Análise de Correlação Canônica
MANOVA	Análise de Variância Multivariada
ANCOVA	Análise de Covariância
SVD	Decomposição de Valor Singular
PCs	Componentes Principais
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IE	Impacto Eletrônico
eV	Eletrovolte
SIM	Monitoramento de Íon Simples
NIST/EPA/NIH	Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia/EUA
TIC	Cromatograma Total de Íons
PC-1 e PC-2	Componente Principal 1 e Componente Principal 2
CG/EM-MIS	Cromatografia Gasosa/Espectro de Massa com Monitoramento de Íon Simples
AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
ABA	Ácido Abscísico
GPP	Geranil Difosfato
FPP	Farnesil Difosfato

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIODIVERSIDADE E O BIOMA CERRADO

O maior número de espécies vegetais encontra-se nas regiões equatoriais da América do Sul, África e da Ásia e o máximo de diversidade global encontra-se na flora da Colômbia, Equador e Peru, onde mais de 40.000 espécies ocorrem em uma área de apenas 2% da superfície terrestre. O máximo valor para a diversidade de espécies florestais foi encontrado na floresta úmida em Iquitos, no Peru, onde se registrou a existência de 300 espécies por hectares. Para se ter uma idéia comparativa desses valores, em todo território dos Estados Unidos e Canadá, a magnitude da diversidade genética vegetal nativa limita-se a 700 espécies (GENTRY, 1988; WILSON, 1992).

A oportunidade na identificação de produtos naturais com possível utilização econômica aumenta com a diversidade das espécies, como a possibilidade de descoberta de novos fármacos ou modelos de estrutura para a síntese de um grande número de princípios ativos para medicamentos (GUERRA et al., 2003).

Com tamanha biodiversidade torna-se complexo compreender a dinâmica e as inter-relações entre planta-planta, planta-animal e planta-parasita, e com qual intensidade os metabólitos especiais se relacionam com as mesmas, visando às vantagens que esses metabólitos proporcionariam à agricultura com o aumento na produtividade nas lavouras, inibindo a herbívoros e as pragas (GUERRA et al., 2003).

Localizado basicamente no Planalto Central do Brasil, o Cerrado é o segundo maior bioma do País, superado apenas pela Floresta Amazônica, e comporta as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, apresentando índices pluviométricos regulares que lhe propiciam uma grande biodiversidade. O Cerrado ocupa uma área superior a 2 milhões de km², cerca de 20% do território brasileiro e devido à sua localização, o bioma Cerrado se apresenta como uma

região única para o estudo da influência que os fatores geográficos e históricos tiveram em sua biota (MÉIO et al., 2003).

O bioma Cerrado se estende como um corredor xérico, conectando o chaco à caatinga, ocupando a região intermediária entre as duas maiores florestas úmida neotropicais: a floresta Amazônica e a floresta Atlântica. A maior parte desse bioma apresenta um gradiente fisionômico com vegetação xeromorfa que varia de campo limpo até cerradão, embora também ocorram matas de galeria e florestas estacionais. Há uma grande proporção de espécies oriundas da floresta Atlântica (44,8%) em adição a uma proporção bem menor de espécies oriundas da floresta Amazônica (1,4%), em sua composição florística. Estudos recentes indicaram que a flora arbórea do bioma Cerrado tem maior afinidade com a floresta Atlântica (55% de espécies comuns) do que com a floresta Amazônica (20%). Todos estes resultados indicam a existência de uma maior afinidade florística do bioma Cerrado com a floresta Atlântica (MÉIO et al., 2003).

1.2. TERPENOS E ÓLEO ESSENCIAL

Os terpenóides compõem um das principais grupos de moléculas que permitem a interação de plantas com outros organismos, incluindo competição (alelopatia), herbivoria, atuando como hormônio de crescimento de plantas e patógenos. Atuam ainda na defesa química como fitoalexinas, atração de polinizadores, na comunicação química entre insetos ou precursores de hormônios que pode interferir no desenvolvimento dos insetos (BOHLMANN et al., 1998).

Assim como os outros metabólitos especiais produzidos pelas plantas, os óleos essenciais são produzidos em vários sítios no interior da célula e são armazenados primariamente dentro de vacúolos, freqüentemente em estruturas chamadas de tricomas glandulares (TAIZ et al., 2004).

A existência de quimiotipos – vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente – é freqüente em plantas ricas em óleos essenciais. A divergência química em espécie pode ser devido a influências epigenéticas ou ambientais (BOHLMANN et al., 1998; BARAZANI et al., 2002).

As indústrias de perfumaria, cosméticos e aromatizantes alimentares absorvem grande parte das essências naturais e respectivos derivados, o que justifica o alto nível técnico atingido na sua preparação e o elevado valor econômico que apresentam; as indústrias de tintas e vernizes consomem quantidades importantes de algumas essências utilizadas na flotação de minérios e na preparação de agentes molhantes e, na medicina, participa da formulação de anti-sépticos, antiespasmódicos, inalantes e analgésicos (RISSATO et al., 2004).

1.3. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

A pitangueira é originária de regiões que se estende desde o Brasil Central até o Norte da Argentina, distribuindo-se geograficamente ao longo de quase todo o território nacional. Está presente em muitos centros de diversidade e domesticação brasileiros, os quais abrangem diferentes ecossistemas tropicais, subtropicais e temperados. Entretanto, essa espécie apresenta sua mais ampla variabilidade nos centros de diversidade classificados como Centro-Nordeste/Caatinga, Sul/Sudeste, Brasil Central/Cerrado e Mata Atlântica, que engloba as regiões costeiras da Paraíba ao Rio Grande do Sul. Devido à sua adaptabilidade às mais distintas condições de clima e solo, a pitangueira foi disseminada e é atualmente cultivada nas mais variadas regiões do globo (BEZERRA et al., 2004).

A pitanga ou pitanga-vermelha tem seu nome derivado do tupi pi'tãg, que quer dizer vermelho-rubro, em alusão à cor de seu fruto, que de fato pode se apresentar nas cores vermelha (alaranjado, claro e escuro), amarelo-alaranjado, roxa, e às vezes quase preta, sendo conhecida popularmente como pitangueira. Pertence à ordem Myrtales, família Myrtaceae, cuja espécie é *E. uniflora*. A pitangueira é um arbusto denso de 2 a 4 m de altura e mais raramente uma pequena árvore de 6 a 9 m. As folhas são opostas, simples, com pecíolo curto de mais ou menos 2,0 mm. Limbo oval ou oval-lanceolado de 2,5 a 7,0 cm de comprimento e 1,2 a 3,5 cm de largura. O limbo quando macerado exala um odor

característico. As variações climáticas das diferentes regiões de cultivo determinam as épocas de florescimento e frutificação. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, essas fases podem ocorrer duas ou mais vezes durante o ano; a floração normalmente ocorre de agosto a dezembro, podendo acontecer também de fevereiro a julho, e a frutificação, de agosto a fevereiro, podendo ainda ocorrer entre abril e julho (FRAZÃO, 2008).

O fruto, quando inicia o processo de maturação, apresenta o epicarpo passando de verde para amarelo-alaranjado, vermelho, roxo, podendo chegar até quase o negro. O sabor é doce ácido, e o aroma muito intenso e característico (FRAZÃO, 2008).

A planta apresenta certa tolerância à seca, desenvolvendo-se bem em condições semi-áridas, desde que se proporcione uma mínima quantidade de água. Não é tolerante à salinidade. Em relação aos solos, cresce adequadamente tanto nos tipos arenosos (como os de restinga e praia), quanto nos areno-argilosos, argilo-arenosos, argilosos e até mesmo em solos pedregosos (FRAZÃO, 2008).

Resultados recentes têm mostrado uma gama de aplicações da *E. uniflora*. No Estado de Pernambuco o seu cultivo tem aumentado substancialmente em razão da utilização do fruto para o preparo de polpa e suco, como também para a fabricação de sorvetes, refrescos, geléias, licores e vinhos (BEZERRA et al., 2004).

Em testes realizados com extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*, obtiveram uma inibição de 40% para *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, 60% para *Microsporium gypseum* e 100% para *Trichophyton rubru* para uma concentração de 500 µg/mL de extrato (SOUZA et al., 2002).

Testes realizados com extrato macerado de folhas *E. uniflora* com etanol/água (90-10%) por 48 h em repouso a 25°C protegido de luz solar, apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, antifúngico (extrato hidro-alcoólico) com CIM de 31,2 µg/mL para *Candida Krusei*; 31,2 µg/mL para *Candida. tropicalis* e 125 µg/mL para *Candida. parapsilosis* (HOLETZ et al., 2002).

O extrato alcoólico das folhas da *E. uniflora* para teste de tolerância de açúcar por via oral, apresentou ação, que inibi o aumento do nível de açúcar plasmático em ratos. E o mesmo estrato diminui o nível de triglicérideos no plasma de ratos (ARAI et al., 1999). Do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* isolaram-se compostos com atividade vasodilatador e com ação hipotensa (CONSOLINI et al., 1999; CONSOLINI & SARUBBIO, 2002). A ação antidiarréica do infuso das folhas mostrou-se compatível com o seu uso popular devido à abundância de taninos (ALMEIDA et al., 1995). Os extratos aquoso, acetato, clorofórmico e hexânico das folhas de *E. uniflora* apresentaram uma alta atividade antioxidante, mesmo a concentrações de 6,9 µg/mL (VELÁZQUEZ et al., 2003).

Os resultados mostraram que a CIM_{50%} na replicação do vírus de herpes humana-4 (EBV), encontrado no DNA do vírus do herpes lifotrópico B̃ associado ao câncer de nasofarige de alta incidência no sul da China e sudeste da Ásiã está associado a substâncias tanínicas como a galocatequina, oenoteína B e as eugeniflorinas D1 e D2 extraídos das folhas de *E. uniflora* (LEE et al., 2000).

Testes antimicrobianos por difusão em ágar realizados com extrato bruto metanólico das folhas de *E. uniflora* apresentaram resultados positivos para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (SOUZA et al., 2004).

O extrato em acetato de etila das folhas de *E. uniflora* apresentou uma dose letal em 50% da população (LD₅₀) de 12,5 µg/mL para o parasita *Trypanosoma congolense* IL 1180 e *T. congolense* IL 3338 (clone resistente) encontrado primeiramente no camelo e, posteriormente, no homem, cujas opções terapêuticas de uso corrente apresentam uma elevada toxicidade para o homem (ADEWUNMI et al., 2001).

Outros estudos envolveram a atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial das folhas e dos frutos de *E. uniflora*. Os principais constituintes identificados no óleo essencial nas folhas foram o curzereno (19,78%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,8%), atractilona (16,9%) e furanodieno (9,6%), enquanto que o óleo proveniente dos frutos apresentou como constituintes majoritários a germacrona (27,5%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (19,2%), curzereno (11,3%) e o

epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (11,0%). O óleo essencial dos frutos e das folhas apresentou uma CIM de 39 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, respectivamente. Já nos ensaios citotóxicos, tanto o óleo essencial do fruto quanto da folha apresentaram ação citotóxica total a 100 µg/mL para células tumorais de próstata e a 250 µg/mL para células tumorais de seio e fígado (OGUNWANDE et al., 2005), demonstrando a potencialidade dos óleos essenciais dessa espécie.

1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

A análise estatística multivariada consiste em um conjunto de métodos utilizados em situações nas quais várias variáveis são medidas em cada amostra. A estatística Multivariada se divide em dois grupos: um primeiro consiste em técnicas exploratórias como as análises de Componentes Principais (PCA), análise de Agrupamento (CA), análise de Discriminante Canônico (CDA) e análise de Correlação Canônica (CCA), enquanto que o segundo grupo consiste de técnicas de inferência estatística que envolve a análise de variância (MANOVA) e covariância (ANCOVA) multivariadas, teste de hipóteses e regressão multivariados (MINGOTI, 2005).

Análise de Componentes Principais (PCA) tem como objetivo reduzir o número de dimensões da matriz de dados, a fim de explicar a estrutura de variância e covariância em um menor número de variáveis (MINGOTI, 2005).

O coeficiente de correlação entre as i -ésima e j -ésima variáveis do vetor X é definido por:

$$\rho_{ij} = \frac{\sigma_{ij}}{\sqrt{\sigma_{ii}\sigma_{jj}}} = \frac{\sigma_{ij}}{\sigma_i\sigma_j}$$

$$-1 \leq \rho_{ij} \leq 1, i, j = 1, 2, \dots, p.$$

A correlação é a medida mais adequada para avaliar o grau de relacionamento linear entre duas variáveis quantitativas do que covariância. Além disso, é interessante observar que, ao contrário da covariância, o coeficiente de correlação é adimensional e, logo, não sofre influência das diferenças escalares

de medidas entre variáveis. Quando se têm muitas variáveis, o procedimento mais comum é guardar os valores de ρ_{ij} numa matriz chamada de matriz de correlação como definida a seguir (MINGOTI, 2005)..

$$\rho = \begin{pmatrix} \rho_{11} & \rho_{12} & \dots & \rho_{1p} \\ \rho_{21} & \rho_{22} & \dots & \rho_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \rho_{p1} & \rho_{p2} & \dots & \rho_{pp} \end{pmatrix}.$$

Na álgebra a decomposição do valor singular relaciona a matriz com seus autovalores e seus autovetores (MINGOTI, 2005).

A matriz, após terem os seus dados centrados e reduzidos na média (= 0) e variância (= 1), é decomposta no produto de três matrizes pelo algoritmo de decomposição de valor singular (SVD), conforme a expressão: $X = U \cdot S \cdot V^t$. A matriz V é denominada de matriz dos pesos (*loadings*), as colunas da matriz V correspondem aos autovetores e S é a matriz diagonal. As matrizes U e V são ortogonais entre si e o produto entre matrizes U e S é denominado escores.

Como resultado da PCA, o conjunto original de dados é agrupado em função da correlação existente entre as variáveis, gerando um novo conjunto de eixos (as Componentes Principais; PCs) ortogonais entre si, e de mais simples manipulação matemática (HELFER et al., 2006).

Também conhecida como análise de Conglomerados, Classificação ou *Cluster*, a análise de Agrupamentos tem o objetivo de dividir os elementos da amostra, ou população, em grupos naturais de forma que os elementos (amostras ou variáveis) pertençam a um mesmo agrupamento por similaridade com base na distância. Dentre os métodos utilizados para a obtenção dos agrupamentos temos os de ligação simples, ligação completa, média das distâncias, método do centróide e método da minimização da variância de Ward (MINGOTI, 2005).

A análise discriminante é uma técnica para tratamento *a posteriori* de dados, isto é, visa à validação de hipóteses e usa variáveis que possam

discriminar os agrupamentos prévios, a partir de outros métodos (PCA, análise de Agrupamento, etc.).

Além da separação de grupos, a análise discriminante também é aplicada para classificar, de maneira eficiente, os indivíduos (amostras) dentro dos grupos estudados (PIZZOL, 2004; MINGOTI, 2005).

O interesse da Análise de Correlação Canônica, de modo geral, é o conhecimento das relações existente entre dois grupos de variáveis de tal modo que a correlação entre as combinações lineares das variáveis seja máxima (TRUGILHO et.al., 2003). Essa correlação mede basicamente o grau de associação existente entre os dois conjuntos de variáveis (MINGOTI, 2005).

Esta técnica se baseia na determinação de variáveis canônicas ortogonais em cada conjunto de variáveis, e por isso, as variáveis em cada conjunto devem ser linearmente independentes. Se esta condição não for satisfeita de início, será necessário descartar as variáveis que são combinações lineares das demais variáveis, denominadas de redundantes (MINGOTI, 2005). A correlação canônica elevada ao quadrado R^2 é uma boa estimativa da variância compartilhada entre os dois grupos e R mede a correlação entre os dois grupos. Ambas as funções (F_1, F_2, \dots) devem ser testadas, tanto isoladamente, como em conjunto. O teste lambda de Wilks é empregado para verifica a significância das funções do ponto de vista estatístico em que este valor varia de 0 – 1 quanto mais próximo de 0 melhor é o nível de significância (*valor-p*) (HAIR et al., 2005).

O último passo envolve a validação do modelo dentre eles temos *validação cruzada*: 1° retira-se um vetor de observações da amostra conjunta e utilizam-se os (n_1+n_2-1) elementos amostrais restantes para construir a função de discriminação. 2° utiliza-se a regra de discriminação construída no passo 1° para classificar o elemento que ficou à parte da construção da regra de discriminação, verificando se a regra de discriminação conseguiu acertar na sua real procedência ou não. 3° retorna-se o elemento amostral que foi retirado no passo 1° à amostra original e retira-se outro elemento amostral diferente do primeiro. Os passos 1° e 2° repetidos (HAIR et al., 2005).

O *bootstrap*: é quando dois conjuntos de dados independentes, um para calibrar e outro para avaliar. Aborda o desvio da estimativa realizando re-amostragens múltiplas com reposição, dentro do conjunto de dados da calibração. Remove os desvios para obter uma estimativa imparcial (HAIR et al., 2005).

Jack-nife deixa sempre uma observação de fora a cada cálculo de acordo que se observa o resultado do ajuste do modelo (HAIR et al., 2005).

Embora em sua versão multivariada (MANOVA) a análise de variância unidimensional (ANOVA) foi utilizada neste estudo, permitindo comparar diferentes médias do conjunto de dados (tratamentos) com a construção de gráficos ou regiões de controle, considerando, uma a uma, as variáveis do processo. Para isso é necessário trabalhar com a suposição normal e, assim, é preciso verificar a suposição de normalidade, estimando parâmetros de construção de regiões de confiança (ALMEIDA, 2005). Quando as pressuposições básicas da ANOVA não forem atendidas, por exemplo, a variável em estudo não apresenta distribuição normal, ou exista heterogeneidade de variâncias, são efetuadas transformações nas variáveis afins de que essas pressuposições sejam atendidas (ALMEIDA, 2005).

Após a ANOVA, um teste de comparação múltipla de médias, por exemplo o teste de Tukey, é utilizado quando se deseja comparar todos os pares de médias de r populações, adotando-se um único nível de confiança (BRAGA, 2007). O teste consiste em calcular um valor (D_{crit}), acima do qual a diferença entre duas médias amostrais é significativamente diferente de zero.

$$D_{crit} = \frac{q_{r, n_t - r}}{\sqrt{2}} \sqrt{QME \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

QME é quadrado médio do erro, n_i e n_j são as populações de cada média e onde $q_{r, n_t - r}$ representa o valor tabelado (vindo de uma distribuição da amplitude *studentizada* – “*studentized range*”) associado ao nível de significância adotado (BRAGA, 2007).

2- ANÁLISE QUIMIOTIPOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DA *E. uniflora* EM DIFERENTES BIÓTIPOS DE COR DE FRUTO.

2.1. OBJETIVOS

Analisar os constituintes químicos do óleo essencial das folhas provenientes de diferentes biótipos de cor de fruto e avaliar as correlações entre os constituintes químicos com a coloração dos frutos em diferentes espécimes de *E. uniflora*.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL BOTÂNICO

As amostras foram coletadas por um dos autores (P.H.F.) e identificadas pelo Professor Heleno Dias Ferreira do departamento de Biologia Geral-ICB da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. Um conjunto de amostras foi coletado no mês de Junho e setembro de 2007 nas circunvizinhanças das cidades de Goiânia (S 16°35'14"; W 49°17'40"; 773 m), Santo Antônio de Goiás (S 16°20'13"; W 49°19'35"; 773 m), Nova Veneza (S 16°21'44"; W 49°18'39"; 773 m) e em Anápolis (S 16°20'12,8"; W 48°56'19"; 1066 m), Estado de Goiás. Uma exsicata do material botânico encontra-se depositado no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob o código 25477.

Depois de coletadas, as folhas foram secas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar durante sete dias, ao final do qual apresentaram peso constante. As amostras foram separadamente trituradas em um moinho de facas com granulidade definida (10 mesh), armazenadas em embalagens plásticas etiquetadas e conservadas na temperatura de -18°C, até o momento da extração dos óleos essenciais.

2.2.2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras foram separadamente submetidas à hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado, por 2 h. Após este período, o óleo essencial foi coletado e seco com Na_2SO_4 anidro. Para a análise química, uma alíquota da amostra foi diluída com hexano (ca. 20%) e um volume de 0,5 μL foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector quadrupolar de massas, modelo QP5050A (Shimadzu), operando sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (Shimadzu) (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μm de espessura de filme de 5% em fenilmetilpolisiloxana), tendo como gás de arraste He (1 mL min^{-1}), conectado ao detector quadrupolar operando por meio de IE (70 eV); faixa de massas de 40-400 m/z com uma velocidade de 1,0 varredura s^{-1} , temperaturas do injetor e detector mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A programação do gradiente de temperatura foi de 60°C até 240°C na razão de 3°C min^{-1} , de 240°C até 270°C, com razão de 10°C min^{-1} , permanecendo por 5 min na temperatura final. A técnica de Monitoramento Íons Simples (MIS) foi também utilizada para a detecção de constituintes traços sob as mesmas condições da análise por varredura.

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas e índice de retenção com padrões da literatura (ADAMS, 2007), além da comparação (automática e manual) dos espectros de massas com àqueles das bibliotecas NIST/EPA/NIH (1998). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de VAN DEN DOOL & KRATZ (1963) a partir da co-injeção com uma série de n-alcenos, $\text{C}_8\text{-C}_{32}$ (SIGMA, USA). A análise quantitativa foi efetuada pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC).

2.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A matriz de dados, formada por constituintes químicos dos óleos essenciais foi submetida a análise multivariada com os programas Sytème Portable d'Analyse des Données Numériques/SPAD.N, versão 5.5 do Centre International

de Statistique et d'Informatique Appliquées-CISIA, Saint-Mandé/França (LEBART et al., 2002) e o Statistical Analysis System/SAS, Cary, NC (1996).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para examinar a relação entre os indivíduos e os constituintes químicos dos óleos essenciais. A Análise de Agrupamento (CA) foi aplicada para o estudo da similaridade entre os indivíduos com base na distribuição dos constituintes dos óleos essenciais. A técnica do Vizinho mais Próximo (Nearest neighbour complete linkage), pelo algoritmo de Benzécri (BENZÉCRI, 1980) foi utilizada como índice de similaridade, enquanto que o grupamento hierárquico foi efetuado de acordo com o método da minimização da variância descrito por WARD (1963).

A Análise de Discriminante Canônico foi efetuada pelo procedimento SAS CANDISC para diferenciar as populações com base na composição dos óleos essenciais. A habilidade preditora das funções discriminantes foi avaliada pelas técnicas de Validação Cruzada e Jackknife implementadas no SAS.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a comparação múltipla de médias das composições químicas dos óleos essenciais e dos rendimentos percentuais dos óleos usando o procedimento SAS GLM. A homoscedasticidade das variâncias foi verificada pelo teste de Hartley. Quando necessário, as variáveis foram transformadas pelo arcoseno ou pela ordem das mesmas (*rank*). Onde as diferenças entre as médias foram estabelecidas, aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre as médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados usados na análise estatística encontram-se no apêndice 3.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variações na coloração dos frutos no gênero *Eugenia* são bem conhecidas, embora espécimes de cor de frutos diferentes não sejam consideradas variedades para a maioria de suas espécies (SANCHOTENE, 1989; LEDERMANN et al., 1992; LIMA et al., 2002; FRANZON, 2004). Os estudos envolvendo os óleos essenciais de *E. uniflora* têm se restringido, em sua grande maioria, a folhas de diferentes procedências (VIANA & RETAMAR, 1971; UBIERGO et al., 1987;

WEYERSTAHL et al., 1988; HENRIQUES et al., 1993; MORAIS et al., 1996; MAIA et al., 1999; OGUNWANDE et al., 2005; MELO et al., 2007) e poucos trabalhos descrevem os óleos essenciais dos frutos (RUCKER et al., 1977; PINO et al., 2003; OGUNWANDE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006). De fato, apenas um estudo tem se referido a coloração do fruto (OGUNWANDE et al., 2005) dos espécimes coletados. Recentemente, os óleos essenciais dos frutos de *E. brasiliensis* de coloração amarela e roxa indicaram a presença de dois quimiotipos nessa espécie (MORENO et al., 2007).

Em *E. uniflora* a influência da coloração do fruto na composição química dos óleos essenciais, seja de frutos e folhas, ainda não foram efetuados. Neste trabalho, verificou-se a influência de diferentes biótipos de cor de frutos na composição e variabilidade dos constituintes voláteis das folhas de *E. uniflora* de acordo com a coloração do fruto: amarelo-alaranjado, vermelho alaranjado, vermelho claro, vermelho escuro e roxo (Figura 2.3.1).

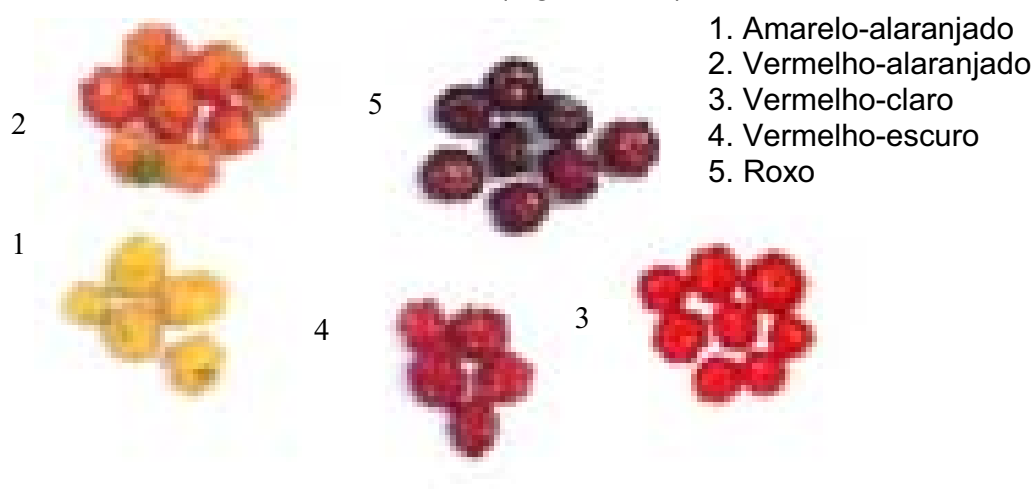


Figura 2.3.1. - Diferentes biótipos de cor de fruto de *E. uniflora*.

A análise química conduziu a identificação de 36 constituintes químicos resultando em 91-95% dos voláteis do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* dos três diferentes biótipos (Apêndices 1 e 2). Os óleos apresentaram predominantemente sesquiterpenos.

Os resultados da PCA e análise de agrupamento (18 amostras x 12 variáveis = 216 dados) que é mostrada na Figura – 2.3.2 foram obtidos da matriz inicial que se encontra no Apêndice 3. As 24 variáveis eliminadas se mostraram pouco expressiva na análise de componentes principais bem como na composição do óleo essencial.

A análise de componentes principais conduziu uma variância acumulada de 71,4% no plano fatorial, sendo que as variáveis que mais contribuíram na composição dos três primeiros PCs foram o β -elemeno, β -cariofileno, germacreno D, δ -selineno, curzereno, germacreno A, germacreno B, espatulenol, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, atractilona, germacrona e o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

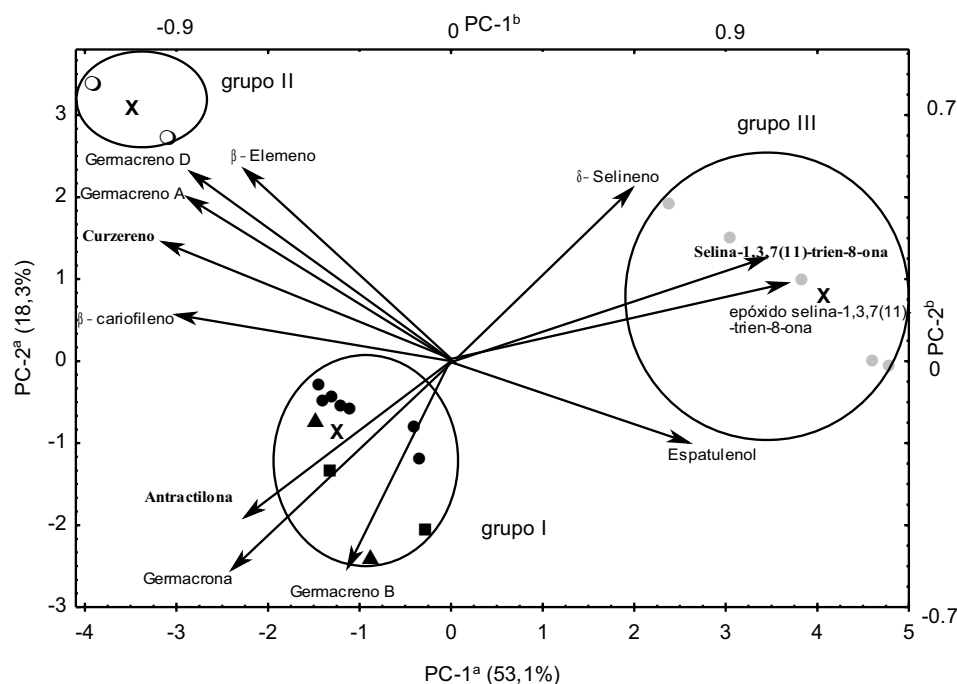


Figura 2.3.2. – Gráfico da PCA dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* de acordo com a cor de fruto: vermelho (círculo), amarelo-alaranjado (quadrado) e roxo (triângulo) e cujo grupo I (símbolos escuros) compreende os biótipos: vermelho escuro, amarelo-alaranjado e roxo; grupo II (símbolos não preenchidos) vermelho claro, e grupo III (símbolos cinza) frutos vermelho-alaranjados. ^aEixo dos indivíduos (escores). ^bEixo referente aos constituintes discriminantes dos óleos essenciais (loadings) representados por vetores a partir da origem. Os valores em parênteses se referem à variância retida sobre cada eixo da PCA e as cruzes os centróides de cada grupo

A primeira Componente Principal (PC-1) (Figura 2.3.2) mostrou que ($p < 0.0001$) as amostras ricas em sesquiterpenos oxigenados de cor de frutos vermelho-alaranjado (Anápolis e Nova Veneza), localizados a direita do gráfico (círculos cinza), das amostras coletadas em outras regiões. A PC-2, por sua vez, mostrou ($p < 0.0001$) as amostras de cor de fruto vermelho-claro de Goiânia (círculos não preenchidos), ricas em hidrocarbonetos sesquiterpênicos, de outras amostras de Goiânia, Santo Antônio de Goiás e Nova Veneza (símbolos escuros).

O dendrograma de similaridade entre as amostras com base na distribuição percentual dos constituintes voláteis forneceu o nível de similaridade entre cada indivíduo e o seu agrupamento de acordo com a variância mínima de WARD (1963), Figura 2.3.3.

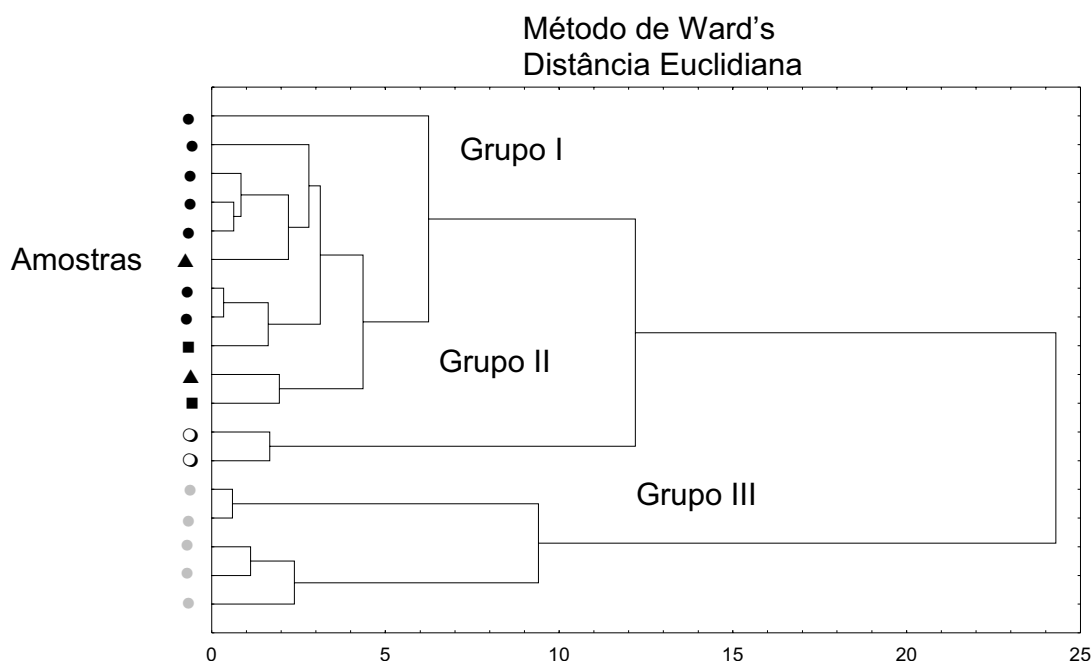


Figura 2.3.3. - Dendrograma de similaridade baseado na composição química dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* das amostras, vermelhas (círculo), amarelo-alaranjado (quadrado) e roxo (triângulo). As cores dos frutos se agrupam em: I (símbolos escuros: fruto vermelho escuro, amarelo-alaranjado e roxo); II (símbolos não preenchidos: fruto vermelho claro), e III (símbolos cinza: fruto vermelho-alaranjado).

Dessa forma, três tipos de óleos essenciais foram obtidos: grupo I (amostras de frutos vermelho-escuro, amarelo-alaranjado e roxo), caracterizados por teores elevados de germacreno B ($22 \pm 7\%$), atractilona ($12 \pm 5\%$) ($p < 0,0001$), germacrona ($18 \pm 13\%$) ($p < 0,015$) e β -cariofileno ($8,7 \pm 3,7\%$) ($p < 0,007$); grupo II (amostras de frutos vermelho-claro) contendo curzerene ($43 \pm 1\%$) ($p < 0,003$), germacreno D ($8,8 \pm 0,1\%$) ($p < 0,001$), germacreno A ($7,4 \pm 1,5\%$) ($p < 0,001$) e β -elemene ($4,4 \pm 0,1\%$) ($p < 0,002$) como constituintes majoritários; e o grupo III (amostras de cor de fruto vermelho-alaranjado) contendo conteúdos elevados em selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($48 \pm 5\%$), epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($19 \pm 4\%$) ($p < 0,0001$), espatulenol ($4,1 \pm 5,0\%$) ($p < 0,029$) e δ -selinene ($3,3 \pm 2,9\%$) ($p < 0,003$). A técnica de CG/EM-MIS indicou que as amostras dos grupos I e II não apresentaram selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e o seu epóxido, enquanto que em amostras do grupo III foram detectados curzereno, germacreno B, e atractilona. Atractilona foi também detectada em amostras do grupo II.

A composição química de cada grupo (I: $n = 11$, II: $n = 2$, III: $n = 5$) encontra-se na Tabela 2.3.1. A Análise de variância permitiu verificar as diferenças nas médias dos sesquiterpenos e monoterpenos nos três grupos. Todos os dados foram avaliados para a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Hartley, o qual revelou heterocedasticidade para o óxido de cariofileno, allo-aromandendreno, δ -selineno, germacreno A, espatulenol, germacrona e para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Essas variáveis foram transformadas para o arseno e pela ordem dos mesmos (rank), respectivamente, embora as médias na Tabela 2.3.1. estejam de acordo com os dados originais. Onde as diferenças entre as médias foram estabelecidas, aplicou-se o teste de Tuckey para a comparação entre as médias, com os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

Tabela 2.3.1. - Médias percentuais dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de diferentes biótipos de cor de frutos de *E. uniflora*.

Constituinte	IR	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Mirceno	990	0,1	-	-
α -Felandreno	1002	t	-	-
α -Terpineno	1017	0,1	-	-
(Z)- β -Ocimeno	1037	0,1	-	-
(E)- β -Ocimeno	1050	0,3	-	-
γ -Terpineno	1059	t	-	-
p-Menta-2,4(8)-dieno	1088	t	-	-
Linalool	1096	0,1a	-	0,3a
Presilfiperfol-7-eno	1336	t	-	-
δ -Elemeno	1338	0,5a	1,1b	0,1c
β -Elemeno	1390	2,5a	4,4b	1,7a
(E)-Cariofileno	1419	8,7a	7,0	2,2b
γ -Elemeno	1436	0,4a	0,3ab	0,1b
α -Humuleno	1454	0,4a	-	0,1b
allo-Aromadendreno	1460	0,3a	0,6a	-
Germacreno-D	1485	4,4a	8,8	1,6b
β -Selineno	1490	0,3a	0,40	0,1b
δ -Selineno	1492	0,1a	0,6	3,3a
Curzereno	1499	20,5	42,6	-*
Germacreno A	1509	3,4a	7,4b	1,2c
δ -Amorfeno	1512	0,3a	1,1	0,1a
Germacreno B	1561	21,6a	3,4	5,9b
Espatulanol	1578	1,0a	-	4,1a
Óxido de Cariofileno	1583	0,5a	-	1,3a
Tujopsan-2 α -ol	1587	0,1a	-	0,3a
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1634	-	-	48,2
Selina-3,11-dien-6-ol	1644	-	-	0,3
Posgotol	1563	-	-	0,1
Atractilona	1658	11,7	-*	-*
14-hidróxi-9-epi-(E)-Cariofileno	1669	-	-	0,4

Cont.

Cont.

Constituinte	IR	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Ocidenol	1677	-	-	0,3
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	1686	-	-	0,1
Germacrona	1693	17,3a	13,5	0,8b
Nootkatol	1715	-	-	0,2
Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1748	-*	-*	19,3
2 α -hidróxi-Amorfa-4,7(11)-diene	1776	-*	-*	0,1
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,5	-	-
Monoterpenos oxigenados		0,1a	-	0,30a
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		63,5a	77,8b	16,5c
Sesquiterpenos oxigenados		30,6a	13,5b	75,5c
Monoterpenos		0,6a	-	0,30a
Sesquiterpenos		94,0a	91,3a	92,0a
Total identificado		94,6a	91,3a	92,3a

IR = Índice de retenção; t = traço (< 0,1%). Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. *Detectado por CG/EM-MIS

A análise de Discriminante Canônico permitiu estabelecer que as variáveis curzereno e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona discriminam e classificam os grupos previamente estabelecidos pela análise de agrupamento, com 100% de predição pelo método de Validação Cruzada (Tabela 2.3.2).

Tabela 2.3.2. - Sumário da análise de Discriminante dos biótipos de *E. uniflora*.

A. Função canônica discriminante							
	Autovalor	Porcentagem relativa	Correlação canônica	Lambda de Wilks	F*	Gl*	P*
F1	71,53	96,7	0,993	0,004	104,07	4; 28	0,0001
F2	2,47	3,3	0,844	0,288	37,07	1; 15	0,0001
B. Coeficientes padronizados							
	Curzereno		Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona				
F1	0,32		-0,95				
F2	0,95		0,32				
C. Validação Cruzada							
	Percentual de classificação correta						
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total			
	100	100	100	100			

Cont.

Cont.

D. Variáveis canônicas das médias de grupos

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
F1	4,53	6,12	-12,43
F2	-0,77	3,90	0,15

Número de amostras = 18; variáveis discriminantes: curzereno e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

*F = valor de Fisher; GL = Grau de liberdade; P = probabilidade.

A primeira função discriminante (F1 = 71,53, GL = 4 e 28 e $p < 0,0001$) representou 97% da variabilidade total dos dados e discriminou ($p < 0,0001$) o grupo III devido ao elevado conteúdo de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona. Por outro lado, (F2 = 2,47, GL = 1 e 15 e $p < 0,0001$) distinguiu as amostras do grupo II como decorrência do teor elevado em curzereno. Adicionalmente, quando foram utilizadas as duas funções discriminantes foi possível uma predição total dos dados baseado nas técnicas de Validação Cruzada ou de reamostragem por Jackknife.

Na família Myrtaceae é comum a ocorrência de diferentes biótipos cuja definição de variedades não é fácil e também não é amplamente aceita. *E. brasiliensis* possui dois biótipos com cor do fruto (roxo e amarelo) e apresentou diferenças na composição dos óleos essenciais das folhas e frutos. A variedade com frutos roxos acumulou uma maior quantidade de sesquiterpenos oxigenados (33,9%) do que com os frutos amarelos (3,8%). A diferença principal ocorreu no fruto roxo, o qual teve como constituinte majoritário o óxido de cariofileno (22,2%) e o α -cadinol (10,4%), o que não é detectado no óleo das folhas dos frutos roxos e amarelos, e no óleo do fruto amarelo. Por outro lado, o óleo essencial do fruto amarelo apresentou uma composição similar àquela observada em suas folhas (MORENO et al., 2007).

Em um estudo com pitanga em estágio de maturação diferente (maduro e semi-maduro) quantificaram-se os teores de compostos fenólicos e de carotenóides totais presentes em dois biótipos, roxo e vermelho. Observou-se que a pitanga roxa apresentava quantidades de carotenóides totais superior ao fruto vermelho nos dois estágios de maturação: roxa maduro 111 $\mu\text{g/g}$, semi-maduro 98 $\mu\text{g/g}$ e vermelho maduro 104 $\mu\text{g/g}$, semi-maduro 79 $\mu\text{g/g}$ (LIMA et al., 2002).

Um estudo feito por OLIVEIRA et al., (2006) descrevendo o perfil dos constituintes voláteis do fruto da pitangueira, revelou que 5,4% são compostos alifáticos, 4,6% sesquiterpenos e 83,8% são monoterpenos, embora o autor não tenha mencionado a cor do fruto dos espécimes.

Em outras regiões do Brasil, Argentina e Nigéria são observadas variações nas composições químicas dos óleos essenciais de folhas de *E. uniflora*, com alguns quimiotipos sendo sugeridos; no Rio grande do sul o óleo contém α e β -selineno (15,1% e 25,9%, respectivamente) e nerolidol (25,2%) como majoritários (VIANA et al., 1971; UBIERGO et al., 1987; HENRIQUES et al, 1993). Na Argentina (OGUNWANDE et al., 2005) obteve como constituintes majoritários os monoterpenos pulegone, carvona, limoneno e o sesquiterpeno nerolidol. No nordeste brasileiro (MORAIS et al., 1996), Nigéria (WEYERSTAHL et al., 1988) e Goiás (grupo III) a presença dos sesquiterpenos selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (48,5%, 17,0% e 48,2%, respectivamente) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,3%, 14,0% e 19,3%) são majoritários, enquanto que em Goiás (grupo II) o curzereno (42,6%), germancrona (13,5%) e germancreno A (7,4%) foram os majoritários, ocorrendo ainda em Goiás (grupo I) teores elevados de atractilona (20,5%), germacrona (17,3%) e germancreno B (21,6%).

E importante ressaltar que à medida que seguimos do nordeste da Argentina para a linha do equador, observa-se um aumento nos compostos sesquiterpênicos oxigenados e uma redução na quantidade de monoterpenos oxigenados. Segundo LIMA et al. (2003) foi observado que em condições controladas a intensidade luminosa e a temperatura diária influenciam significamente na produção de compostos oxigenados.

SALGUEIRO et al. (2004) analisaram diferentes populações de *E. uniflora* em Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul a fim de verificar o nível diferenciação genética nas diferentes regiões do país. Foram feitos análises do DNA no núcleo e no cloroplasto (folhas) por AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Verificou-se, pela análise de agrupamento da distância genética, que as populações de PE e RJ são mais próxima geneticamente e mais distante das populações do RS, com esta última

apresentando 78% de polimorfismo. Segundo os autores, a explicação pode ser atribuída ao isolamento genético antigo entre as populações, que pode ser compreendido pela possível existência de diferentes refúgios glaciais no período de 5000-6000 anos atrás, o qual limitou o fluxo gênico e de pólen entre o sul e as outras regiões estudadas. Tendo a mesma classificação taxonômica, em relação à morfologia, *E. uniflora* apresentou diferenças intra-específicas consideráveis o que sugere uma reavaliação no processo de classificação taxonômica desta espécie. Os autores não relacionam o estudo com os diferentes biótipos da pitanga e o alto grau de polimorfismo atribuiu-se às intensas ações antrópicas na região coletada.

O estudo de SALGUEIRO et al. (2004) mostrou que *E. uniflora* apresenta alta variabilidade genética seja por ações naturais e antrópicas. Observa-se que o grupo I, com três diferentes biótipos de cor de frutos, apresentam um mesmo perfil químico. Além disso, amostras coletadas na mesma região (Nova Veneza) apresentaram composição química de óleo essencial diferentes; três indivíduos no grupo III, biótipo de cor de fruto vermelho-alaranjado e sete no grupo I (biótipos de fruto roxo, amarelo-alaranjado e vermelho-escuro), o que poderia excluir a presença de ecótipos, uma adaptação local de uma espécie, em que cada população mostra uma menor/maior mudança na morfologia e/ou fisiológica (e/ou fitoquímica) o qual são induzidos geneticamente pelo habitat (BARAZANI et al., 2002). O que sugere uma variabilidade genética em *E. uniflora*.

Na análise cromatográfica do óleo essencial das folhas da *E. uniflora* foi observada a possibilidade de formação de artefatos na coluna cromatográfica (figura 2.3.4.), e um destes constituintes é o curzereno formando atractilona (WEYERSTAHL et al., 1988).

Para que a quantificação do curzereno e antractilona fossem medidas sem nenhum prejuízo, devido à formação de artefatos, fixaram-se os tempos de retenção de cada constituinte e a programação no cromatógrafo, mantendo-se a mesma intensidade de conversão e, assim, minimizando alguma tendência na comparação entre as médias uma vez que o curzereno é a variável discriminante.

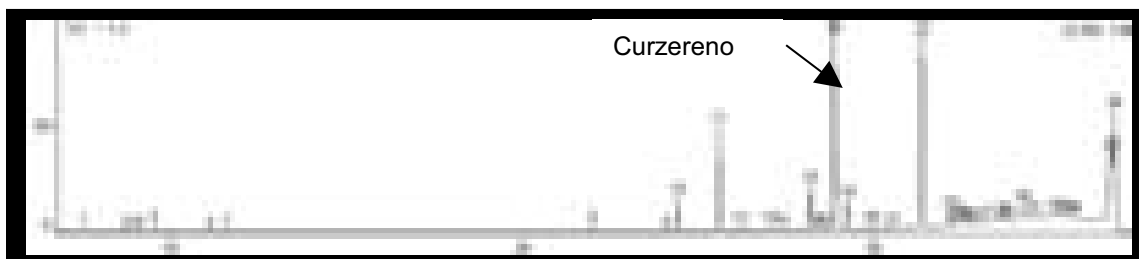


Figura 2.3.4. – Cromatograma total de íons do óleo essência das folhas de *E. uniflora*.

região característica da formação de atractilona a partir do curzereno.

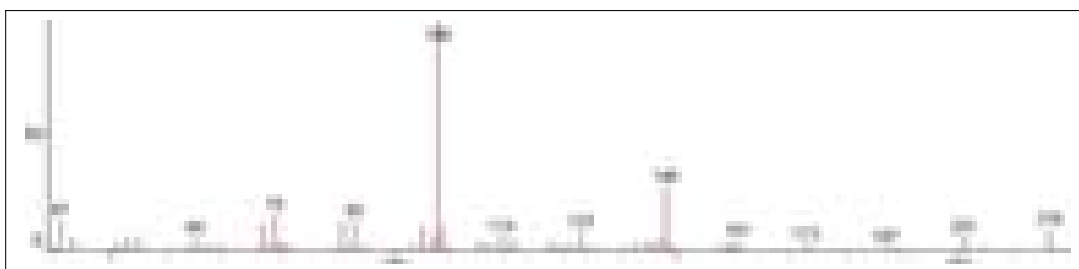


Figura 2.3.5. - Espectro de massa do curzereno.

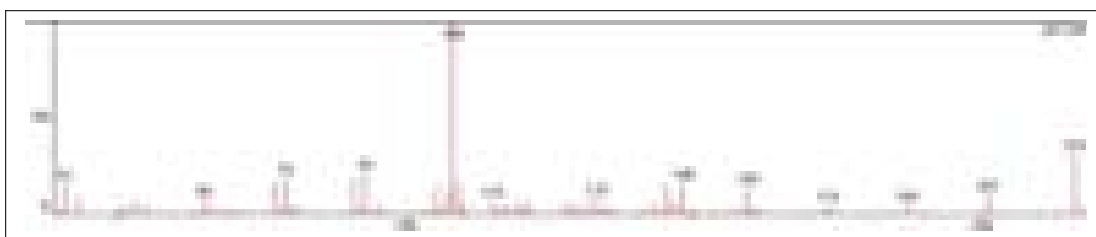


Figura 2.3.6. - Espectro de massa da atractilona.

A alta temperatura no injetor, coluna e interface do cromatógrafo gasoso pode favorecer a formação de uma reação eletrocíclica do curzereno formando a antractilona, como é mostrado na figura 2.3.7. (FLEMING, 1998)

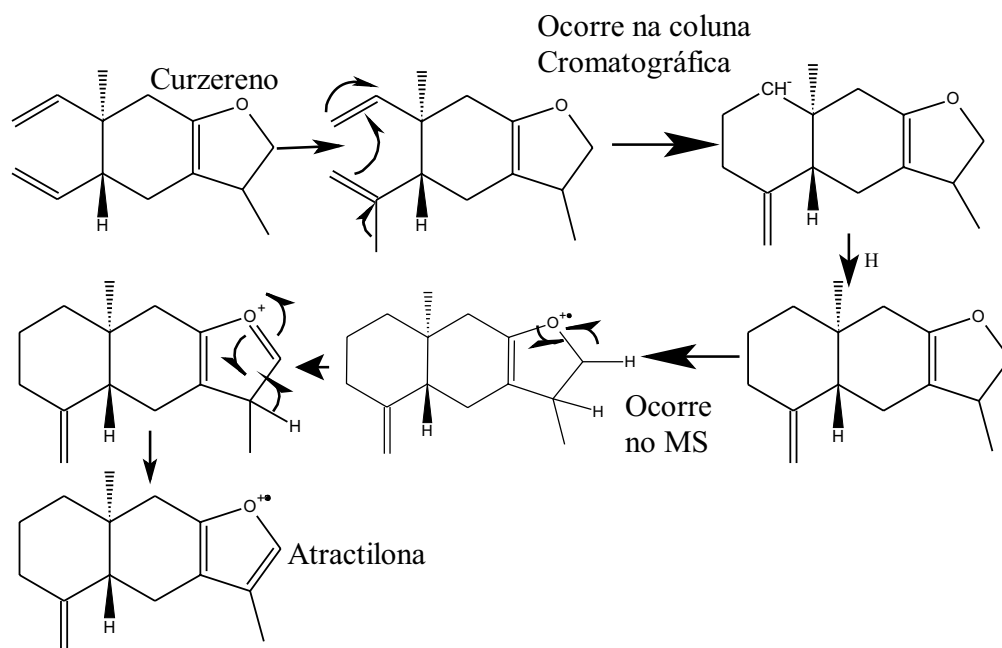


Figura 2.3.7. - Mecanismo sugerido para a formação eletrocíclica de atractilona a partir do curzereno.

2.4. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais das folhas de *E. uniflora*, coletados no Brasil Central, apresentaram um grande polimorfismo químico o qual pode ser influenciado pela coloração do fruto das amostras. Dessa forma devem-se ter precauções na avaliação química e/ou biológica dos óleos essenciais das folhas dessa espécie devido à influência a essa influência de biótipos.

3 - INFLUÊNCIA SAZONAL SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora*

3.1. OBJETIVOS

Verificar a influência dos minerais foliares e fatores climáticos na variabilidade química dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* de amostras coletadas na cidade de Anápolis/GO.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL BOTÂNICO E DADOS CLIMÁTICOS

As folhas de *E. uniflora* foram coletadas mensalmente no período de dezembro de 2001 a dezembro de 2003, em Anápolis, Estado de Goiás (S 16°20'12,8"; W 48°56'19"; 1066 m), perfazendo um total de 25 amostras cujo biótipo de cor de fruto apresenta coloração vermelho alaranjado. As amostras foram coletadas e identificadas pelo professor Heleno Dias Ferreira do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. Uma exsicata foi depositada no herbário (UFG) sob o código 25477.

Os dados climáticos (precipitação, umidade e pluviosidade) foram cedidos pela base aérea de Anápolis/GO.

Depois de coletadas as folhas foram secas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar, durante sete dias até peso constante, trituradas em um moinho de facas de granulação definida (10 mesh), armazenadas em embalagens plásticas, etiquetadas e conservadas a temperatura de -18°C, até a análise química.

3.2.2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras foram separadamente submetidas à hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado, por 2 h. Após este período, o óleo essencial foi coletado e seco com Na₂SO₄ anidro. Para a análise química, uma alíquota da amostra foi diluída com hexano (ca. 20%) e um volume de 0,5 µL foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector quadrupolar de

massas, modelo QP5050A (Shimadzu), operando sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (Shimadzu) (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de espessura de filme de 5% em fenilmetilpolisiloxana), tendo como gás de arraste He (1 mL min⁻¹), conectado ao detector quadrupolar operando por meio de IE (70 eV); faixa de massas de 40-400 *m/z* com uma velocidade de 1,0 varredura s⁻¹, temperaturas do injetor e detector mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A programação do gradiente de temperatura foi de 60°C até 240°C na razão de 3°C min⁻¹, de 240°C até 270°C, com razão de 10°C min⁻¹, permanecendo por 5 min na temperatura final. A técnica de Monitoramento Íons Simples (MIS) foi também utilizada para a detecção de constituintes traços sob as mesmas condições da análise por varredura.

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas e índice de retenção com padrões da literatura (ADAMS, 2007), além da comparação (automática e manual) dos espectros de massas com àqueles das bibliotecas NIST/EPA/NIH (1998). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de VAN DEN DOOL & KRATZ (1963) a partir da co-injeção com uma série de n-alcenos, C₈-C₃₂ (SIGMA, USA). A análise quantitativa foi efetuada pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC).

A análise mineral foliar foi feita pelas técnicas tradicionais (MALAVOLTA et al., 1989). N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados no Laboratório de Análise de Solos e Foliar da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (SANTOS, 2007). Fenóis totais e flavonóides foram quantificados por meio de métodos espectrofotométricos (WATERMAN et al., 1994).

3.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A matriz de dados formada por constituintes químicos do óleo essencial foi submetida à PCA e a análise de agrupamento com o SPAD (LEBART et al., 1994). A análise de Discriminante Canônico, com o procedimento SAS DISCRIM, STEPDISC e SCANDISC, foram realizadas com a finalidade de encontrar um

número mínimo de variáveis discriminantes dos grupos formados previamente pela análise de agrupamentos. A técnica de Validação Cruzada foi utilizada para validar as funções discriminantes.

A Análise de Correlação Canônica, com o procedimento SAS CANCORR, foi realizada objetivando-se a correlação máxima entre os conjuntos de variáveis: percentuais dos constituintes dos óleos essenciais e da matriz composta pelos nutrientes minerais e fenólicos foliares, além de variáveis climáticas. Para a validação das correlações utilizou-se a análise de redundância canônica com os coeficientes normalizados. Os dados climáticos foram cedidos pela Base Aérea de Anápolis/GO e representam valores médios mensais. Os dados usados na análise estatística encontram-se no apêndice 4.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência sazonal sobre os óleos essenciais de *E. uniflora* foi observada com o biótipo de cor de fruto vermelho-alaranjado, o qual teve as folhas coletadas mensalmente durante o período de dois anos consecutivos. Um total de 15 constituintes foi identificado, contribuindo com 80-95% dos voláteis extraídos por hidrodestilação. Os óleos essenciais apresentaram predominantemente sesquiterpenos oxigenados (78-93%), com aumento na estação quente e úmida (85-93%).

Os resultados PCA e análise de agrupamento (25 amostras \times 8 variáveis = 200 dados) encontram-se representado na Figura - 3.3.1 e foram obtidos da matriz que se encontra no Apêndice 4. As 17 variáveis eliminadas mostraram-se pouco expressivas na análise de componentes principais (baixos pesos), além de apresentarem pequena ($< 0,5\%$) contribuição percentual na composição do óleo essencial.

A análise dos dados revelou uma alta variabilidade química entre os meses de coleta. A Figura 1 apresenta a posição relativa dos meses amostrados no espaço discriminante das PCs. A PC-1 reteve 42% da variação total dos dados originais e discriminou ($p < 0,0001$) as amostras coletadas na estação seca (abril-setembro, média de precipitação de 47,8 mm) da estação úmida (outubro-março,

média de precipitação de 200,8 mm). A PC-2 discriminou as amostras com um alto teor de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($46 \pm 4\%$), o qual ocorreu nos meses com maior pluviosidade (217,3 mm), das outras amostras.

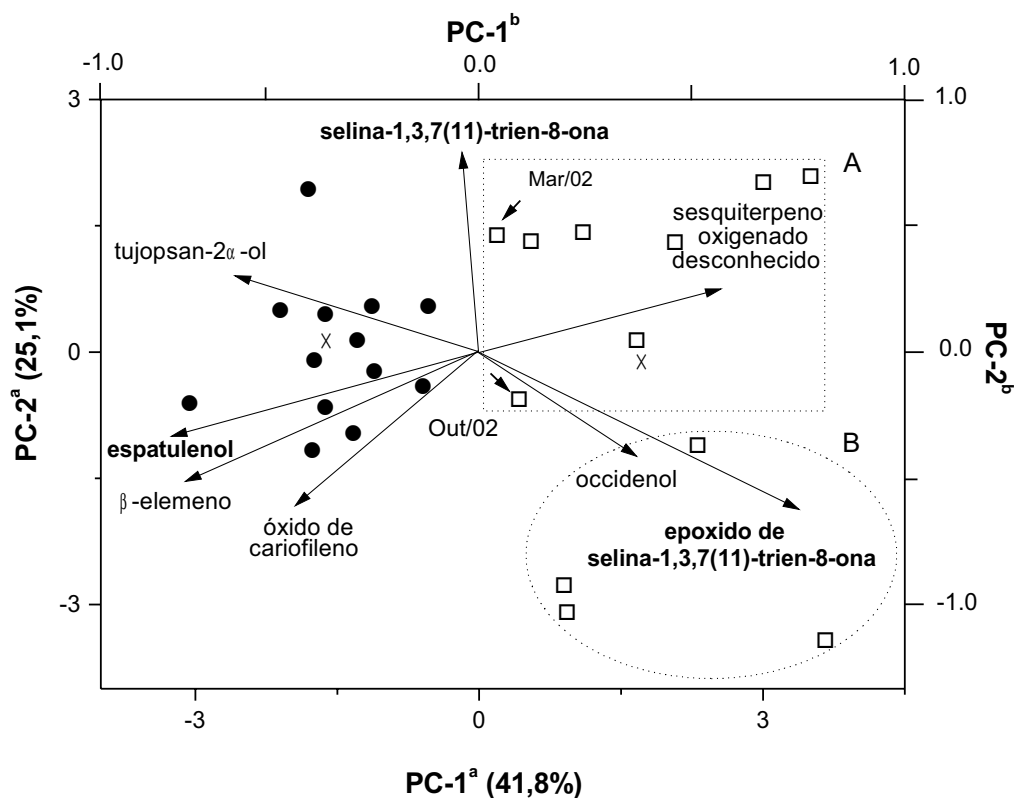


Figura 3.3.1. - Gráfico da PCA dos óleos essenciais de *E. uniflora* de uma população com biótipo de fruto vermelho-alaranjado, coletado na estação chuvosa (□) e durante a seca (●). ^aEixos referentes aos escores das amostras. ^bEixos referentes aos pesos (*loadings*) dos constituintes químicos discriminantes representados por vetores a partir da origem. Os valores entre parênteses representam a variância em cada PC. As cruzes indicam os baricentros das classes e as setas pequenas mostram os indivíduos mal classificados.

Na PC-1 observa-se que as amostras coletadas no período de seca (●) apresentam uma distribuição mais central dos indivíduos, enquanto se observa uma maior dispersão das amostras no período de chuva, pouco regular. Na PC-2

ocorreu, ainda, uma separação majoritária da amostragem de 2002, nos escores positivos, e 2003, nos escores negativos.

A análise hierárquica (Figura 3.3.2) confirmou os resultados da PCA e conduziu a dois grupos principais: grupo I, incluindo amostras coletadas durante a estação seca, caracterizou-se pelos teores elevados de espatulenol ($10 \pm 1\%$), óxido de cariofileno ($4,0 \pm 1,6\%$), β -elemeno ($1,4 \pm 0,4\%$) e tujopsan- 2α -ol ($0,85 \pm 0,41\%$); grupo II, constituído de amostras coletadas na estação úmida e possuindo altos teores de epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($29 \pm 7\%$), occidenol ($0,70 \pm 0,14\%$) e o sesquiterpeno oxigenado desconhecido ($0,27 \pm 0,21\%$). Observa-se ainda que os meses amostrados na estação úmida possam ser separados em dois subgrupos: IIA, formado principalmente pelos meses mais chuvosos (2002), caracterizado pelo maior teor de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($46 \pm 4\%$); e o subgrupo IIB, principalmente formado pelos meses úmidos de 2003, quando a pluviosidade foi mais baixa e apresentando o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($37 \pm 5\%$) como majoritário.

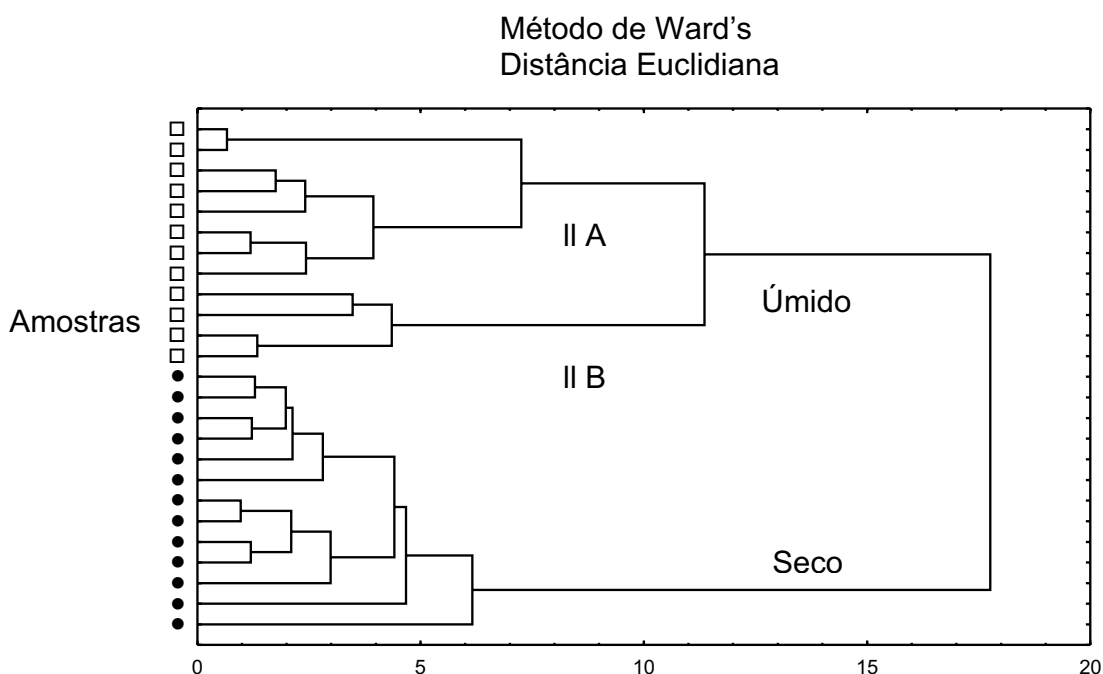


Figura 3.3.2. - Dendrograma de similaridade mostrando o nível de agrupamento das amostras em períodos de seca (●) e na estação úmida (□).

A ANOVA permitiu destacar os constituintes que apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 3.3.1.), os quais foram, principalmente, β -elemeno, espatulenol, tujopsan-2 α -ol, ocidenol, epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e o sesquiterpeno oxigenado desconhecido. Os grupos formados foram baseados em meses do período de estiagem (seca) e chuvosos (úmido).

Tabela 3.3.1. - Percentagem^a média dos constituintes voláteis das folhas de *E. uniflora* de biótipo do fruto vermelho alaranjado coletado nas estações seca e úmida do Cerrado/GO.

Constituinte	IR ^b	Período	
		Úmido	Seca
Linalool	1096	0,2 a	0,3 a
β -Elemeno	1390	0,9 b	1,4 a
Espatulenol^d	1578	7,5 b	10,1 a
Óxido de cariofileno	1583	2,9 a	4,1 a
Tujopsan-2 α -ol	1587	0,3 b	0,9 a
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ^d	1634	42,7 a	42,6 a
Selina-3,11-dien-6 α -ol	1644	0,8 a	0,9 a
Posgotol	1653	0,6 a	0,4 a
14-hidróxi-9-epi-(E)-Cariofileno	1669	0,8 a	0,7 a
Ocidenol	1677	0,7 a	0,5 b
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol ^c	1686	0,4 a	0,3 a
Germacrona	1693	0,7 a	0,6 a
Nootkatol	1715	0,5 a	0,4 a
Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona^d	1748	29,2 a	20,1 b
2 α -hidróxi-Amorfa-4,7(11)-dieno	1776	0,6 a	0,3 b
Sesquiterpeno oxigenado desconhecido	1975	0,3 a	0,0 b
Monoterpenos		0,2 a	0,3 a
Monoterpenos oxigenados		0,2 a	0,3 a
Sesquiterpenos		88,3 a	82,9 b
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		0,9 b	1,4 a
Sesquiterpenos oxigenados		87,4 a	81,5 b
Rendimento (%)		0,3 a	0,2 a

^aEm relação aos dados originais. ^bÍndice de Retenção. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ANOVA: transformado pelo arcoseno (^c) ou pela ordem das mesmas, rank (^d).

A análise de discriminante canônico forneceu uma predição de 91,7% de classificação correta por Validação Cruzada, com a estiagem associada ao teor elevado de espatulenol e a época chuvosa caracterizada por níveis elevados de

epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona ($F = 19,05$, $GL = 2$ e 22 e $p < 0,0001$). De todas as amostras, os indivíduos coletados em out/02, devido a uma maior quantidade de espatulenol (10,2%) e aqueles coletados em Mar/03, de maior índice pluviométrico (239 mm) – o dobro em relação no ano anterior Mar/02 (135 mm de chuva) – constituíram as amostras mal classificadas (Tabela 3.3.2.).

Tabela 3.3.2. - Sumário da análise discriminante canônica de *E. uniflora*.

A. Função discriminante Canônica	Autovalor	Percentual relativo	Correlação Canônica	Lambda de Wilks	F^*	GL^*	P^*
F1	1,384	100	0,762	0,419	15,23	2; 22	0,0001
B. Coeficientes normalizados		Espatulenol	Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona				
F1		0,90	-0,85				
C. Validação cruzada		Percentual de classificação correta					
		Grupo I	Grupo II	Total			
		83,3	100	91,7			
D. Indivíduos mal classificados		Out/02 e Mar/03					

Nº. de amostras = 25; variáveis discriminantes: espatulenol e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona.

* F = valor de Fisher; GL = Grau de liberdade; P = valor- p .

Na análise de correlação canônica entre os constituintes químicos dos óleos essenciais (conjunto 1) e os dados climáticos (conjunto 2) verificou-se uma influência positiva da precipitação para selina 1,3,7(11)-trien-8-ona, germacrona e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e uma correlação negativa com o espatulenol, óxido de cariofileno, selina-3,11-dien-6 α -ol e nootkatol o que é sugerido pela análise de PCA (Tabela 3.3.3.).

Tabela 3.3.3. - Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais de *E. uniflora* e as variáveis climáticas.

Constituintes químicos discriminantes (conjunto 1)	Variável canônica (V1)	Clima (conjunto 2)	Variável canônica (W1)
Espatulenol	-0,769	Temperatura	0,223
Óxido de cariofileno	-0,522	Precipitação	0,998
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,364		
Selina-3,11-dien-6 α -ol	-0,461		
Germacrona	0,511		

Cont.

Cont.			
Constituintes químicos discriminantes (conjunto 1)	Variável canônica (V1)	Clima (conjunto 2)	Variável canônica (W1)
Nootkatol	-0,574		
Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,447		
Autovalor			0,700
Correlação canônica			0,837
Lâmbda de Wilks			0,150
χ^2 de Bartlett			35,86
Graus de liberdade			14
F			3,58
P			0,001
Variância acumulada (%)			
dos constituintes químicos discriminantes			28,60
da relação climas-constituintes químicos discriminantes			20,05

Em contraste com a rota metabólica dos fenóis e flavonóides, os terpenos não competem diretamente na biosíntese dos fenilpropanóides (ácido hidroxicinâmico, flavonóides, taninos condensados e lignóides) (SANTOS, 2007). Além disso, independente do estágio de desenvolvimento da planta a produção de terpenos não cessa, pois mesmo que seja classificado como metabólico especial, a sua função é essencial para a manutenção e proteção da planta (HAUKIOJA et al, 1998). Entretanto foi verificada uma correlação positiva entre os flavonóides totais foliar com linalool, β -elemeno, espatulenol, óxido de cariofileno e entre os fenóis totais foliar com ocidenol e o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (SANTOS, 2007) (Tabela 3.3.4.).

Tabela 3.3.4. - Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais de *E. uniflora* e os constituintes fenólicos foliares.

Constituintes químicos voláteis discriminantes (conjunto 1)	Variável Canônica (V1)	Constituintes fenólicos (conjunto 2)	Variável Canônica (W1)
Linalool	0,411		
β -elemeno	0,701	Fenóis totais	-0,318
Espatulenol	0,360	Flavonóides	0,548
Óxido de cariofileno	0,812		
Occidenol	-0,547		
Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	-0,564		
Autovalor			0,392
Correlação canônica			0,63

Cont.

Cont.	
Lâmbda de Wilks	0,403
χ^2 de Bartlett	21,65
Graus de liberdades	12
F	2,068
P	0,041
Variância acumulada (%)	
dos constituintes químicos discriminantes	34,4
da relação constituintes químicos voláteis-fenólicos foliares discriminantes	15,8

Por outro lado, verificou-se que os minerais foliares K, Zn e Mn correlacionaram-se positivamente com occidenol e o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, enquanto que Ca, S e Fe apresentaram uma forte correlação com espatulenol, óxido de cariofileno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e selina-3,11-dien-6 α -ol (Tabela 3.3.5.).

Tabela 3.3.5. - Sumário de Análise de Correlação Canônica entre os óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* e seus nutrientes foliares.

Constituintes químicos voláteis discriminantes (conjunto 1)	Variável Canônica (V1)	Nutrientes foliares (conjunto 2)	Variável Canônica (W1)
Espatulenol	0,499	K	-0,310
Óxido de cariofileno	0,300	S	0,303
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,311	Ca	0,677
Selina-3,11-dien-6 α -ol	0,424	Cu	-0,484
Occidenol	-0,743	Mn	-0,312
Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	-0,877	Fe	0,457
Autovalor			0,876
Correlação canônica			0,936
Lâmbda de Wilks			0,017
χ^2 de Bartlett			61,54
Graus de liberdades			36
F			2,32
P			0,0023
Variância acumulada (%)			
dos constituintes químicos discriminantes			29,0
da relação nutrientes foliares-constituíntes voláteis discriminantes			17,0

A abertura e o fechamento dos estômatos foliares são controlados pela entrada de potássio no vacúolo (Tabela 3.3.6). Quando as células estomáticas mantêm-se túrgidas, o poro é mantido aberto, processo esse denominado de transpiração estomática (MARSXHNER, 1997; SCHULZE et al., 2005).

Conseqüentemente, a correlação do potássio com o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, o constituinte químico discriminante para o período com maior índice pluviométrico.

Tabela 3.3.6. - Relação entre abertura dos estômatos e a concentração de K foliar.

Estômatos	Abertura dos Estômatos (μm)	Concentração de K nos estômatos (mol).
Abertos	12	424
Fechados	2	20

Por outro lado, o fechamento dos estômatos esta ligado com aumento na concentração de Ca^{2+} , livre no citosol, ativado pelo ácido abscísico (ABA). Quando a planta está sobre deficiência de água, stress de sal e frio. O cálcio age bloqueando a bomba de próton e exporta o potássio e os ânions para o apoplasto, aumentando o potencial osmótico nas regiões circunvizinhas a célula. Todos estes eventos levam a diminuição da turgência das células guardas e, conseqüentemente, ao fechamento dos estômatos (MARSXHNER, 1997; SCHULZE et al. 2005). Tais fatores podem explicar a forte correlação entre o cálcio e o espatulenol, um constituinte químico discriminante para o período de chuva.

Não se pode descartar a relação dos minerais foliares como alterações fisiológicas da planta como foi citado acima, e nem como percussor na síntese terpênica. Segundo KELLOGG (1997) e THOLL (2001), as enzimas requerem um metal divalente na atividade catalítica da sintase GPP (geranil difosfato), sendo preferencialmente o Mg^{2+} como co-fator. No entanto, em alguns casos, como na sintase FPP (farnesil difosfato), outros metais equivalentes como Zn^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} podem atuar como co-fatores enzimáticos na síntese de terpenos. De acordo com BOHLMANN (1998), sintases terpênicas das gimnospermas se diferenciam das angiospermas por requererem um metal monovalente (K de preferência), enquanto que as angiospermas requerem um metal divalente (Mn^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+}) como co-fator (Figura 3.3.3).

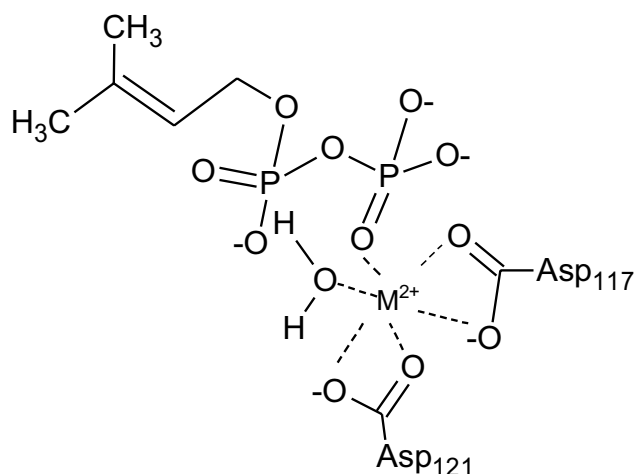


Figura 3.3.3. – Coordenação do metal por seis ligantes, com uma molécula de água, dois de ácido aspártico e uma de fosfato. O Metal pode ser Mg, Mn, Zn ou Co.

3.4. CONCLUSÃO

Os fatores climáticos influenciaram a composição química do óleo essencial das folhas de *E.uniflora* de um biótipo de cor de fruto vermelho-alaranjado. Dentre os componentes dos óleos essenciais, destacam-se os epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e espatulenol como os constituintes discriminantes para o período chuvoso e de estiagem, respectivamente. Esses constituintes correlacionam-se fortemente com K e Ca, cujos cátions encontram-se influenciando diretamente a abertura e fechamento dos estômatos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured: Illionois, 2007.

ADEWUNMI, C.O.; AGBEDAHUNSI, J.M; ADEBAJO, A.C.; ALADESANMI, A.J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Entho-veterinary medicine: Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. Journal of Ethno-Pharmacology, v. 77, p. 19-24, 2001.

ALMEIDA, M.D. Biogeoquímica do mercúrio na interface solo-atmosfera na Amazônia. 2005. 66 f. Dissertação (Doutorado em Geoquímica ambiental) -Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

ALMEIDA, C.E.; KRMIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. Revista Saúde Pública, v.29 (6), p.428-433, 1995.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, M; Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. Journal of Ethnopharmacology, v.68, p.307–314, 1999.

BARAZANI, O.; COHEN, Y.; FAIT, A.; DIMINSHTEIN, S.; DUBAI, N.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; FRIEDMAN, J. Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. Biochemical Systematics and Ecology, v.30, p.721-731, 2002.

BENZÉCRI, J.P. L'Analyse des données: la taxinomie. Tome1. Paris: Dunod, 1980.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; SILVA, J.F.J.; ALVES, M.A. Comportamento da pitangueira (*Eugenia uniflora* L) sob irrigação na região do vale do rio Moxotó, Pernambuco. *Revista Brasileira de Frutificação*, v. 26(1), p. 177-179, 2004

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Biochemistry*, v.95, p. 4126-4133, 1998.

BRAGA, K. S. P. R.; Aperfeiçoamento de testes de hipóteses para modelos não-lineares simétricos. 2007—Dissertação (Mestrado em Estatística) -- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, p.33-39, 1999.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, v.81, p.57-63, 2002.

FLEMING, I. *Pericyclic Reactions (Oxford chemistry primers)* . Oxford science publications Ed 1°, Cambridge, p. 57 ,1998

FRANZON, R. C.; Caracterização de Mirtáceas nativas do Sul do Brasil. M. Sci. Thesis, Universidade Federal de Pelotas, 2004.

FRAZÃO, A.A.; MELO, B. Cultura da Pitangueira. <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/pitangueira.html>> dia 04/07/2008.

GAUCH, H. G. Jr. *Multivariate analysis in community ecology*. New York: Cambridge University Press, p. 298, 1982.

GENTRY, A. H. Tree species richness of upper Amazonian forest. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 156-159, 1988.

GUERRA, M.P.;NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/EDUFSC, p. 13, 2003.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. Análise Multivariada de dados, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HAUKIOJA, E.; OSSIPOV, V.; KORICHEVA, J.; HONKANEN, T.; LARSSON, S.; LEMPA, K. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization?. Chemoecology, v. 8, p. 133-139, 1998.

HELFER, G.A.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, C.V.; HERMES, N. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. Ciência Tecnologia de Alimentos, v. 26(4), p. 779-786, 2006.

HENRIQUES, A.T.; SOBRAL, M.E.; CAUDARO, A.D. SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L.; LAMATY, G. MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Aromatic Plants from Brazil. II. The Chemical Composition of Some *Eugenia* Essential Oils. Journal Essential Oil, v.5, p.501-505, 1993.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.97(7), p.1027-1031, 2002.

KELLOGG, B.A.; POULTER, C.D. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Chemical Biology*, v. 1, p. 570-578, 1997.

LABART, L.; MORINEU, A.; LAMBERT, T.; PLEUVRET, P. SPAD.N version 5.5, Sistema Compatible para el Análisis de Datos. Saint Mandé Centre International de Statistique et d'Informatique Apliques, 2002.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F.; CALADO, G.; A Pitangueira em Pernambuco. Secretaria de Agricultura, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária: Recife, 1992

LEE, M.H.; CHION, J.F.; YEN, K.Y.; YANG, L.L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Letters*, v. 154, p. 131-136, 2000.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influencia dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente* v. 10(2), p. 71-77, 2003.

LIMA, V.L.A.G.; MÉIO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. *Scientia Agricola*, v. 59(3), p. 447-450, 2002.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, M. H. L.; SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; J. *Essent. Oil Res.* , v. 11, p. 727,1999

MALAVOLTA, E; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípio e Aplicações. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba,SP. 1989.

MARSXHNER, H. Mineral nutritios of Higher plants. 2nd ed. San Diego, EUA. Academic Press, p. 229, 1997.

MÉIO, B.B.; FREITAS, C. V.; JATOBÁ, L.; SILVA, M.E.F.; RIBEIRO, J.F.; HENRIQUES, R.P.B. Influência da flora das florestas Amazônicas e Atlânticas na Vegetação do Cerrado sensu stricto. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25(4), p. 437, 2003.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* v. 18, p. 179, 2007.

MINGOTI, S.A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. 1ª ed., Belo Horizonte-MG: Editora UFMG p. 21-25, 2005.

MORAIS, S.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F. J. A. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil, v. 8, p. 449-451, 1996.

MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M. C. M.; CORDEIRO, I.; APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Sciencia Agricultural*, v. 64(4), p. 428-432, 2007.

COSTA NETO, P. L. O.; *Estatística*. 2º ed., Editora Edgard Blücher Ltda São Paulo – SP, 2005.

NIST/EPA/NIH National institute of standards and technology; Pc version of the mass spectral data base, U. S. Department of commerce: Gaithersburg, 1998.

NETO, P.L.O.C. *Estatística*. 2ª ed. São Paulo-SP, Brasil: Edard Blücher, p. 149-173, 2002.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE. N.O.; EKUNDAYO. O.; WALKER, T.M.; SCHMIDT, J.M.; SETZER, W.N. Studies on the essential oils composition,

antibacterial and citotoxicity of *Eugenia uniflora* L. The international Journal of Aromatherapy, v. 15, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). Food Chemistry, v. 99, p. 1-5, 2006.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; J. Essent. Oil Res. v. 15, p. 70, 2003.

PIZZOL, S.J.S. Combinação de Grupos Focais e Análise Discriminante: um Método para Tipificação de Sistemas de Produção Agropecuária. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 42(2), p. 451-468, 2004.

RISSATO, S.R.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L.C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. Salusvita, v. 23 (2), p. 209-222, 2004.

RÜCKER, G.; BRASIL E SILVA, G. A.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M.; Plant Med. V. 31, p. 322, 1977.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even Population differentiation for Maternal and Biparental Gene Markers in *Eugenia uniflora*, a Widely Distributed Species from the Brazilian Coastal Atlantic Rain Forest. Biodiversity and Distributions, v. 10, p. 201-210, 2004.

SANCHOTENE, M. C. C.; Frutíferas Nativas Úteis à Fauna na Arborização Urbana, 2ª. ed., Sagra: Porto Alegre, 1989.

SANTOS, R. M. DOS. Sazonalidade dos nutrientes minerais e dos fenóis em folhas de *Eugenia uniflora* L.. 2007. 44 f. Dissertação (Mestrado em ciência farmacêutica) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethno-Pharmacology*, v. 90, p. 135-143, 2004.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, J.G.J.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 247-249, 2002.

SCHULZE, E. D.; BECK, E.; MÜLLER-HOHENSTEIN, K. *Plant Ecology*. 1st ed. Alemanha: Springer, p. 117, 2005.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM/SAS Institute Inc., Cary, NC, 1996.

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

THOLL, D.; CROTEA, R.; GERSHENZON, J.; Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase from *Abies grandis* (Grand Fir). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 386 (2), p. 233-242, 2001.

TRUGILHO, P.F.; LIMA, J.T.; MORI, F.A. Correlação canônica das características químicas e físicas da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. *CERNE*, v. 9(1), p. 66-80, 2003.

UBIERGO, G.; TAHER, H. A.; TALENTI, E. C.; An. Asoc. Quim. Argent., v. 75, p. 377, 1987.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the Retention Index system including linear temperature programmed gás-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography, v. 11, p. 463-471, 1963.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia, v. 74, p. 91-97, 2003.

VIANA, M. E. L.; RETAMAR, J. A.; An. Soc. Cient. Argent., 1971.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R.R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. Em: ____ Natural products: drug discovery and therapeutic medicine, Zhang, L.; Demain. L.A. (org), 1ª ed. Totowa, New Jersey, EUA: Humana Press p. 197-228, 2005.

WARD, J. H.; Hierarchical grouping to optimize na objective function. Journal American Statistica Association, v. 58, p. 238, 1963.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. ed. blackwell scientific publications. p. 66-103, 1994.

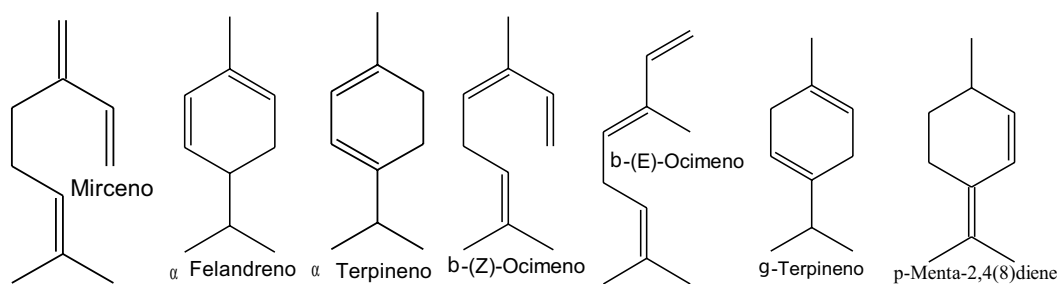
WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H.; CHISTIENSEN, C.; OGUNTMEIN, B. O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. Planta Medica, v.54, p.546-549, 1988.

WILSON, E. O. The diversity of life. Boston: Belknap, p. 424, 1992.

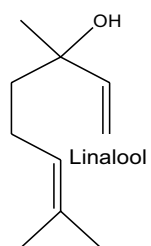
WINK, M.; Evolution of secundary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, v. 65, p. 3-19, 2003.

Apêndice 1

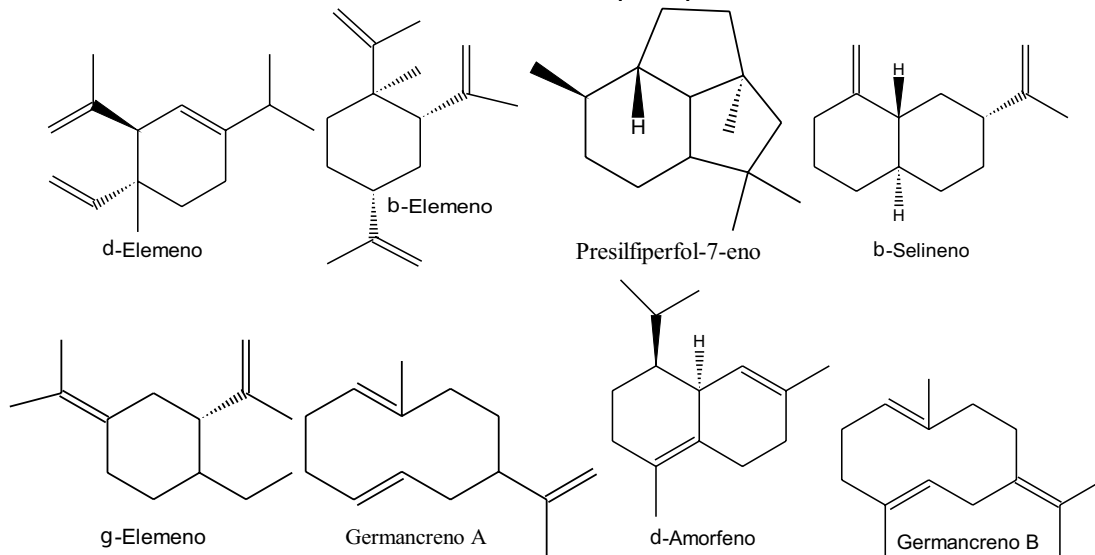
Hidrocarbonetos monoterpênicos

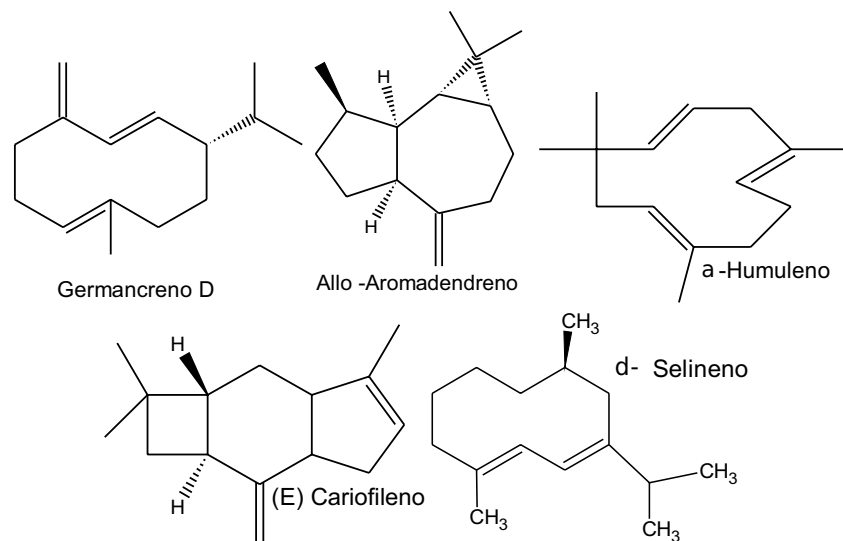


Monoterpenos oxigenados

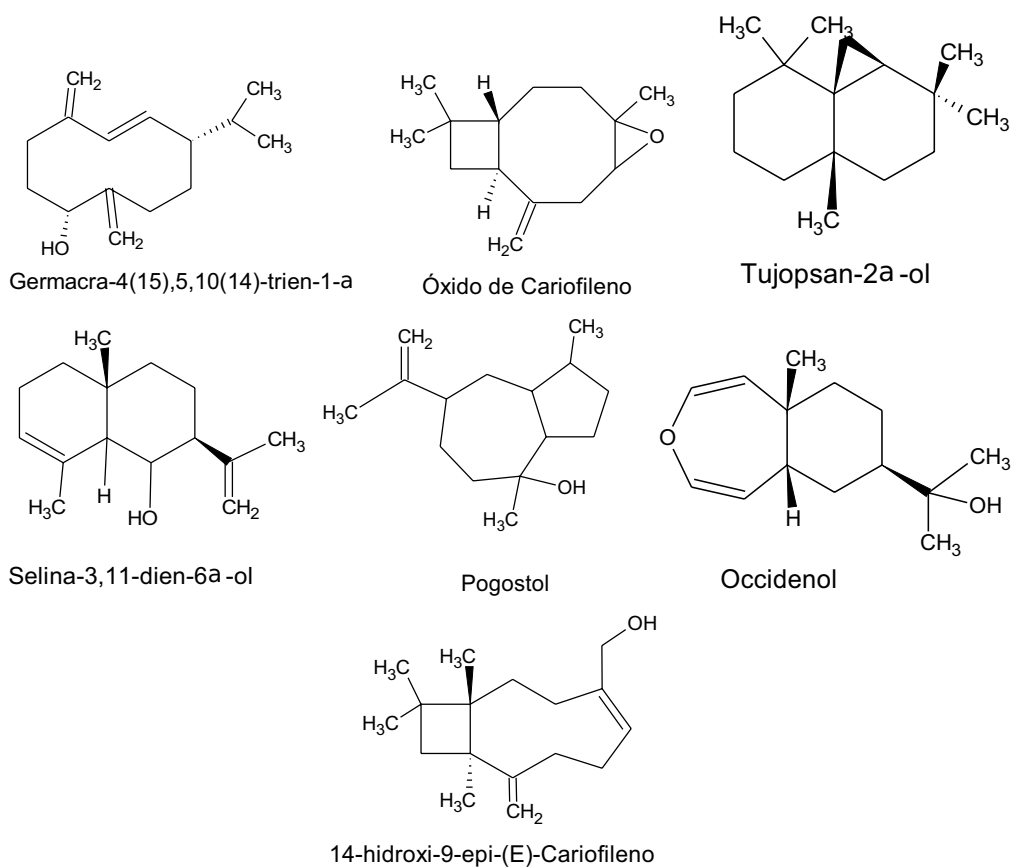


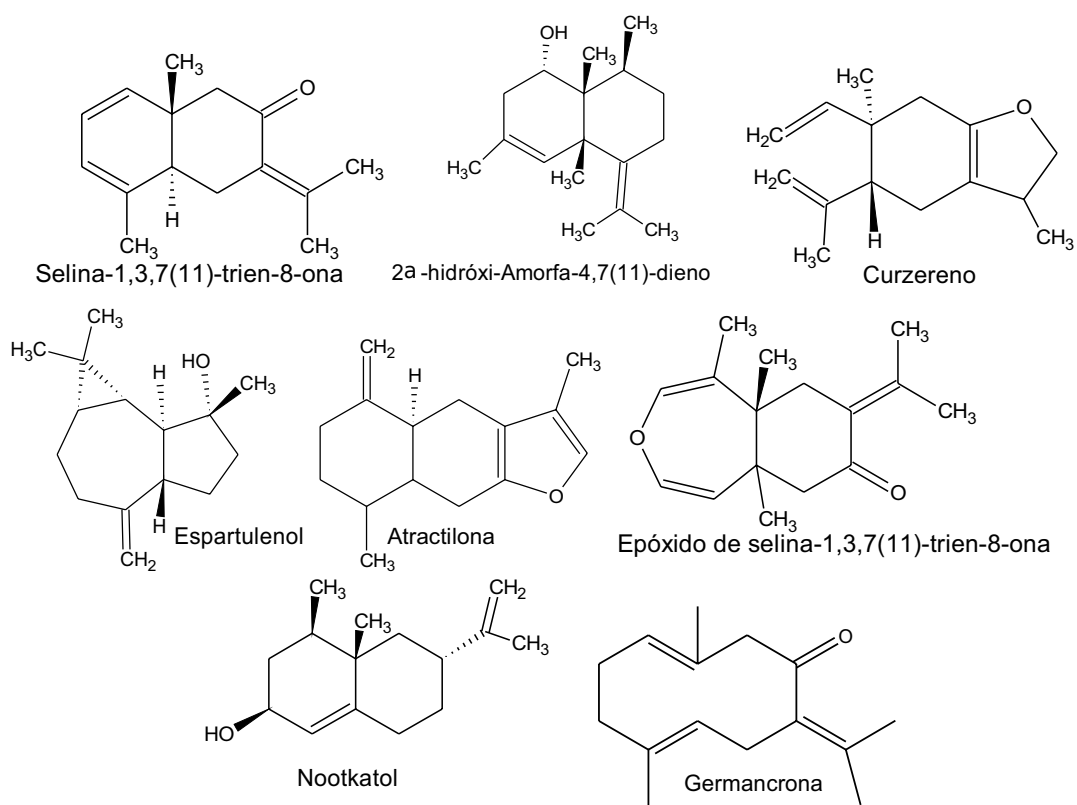
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos





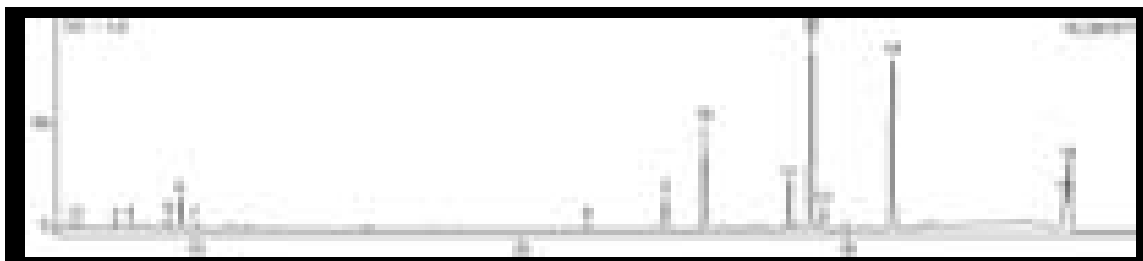
Sesquiterpenos oxigenados





Apêndice 2

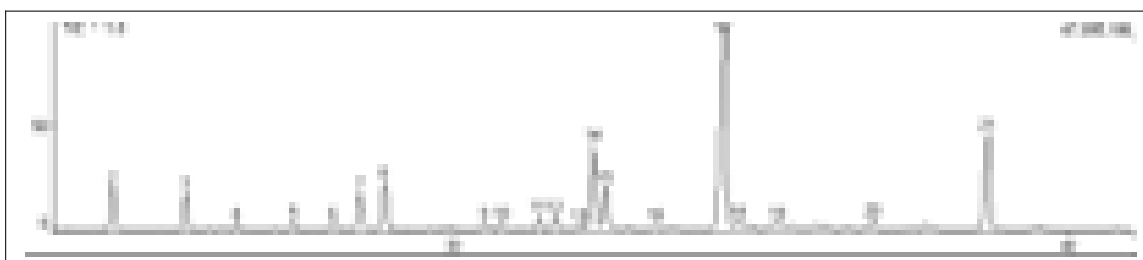
Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* dos três grupos de biótipos formados. E o espectro de massa dos constituintes químicos identificados.



Grupo I



Grupo II

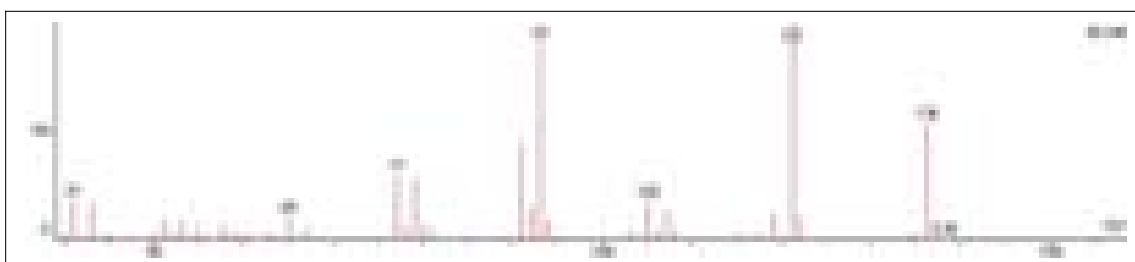
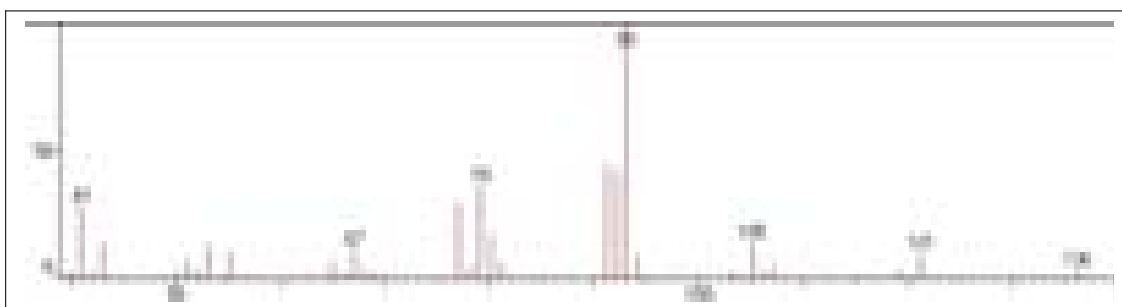


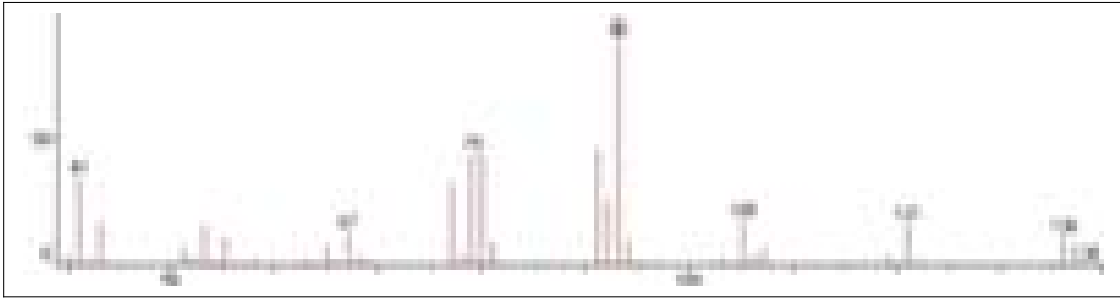
Grupo III

Hidrocarbonetos monoterpênicos

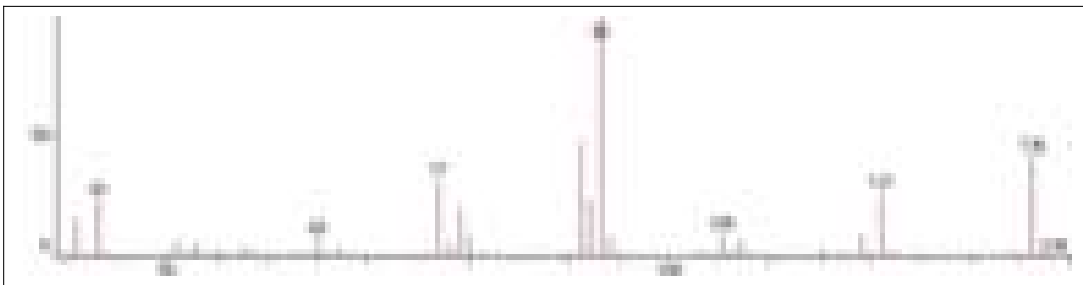


Mirceño

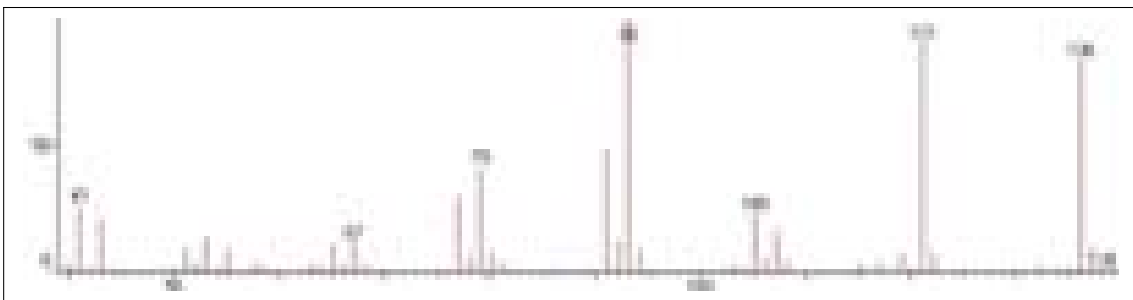
 α -Felandreno α -Terpineno(Z)- β -Ocimeno



(E)-β-Ocimeno



γ-Terpineno



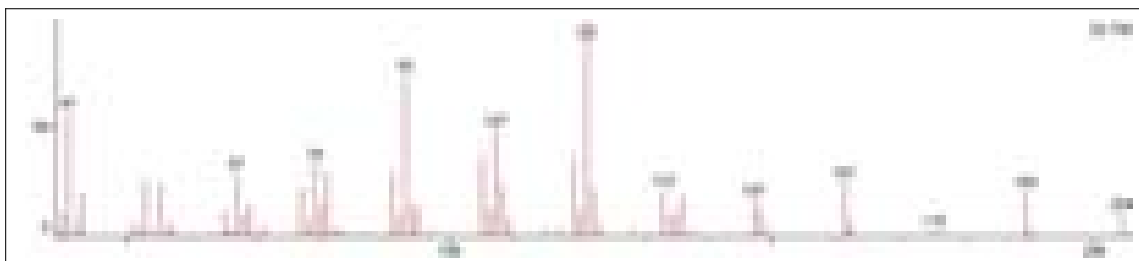
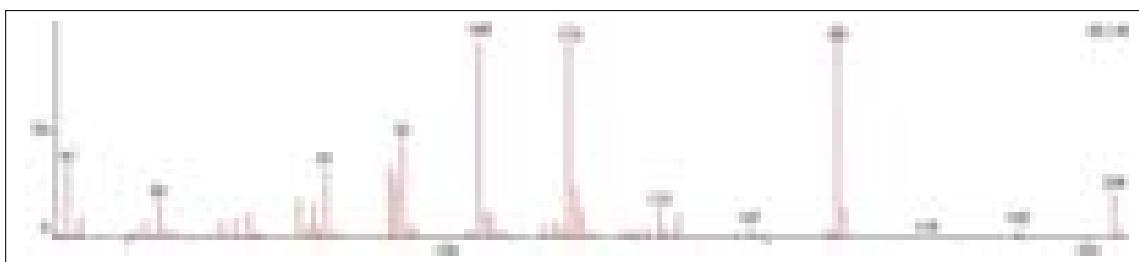
p-Menta-2.4(8)-dieno

Monoterpenos oxigenados

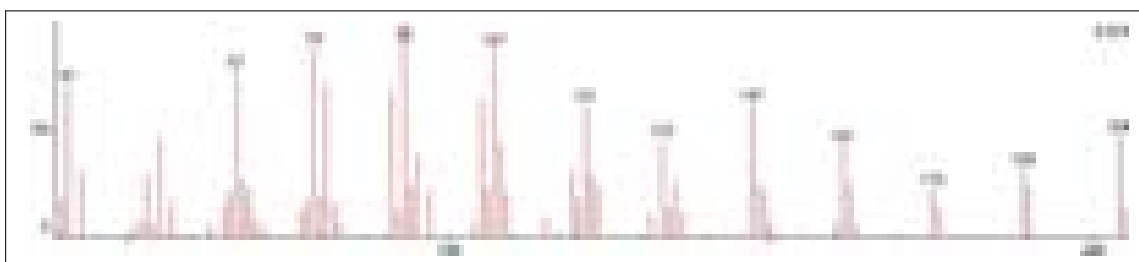


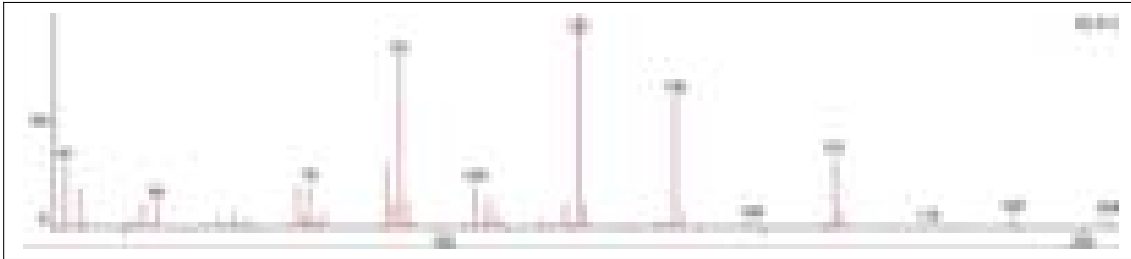
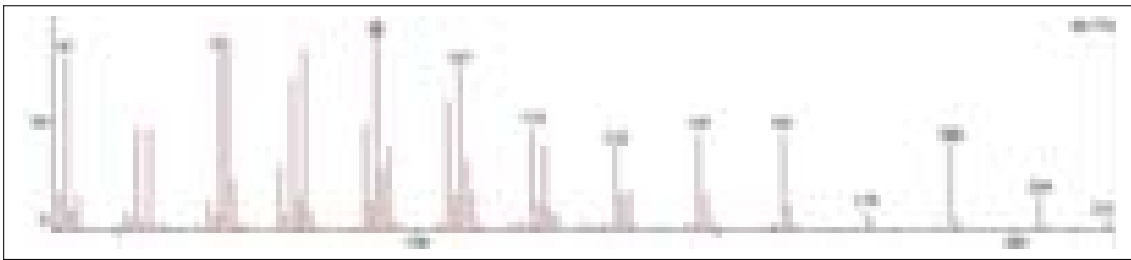
Linalool

Hidrocarbonetos sesquiterpênicos

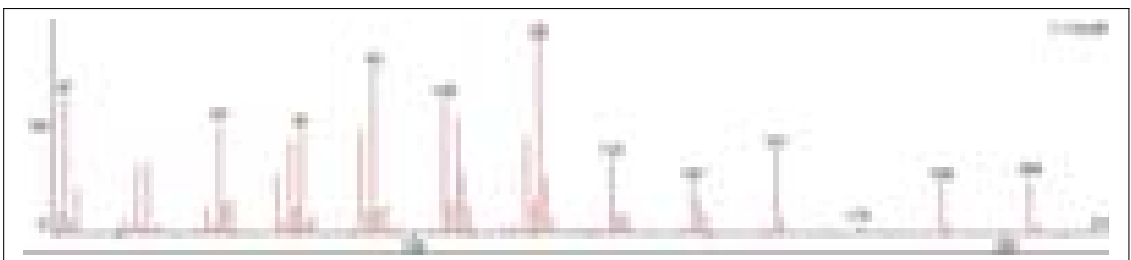
 γ -Elemeno β -Elemeno

Presilfiperfol-7-eno

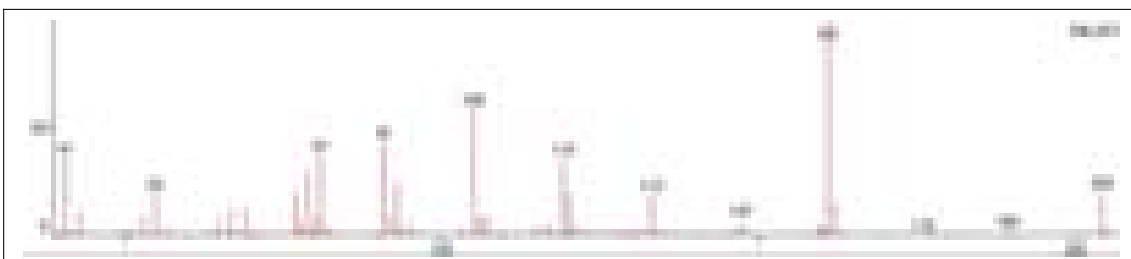
 β -Selineno

 δ -Elemeno

Germancreno A

 δ -Amorfeno

Germancreno B



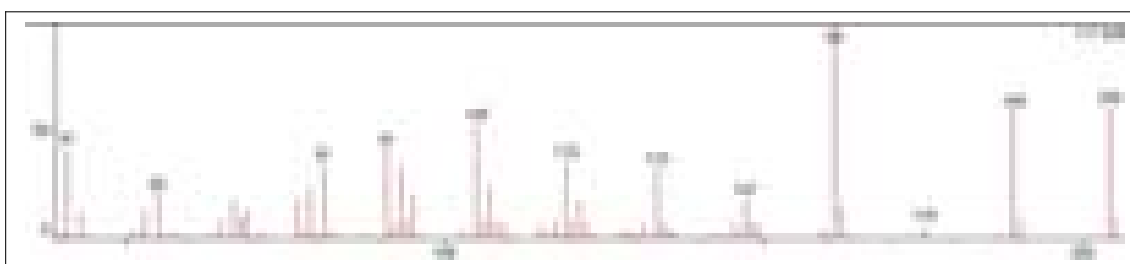
Germancreno D



allo-Aromadendreno

 α -Humuleno

(E)-Cariofileno

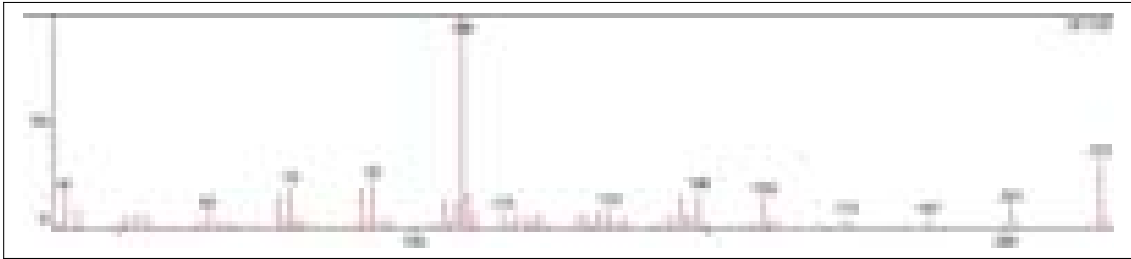
 δ -Selineno

Sesquiterpênicos Oxigenados

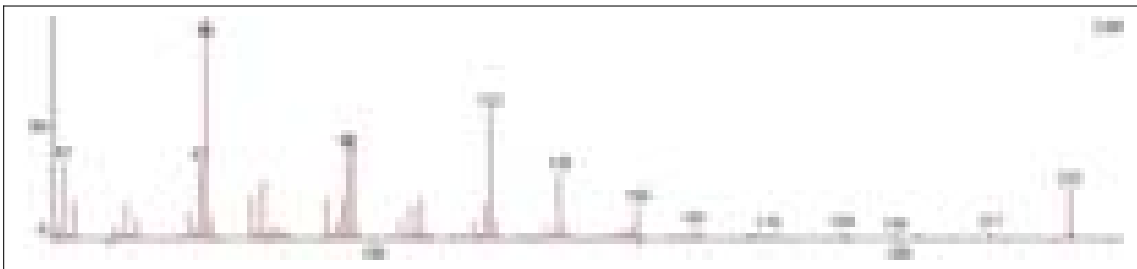
Germancra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol







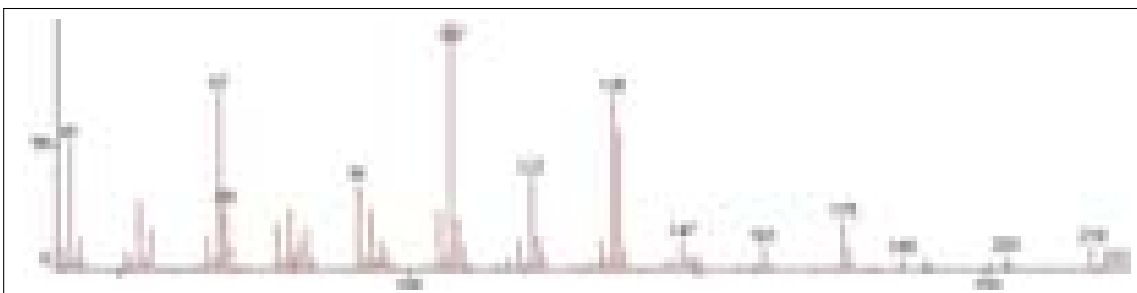
Atractilona



Epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona



Nootkatol



Germancrona

Apêndice 3

Constituintes químicos das folhas de *E. uniflora* dos cinco biótipos.

Constituintes	IR	ve jul/07 ^a	ve jul/07 ^a	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^a	vc jul/07 ^a	vc jul/07 ^b	vc jul/07 ^a	aa nov/07 ^c
Mirceno	990	-	0,17	0,21	0,19	-	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Terpineno	1017	-	0,1	0,1	0,08	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-β-Ocimeno	1037	-	0,11	0,17	0,15	-	-	-	-	-	-	-
(E)-β-Ocimeno	1050	-	0,27	0,42	0,35	-	-	-	-	-	-	0,34
γ-Terpineno	1059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Menta 2,4(8)-dieno	1088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	1096	-	0,15	0,24	0,13	0,29	0,37	-	-	-	-	0,37
Presiliferfol-7-eno	1336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-Elemeno	1338	0,37	0,28	0,65	0,56	0,6	0,63	1,23	1,02	0,69	0,69	0,69
β-Elemeno	1390	1,33	2,62	3,59	3,27	2,47	2,54	4,56	4,29	2,1	2,1	2,1
(E)-Cariofileno	1419	2,88	9,66	11,21	10,43	14	14,15	6,93	7,09	5,96	5,96	5,96
γ-Elemeno	1436	0,16	-	0,51	0,51	0,43	0,41	0,33	0,27	0,67	0,67	0,67
α-Humuleno	1454	0,15	0,47	0,57	0,54	0,67	0,69	-	-	0,31	0,31	0,31
allo-Aromadendreno	1460	0,34	0,68	0,27	0,22	0,34	0,69	0,61	0,53	-	-	-
Germacreno-D	1485	3,6	3,19	4,71	4,51	5,66	5,72	8,96	8,72	5,1	5,1	5,1
β-Selineno	1490	0,27	-	0,39	0,31	0,49	0,5	0,4	0,4	0,29	0,29	0,29
δ-Selineno	1492	0,25	-	0,31	0,12	0,27	-	0,51	0,58	-	-	-
Curzereno	1499	17,67	30,84	24,15	21,72	14,73	22,52	42,02	43,24	18,59	18,59	18,59
Germacreno A	1509	2,82	2,95	3,21	3,06	4,1	3,86	8,92	5,88	3,1	3,1	3,1
δ-Amorfeno	1512	0,42	-	0,54	0,17	0,64	-	1,13	1,12	-	-	-
Germacreno B	1561	11,1	-	20,7	21,44	23,91	23,51	3,47	3,35	32,19	32,19	32,19
Espatuleno	1578	0,36	4,37	1,07	1,68	0,78	0,77	-	-	-	-	-
Oxido de Cariofileno	1583	0,55	2,14	0,93	1,07	-	-	-	-	-	-	-
Tujopsan-2-α-ol	1587	0,47	0,95	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1634	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Selina-3,11-dien-6-ol	1644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Posgotol	1563	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atractilona	1658	-	11,85	13,34	12,15	8,42	10,22	-	-	10,29	10,29	10,29
14-hydroxy-9-epi-(E)-Cariofileno	1669	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Occidenol	1677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacra 4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1686	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacrona	1693	53,71	15,55	6,53	11,49	11,06	9,21	14,01	12,93	18,04	18,04	18,04

Cont.		Cont.											
Constituintes		IR	ve jul/07 ^a	ve jul/07 ^a	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^b	ve jul/07 ^a	vc jul/07 ^a	vc jul/07 ^a	aa nov/07 ^c
Nootkatol		1715	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epóxido de selina -1-3-7(1)-trien-8-ona		1748	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 α -hidróxi-Amorfa-4,7(11)-diene		1776	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Detectado (-)													
Hidrocarbonetos monoterpênicos			0,00	0,00	0,65	0,90	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34
Monoterpenos oxigenados			0	0	0,15	0,24	0,13	0,29	0,37	0	0	0	0,37
Hidrocarbonetos sesquiterpenos			23,69	19,85	46,66	45,14	47,13	53,31	52,70	37,05	33,25	50,41	50,41
Sesquiterpenos oxigenados			72,76	65,7	46,02	48,11	39,13	42,78	42,03	56,03	56,17	46,92	46,92
Monoterpenos			0,00	0,00	0,80	1,14	0,90	0,29	0,37	0,00	0,00	0,00	0,71
Sesquiterpenos			96,45	85,55	92,68	93,25	86,26	96,09	94,73	93,08	89,42	97,33	97,33
Total (%)			96,45	85,55	93,48	94,39	87,16	96,38	95,10	93,08	89,42	98,04	98,04

Cor do fruto: aa=amarelo-alaranjado; va=vermelho alaranjado; vc=vermelho claro;

ve=vermelho escuro; r=roxo

Símbolos sobrescritos: a=Goiânia; b=Nova Veneza; c=Santo Antônio de Goiás;

d=Anapólis

Cont.

Constituintes	IR	aa jul/07 ^c	r jul/07 ^c	r jul/07 ^c	va Jun/02 ^d	va Jun/03 ^d	va jun07 ^b	va jun/07 ^b	va jun/07 ^b
Mirceno	990	-	-	0,15	-	-	-	-	-
α -Felandreno	1002	-	-	0,23	-	-	-	-	-
α -Terpineno	1017	-	-	0,12	-	-	-	-	-
(Z)- β -Ocimeno	1037	-	-	0,34	-	-	-	-	-
(E)- β -Ocimeno	1050	0,4	-	0,93	-	-	-	-	-
γ -Terpineno	1059	-	-	0,25	-	-	-	-	-
p-Menta 2.4(8)-diene	1088	-	-	0,2	-	-	-	-	-
Linalool	1096	-	-	-	0,21	0,31	0,15	0,51	0,34
Presiliferfol-7-eno	1336	-	-	0,12	-	-	-	-	-
δ -Elemeno	1338	-	0,35	0,72	-	-	-	0,32	0,23
β -Elemeno	1390	2,46	1,71	2,49	1,05	1,48	1,2	2,59	1,94
(E)-Cariofileno	1419	4,93	4,13	7,67	-	-	2,64	5,31	3,17
γ -Elemeno	1436	0,45	0,39	0,4	-	-	-	0,37	0,26
α -Humuleno	1454	0,41	-	0,42	-	-	0,23	0,25	0,16
allo-Aromadendreno	1460	-	-	0,55	-	-	-	-	-
Germacreno-D	1485	2,25	3,63	4,72	-	-	2,06	3,36	2,57
β -Selineno	1490	0,51	0,32	0,36	-	-	-	0,46	0,25
δ -Selineno	1492	-	-	0,39	-	-	4,22	7,29	4,92
Curzereno	1499	13,1	14,39	26,44	-	-	-	-	-
Germacreno A	1509	3,3	3,63	3,28	-	-	1,53	2,48	1,81
δ -Amorfeno	1512	-	-	0,54	-	-	-	0,37	0,2
Germacreno B	1561	27,19	30,67	14,09	-	-	7,97	12,93	8,64
Espatuleno	1578	-	0,59	-	10,11	10,28	-	-	-
Oxido de Cariofileno	1583	-	-	-	2,8	3,75	-	-	-
Tujopsan-2- α -ol	1587	-	-	-	1,01	0,5	-	-	-
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1634	-	-	-	40,28	46,53	55,35	47,06	51,71
Selina-3,11-dien-6-ol	1644	-	-	-	0,78	0,68	-	-	-
Posgotol	1563	-	-	-	0,36	0,27	-	-	-
Atractilona	1658	10,62	19,6	19,88	-	-	-	-	-
14-hidroxy-9-epi-(E)-Cariofileno	1669	-	-	-	0,78	0,96	-	-	-
Occidenol	1677	-	-	-	0,66	0,59	-	-	-
Germacra 4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1686	-	-	-	0,36	0,25	-	-	-
Germacrona	1693	24,56	19,6	9,8	0,79	0,37	1,16	0,76	0,96
Nootkatol	1715	-	-	-	0,6	0,61	-	-	-

Cont.		IR	aa jul/07 ^c	r jul/07 ^c	r jul/07 ^c	va Jun/02 ^d	va Jun/03 ^d	va jun07 ^b	va jun/07 ^b	va jun/07 ^b
Constituintes										
Epóxido de selina -1-3-7(11)-trien-8-ona		1748	-	-	-	24,44	20,91	20,45	12,74	18,02
2α-hidróxi-Amorfa-4,7(11)-diene		1776	-	-	-	0,33	0,39	-	-	-
Não Detectado (-)										
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,40	0,00	2,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Monoterpenos oxigenados		0	0	0	0,21	0,31	0,15	0,51	0,51	0,34
Hidrocarbonetos sesquiterpenos		41,50	44,83	35,63	1,05	1,48	19,85	35,73	24,15	24,15
Sesquiterpenos oxigenados		48,28	54,18	56,12	83,3	86,09	76,96	60,56	70,69	70,69
Monoterpenos		0,40	0,00	2,22	0,21	0,31	0,15	0,51	0,51	0,34
Sesquiterpenos		89,78	99,01	91,75	84,35	87,57	96,81	96,29	94,84	94,84
Total (%)		90,18	99,01	93,97	84,56	87,88	96,96	96,80	95,18	95,18

Letras na linha: cor do fruto aa=amarelo-alaranjado; va=vermelho-alaranjado; vc=vermelho-claro; ve=vermelho-escuro; r=roxo

Símbolos sobrescritos: a=Goiânia; b=Nova Veneza; c=Santo Antônio de Goiás; d=Anapólis

Apêndice 4

Constituintes químicos do óleo essencial de *E. uniflora*. Biótipo vermelho alaranjado coletado em Anápolis.

Amostra	Linalool	β -elemeno	Des1	Des2	Des3	Des4	Esputulenol	Óxido de Cariofileno	Tujopsan-2 α -ol	Des5	Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	Selina-3,11-dien-6 α -ol	Des6
dez/01	0	0,4	0	0	0,61	0,24	3,25	1,48	0	0,43	50,26	0,58	0
jan/02	0	0,44	0	0,72	0	0,53	4,16	1,91	0	0,92	49,95	0,63	0
fev/02	0	0,55	0	2,3	0	0,98	7,65	1,84	0	1,21	37,54	0,92	0,47
mar/02	0	0,97	0,77	0,55	4,87	1,41	9,77	2,74	0,74	2,06	42,98	0,72	0
abr/02	0,26	1,65	0,8	0	6,31	1,79	9,95	2,32	1,47	3,31	44,26	0,98	0,57
mai/02	0,34	1,68	1,07	0	6,38	1,25	10,38	2,8	1,32	2,27	42,42	0,86	0
jun/02	0,21	1,05	0,75	0,51	4,71	0,89	10,11	2,8	1,01	1,61	40,28	0,78	0,15
jul/02	0,3	1	0,97	0,64	5,61	1,51	11,17	3,56	1,22	2,05	41,3	0,84	0
ago/02	0,31	0,92	1,35	0	5,7	1,46	9,57	3,29	1,36	2,62	46,45	0,78	0
set/02	0,46	1,24	1,31	0	5,12	1,03	10,88	4,45	0,91	2,44	37,89	0,87	0
out/02	0,39	1,13	0,51	0,49	2,15	0,75	10,23	4,1	0,45	1,64	41,63	1,22	0,49
nov/02	0,21	0,63	0	0,86	1,68	1,03	7,19	1,74	0,4	1,95	46,66	0,97	0,71
dez/02	0,3	0,83	0	0	3,13	1,31	7,59	2,42	0,53	1,65	50,37	0,63	0
jan/03	0,2	0,81	0,32	0	3,15	1,23	7,24	2,38	0,74	1,75	47,01	0,77	0,28
fev/03	0,26	0,84	0,42	0	3,15	0,91	8,99	2,77	0,55	2,02	38,46	1,12	0,87
mar/03	0,28	1,01	0,58	0	4,1	1,35	8,89	3,1	0,57	2,33	46,58	1,03	0,44
abr/03	0,35	1,58	0,72	0	5,33	1,15	10,92	4,12	0,61	1,4	39,5	0,86	0
mai/03	0,26	2,4	1,1	0	6,5	1,44	11,13	4,9	0,95	1,99	41,9	0,86	0
jun/03	0,31	1,48	0,86	0,9	4,46	0,87	10,28	3,75	0,5	1,62	43,53	0,68	0
jul/03	0,32	1,28	1,01	0,91	3,88	0,84	9,53	4,07	0,5	1,9	44,33	1,04	0,33
ago/03	0,22	1,58	1,35	0,75	3,09	0,96	9,33	5,44	0,52	2,18	43,33	1,3	0,63
set/03	0,63	1,92	1,71	0	1,58	0,51	8,33	8,89	0	0	46,13	0,78	0
out/03	0,26	1,6	0,51	0	1,76	0,47	7,67	5,67	0	0,21	37,16	0,61	0
nov/03	0,26	0,68	0	0	2,15	0,53	7,38	3,03	0	0,82	27,71	0,48	0
dez/03	0,49	1,33	0,19	0	2,2	0,41	9,67	4,71	0	0	38,78	0,53	0

Des1-m/z 69(100), 41(95), 119(30), 93(28), 218(5); **des2-m/z** 105(100), 183(95), 198(90), 91(87), 216(25); **des3-m/z** 105(100), 157(82), 199(50), 96(48), 214(86); **des4-m/z** 106(100), 110(77), 119(74), 91(50), 216(2); **des5-m/z** 105(100), 106(95), 91(88), 119(70), 232(20); **des6-m/z** 119(100), 43(87), 106(83), 91(70), 234(5); **des7-m/z** 133(100), 93(90), 41(85), 105(82), 220(30); **Des8-m/z** 41(100), 43(97), 91(70), 105(66), 220(38); **des9-m/z** 41(100), 43(94), 81(93), 93(90), 220(44); **des10-m/z** 177(100), 159(72), 41(70), 107(62), 220(80); **des11-m/z** 43(100), 67(40), 81(37), 107(35), 260(5).

Amostra	Posgotol	14-hidroxi-9-epi-(E)-Cariofileno	Occidenol	Germancra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	Germacrona	Des7	Nootkatol	Des8	Des9	Epoxido selina-1,3,7(11)-trien-8-ona
dez/01	0,35	0,29	0,54	0,17	0,71	0,28	0,45	1,13	0,47	31,66
jan/02	0,7	0,29	0,51	0,5	0,84	0,3	0,16	1,5	0,43	29,15
fev/02	0,75	1,33	0,71	0,34	0,51	0,59	0,3	2,39	1,41	32,52
mar/02	0,31	0,79	0,48	0,44	0,74	0,5	0,6	1,68	0,89	22,87
abr/02	0,33	0,29	0,98	0,25	0,82	0,86	0,3	1,93	0,88	17,3
mai/02	0,29	0,44	0,52	0,35	0,7	0,51	0,74	1,61	0,71	17,88
jun/02	0,36	0,78	0,66	0,36	0,79	0,45	0,6	1,39	0,75	24,44
jul/02	0,51	0,82	0,46	0,25	0,59	0,51	0,64	1,59	0,87	20,25
ago/02	0,32	0,37	0,25	0,27	0,76	0,44	0,56	1,54	0,81	16,97
set/02	0,32	0,52	0,44	0,35	0,59	0,64	0,6	1,99	1,05	21,26
out/02	0,58	1,14	0,64	0,48	1,04	0,75	0,64	2,1	1,1	24,16
nov/02	1,11	0,71	0,78	0,78	0,45	1,16	0,42	1,91	0,68	23,81
dez/02	0,75	0,58	0,69	0,39	0,96	0,92	0,4	1,59	0,6	22,46
jan/03	0,59	0,7	0,68	0,35	0,91	0,37	0,4	1,63	0,69	22,93
fev/03	0,77	1,16	0,64	0,58	0,77	0,7	0,48	2,35	1,37	27,6
mar/03	0,51	0,71	0,54	0,39	0,68	0,47	0,49	1,84	0,71	18,99
abr/03	0,46	0,99	0,61	0,3	0,59	0,62	0,61	1,68	0,91	22,46
mai/03	0,31	0,82	0,43	0,26	0,5	0,45	0,5	1,32	0,76	18,25
jun/03	0,27	0,96	0,59	0,25	0,37	0,63	0,61	1,69	0,87	20,91
jul/03	0,3	0,95	0,4	0,3	0,52	0,56	0,3	2,1	0,95	19,75
ago/03	1,21	0,51	0,45	0,28	0,58	0,54	0,52	1,6	0,73	16,55
set/03	0	0,89	0,42	0	0,49	0,48	0,3	1,25	0,67	22,18
out/03	0	1,16	0,85	0	0,57	0,72	0	1,57	0,88	35,08
nov/03	0,26	1,07	0,99	0,25	0,46	0,8	0,2	2,12	1,15	45,52
dez/03	0,22	0,88	0,86	0	0,5	0,42	0,2	0,64	0	36,55

Amostra	2 α -hidróxi-Amorfa-4,7(11)-diene														
	Des10	Des11	óleo	P	K	S	Mg	Ca	N	Cu	Zn	Mn	Umid.	Temp	Prec..
dez/01	0,38	1,43	0,67	0,281	0,77	0,115	0,3	4,4	2,2	16	14,3	27,5	85	21,7	256
jan/02	0,37	0,72	0,53	0,322	0,72	0,135	0,4	4	2,5	8	13,4	22,5	61	22	271
fev/02	0	2,36	0,99	0,375	0,81	0,17	0,3	2,7	2,5	8	14,4	21,5	73	22,8	121
mar/02	0	1,64	0,82	0,514	0,82	0,155	0,4	4,7	2,1	6,5	13,2	16,5	79	22,5	135
abr/02	0	1,79	0,28	0,375	0,82	0,155	0,3	5,4	2,1	6	12,1	19	87	21,5	205
mai/02	0	1,83	0,29	0,316	0,75	0,105	0,3	6,4	2,4	6	12,3	21,5	70	21,6	34,8
jun/02	0	1,4	0,14	0,31	0,91	0,15	0,35	4,4	2	7,5	18	18	65	20,6	0
jul/02	0	1,9	0,12	0,348	0,80	0,18	0,25	3,6	2	6	15,9	13,5	60	21,2	10,8
ago/02	0	1,97	0,05	0,291	0,65	0,15	0,3	4,4	4,9	4	15,7	16,5	53	22,5	6,9
set/02	0,5	2,28	0,11	0,445	0,83	1,6	0,4	2,5	4,5	8,5	18,6	18,5	58	22,5	101
out/02	0,9	0,45	0,17	0,416	0,86	0,15	0,3	2,1	5	9,5	19,9	16	55	24,9	81,6
nov/02	0,83	0,44	0,26	0,388	0,96	0,1	0,2	3,7	5,4	9	18,6	19,5	77	22,6	129
dez/02	0,51	0	1,23	0,403	0,90	0,105	0,3	3,2	2,4	6,5	16,6	13	84	22,4	354
jan/03	0,63	1,93	0,12	0,416	0,98	0,14	0,25	3,8	2,3	5,5	14,9	11,5	88	21,6	278
fev/03	1,13	0,67	1,35	0,43	1,02	0,13	0,3	4,3	2,3	5,5	14	10	80	22,6	129
mar/03	0,64	0,33	2,24	0,78	0,348	0,80	0,135	4,5	2,1	6	15,2	17,5	85	21,4	239
abr/03	0,41	0	2,38	0,438	0,96	0,145	0,35	5,1	2,3	5,5	16,1	14	79	22,2	73,8
mai/03	0	0	1,33	0,273	0,80	0,155	0,25	4	2,1	5	14,2	13,5	70	20,2	8,1
jun/03	0,39	0	1,92	0,15	0,588	1,19	0,155	4,3	1,9	6	16,4	10,5	60	20,7	0
jul/03	0,45	0	2,19	0,27	0,375	0,84	0,15	4	2,1	4	15,8	12	58	19,9	0
ago/03	0,47	0	1,5	0,03	0,279	0,75	0,1	5,1	2,2	4	15,6	17,5	61	21,7	14,9
set/03	0	0	1,43	0,35	0,316	0,80	0,1	5,2	2	5,5	17,1	17	62	22,9	31,1
out/03	0,27	0	1,06	0,3	0,613	1,19	0,105	2,1	2,9	11,5	21,5	17	68	22,6	179
nov/03	0,87	0,29	1,17	0,75	0,368	0,98	0,08	2,1	2,3	6	18,5	13,5	83	21,8	149
dez/03	0	0	0,38	0,08	0,368	0,82	0,07	2,5	2,4	5,5	18,4	21	77	23,3	223

Concentração dos macronutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca) em dag/Kg, e micronutrientes (Cu, Zn, Mn, Fe) em mg/Kg. Óleo rendimento em %.

Dados climáticos umidade (umid.) em %, Temperatura (temp.) °C e precipitação (prec.) em mm.. O (óleo) rendimento em %.

Apêndice 5

Coordenadas dos loadings e escores das Figuras – 2.3.2. e 3.3.1.

	Coordenada loadings Figura - 2.3.2.		Coordenada dos escores Figura - 2.3.2.	
	X	Y	X	Y
β -Elemeno	-0,74	0,54	ve jul/07 ^a	-0,18 -1,06
β -Cariofileno	-0,75	-0,03	ve jul/07 ^a	-0,70 -0,23
Germacreno-D	-0,85	0,46	ve jul/07 ^b	-1,66 -0,24
δ -Selineno	0,48	0,50	ve jul/07 ^b	-1,42 -0,54
Curzereno	-0,88	0,26	ve jul/07 ^b	-1,38 -0,51
Germacreno A	-0,83	0,46	ve jul/07 ^b	-1,79 -0,37
Germacreno B	-0,46	-0,59	ve jul/07 ^b	-1,79 -0,44
EspatulenoI	0,61	-0,17	vc jul/07 ^a	-3,13 3,26
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,93	0,31	vc jul/07 ^a	-2,53 2,69
Atractilona	-0,53	-0,65	aa nov/07 ^c	-1,13 -1,29
Germacrona	-0,42	-0,35	aa jul/07 ^c	-0,66 -1,53
Epóxido de selina -1-3-7(11)-trien-8-ona	0,96	0,21	r jul/07 ^c	-0,88 -2,17
			r jul/07 ^c	-1,36 -0,77
			va Jun/02 ^d	4,80 -0,49
			va Jun/03 ^d	4,65 -0,33
			va jun07 ^b	3,61 0,89
			va jun/07 ^b	2,42 1,85
			va jun/07 ^b	3,13 1,30

Letras na linha: cor do fruto aa=amarelo-alaranjado; va=vermelho-alaranjado; vc=vermelho-claro; ve=vermelho-escuro; r=roxo

Símbolos sobrescritos: a=Goiânia; b=Nova Veneza; c=Santo Antônio de Goiás; d=Anapólis

	Coordenadas dos loadings Figura - 3.3.1.		Coordenadas dos escores Figura - 3.3.1.	
	X	Y	X	Y
Linalool	-0,79	-0,4	3,45	2,02
Espatuleno	-0,81	-0,29	2,93	1,96
Óxido de Cariofileno	-0,52	-0,52	2,01	-0,84
Tujopsan-2 α -ol	-0,68	-0,35	-0,55	0,53
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,06	0,84	-1,26	0,1
Occideno	0,52	-0,51	-2,01	0,49
Epoxido selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	0,78	-0,57	-0,53	-0,18
Sesquiterpeno oxigenado desconhecido	0,66	0,28	-1,59	0,43
			-1,78	1,98
			-1,59	-0,47
			0,33	-0,18
			2,04	1,25
			0,53	1,28
			1,09	1,36
			1,63	0,11
			0,1	1,27
			-1,28	-0,96
			-3,01	-0,58
			-1,05	-0,21
			-1,14	0,44
			-1,72	-0,05
			-1,73	-1,13
			0,77	-2,78
			3,54	-3,32
			0,83	-2,52

