FURG

Dissertação de Mestrado

“ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE MULTIVARIADA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrocarpus frondosus*”

Diego da Costa Cabrera

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

“ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE MULTIVARIADA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrocarpus frondosus*”

por

DIEGO DA COSTA CABRERA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

"ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE MULTIVARIADA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrocarpus frondosus*"

elaborada por

DIEGO DA COSTA CABRERA

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Prof. Dr[a]. Neusa Fernandes de Moura (Presidente/Orientador) FURG

_____
Prof. Dr. Gilber Ricardo Rosa (Membro/ Co-orientador) FURG

_____
Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur (Membro) Univates

_____
Prof. Dr[a]. Vânia Rodrigues Lima (Membro) FURG

Rio Grande, 6 de Setembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **FURG**, **EQA** e ao **PPGQTA** pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e auxilio no desenvolvimento do mestrado.

A minha orientadora **Prof[a]. Dr[a]. Neusa Fernandes de Moura**, pela confiança , amizade, oportunidade de realização deste trabalho e dedicação desde os primeiros momentos.

Ao **Prof. Dr. Gilber Ricardo Rosa** que, como co-orientador e banca de qualificação e defesa, contribuiu intensamente.

A **Prof[a]. Dr[a]. Vânia Rodrigues Lima**, pelas contribuições como banca de qualificação e defesa, além da amizade e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur** por aceitar o convite como banca e pelas sugestões e contribuições.

Aos professores da FURG/SAP, os quais me deram grande apoio no inicio do projeto, em especial ao **Fábio Gonçalves**, **Fernando Kokubun**, **Francine Antelo**, **Carlos Peixoto** e **Cristiano Gariboti**. E também aos colegas da FURG/SAP **Fernanda**, **Andréa**, **Lenise**, **Márcia** e a estagiaria **Samanda**, pela amizade e colaborações no período em que morei em Santo Antônio da Patrulha.

Aos professores da UFRR **Adriana Flach** e **Luiz Antônio da Costa** pelo treinamento, e colaboração na identificação química do óleo essencial.

Aos colegas do grupo de pesquisa GPPN, pela amizade e cooperação em especial **Greizi**, **Sara**, **Chica**, **Joemir**, **Hortência** e o **Nicolas** que me disponibilizou as amostras de cabreúva.

Aos colegas do PPGQTA que compartilharam conhecimentos e dúvidas e aos professores que contribuíram em minha formação.

A minha família: **Ira (mãe)** e **Homero (pai)**, **Liziara (irmã)**, **Paula (sobrinha)** e **Tia Lane (dinda)**, que sempre me apóiam e motivam em todas as minhas escolhas, principalmente meus pais que me deram o primeiro kit de química e minha irmã que sempre em inspirou. A **Renata** pela companhia, carinho, paciência e por me emprestar o material para seleção do mestrado. E agradeço ao meu filho **Caetano**, o qual amo muito e dedico tudo que faço.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE GRAFICOS viii
LISTA DE GRAFICOS viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ix
RESUMO xi
ABSTRACT xii
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DA LITERATURA 4
2.1. Óleo essencial 4
2.2. Importância econômica dos óleos essenciais 5
2.3. Biossíntese - terpenos 7
2.4. Fatores que influenciam a produção de óleos essenciais 13
2.5. Descrição botânica 18
2.6. Técnicas de extração 23
2.7. Técnicas de análise cromatográfica 24
2.8. Análise estatística 26
2.9. Atividade antioxidante 28
3. MATERIAIS E MÉTODOS 30
3.1. Equipamentos 30
3.2. Vidrarias 30
3.3. Reagentes 31
3.4. Coleta 32
3.5. Extração 33
3.6. Análise cromatográfica 34
3.7. Análise de atividade antioxidante 36
3.8. Dados climáticos 37
3.9. Análise estatística 38
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 39
4.1. Rendimento e dados metereológicos 39
4.2. Relações observadas entre o rendimento e dados metereológicos 41
4.3. Caracterização do óleo essencial 45
4.4. Características específicas de cada matriz 47
4.5. Relações entre as matrizes 62
4.6. Relações observadas na composição química do óleo essencial 64
4.7. Relações entre monoterpenos 66
4.8. Relação entre sesquiterpenos 68
4.9. Atividade Antioxidante 72
4.10. Relações observadas com a análise de atividade antioxidante 75
5. CONCLUSÕES 78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diterpenos isolados de *M. frondosus* 2
Figura 2. Esquema da biossíntese de metabólitos secundários..... 8
Figura 3. Rota Biossintética do ácido mevalônico 10
Figura 4. Rota biossintética do DXP..... 11
Figura 5. Formação de terpenos 12
Figura 6. Principais fatores que podem exercer influência no teor de metabólitos secundários..... 14
Figura 7. Distribuição de *Myrocarpus frondosus* no Brasil 20
Figura 8. Compostos extraídos da madeira da cabreúva..... 22
Figura 9. Diterpenos isolados das raízes da cabreúva..... 22
Figura 10. Redução do radical livre DPPH..... 29
Figura 11. Redução do pelo método FRAP..... 29
Figura 12. Localização das matrizes de Cabreúva, M1, M2 e M3..... 32
Figura 13. Fotos das árvores de cabreúva..... 33
Figura 14. Extração do óleo essencial. 34
Figura 15. Análise de componentes principais do rendimento óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais. 44
Figura 16. Estrutura dos monoterpenos, do propanoato de ciclohexila e do cis butanoato de hexenila detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.* 46
Figura 17. Estrutura dos sesquiterpenos e da 1-fenil-heptanona-3 detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.* 47
Figura 18. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*. 51
Figura 19. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus* 55
Figura 20. Análise de componentes principais dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus* 56
Figura 21. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus.* 60
Figura 22. Análise de componentes principais dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus.* 61
Figura 23. Análise de componentes principais entre os compostos de maior incidência de todas as matrizes e as estações do ano 66
Figura 24. Biossíntese de monoterpenos detectados no óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus.* 68
Figura 25. Biossíntese de sesquiterpenos detectados no óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 71
Figura 26. Mecanismo antioxidante do γ-terpineno 74
Figura 27. Análise de componentes principais entre os compostos detectados e a atividade antioxidante no óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus* 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos detectados em diversos óleos essenciais. 5
Tabela 2. Condições de análise cromatográfica CG-EM 35
Tabela 3. Condições de análise cromatográfica CG-DIC..... 36
Tabela 4. Rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus*. 40
Tabela 5. Dados Ambientais observados no período de desenvolvimento do trabalho 40
Tabela 6. Matriz de correlação de Pearson do rendimento óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais. 44
Tabela 7. Compostos detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.* 45
Tabela 8. Composição química do óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*. 49
Tabela 9. Matriz da correlação de Pearson para os compostos de maior incidência do óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*. 52
Tabela 10. Composição química do óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus*. 53
Tabela 11. Composição química do óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus*. 58
Tabela 12. Matriz da correlação de Pearson para os monoterpenos de maior incidência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*... 67
Tabela 13. Matriz da correlação de Pearson para os sesquiterpenos de maior incidência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*... 69
Tabela 14. Atividade antioxidante ao DPPH do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 72
Tabela 15. Atividade antioxidante ao FRAP do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 73
Tabela 16. Atividade antioxidante de diversas espécies vegetais pelos métodos DPPH e FRAP 74
Tabela 17. Matriz de correlação de Pearson da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais. 76

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1: Dados de exportação do comércio de óleos essenciais, resinóides, sub-produtos de terpenóides e etc no período de 2008-2011 6
Gráfico 2: Crescimento da exportação mundial do comércio de óleos essenciais, resinóides, sub-produtos de terpenóides e etc no período de 2001-2011 7
Gráfico 3: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a temperatura ambiente. 41
Gráfico 4: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a precipitação. 42
Gráfico 5: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a Radiação Solar. 43
Gráfico 6: Composição química do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 62
Gráfico 7: Compostos de maior ocorrência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 63
Gráfico 8: Relação entre monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*. 65
Gráfico 9: Relação entre a concentração dos monoterpenos mirceno, limoneno e terpinenol- 4 do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*... 67
Gráfico 10: Relação entre a concentração dos sesquiterpenos β-cariofileno e o D-germacreno do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.. 69
Gráfico 11: Relação entre atividade antioxidante do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais. 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AA%, concentração de atividade antioxidante em %
2. Abr, Abril
3. ACP, análise de componentes principais
4. Ago, agosto
5. ATP, adenosina trifosfato
6. Dez, dezembro
7. DMAPP, difosfato de dimetilalilo
8. DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
9. DXP, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
10. Fev, fevereiro
11. FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*
12. GAP, D-gliceraldeído-3-fosfato
13. GC-DIC, cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
14. GCxGC-ToF, cromatografia gasosa bidimensional com detector por tempo de vôo, do inglês *two-dimensional gas chromatography - time*-of-*flight* mass spectrometry
15. GC-EM, cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massas
16. HMG-CoA , β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA
17. HS-SPME, do inglês *headspace* solid phase *microextraction method*
18. IK, índice de Kovats
19. INMET, Instituto Nacional de Meteorologia
20. IPP, pirofosfato de isopentilo
21. ISO, do inglês *International Organization for Standardization*
22. ITC, Centro de Comércio Internacional ,do inglês *International Trade Centre*
23. IR, índice de retenção
24. IRL, índice de retenção da literatura
25. Jan, janeiro
26. Jun, junho
27. Jul, julho
28. Mai, maio
29. Mar, março
30. M1, matriz de cabreúva 1
31. M2, matriz de cabreúva 2
32. M3, matriz de cabreúva 3
33. MVA, ácido mevalônico

34. NADPH, nicotinamida-adenina-difosfato
35. N.D, não detectado
36. Nov, novembro
37. NPK, nitrogênio, fósforo e potássio
38. Out, outubro
39. PREC, precipitação
40. TPP, coenzima difosfato de tiamina
41. RAD, radiação solar
42. REND 1, rendimento matriz 1
43. REND 2, rendimento matriz 2
44. REND 3, rendimento matriz 3
45. RI, do inglês *retention index*
46. $RI_{(x)}$, índice de retenção do composto X
47. $RT_{(X)}$,tempo de retenção de X
48. $RT_{(Z)}$, tempo de retenção de Z
49. Set, setembro
50. TEMP, temperatura
51. UV, radiação ultravioleta
52. Vis, radiação visível
53. X ,composto desconhecido
54. Z, número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos antes de X
55. Z+1, número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos depois de X

RESUMO

Título: "ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISE MULTIVARIADA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrocarpus frondosus*"

Autor: Diego da Costa Cabrera

Orientador: Prof. Dr. Neusa Fernandes de Moura

A espécie *Myrocarpus frondosus* é nativa da região sul do Brasil, onde é conhecida como cabreúva. É uma árvore de grande porte, e sua madeira é utilizada como reservatório de bebidas destiladas, principalmente a cachaça. Na medicina popular a espécie é utilizada no tratamento de varizes. Neste trabalho pioneiro, o óleo essencial foi extraído das folhas de três árvores de cabreúva, mensalmente no período de um ano. A determinação da composição química foi realizada através das técnicas cromatográficas CG-DIC e GC-EM, identificando trinta e cinco compostos no óleo essencial, sendo o β-pineno, biciclogermacreno e D-germacreno os terpenos majoritários. O rendimento do óleo, extraído por hidrodestilação, foi diretamente proporcional à temperatura ambiente e à radiação solar na maioria dos períodos. A espécie *M. frondosus* apresentou o máximo de 66,91% de atividade antioxidante para concentração 250 µg/mL do óleo essencial, utilizando o método do DPPH, e máximo de 1660,74 µM $FeSO_4$/g de óleo essencial pelo método FRAP, e os compostos β-cariofileno, α-humuleno, D-germacreno e biciclogermacreno apresentaram maior relação com essa atividade.

ABSTRACT

Title: "CHEMICAL STUDY, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND MULTIVARIATE ANALYSIS OF THE ESSENTIAL OIL OF *Myrocarpus frondosus*"

Author: Diego da Costa Cabrera
Advisor: Prof. Dr. Neusa Fernandes de Moura

The specie *Myrocarpus frondosus* is native from the southern of Brazil, and it is popularly known as "cabreúva". The cabreúva is a large tree, and its wood is used as reservoir of distilled spirits, especially the Cachaça. In the popular medicine, the specie is used in the treatment of varicose veins. In this pioneer work, the essential oil was extracted from the leaves of three cabreúva trees, monthly, during one year. The determination of the essential oil composition was performed by GC-FID and GC-MS, identifying thirty-five compounds in the essential oil: β-pinene, germacrene-D and bicyclogermacrene are the majority terpenes. The yield of the oil extracted by hydrodistillation was directly proportional to temperature and solar radiation in most periods. The specie *M. frondosus* showed a maximum antioxidant activity of 66.91% for 250 µg/mL of essential oil, using the DPPH method, and a maximum of 1660.74 µM $FeSO_4$/g of essential oil detected by FRAP method, which may be attributed to β-caryophyllene, α-humulene, germacrene-D and bicyclogermacrene.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos referentes à química dos produtos naturais são de grande importância, tanto para a compreensão da biodiversidade vegetal, como tanto para o conhecimento dos caminhos da evolução. No passado, os produtos naturais eram considerados apenas como produtos de "refugo metabólico". Atualmente, essas micromoléculas (para se diferenciar das macromoléculas como proteínas e genes) são muito estudadas por sua complexa interação planta-inseto, despertando o interesse para diversos estudos. A interação dinâmica entre os metabólitos secundários e o ambiente faz com que esses representem a comunicação das plantas com o meio externo, relacionada diretamente com a evolução da espécie.[1]

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais, fornecendo modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas. Assim, também auxiliam na construção de novas rotas sintéticas, baseadas em compostos naturais.[2]

Os óleos essenciais estão incluídos entre os principais constituintes de uma espécie vegetal, sendo esses considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários. Também constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e afins.[3] Esta matéria prima, como outras de origem vegetal, reativaram interesses sociais e econômicos nos últimos anos, como importantes fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas.[2]

A composição química de um óleo essencial pode ser influenciada por fatores genéticos, climáticos e edáficos (inerentes ao solo), resultado este observado na diversificação de compostos encontrados nos óleos essenciais.[3] Segundo Nascimento e colaboradores,[4] ao longo do dia observa-se que o aroma peculiar a cada espécie torna-se mais acentuado, levando-se a conclusão de que a concentração de compostos voláteis seja maior em horários específicos e, assim, mais intenso o aroma.

Dessa forma, o horário de colheita do material pode ser um aspecto relevante na produção de óleos essenciais.

Observa-se que, as plantas aromáticas popularmente utilizadas, encontram-se próximas ao estado silvestre (ocorrem de forma espontânea), e mantém forte interação com o ambiente.[3] Assim, a análise da biodiversidade local é importante para obtenção de informações de espécies silvestres e seu potencial químico, em busca de matéria-prima no mercado de óleos essenciais.[5]

A espécie em estudo, *Myrocarpus frondosus*, nativa do sul do Brasil, está distribuída entre o sudoeste do Paraguai, norte da Argentina, e no Brasil do interior do estado de São Paulo ocorrendo até Porto Alegre. Os representantes de *Myrocarpus* geralmente são árvores de grande porte com os indivíduos ultrapassando 20 m de altura. Os nomes populares para *Myrocarpus frondosus* no Brasil são: cabreúva, óleo-pardo, recoleta, brahuma, brahuma-parda, caboretinga e cabore,[6] cabreúva-parda, cabriúna, cabreúva-amarela, bálsamo, caburé, pau-bálsamo, cabrué, quina-morada, caborida, caburéida, jataúba, pau-de-óleo-verdadeiro ou caboreíba.[7] Da espécie *Myrocarpus frondosus* foram isolados terpenos (Figura 1) e flavonóides das cascas das raízes. Alguns diterpenos isolados mostram-se ativos frente a células cancerosas do ovário e pulmão.[8]

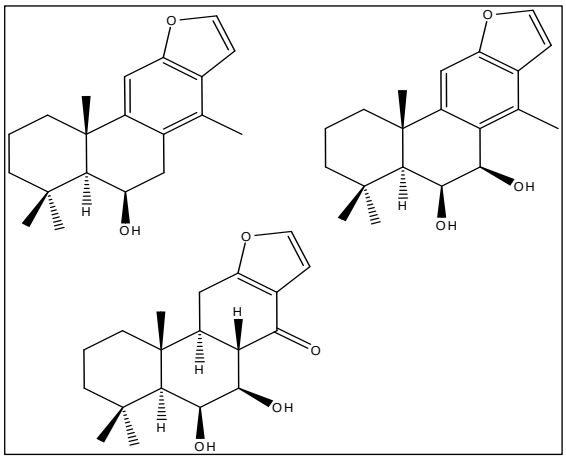


Figura 1. Diterpenos isolados de *M. frondosus*

Estudos sobre óleos essenciais, comumente extraídos das folhas, são encontrados na literatura,[2,3] mas até o momento não há relatos sobre a composição química de óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus*. Informações sobre o

efeito de condições ambientais no metabolismo secundário de plantas são de grande importância para o manejo da espécie e a maximização dos compostos bioativos presentes.[3] Sendo assim, o trabalho visa a caracterização fitoquímica, a atividade antioxidante e análise multivariada do óleo essencial das folhas do *Myrocarpus frondosus* (cabreúva).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Óleo essencial

Os óleos essenciais são definidos pela ISO (Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*) como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água. São substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríferas, que se diferenciam dos óleos fixos (geralmente extraídos de sementes) por sua volatilidade. Devido a seu odor agradável e intenso também podem ser chamados de essências. São solúveis em solventes orgânicos apolares, e em água apresentam pouca solubilidade, mas o suficiente para aromatiza-lá.[9] Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários, principalmente de terpenos,[3,10] como os monoterpenos (com 10 átomos de carbono) e sesquiterpenos (com 15 átomos de carbonos). [9,11]

A composição especifica de cada óleo essencial lhe atribui algumas propriedades físico-químicas características. Assim a diferença no aroma está relacionada diretamente com a variação da composição de seus constituintes.[12]

Há relatos sobre o uso de ervas aromáticas na forma de especiarias, óleos e resinas, em varias civilizações como os egípcios, chineses, indianos, gregos e romanos. Essas plantas geralmente atuam como antisséptico, agentes anti-infecciosos, propiciando aroma a perfumes e cosméticos, e como flavorizantes em alimentos e bebidas.[13,14]

O armazenamento de óleo essencial nos vegetais pode ocorrer em diversos órgãos, como nas flores, frutos, sementes, caules, raízes, rizomas e principalmente folhas. A composição química do óleo pode variar de acordo com o órgão e o estágio de desenvolvimento da planta.[9,10]

A tabela 1 exibe os principais componentes de óleos de diversas espécies vegetais visando demonstrar a variedade da composição química existente nos óleos essenciais.

Tabela 1. Compostos detectados em diversos óleos essenciais.[14]

Óleo Essencial	Componentes Principais
Amêndoa Amarga	Benzaldeído
Bergamota	Bergamiol, limoneno, linalool, α-pineno,γ-terpineno, geranial, neral, geraniol, acetato de nerilo, acetato de geranilo, e bergapteno
Casca da Canela	Cinaldeído, acetato de cinamilo, eugenol, cariofileno, linalool, e α-Terpineol
Cravo da Índia	Eugenol, cariofileno, acetato eugenilo e α-humuleno
Semente de Coentro	Linalol, γ-terpineno, cânfora, α-pineno, p-cimeno, limoneno e acetato geranilo
Limão	Limoneno, β-pineno, γ-terpineno, geranial, neral, acetato geranilo, acetato nerilo, citronelal, linalol e nonanal
Lima (destilada)	Limoneno, β-pineno, γ-terpineno, terpinoleno, p-cimeno, 1,4 eucaliptol e 1,8 eucaliptol
Casca da laranja (doce)	Limoneno, mirceno, decanal, octanal, linalool, citronelal, neral, geranial, valenceno, α-sinensal e β-sinensal
Óleo de Rosa	Citronelol, geraniol, nonadecano, nerol, metil eugenol, acetato geranilo, eugenol, efenil etanol e óxido de rosa
Óleo de Hortelã	l-carvona, limoneno, mirceno, 1,8 eucaliptol, acetato de carvil, acetato dihidrocarvil, dihidrocarveol, octanol-3, e cis-jasmona.
Anis estrelada	Trans-Anetol, limoneno, anisaldeído, linalool e metil cavicol
Ylang ylang	D-germacreno, linalool, α-farneseno, acetato de benzila, α-cariofileno, acetato garanilo, benzoato de metila e salicicato de benzila e acetato de eugenila
Eucalipto	1,8 eucaliptol, α-pineno, p-cimeno e limoneno

2.2. Importância econômica dos óleos essenciais

Historicamente, as ervas e especiarias apresentam um papel importante na indústria e no comércio mundial. O estudo de óleos essenciais teve uma melhoria significativa no início do século XIX, visto que o desenvolvimento da ciência proporcionou aprimoramento nas técnicas de destilação, processamento, separação e a identificação dos componentes naturais responsáveis pelo sabor e aroma.[14]

Atualmente, o Brasil encontra-se em uma posição promissora com relação ao mercado de óleos essenciais, devido à grande biodiversidade de sua flora. No mercado internacional, a participação brasileira é pequena, e concentrada basicamente na produção de óleos cítricos, subprodutos de derivados da laranja.[10]

Dados do Centro de comércio internacional, ITC (do inglês *International trade centre*) mostram que o Brasil, no mercado de óleos essenciais, resinóides, subprodutos de terpenóides e etc., representa 6% da exportação mundial (2008-2011), estando abaixo apenas de países como Estados Unidos, Índia e França, conforme mostra o gráfico 1. Deste total, os países que mais importam do Brasil são os Estados Unidos, Holanda, Japão e Alemanha. Somente neste período o mercado de exportação brasileiro destes produtos movimentou US$710.496.[15]

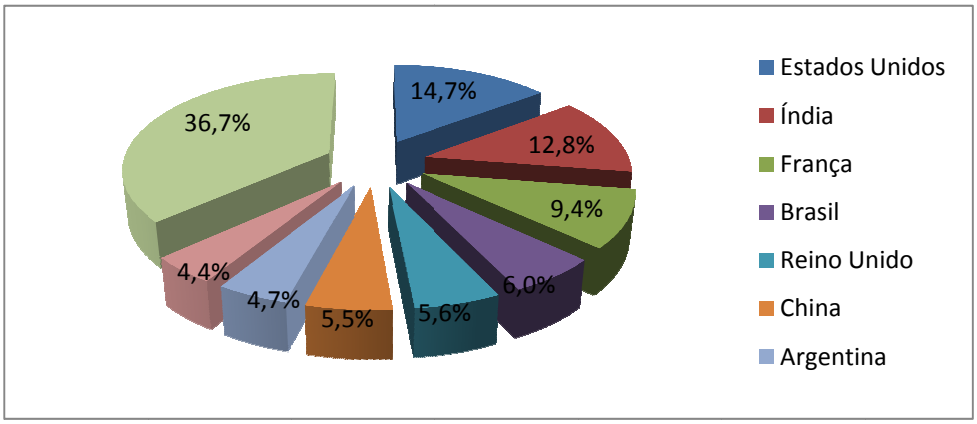


Gráfico 1: Dados de exportação do comércio de óleos essenciais, resinóides, sub-produtos de terpenóides e etc no período de 2008-2011, elaborado conforme dados da ITC.[15]

No comércio mundial desta classe de produtos há um grande crescimento, de modo que, no período de 2001 até 2011, houve um aumento de aproximadamente três vezes o valor exportado mundialmente, conforme mostra o gráfico 2. O ano de 2011 movimentou US$3.615.630 neste âmbito.[15]

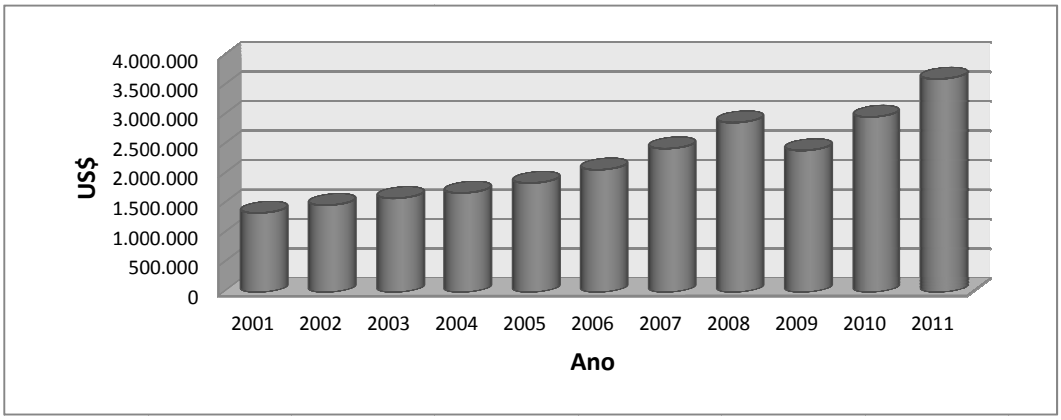


Gráfico 2: Crescimento da exportação mundial do comércio de óleos essenciais, resinóides, sub-produtos de terpenóides e etc no período de 2001-2011, elaborado conforme dados da ITC.[15]

2.3. Biossíntese - terpenos

A vida dos organismos vivos é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas por metabolismos primário e secundário. O metabolismo primário fornece as substâncias envolvidas nas funções básicas essenciais da vida celular, assumindo grande importância no crescimento e rendimento agrícola. Os metabólitos secundários são específicos das espécies, contribuem com aromas, cores e atuam em processos de polinização. Também contribuem para a resistência dos organismos pela defesa contra pestes e outras doenças, assim estabelecem ajustes necessários para a convivência e sobrevivência ambiental.[2] Esses metabólitos protegem as plantas de insetos, stresses ambientais, microorganismos e até herbívoros.[11]

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida através da glicólise, por via de dois intermediários, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina a maioria dos metabólitos secundários aromáticos. A rota do acetato (através da acetil-Coenzima A) é precursora de diversas substâncias como aminoácidos alifáticos, esteróides, ácidos graxos, triglicerídeos e terpenos.[9]

Conforme mostra a figura 2, através da glicólise há formação de Gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e Piruvato (ácido pirúvico). A acetil-CoA é formada por

oxidação e descarboxilação do produto da via glicólica (ácido pirúvico) gerando posteriormente o ácido mevalônico (MVA). Há a formação também do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) pela reação do ácido pirúvico e do GAP. Metabólicos como terpenóides e esteróides são biossintetisados através das vias do MVA e do DXP. A acetil-CoA origina outros metabólitos e também participa do ciclo de Krebs.[16]

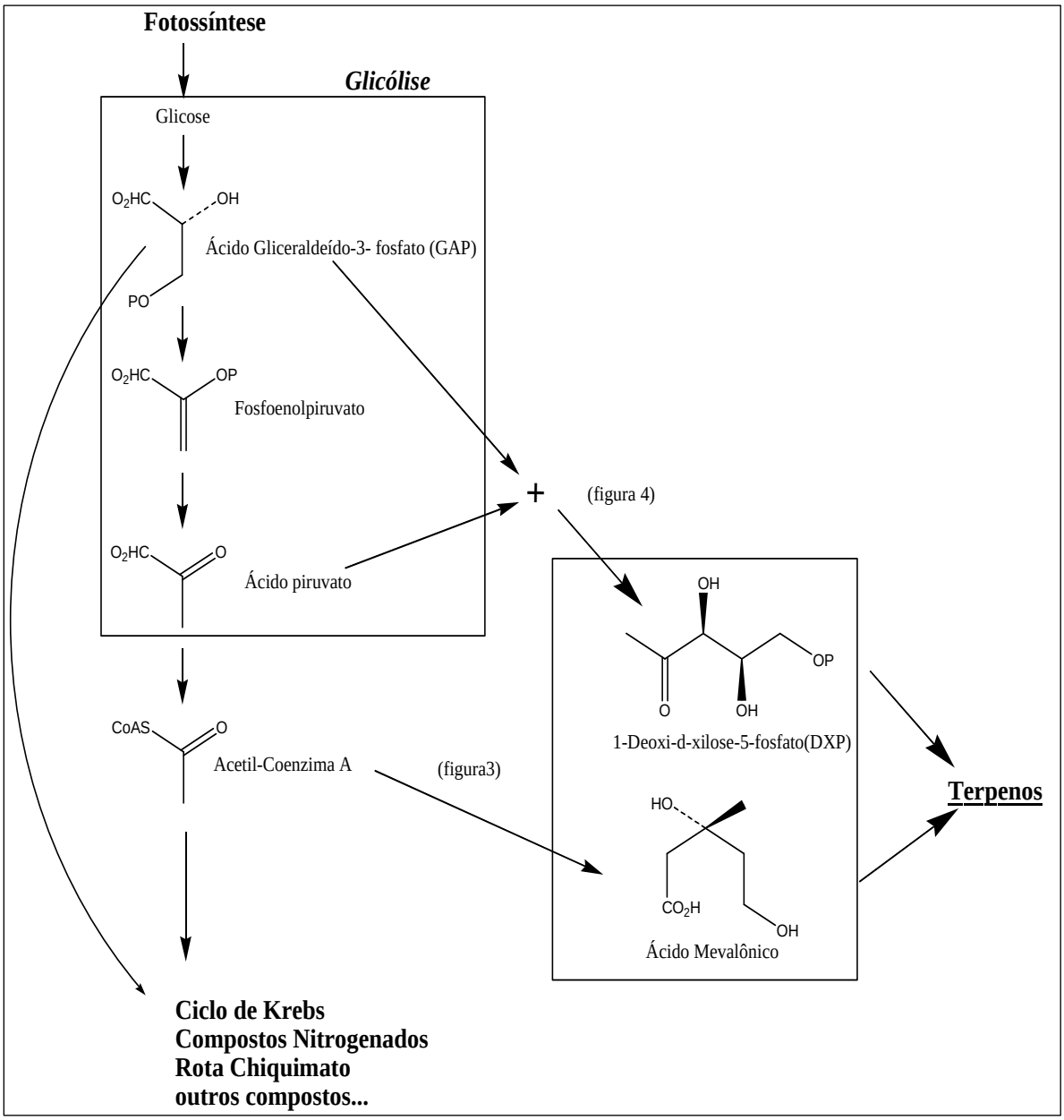


Figura 2. Esquema da biossíntese de metabólitos secundários, adaptado de Dewick[16]

Na rota do ácido mevalônico (MVA) (Figura 3), são utilizadas três moléculas de acetil-CoA. Duas moléculas inicialmente se combinam em uma condensação de Claisen para gerar o acetoacetil-CoA, e uma terceira é incorporada por meio de uma adição aldólica estereoespecífica originando um éster de cadeia ramificada, o β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esta terceira molécula de acetil-CoA está ligada à enzima através de um grupo tiol, sendo esta ligação posteriormente hidrolisada para formar um grupo ácido livre de HMG-CoA. Através da redução grupo tioéster a um álcool primário ocorre à formação do MVA, por intermédio de enzimas HMG-CoA redutase e nicotinamida-adenina-difosfato (NADPH). O isopreno ativo, pirofosfato de isopentilo (IPP), é formado apartir da fosforização sucessiva dos grupos hidroxilas do MVA com auxílio enzimas dependentes da adenosina trifosfato (ATP), resultando no difosfato de ácido mevalônico. Uma terceira molécula de ATP é necessária para tornar a hidroxila um melhor grupo de saída, não há evidencias que esta terceira hidroxila seja fosfatada. No intermediário formado, ocorre a descarboxilação e a eliminação de um grupo pirofosfato. A enzima estereoespecífica IPP-isomerase, remove o próton pro-R (HR) no C-2 desta unidade isoprênica e incorpora um próton de água no C-4. Enquanto a isomerização é reversível, o equilíbrio reside fortemente no lado de difosfato de dimetilalilo (DMAPP). DMAPP possui um bom grupo de saída, o difosfato, e pode produzir através um processo substituição nucleofílica (SN1) um carbocátion alílico que é estabilizado por deslocalização de carga. Em contraste IPP, com a sua dupla ligação terminal é mais fácil de atuar como um nucleófilo, especialmente para o DMAPP (eletrofílico). Essas diferenças na reatividade são à base da biossíntese de terpenos.[16]

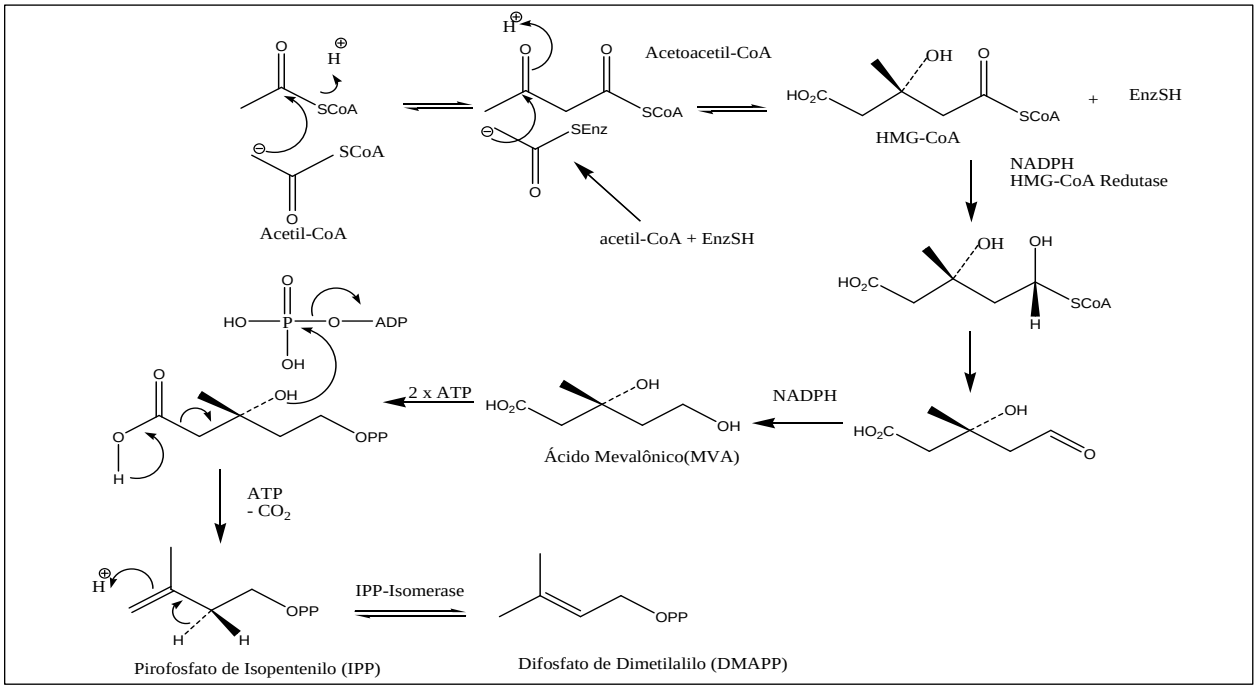


Figura 3. Rota Biossintética do ácido mevalônico, adaptado de Dewick[16]

A formação da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) envolve dois produtos da glicólise, o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP), intermediado pela coenzima difosfato de tiamina (TPP). Esta enzima promove a descarboxilação do ácido pirúvico a piruvato, produzindo o difosfato-hidróxi-etil-tiamina, um acetaldeído ligado na forma de uma enamina, o qual reage com um nucleófilo em uma reação de adição com o D-gliceraldeído-3-fosfato. Por via de um rearranjo tipo pinacol (entre o diol e a carbonila) e redução (NADPH), a DXP é transformada em 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, a qual reage com a citidina trifosfato (CTP) para produzir um derivado de citidina-difosfato, que é então fosforilada através de ATP (por meio de ataque nucleofílico ao difosfato). Este 2-fosfato resultante é convertido num cíclico de fosfoanidrido através da perda de fosfato de citidina. Este ciclofosfato leva a formação do IPP por meio de duas etapas de redução (NADPH) e duas desidratações. DMAPP pode ser então derivado por isomeria de IPP, ou podem ser produzidas de forma independente. Segundo Dewick[16] tanto a formação do IPP e quanto a do DMAPP ainda precisam ser esclarecidas. Esta via para formação de terpenos está presente apenas em plantas, algas e bactérias. Em plantas

especificamente, as duas vias metabólicas (mevalonato ou deoxilulose) podem ocorrer simultaneamente. Acredita-se que nos vegetais as enzimas da via mevalonato ocorrem no citoplasma enquanto as enzimas necessárias para a via deoxilulose são encontradas nos cloroplastos (plastídio que realiza a fotossíntese). Desta forma, triterpenóides, esteróides e alguns sesquiterpenos (produtos citozóicos) são formados da via mevalonato e os demais terpenóides são formados nos cloroplastos, sendo derivados da via deoxi-xilulose.[16] A rota do DXP está representada na figura 4.

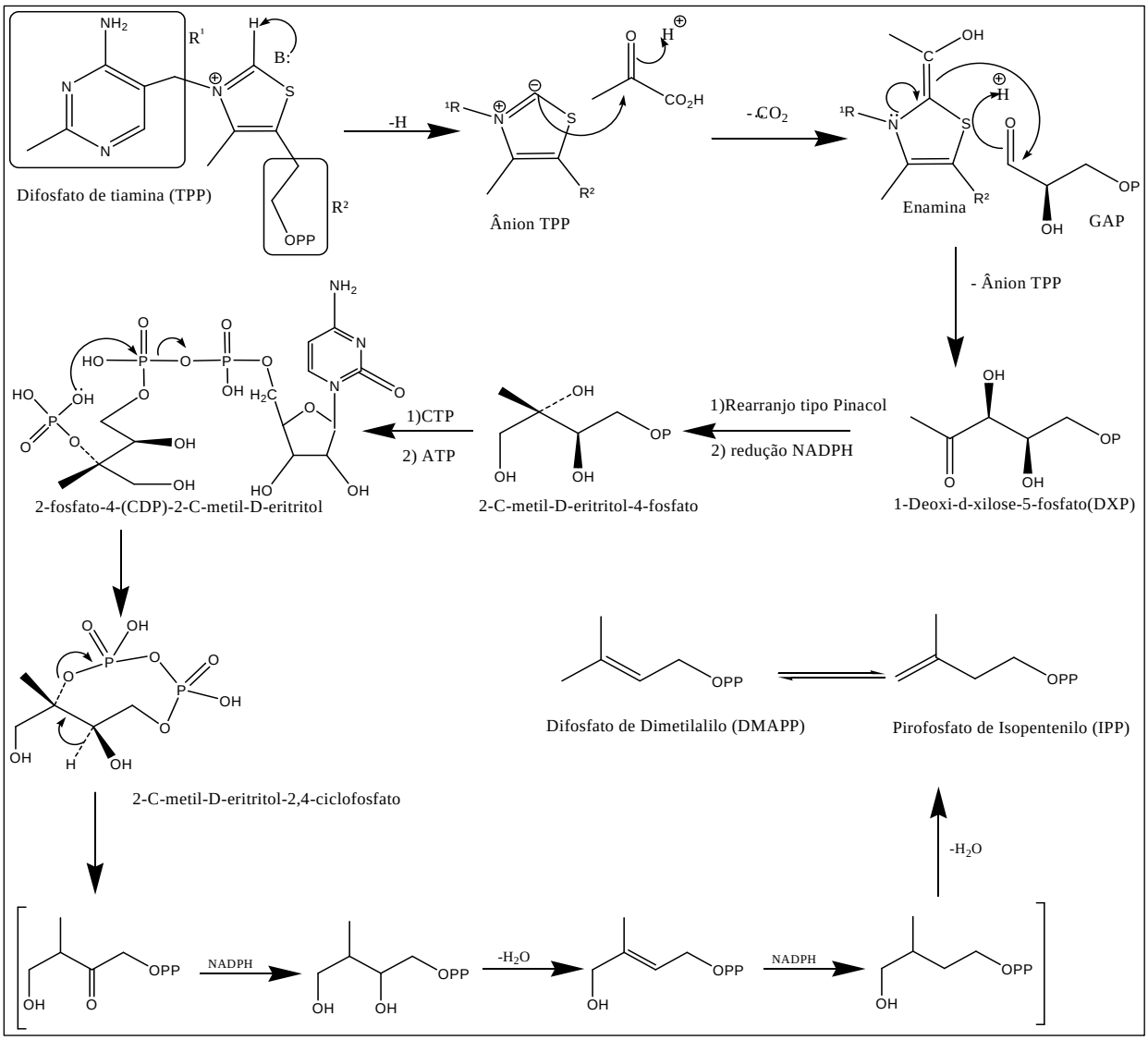


Figura 4. Rota biossintética do DXP, adaptado de Dewick[16]

Os terpenos são classificados a partir da regra do isopreno, ou seja, pelo número de unidades de isopreno (ou hemiterpeno com cinco átomos de carbono). Assim, além dos monoterpenos e sesquiterpenos citados anteriormente, existem diterpenos (com 20 átomos de carbono), com 30 carbonos os triterpenos, 40 carbonos os tetraterpenos, e ainda existem com mais de oito unidades do isopreno que são conhecidos como politerpenos (figura 5).[11]

Isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação destes compostos. O IPP e o DMAPP são os isoprenos bioquimicamente ativos responsáveis pela formação de terpenos. Existem poucos terpenóides naturais formados exatamente ao conceito simples de uma combinação cabeça-cabeça ou cabeça-cauda de unidades de isoprenos bioativos. A maioria dos terpenóides é modificada, ainda mais por meio de reações de ciclização.[16]

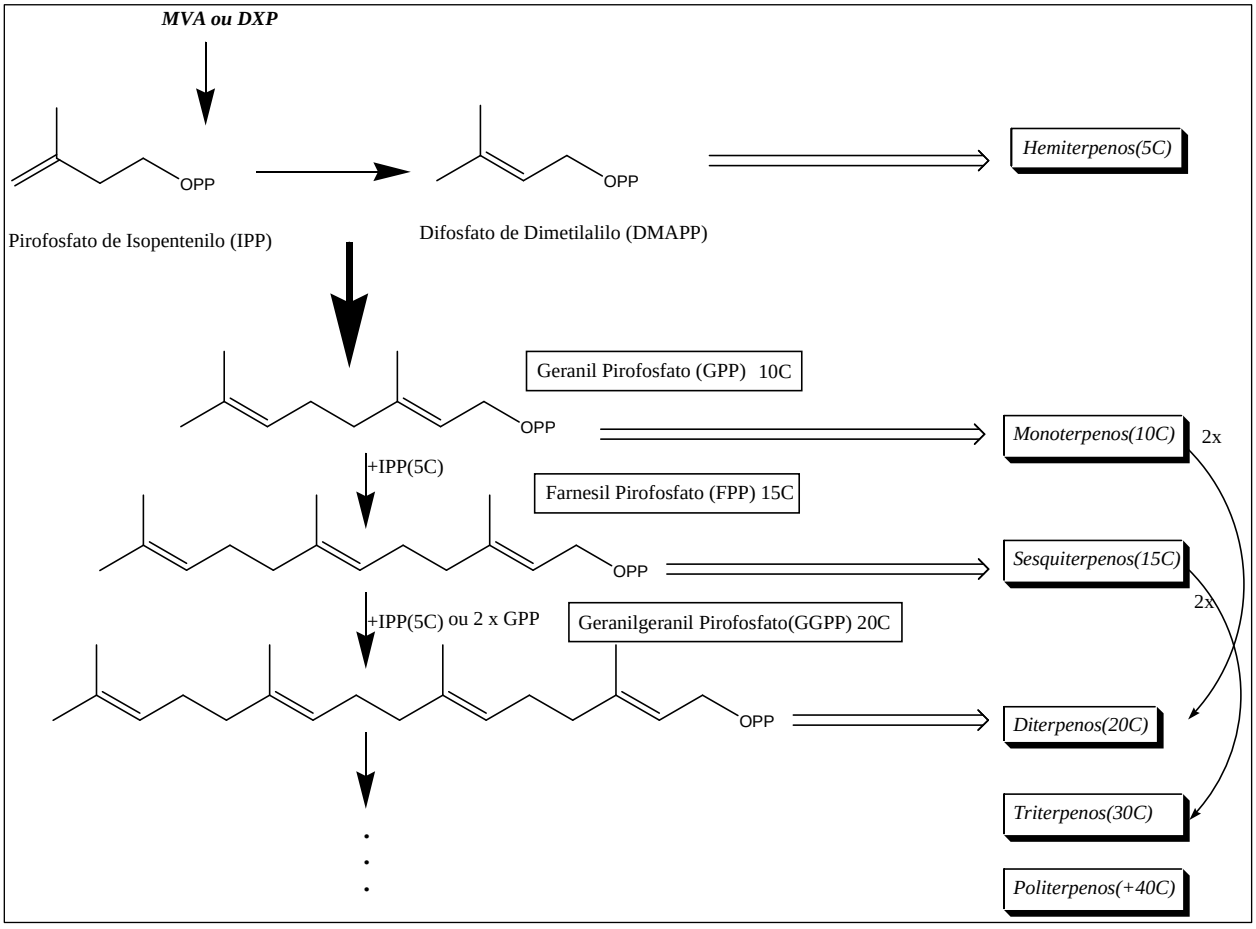


Figura 5. Formação de terpenos, adaptado de Dewick[16]

2.4. Fatores que influenciam a produção de óleos essenciais

A classificação química de espécies vegetais, a quimiotaxonomia, estuda as características químicas, especialmente de metabólitos secundários, com o objetivo categorizar de forma hierárquica os seres vivos.[17] As propriedades biológicas de vegetais estão diretamente relacionadas com a sua composição química, e são afetadas pelas variações ambientais, geográficas e sazonais.[13]

Essas variações dificultam a definição do comportamento de espécies aromáticas, pois afetam o desenvolvimento e o metabolismo secundário de cada espécie. No Brasil, a grande variação climática entre regiões, fornece condições para o cultivo de diversas espécies.[10]

Sendo assim, nos estudos de rotas metabólicas de terpenos, o conhecimento de fatores externos é muito importante, uma vez que a biossíntese vegetal ocorre de acordo com a necessidade de defesa da planta, logo, alguns estímulos decorrentes do ambiente, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos.[3]

O estágio de desenvolvimento vegetal, a temperatura, a umidade relativa, o tempo de exposição ao sol, a pluviosidade, nutrição, exposição a ventos, época e horário de coleta, as interações planta/ microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta, técnicas de colheita e pós–colheita, são alguns fatores que afetam diretamente na composição química em algumas espécies, a figura 6 mostra alguns fatores que podem exercer influencia sobre espécies vegetais. Outro fator observado, desde os primeiro estudos da quimiotaxonomia vegetal, é a variação de plantas relacionadas as características do solo.[9] Também é válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário,[3] como: desenvolvimento e período; índice pluviométrico e período; temperatura e altitude, entre outros.[18]

Geralmente esses estudos são restritos a espécies que ocorrem predominantemente em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes, e podem ter sofrido fortes pressões seletivas antrópicas visando certas

características desejadas. Mas seu comportamento, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat.[18]

Para óleos essenciais de importância econômica reconhecida, o conhecimento das condições de cultivo é fundamental, visando estimular o aumento ou manutenção da produção dos componentes. Em plantas medicinais a variabilidade terpenoídica deve ser considerada como uma questão de alta relevância visto que a droga vegetal é caracterizada pelo teor do princípio ativo que contém.[19] Dewick[16] mostra alguns exemplos como: no oléo de eucalipto, que é caracterizado pela ação antisséptica do eucaliptol; ou no óleo essencial das folhas de capim-limão usado em perfumes pelo odor caracteristico do citral e a ação antisséptica e desinfetante do α-terpineol no óleo essencial de pinho.

Mesmo sabendo que as variações químicas ocorrem de acordo com diversos fatores, a quimiotaxonomia vem fornecendo dados de grande validade para a reestruturação de sistemas de classificação das espécies.[17]

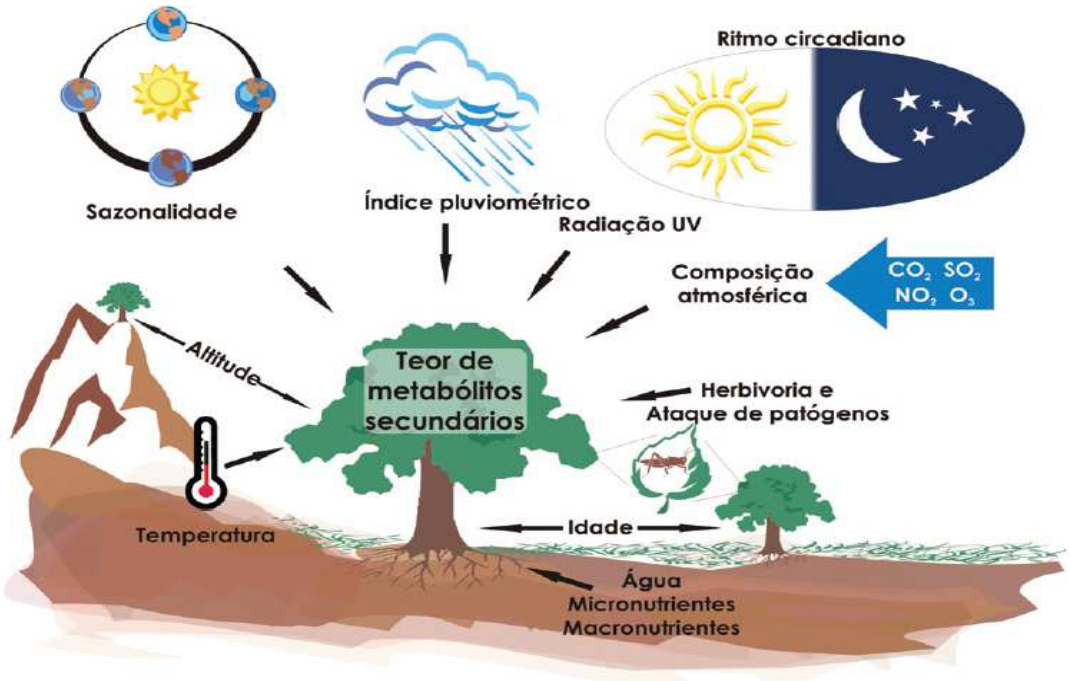


Figura 6. Principais fatores que podem exercer influência no teor de metabólitos secundários, adaptado de Gobbo-Neto e Lopes.[18]

Alguns exemplos da variabilidade de composição química podem ser observadas nas flores de *Matricari recutita L* as quais demonstraram que a composição química é diferente por região e também foi observado uma maior variedade de compostos em práticas agrícolas convencionais.[20]

Do óleo essencial extraído de folhas e flores de *Myrcia salzmannii* Berg, foi observado influências relacionadas à temperatura e precipitação em determinados compostos. O α-pineno, cariofileno e o α-humuleno apresentaram concentração semelhante no inverno (época de chuvas) e no verão, mas compostos não identificados com IK (índice de Kovats, conforme a equação 2 página 25) de 1582, 1586 e 1602 apresentaram quase o dobro da média da concentração no verão. Também é possível observar que o óleo extraído das flores apresentou maior variedade de compostos.[21] Das folhas, frutos e caule de *Pseudoxandra cuspidata* foi extraído óleo essencial e se observou diferença tanto qualitativa como quantitativa dos compostos majoritários.[22] O mesmo comportamento ocorreu para o óleo essencial de folhas e galhos de *Ocotea puberula*[23] demonstrando assim diferença de óleos extraídos de órgãos diferentes da mesma espécie.

Num estudo sazonal do óleo essencial de folhas de *Eugenia pyriformis* e análise da composição dos óleos de flores e frutos da mesma espécie situada no estado do Paraná, observou-se variabilidade na composição do óleo extraído das folhas, devido as variações climáticas. A fração monoterpênica foi predominante, exceto nos meses de dezembro, abril e outubro de 2006. Também foi possível observar que amostras do mesmo mês coletadas em um ano diferente demonstraram variações como em outubro de 2005 o teor de monoterpenos era 60,7%, um ano depois foi 12,3%. Em dezembro de 2005 a fração monoterpênica representava 43,8% em dezembro de 2006 foi de 11,3%, o autor relata a influencia de diversas variáveis ambientais para explicar o fato observado. Também foi possível visualizar diferença na composição do óleo de diferentes partes do vegetal (folhas, flores e frutos), sendo que alguns compostos apresentaram característicos em todas as amostras: terpinenol-4, α-terpineol, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol e o α-cadinol. O teor de monoterpenos foi maior nas folhas (média de 48,7%) seguindo dos frutos (29,0%) e flores (2,0%).[24]

Da mesma forma, verificando influências relacionadas a partes do vegetal, o óleo essencial extraído de folhas e caule da espécie de *Schefftera heptaphylla* foi possível observar rendimento maior para o óleo das folhas no inverno, e menor para o óleo do caule na primavera.[21] Rosa *et al.*[25] estudou o óleo essencial de *Cymbopogon martinii* avaliando partes do vegetal em horários de coleta diferente. O teor de óleo foi maior nas flores e que o horário da coleta este caso não teve diferença significativa.

Já para a *Andropogum sp.* o horário de coleta foi significativo. Foram coletadas amostras ás 7, 9, 11, 13, 15 e 17 h, e foi verificado que o rendimento do óleo essencial foi maior nos períodos de corte das 7 h até as 11 h. Também foi observado que a concentração de citral, presente no óleo essencial, foi menor no período neste período.[4] Para o óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris*, Tininis *et al.,*[26] coletaram material vegetal de 12 indivíduos ao amanhecer (7 h) e a tarde (15 h), também foi observado que no período da tarde há uma maior variedade de compostos majoritários.

Das folhas e galhos de *Trichilia catigua A. Juss* e *Siparuna guianensis Aubl.*, de espécies localizadas em Viçosa-MG, foram extraídos óleos essenciais e realizado a avaliação sazonal. Foi possível observar que ambas espécies não apresentaram variação sazonal na produção de óleo essencial, as folhas das duas espécies apresentaram maior rendimento de óleo. Sendo que a melhor época de colheita, para um manejo sustentável, o outono e inverno.[27]

O teor de óleo e o período foi monitorado do mesmo modo no trabalho de Deschamps *et al.*[28] com o óleo essencial de espécies de menta (*Mentha x piperita* L., *M. suaveolens* Ehrh., *M. spicata* L., *M. aquatica* L. e *M. arvensis* L.) cultivadas na região de Curitiba-PR. Foi possível observar aumento de rendimento de óleos de vegetais coletados durante o verão (janeiro) mais do que os obtidos no inverno (julho). Demonstrando assim a influência das estações do ano sobre as características do óleo essencial. Comportamento observado também no estudo do óleo essencial das folhas de *Hyptis marrubioides*, onde foi acompanhado a composição e o teor em todas as estações do ano, sendo o verão a época com o maior rendimento. E no período do inverno foi observada maior concentração de

compostos majoritários.[29] A comparação entre o óleo essencial de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth) foi possível observar um teor maior de óleo na sacaca branca do que na vermelha.[30]

Mendes *et al*.[31] avaliou o rendimento e composição química do óleo volátil das folhas de *Dalbergia frutescens*, monitorando variáveis climáticas como a temperatura, precipitação, insolação e a nebulosidade num período de um ano. O rendimento sofreu influencia direta com a temperatura e nebulosidade, e inversa com a precipitação e nenhuma com a insolação. Já na composição química foi possível caracterizar compostos majoritários por estações do ano.

Já na avaliação da sazonalidade do óleo essencial de três matrizes de *Heteropyxis natalensis* localizadas no Jardim Botânico de Johanesburgo, houve variação entre a concentração dos compostos majoritários durante o período analisado. No mesmo trabalho foi avaliada a variação geográfica de seis localidades na composição química do óleo essencial, três localidades formaram grupos distintos individuais, devido à composição química majoritária dos óleos extraídos das espécies dessas regiões.[32]

Santos *et al.*[33] estudou a alelopatia (influência de interações entre espécies vegetais, geralmente devido à presença de metabólitos secundários)[34] no óleo essencial de *Cymbopogon citratus,* o rendimento foi maior para espécies cultivadas consorciada com *Achillea millefolium* L., em coletas no período da manhã, em épocas de elevadas temperaturas e umidades.

Avaliando a idade da planta (60 e 135 dias) e tratamento do solo (em relação a NPK), do óleo essencial das partes aéreas de *Hyptis suaveolens* localizadas em Alfenas-MG, houve variação química relacionada aos fatores ambientais, demonstrando que a deficiência de NPK com fator significativo na composição do óleo. Já a idade da planta aliado com a disponibilidade nutricional constituiu um fator mais significante ainda.[35]

2.5. Descrição botânica

Existem diversas famílias de espécies vegetais produtoras de óleos essenciais,[10] neste contexto, o conhecimento sobre as características taxonômicas dos vegetais são de grande importância.

2.5.1 Angiospermas

As angiospermas são um grupo diversificado de plantas com flores e frutos, existem 2.826 gêneros com cerca de 250.000 espécies atuais, sendo no Brasil 31.788 espécies distribuídas por todo território nacional.[36] A cobertura vegetal do planeta está, em sua maior parte, representada por angiospermas, isso mostra o grande poder de adaptação e a diversidade deste grupo. Dentro deste grupo existem plantas fotossintéticas e aclorofiladas, aquáticas de águas doces e salgadas, pequenas ervas e árvores de grande porte, e até plantas carnívoras, mostrando a grande diversidade deste grupo. A dupla fecundação é uma característica marcante nas angiospermas e é um avanço biológico perante as gimnospermas.[37]

2.5.2 Fabaceae

Dentro do grupo das angiospermas está a família das Fabaceae. É a segunda maior família de plantas medicinais, com 490 espécies utilizadas em diversos medicamentos tradicionais. Há também cerca de 290 espécies de Fabaceae relatadas como tóxicas.[38] Dependendo do sistema de classificação, a família das Fabaceae pode ser chamada de Leguminosae, ela engloba desde espécies arbóreas até espécies herbáceas anuais, muitas de grande importância econômica e principalmente alimentar como a soja, o feijão, e também como produtoras de madeiras valiosas. Há cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18 mil espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais, do ponto de vista econômico. Ocorre em todos os habitats do planeta, com exceção das regiões antárticas e árticas, e sendo abundantes em regiões tropicais. No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies. Caracteriza-se com a presença de frutos em forma de vagem, embora haja algumas exceções. A maioria delas utiliza de uma contribuição simbiótica de bactérias (do gênero *Rhizobium*) para a fixação e incorporação do nitrogênio atmosférico.[39,40,41]

Há cerca de 2.722 espécies de Fabaceae no Brasil, alguns exemplos são: *Abarema* Pittier, *Abrus* Adans, *Acacia* Mill, *Aldina* Endl, *Barbieria* DC., *Bocoa* Aubl., *Canavalia* DC., *Chamaecrista* Moench, *Clitoria* L., *Copaifera* L., *Cymbosema* Benth., *Galactia* P.Browne, *Indigofera* L., *Leucaena* Benth., *Luetzelburgia* Harms, *Machaerium* Pers., *Macrolobium* Schreb., *Mimosa* L., *Pithecellobium* Mart., *Pueraria* DC., *Senna* Mill., *Swartzia* Schreb., *Zornia* J.F.Gmel., e a *Myrocarpus* Allemão.[36]

Foram observadas atividades biológicas de óleos e extratos vegetais de extraídos de espécies de Fabaceae. Como o óleo essencial de *Bowdichia virgilioides* Kunt apresentou atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans, Candida guilliermondii, Candida stellatoidea, Micrococcus luteus* e *Trichophyton rubrum.*[42] Produtos extraídos do gênero da *Copaifera* podem atuar com uma droga menos tóxica e com maior eficiência para o combate da doença de Chagas,[43] ou como um substitutivo potencial ao eugenol (o qual é citotóxico) no cimento para tratamento de cáries devido a sua atividade antibacteriana, no caso do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne.[44] A baixa toxicidade deste gênero foi estudada também demonstrando que o óleo essencial de *Copaifera reticulata* Ducke (ou apenas óleo-resina de copaíba) apresenta uma relativa margem segurança no uso em tratamentos terapêuticos.[45]

Também apresentou atividade biológica e possível uso como conservante de carnes o óleo essencial de *Ceratonia siliqua.*[46] E o óleo das folhas *Pterodon emarginatus* Vogel apresentou potencial para o uso em produtos farmacológicos.[47]

Espécies de Fabaceae, com uso medicinal, utilizadas por índios Tapebas foram relatadas por Morais e colaboradores,[48] como a *Amburana cearensis* utilizada com atividade anti-malária, antiprotozoários, antifúngicos e antibacterianos.[49]

2.5.3 Myrocarpus

O gênero *Myrocarpus*, presente na família das Fabaceae, se divide em quatro espécies: *Myrocarpus fastigiatus* Allemão, *Myrocarpus leprosus* Pickel, *Myrocarpus venezuelensis* Rudd e o *Myrocarpus frondosus* Allemão. São espécies nativas que pertencem a família das Fabaceae, as espécies *Myrocarpus fastigiatus* Allemão e *Myrocarpus leprosus* Pickel são endêmicas, se desenvolvendo apenas em

determinadas regiões. A espécie *Myrocarpus fastigiatus Allemao* é distribuída no Nordeste (Pernambuco e Bahia), no Sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro), na Caatinga e na Mata Atlântica. A *Myrocarpus leprosus Pickel* está presente no sudeste (São Paulo) e na Mata Atlântica. A *Myrocarpus venezuelensis* Rudd é de regiões com o Norte (Pará), o Centro-Oeste (Mato grosso) e a Amazônia. A espécie *Myrocarpus frondosus* Allemão é a espécie do gênero o qual é mais distribuída no Brasil (figura 7) e a única na região sul, ocorre no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul).[7, 40,36]

O gênero *Myrocarpus* é um dos principais pertencentes a subfamília *Papilionoideae.* Esta subfamília inclui árvores, arbustos, lianas e ervas, com folhas que podem ser pinadas, trifoliolodas, simples ou subáfilas. As flores são zigomorfas e os frutos podem ser em forma de legumes (vagem), lomentos e sâmaras.[40]

Figura 7. Distribuição de *Myrocarpus frondosus* no Brasil[6]

2.5.4 Cabreúva (*Myrocarpus frondosus*)

A cabreúva como é conhecida a espécie *Myrocarpus frondosus* no sul do Brasil, é uma arvore de 20-30 m de altura com ramos fortemente lenticelados, e tronco que varia de 60-90 cm de diâmetro revestido por casca pouco suberosa de cor pardo-amarelada, folhas compostas e imparipinadas. Inflorescências em racemos auxiliares e terminais cilíndricos com flores de cor branco-creme, as quais florescem nos meses de setembro e outubro. Os frutos são de cor parda do tipo pterocarpo e amadurecem em novembro e dezembro.[7]

A madeira é pesada, com densidade que varia de 0,87-0,89 g/cm^3 , é muito resistente e com grande durabilidade.[40] É também avermelhada, dura[6,50] e de odor doce e floral, proporciona diversas finalidades para seu uso como a fabricação de piso de parquet,[51] como na construção civil (caibros, ripas, vigas, obras externas), vigas para pontes e mourões, fabricação de rodas, móveis, balcões, carrocerias, peças torneadas, lambris, paineis e revestimentos decorativos.[7,40] E também é muito utilizada para confeção de reservatórios (barris) para bebidas destiladas e vinhos, com o objetivo de caracterizar ao produto final seu aroma.[50]

Em alguns casos, é observado alergia ocupacional nas atividades com madeira (em geral doenças respiratórias). Isto também foi observado na manipulação da madeira da cabreúva, que ocasionou uma leve alergia.[51] Di Stasi *et al.*,[52] destacaram, em estudos de árvores nativas e a medicina popular, a espécie *Myrocarpus frondosus* pelo uso como antiflamatório e cicatrizante.

Na literatura, cabreúva é o nome comum de diversas espécies de Fabaceae, o óleo essencial de cabreúva pode ser encontrado como o óleo-pardo (*Myrocarpus frondosus),* óleo vermelho *(Myroxylon peruiferum)* e a cabreúva vermelha (*Myrocarpus fastigiatus)*. Com relação a esses óleos, geralmente extraídos de galhos e resíduos de carpintaria, os componentes majoritários são o nerolidol e o farnesol.[53] Alguns compostos foram extraídos da madeira de *Myrocarpus frondosus* (figura 8)*,* como a nerolidol, farnesol (Naves, 1947 apud Perez, 2005),[8] p-metil-acetofenona , aldeído tetrahidro-Δ3-p-toluil, tetrahidro-Δ3-p-metil-cetofenona (Naves,

1948 apud Perez,2005),[8] α-cadinol (Naves, 1955 apud Perez,2005), [8] e o 1-metil-4-acetil-1-ciclohexeno (Zipei et al, 1988 apud Perez,2005).[8]

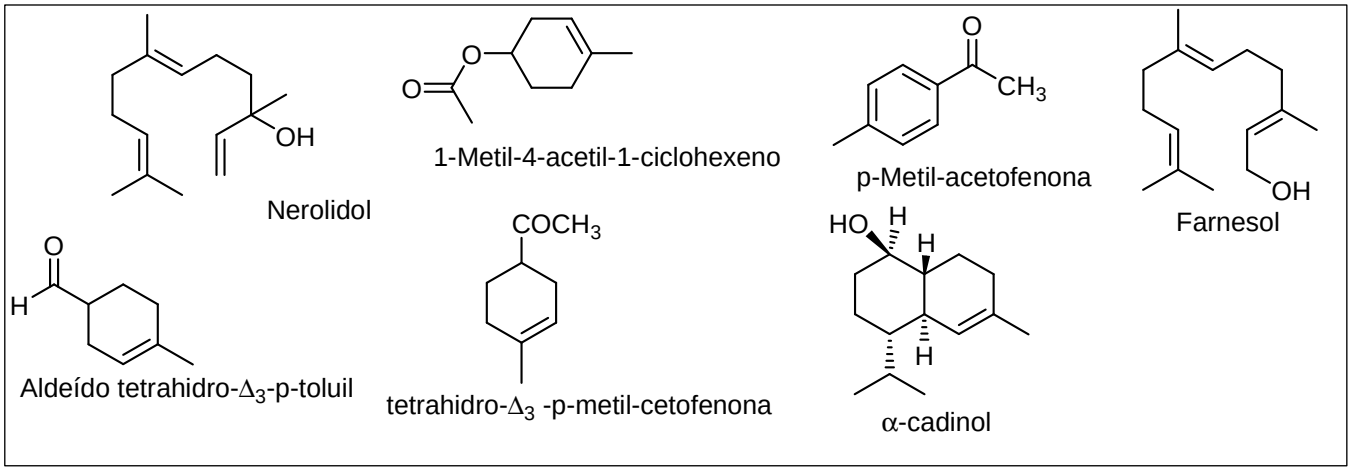


Figura 8. Compostos extraídos da madeira da cabreúva

Perez[8] extraiu diterpenos das raízes da cabreúva estruturas apresentadas na figura 9.

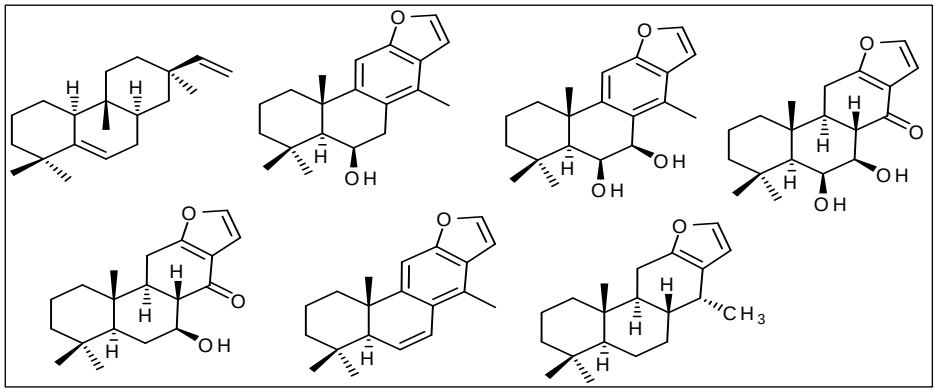


Figura 9. Diterpenos isolados das raízes da cabreúva

2.6. Técnicas de extração

Algumas características, como o órgão no qual se encontra as células secretoras de óleo e valor comercial do produto final, podem indicar qual o melhor método de extração.[10] Óleos essenciais, geralmente são extraídos de plantas destilação por arraste a vapor, e também pela prensagem a frio do pericarpo de frutos cítricos.[10,54] Quando o produto é de alto valor comercial e baixo rendimento, como jasmim, é utilizado a enfleurage (enfloração) e extração com solventes orgânicos. Para óleos de alta volatilidade e instabilidade a altas temperaturas se utiliza a extração por fluído supercrítico (muito utilizado industrialmente, sendo de alto custo).[3] Uma técnica simples e viável e que tem sido utilizada em diversas matrizes volatéis e semi-volatéis é a Microextração em fase sólida com *Head-Space* (HS-SPME, do inglês *headspace solid phase microextraction method*).[55] Essa técnica não é utilizada comercialmente mas é muito útil na identificação de compostos voláteis.[10]

Variáveis relacionadas à extração são muito estudadas. Na extração de terpenos em folhas de espécie de *Perilla frutescens*, através das técnicas de Fluído supercrítico, hidrodestilação e HS-SPME , Huang *et al.,*[56] observaram a mesma composição majoritária, com algumas diferenças como a maior sensibilidade e velocidade na técnica de HS-SPME, quantificação de compostos com maior peso molecular ,como vitaminas, e no maior rendimento na técnica de fluído supercrítico. Na hidrodestilação alguns compostos voláteis não foram detectados devido ao tratamento térmico.

A técnica de hidrodestilação quando comparada a de HS-SPME em raízes de *Rhaponticum acaule L.* demonstrou pouca diferença qualitativa na composição química. As diferenças encontradas são justificadas pelo método de obtenção dos compostos voláteis. HS-SPME é uma técnica muito utilizada para uma rápida e prática caracterização a qual utiliza uma pequena quantidade de amostra, a extração depende da afinidade da fibra com os compostos voláteis. Já a hidrodestilação depende da solubilidade dos compostos em água, perdas por evaporação e na fase aquosa. [57]

Muitos autores, além dos já citados, adotam a técnica de hidrodestilação para a extração de óleos essencias de diversas espécies. Zouari *et al*,[58] utilizaram a hidrodestilação para extração de óleo essencial de flores de *Allium roseum L.* Na extração de óleo volátil da casca de canela de três espécies *(C.cassia, C. verum e C. loureirii)* a técnica de hidrodestilação também foi utilizada.[59] E na extração de outras espécies como *Dalbergia frutescens;*[31] *Malania oleifera*;[60] três espécies de *Thymus* (*Thymus broussonetii, Thymus maroccanus* e *Thymus satureioides*).[61] Estudos da espécie *Matricaria recutita L.*(camomila) também foram utilizados a hidrodestilação.[20,62]

Na hidrodestilação, o material vegetal é aquecido com água e recebe pressão das moléculas de vapor d'água entrando em ebulição. No estado gasoso, os compostos voláteis são arrastados pelas moléculas de água até um resfriador e posteriormente separadas. Em pequena escala o equipamento utilizado é um extrator do tipo clevenger.[10] A hidrodestilação também pode ser utilizada assistida por microondas. Onde o sistema de aquecimento, geralmente são mantas aquecedoras, é substituído por um aparelho de microondas específico ou por um doméstico adaptado resultando menor tempo de extração e maior rendimento.[63] Wang *et al.*,[21] obtiveram redução do tempo de extração utilizando a hidrodestilação assistida por microondas.

2.7. Técnicas de análise cromatográfica

Sendo o valor de mercado do óleo essencial determinado diretamente pela sua composição, a caracterização química é um item importante para a manutenção da qualidade, planejamento de cultivos e obtenção de fitofármacos.[19]

A análise cromatográfica em óleos essenciais visa o controle de qualidade, investigação de adulteração, busca de novos componentes, ou a caracterização das classes químicas de compostos presentes.[55] Para caracterização química qualitativa do óleo essencial utiliza-se cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM),[9,55] a amostra pode ser injetada sem nenhum tratamento prévio. Neste método, a identificação dos compostos é realizada comparando o espectro de massa do composto e seu índice de retenção (IR) com dados presentes na

literatura,[55] sendo utilizado para cromatografia gasosa com temperatura programada (o índice de retenção varia linearmente com a temperatura), o qual é baseado no tempo de retenção de uma série de alcanos saturados de cadeia normal, conforme equação 1.[64]

$$IR_{(X)} = 100Z + 100\left(\frac{TR_X - TR_Z}{TR_{Z+1} - TR_z}\right) \qquad (1)$$

onde ,

X = composto desconhecido

$IR_{(x)}$ = índice de retenção do composto X

Z = número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos antes de X

Z+1 = número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos depois de X

$TR_{(X)}$ = tempo de retenção de X

$TR_{(Z)}$ = tempo de retenção de Z

Alternadamente também pode ser utilizado o índice de Kovats (IK), quando se utilizada a cromatografia gasosa com temperatura a constante (isoterma). Assim são relacionados o número de átomos de carbono dos n-alcanos e o número de átomos de carbono do composto desconhecido com o logaritmo dos tempos de retenção, conforme equação 2.[64]

$$IK_{(X)} = 100Z + 100\left(\frac{logTR_X - logTR_Z}{logTR_{Z+1} - logTR_z}\right) \qquad (2)$$

onde ,

X = composto desconhecido

$IK_{(x)}$ = índice de retenção do composto X

Z = número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos antes de X

Z+1 = número de átomos de carbono dos n-alcanos eluídos depois de X

$TR_{(X)}$ = tempo de retenção de X

$TR_{(Z)}$ = tempo de retenção de Z

Para quantificação destes constituintes, além do espectrômetro de massas, também é utilizado a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC),[9,64] utilizando o método de normalização das áreas dos picos, ou método do 100%. Com o objetivo de ter mais segurança no resultado pode ser usado padrão interno ou adição de padrão para alguns componentes. [9]

A cromatografia bidimensional com detector espectrômetro de massa por tempo de vôo (GCxGC-ToF, do inglês *two-dimensional gas chromatography - time-of-flight* mass spectrometry), é uma técnica pouco utilizada, que tem se destacado por apresentar resultados mais sensíveis na identificação de compostos voláteis.[55] Resultados observados por Petronilho *et al.*[20] na análise de flores de Camomila (*Matricari recutita L*).

2.8. Análise estatística

A análise estatística de dados é fundamental para o estudos de quaisquer processos onde exista variabilidade. Em uma etapa de análise e interpretação dos dados os cálculos de medidas visam descrever o fenômeno observado. O significado exato de cada um dos valores obtidos através do cálculo das várias medidas estatísticas disponíveis deve ser bem interpretado.[65] Afinal, analisar dados significa identificar comportamentos médios, comportamentos discrepantes, comparar comportamentos, resumir a informação contidas nesses dados e assim permitir que as decisões sejam tomadas de forma mais consicente.[66]

Para realizar análises de médias entre amostras do mesmo tamanho, há diversos métodos para comparação, o procedimento mais eficiente proposto é o teste de Tukey.[67,68]

Mas em muitos casos a complexidade de vários fenômenos requerem uma análise de muitas variáveis diferentes.[69] Dentro desse contexto, a análise estátistica multivariada, é um método muito utilizado. Essa técnica é definida pela análise simultanea de múltiplas medidas sobre cada individuo (objeto sob investigação),

qualquer análise simultânea de mais de uma variável de certo modo pode ser considera análise multivariada.[70] De modo geral essas variáveis são correlacionadas entre si, e quanto maior o número de variáveis mais complexa é a análise por métodos univariados.[71]

Atualmente, a vasta quantidade de dados sob diversas áreas do conhecimento, proporciona o uso dessas análises. Técnicas analíticas multivariadas historicamente foram muito utilizadas em trabalhos nas áreas de Psicologia, Ciências Sociais e Biológicas, mais recentemente têm sido utilizadas amplamente em trabalhos relacionados a Química, Física, Geologia, Educação, Engenharias, Ergonomia ,e também em indústrias e governos. O grande avanço da tecnologia computacional e o crescente número de softwares estatísticos com módulos de análise multivariada permitiram a expansão dessas técnicas de análise.[69,70,71]

Na análise de dados multivariados há basicamente dois grupos, o primeiro grupo constituído de técnicas exploratórias de sintetização ou simplificação da estrutura de variabilidade dos dados, como a análise de componentes principais, análise de agrupamento, análise fatorial, correlações, análise discriminante e análise de correspondência. Um segundo grupo é formando por técnicas de inferência é constituído de métodos de estimação de parâmetros, testes de hipótese, análise de variância e covariância, e análises de regressão.[71]

Dentro do grupo de técnicas exploratórias e de sintetização, a matriz de correlação de Pearson é largamente utilizada sendo uma técnica simples e de fácil interpretação das correlações, sendo também a base para a análise de componentes principais. Logo, a análise de componentes principais (ACP) tem destaque, pois tem como objetivo analisar as interrelações entre muitas variáveis e explicar estas utilizando fatores comuns, e tentar condensar as informações obtidas em um menor número de fatores com uma perda mínima de informação. Outra técnica exploratória e de sintetização muito utilizada é a análise de agrupamento, onde é possivel visualisar, através de um dendrograma, a formação de agrupamentos aproximados e grupos atipicos.[70]

2.9. Atividade antioxidante

Existe uma grande procura por substâncias que possam prevenir ou combater doenças patológicas relacionadas ao estresse oxidativo, como exemplo o café que possui constituintes potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. A explicação estaria nos numerosos antioxidantes presentes na bebida.[72]

A atividade antioxidante está diretamente relacionada à capacidade de um composto de inibir a degradação oxidativa. Muitos alimentos e bebidas tem seu benefício à saúde justificado por esta propriedade.[73]

Na indústria alimentícia muitos aditivos antioxidantes são utilizados com a finalidade de evitar a oxidação de lipídeos, sem esses aditivos ocorre a formação de sabores e de compostos químicos indesejáveis.[74]

2.9.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Com o objetivo de identificar e isolar possíveis compostos que possuam atividade antioxidante,[75] um método que é popularmente utilizado é do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).[76]

Neste método a amostra reage com o reagente DPPH onde é monitorada, por métodos espectroscópicos na região do visível, há diminuição de absorbância conforme a redução com o radical livre DPPH.[74] O DPPH é um radical livre estável, em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. A reação de redução é observada pela variação de coloração, do violeta ao violeta-claro ou amarelo (forma reduzida), conforme a equação química apresentada na figura 10.[76]

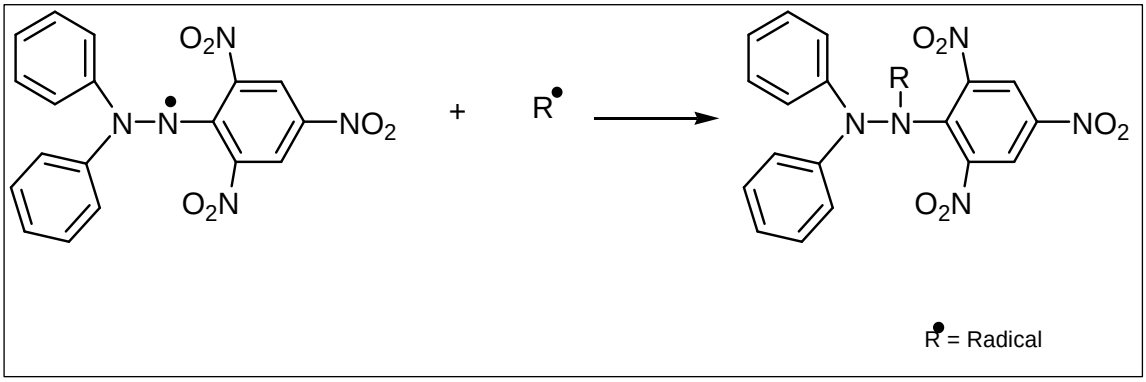


Figura 10. Redução do radical livre DPPH

2.9.2 Método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Poder Antioxidante de Redução ao Ferro, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é aplicada tanto para fluidos biológicos, como para soluções aquosas, e extratos vegetais, sendo um método simples e reprodutivo.[77]

O método é baseado na redução do complexo formado por 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e ferro (III) conforme figura 11. Neste método a reação de redução é monitorada por métodos espectroscópicos na faixa do visível, o complexo de ferro (III) apresenta a coloração azul-clara e o complexo reduzido, ferro (II), a cor azul-escura.[78]

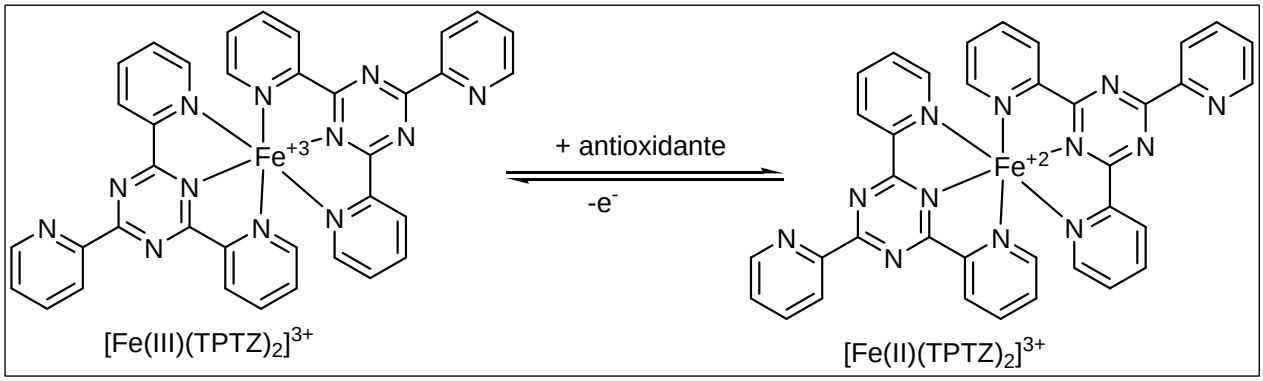


Figura 11. Redução do pelo método FRAP

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

Agitador tipo Vortex Biomixer, modelo QL 901;

Balança Analítica Marte, modelo AY220;

Balança eletrônica de precisão Shimadzu, modelo BL3200H;

Banho Maria Nova ética, modelo314-6DN;

Bomba de vácuo e ar comprimido Prismatec, modelo 131;

Coluna cromatográfica RTX-5MS Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm);

Cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-2010;

Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro massas Shimadzu, modelo GC-MS- QP2010 Plus;

Espectrofotômetro UV/Vis Dynamica, modelo SB- 10;

Evaporador rotativo Fisaton, com banho de aquecimento, modelo 801;

Liquidificador 2 L Walita , modelo RI-2034;

Manta aquecedora 5,0L Heating Mantles;

Refrigerador 350L Electrolux, modelo RDE35.

3.2. Vidrarias

Balão fundo redondo 2 L;

Balão volumétrico de 10, 25, 50 e 100mL;

Becker de 10, 50 e 100 mL;

Extrator de óleo tipo clevenger;

Funil de separação 250 mL;

Pipeta volumétrica de 1, 2, 10 e 25 mL;

Tubo de ensaio.

3.3. Reagentes

Acetato de sódio trihidratado 99,0% Alphatec;

Acetona P.A. 99,5% Alphatec;

Ácido acético glacial P.A 99,5% Nuclear;

Ácido clorídrico P.A. 36,5 - 40% Nuclear;

Ar Sintético, pureza 99,999%;

Cloreto férrico hexahidratado 98,0 - 101,0% Synth;

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) Aldrich;

Éter Etílico P.A 99,8% Quimios;

Hélio, pureza 99,999%.

Hidrogênio, pureza 99,999%;

Metanol P.A 99,8% Synth;

Padrões de *n*-alcanos C7-C30 (Supelco Analytical);

Sulfato ferroso heptahidratado 99,0% Dinâmica;

Sulfato de Sódio Anidro P.A 98% Vetec;

TPTZ 98% Sigma Aldrich;

3.4. Coleta

As folhas das matrizes de *Myrocarpus frondosus* foram coletadas no município de Taquara-RS no Distrito Rio da Ilha no Quarto Frio (figura 12). O período de coleta foi de um ano, sendo realizado sempre na primeira quinzena de cada mês durante a manhã. Exsicatas das três espécimes foram incorporadas no herbário da Universidade Federal do Rio Grande – FURG e identificadas com o número de registro HURG 5137. A localização geográfica dos exemplares são: matriz 1 latitude 29º35’07.61”S e longitude 50º38’00.91”O; para matriz 2 a latitude 29º35’07.65”S e longitude 50º38’01.71”O; e para matriz 3 latitude 29º35’07.85”S e longitude 50º38’02.36”O. A figura 13 apresenta as três matrizes coletadas para a pesquisa.

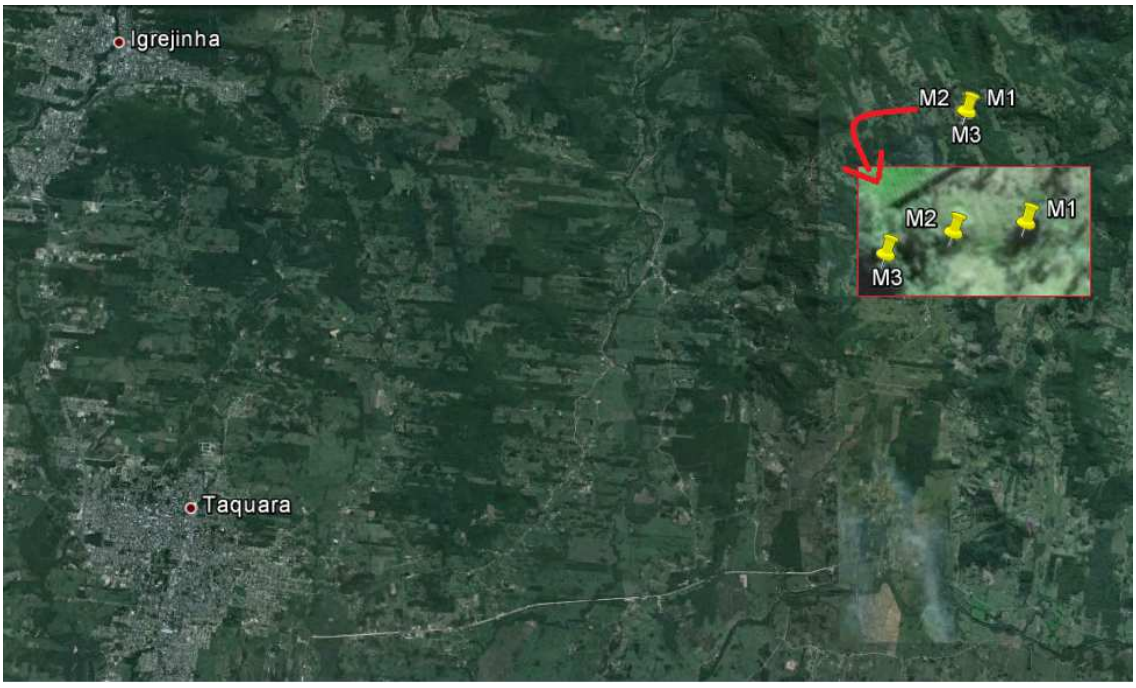


Figura 12. Localização das matrizes de Cabreúva, M1, M2 e M3

Figura 13. Fotos das árvores de cabreúva

3.5. Extração

As folhas foram coletadas e trazidas para o laboratório onde foram maceradas no liquidificador e pesadas. Em seguida as folhas foram então extraídas por hidrodestilação para obtenção do óleo essencial. A figura 14 mostra o esquema de extração do óleo essencial. O solvente utilizado na separação das misturas água/óleo foi o éter etílico P.A.. Após quatro horas de extração, o óleo foi separado da fase aquosa com auxilio de um funil de separação, seco com sulfato de sólido anidro P.A e a fase etérea evaporada para obtenção do óleo essencial. O rendimento do óleo foi obtido através de pesagem.[31]

Figura 14. Extração do óleo essencial.

3.6. Análise cromatográfica

Para a avaliação qualitativa do óleo essencial foi realizada a análise em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa nas condições descritas na tabela 2.

Tabela 2. Condições de análise cromatográfica CG-EM

Cromatógrafo com Espectrômetro de massas	**Shimadzu, modelo GC-MS- QP2010 Plus**
Quantidade de amostra	10 mg/mL
Modo de injeção	Split 1:10
Coluna	RTX-5MS –Restek(30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Velocidade linear	1 mL/min
Gás de arraste	Hélio (He)
Pressão na coluna	59 kPa
Temperatura do injetor	240°C
Temperatura do forno	50°C a 290°C (4 °C/min)
Modo de ionização eletrônica	70 eV
Varredura de m/z	40 a 600 Da
Freqüência	2,94 scan/sec
Temperatura fonte de íons	260 °C
Temperatura interfase	280 ºC

A obtenção dos dados foi efetuada pelo *software* GCMS Postrun Analysis. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos índices de retenção na mesma coluna e espectro de massa descrito por Mc Lafferty and Stauffer (Wiley) e por Adams.[79] O índice de retenção (IR) foi obtido de acordo com o método de Van den Dool para padrões de n-alcanos C7-C30. O índice de retenção foi calculado pelo software do equipamento conforme equação 1(ver página 25).[64,79]

A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC), com as condições citadas no tabela 3.

Tabela 3. Condições de análise cromatográfica CG-DIC

Cromatógrafo	**Shimadzu, modelo GC-2010**
Quantidade de amostra	10 mg/mL
Modo de injeção	Split 1:10
Coluna	RTX-5MS –Restek(30m x 0,25mm x 0,25µm)
Velocidade linear	1 mL/min
Gás de arraste	Hélio (He)
Pressão na coluna	59 kPa
Temperatura do injetor	240 °C
Temperatura do forno	50 °C a 290 °C (4 °C/min)
Temperatura do detector	260 ºC

Nesta análise a identificação foi por meio da normalização da área dos picos, sem uso de fatores de correção.[5,9]

3.7. Análise de atividade antioxidante

3.7.1 Método DPPH

Em tubos de ensaio foram adicionados a amostra de óleo essencial e 1 mL do padrão de DPPH de modo que a concentração final de óleo essencial fosse 250 µg/mL e o volume total de 3,5 mL utilizando metanol P.A para as diluições. Também foi preparada a amostra controle de DPPH . Estes procedimentos foram realizados em triplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de UV-Vis, a 517 nm e convertida para atividade antioxidante (AA%),[74] sendo utilizado como amostra branco o metanol P.A conforme equação 3 abaixo, adaptado de Costa *et al.*.[80]

$$AA\% = 100 - \left\{\left[\frac{(Absorbância\ da\ Amostra - Absorbância\ do\ Branco)}{Absorbâcia\ do\ controle}\right] X\ 100\right\} \qquad (3)$$

3.7.2 Método FRAP

Inicialmente para a elaboração da curva de sulfato ferroso foram preparadas soluções nas concentrações de 500, 1000, 1500, e 2000µM. A amostra foi preparada a partir de um solução estoque de 10 mg/L de óleo essencial em metanol P.A., desta solução foram realizadas mais duas diluições nas concentrações 2,78 mg/L e 5,00 mg/L em água. Tanto as quatro soluções padrão quanto as três diluições de amostra foram preparadas para leitura em espectrofotômetro em 595 nm da seguinte maneira: em um tubo de ensaio uma alíquota de 90 µL (amostra ou padrão) foi adicionada, e foram acrescentadas a esta 270 µL de água destilada e 2,7 mL da solução de FRAP. O tubo foi mantido em banho-maria a 37 ºC durante 30 minutos antes de ser realizada a leitura em espectrofotômetro na região do visível (595 nm), onde o regente FRAP foi utilizado como branco. A partir da equação obtida pela curva padrão,obtém-se o valor de absorbância referente a 1000 µM de sulfato ferroso. Tal valor é utilizado na equação obtida da curva da amostra com o objetivo de determinar qual a diluição de amostra (mg/L) correspondente a 1000 µM de sulfato ferroso. O resultado do ensaio é expresso em µM $FeSO_4$/óleo essencial (g) conforme a equação 4.[77,78]

$$AA = \frac{1000}{X/1000} \qquad (4)$$

Onde,

AA = atividade antioxidante em µM $FeSO_4$/óleo essencial (g)

X = diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de $FeSO_4$.

3.8. Dados climáticos

As variáveis climáticas radiação solar, temperatura e precipitação foram monitoradas mensalmente através da estação meteorológica automática de Canela-RS, conforme dados da INMET (Instituto Nacional de Meteorologia).[81]

3.9. Análise estatística

As médias dos ensaios de atividade antioxidante foram comparadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA). A significância das diferenças foi calculada pelo teste de Tukey num nível de significância de 5%.

A análise multivariada dos dados foi realizada para interpretar a variabilidade química das amostras, por meio da matriz de correlação de Pearson, análise de componentes principais e análise de agrupamento, sendo todos os dados analisados estatisticamente utilizando os softwares Statistic 7.0 e PAST.[82]

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Rendimento e dados metereológicos

As três matrizes de *Myrocarpus frondosus* estavam em uma área nativa de aproximadamente de 500 m² de área onde se encontram diversas espécies de árvores na região (figuras 12 e 13). Em uma linha vertical, podemos descrever primeiramente a matriz 1 (M1) que está a 40 m da matriz 2 (M2) que por sua vez se encontra a 5 m da matriz 3 (M3). A matriz 2, em função do seu tamanho, é a árvore mais antiga da região. Na região existe um pequeno córrego o qual beneficiam as matrizes 2 e 3 e naturalmente a região onde se encontram essas duas árvores há uma maior diversidade de espécies. Como o trabalho está focado no estudo pioneiro das propriedades do óleo essencial das folhas da espécie de *Myrocarpus frondosus* na região da Taquara-RS em seu estado natural, alguns fatores que não foram analisados poderiam influenciar nos resultados desse trabalho, como a idade da espécie, demanda de nutrientes no solo,[35] e as influencias alelopáticas[34] em função do crescimento consorciado com outras espécies.[33]

As folhas sempre foram coletadas durante a manhã na primeira quinzena de cada mês, com o objetivo de evitar influencias relacionadas ao horário de coleta,[4,26] sendo sempre observadas possíveis mudanças nas árvores em estudo.

Após a coleta das folhas, as mesmas eram encaminhadas para o laboratório para as etapas de maceração e extração. Do óleo obtido, foi determinado o rendimento e, posteriormente, foram realizados os ensaios de atividade antioxidante e de cromatografia gasosa. Foi possível observar a variação no rendimento durante o período do trabalho. O menor rendimento foi de 0,11% para as amostras da M1 nos meses de maio até agosto de 2012 (outono e inverno) e o maior rendimento de 0,25%, também para M1 no mês de março de 2012 (verão). Os maiores valores apresentados no verão e os menores no outono e inverno, caracterizaram um comportamento semelhante encontrado no óleo essencial das folhas de angiospermas como *Eucalyptus citriodora* Hook.,[83] *Cymbopogon citratus*, [33] *Lippia*

alba.[84,85] A tabela 4 mostra o rendimento obtido de óleo essencial nos meses de outubro de 2011 até setembro de 2012.

Tabela 4. Rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus*.

Mês/Ano	Matriz	Rendimento (%)	Mês/Ano	Matriz	Rendimento (%)
Janeiro 2012	1	0,22	**Julho 2012**	1	0,11
	2	0,19		2	0,16
	3	0,17		3	0,12
Fevereiro 2012	1	0,23	**Agosto 2012**	1	0,11
	2	0,20		2	0,17
	3	0,21		3	0,12
Março 2012	1	0,25	**Setembro 2012**	1	0,13
	2	0,21		2	0,17
	3	0,22		3	0,15
Abril 2012	1	0,18	**Outubro 2011**	1	0,14
	2	0,16		2	0,17
	3	0,19		3	0,14
Maio 2012	1	0,11	**Novembro 2011**	1	0,14
	2	0,15		2	0,17
	3	0,17		3	0,15
Junho 2012	1	0,11	**Dezembro 2011**	1	0,19
	2	0,15		2	0,19
	3	0,14		3	0,17

Tabela 5. Dados Ambientais[1] observados no período de desenvolvimento do trabalho

Estação-Ano	**Verão-2012**			**Outono-2012**		
Mês	**Jan**	**Fev**	**Mar**	**Abr**	**Mai**	**Jun**
Temperatura (ºC)	17,83	20,12	21,17	16,84	14,33	13,27
Radiação Solar (KJ/m^2) x10^{-1}	160,12	177,69	168,95	158,8	113,3	130,44
Precipitação (mm)	137,6	248,8	262,4	65,6	92,0	133,4
Estação-Ano	**Inverno-2012**			**Primavera -2011**		
Mês	**Jul**	**Ago**	**Set**	**Out**	**Nov**	**Dez**
Temperatura (ºC)	12,23	11,23	15,21	13,32	15,71	17,11
Radiação Solar (KJ/m^2) x10^{-1}	100,96	93,55	122,62	141,88	175,51	168,76
Precipitação (mm)	127,8	100,6	97,8	125,4	133,4	36

[1] Fonte: Inmet, Estação Automática de Canela, RS. [81]

Paralelamente às coletas das folhas para extração do óleo essencial, foram monitorados os dados ambientais da região no período de coleta de material vegetal

(tabela 5). A estação meteorológica adotada para obtenção dos dados foi a de Canela-RS devido a localização próxima das árvores em estudo (aproximadamente 30 Km). Dentre os dados fornecidos pela estação, foram escolhidas a temperatura, radiação solar, e a precipitação.

4.2. Relações observadas entre o rendimento e dados metereológicos

A variável rendimento foi relacionada com as variações ambientais, demonstrando uma forte relação com a temperatura, como demonstra o gráfico 3 para as três matrizes de *Myrocarpus frondosus*, sendo que o maior rendimento de óleo essencial foi no verão.

A relação entre temperatura e rendimento sempre foi diretamente proporcional, exceto nos meses de junho, agosto, e outubro para a M1, nos meses de junho, julho e agosto para M2, e para M3 apenas no mês de agosto. O mês de agosto é o que apresentou menor temperatura e radiação solar, então o comportamento observado neste mês pode estar relacionado a outras variáveis.

Da mesma maneira, Mendes *et al.*,[31] observou forte relação da temperatura com o rendimento nas espécie de *Dalbergia frutescens* (Fabaceae).

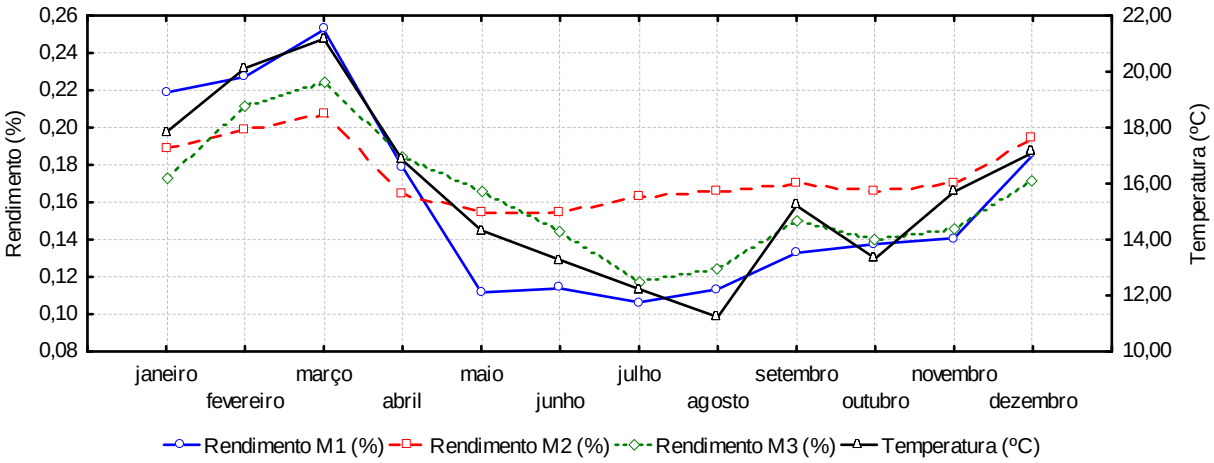


Gráfico 3: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a temperatura ambiente.

A variável precipitação também foi relacionada. No período de maior precipitação, durante o verão, e nos meses de abril e novembro o rendimento em todas as matrizes foi diretamente proporcional ao índice pluviométrico, isso também ocorreu no junho para M2, julho para M3 e junho, julho e outubro para M1. Em alguns meses das outras estações, como em agosto, setembro e dezembro para as três matrizes, junho e outubro para M3, julho e outubro para M2 o comportamento era inverso. Podendo se concluir que nos meses onde a precipitação foi acima de 133 mm, a relação precipitação e rendimento são diretamente proporcionais. O gráfico 4 mostra a relação entre precipitação e rendimento para as três matrizes de *Myrocarpus frondosus* durante um ano.

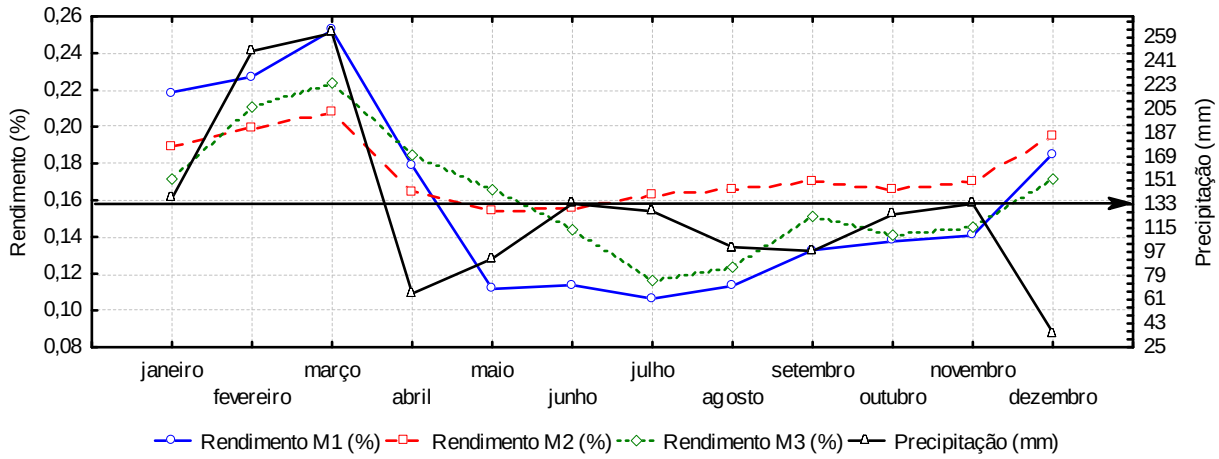


Gráfico 4: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a precipitação.

Analisando a radiação solar, observa-se que para a maioria dos meses referente à primavera, o comportamento foi inversamente proporcional. Isto também foi observado no mês de agosto e em março para M1, junho para M3 e julho para M2. Mas para maioria dos períodos do ano esta variável ambiental apresentou mesmo comportamento da temperatura. O gráfico 5 mostra a relação entre radiação solar e rendimento para as três matriz de *Myrocarpus frondosus* durante um ano.

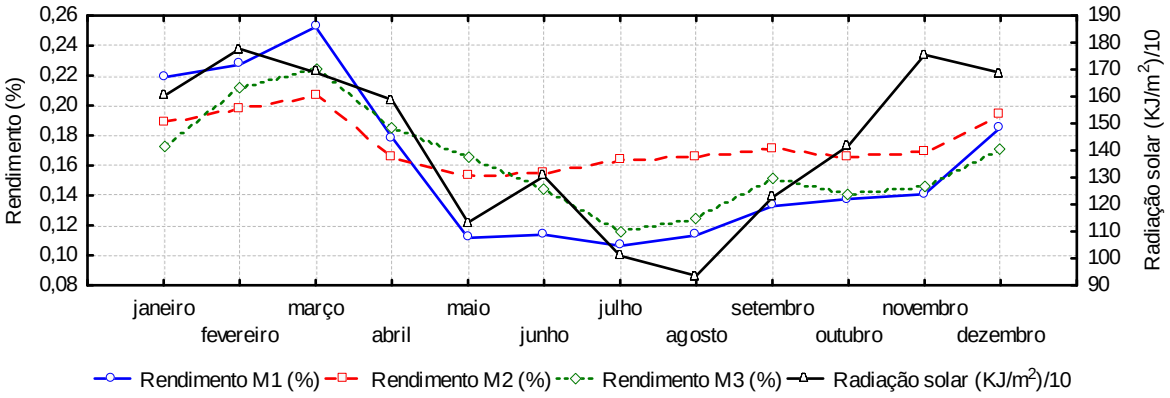


Gráfico 5: Relação entre rendimento do óleo essencial das folhas da M1, M2 e M3 de *Myrocarpus frondosus* e a Radiação Solar.

A análise de componentes principais das variáveis ambientais (temperatura, precipitação e radiação solar) com o rendimento de óleo essencial das três matrizes, explica 89,99% da variância e esta apresentada na figura 15. Nela identificamos a forte relação entre rendimento e temperatura. Também pela distribuição das amostras podemos observar um grande grupo formado por amostras do outono, inverno e inicio da primavera (maio, junho, julho, agosto, setembro, e outubro) essas amostras foram as de menores valores de rendimento e temperatura. Este dado demonstra a relação das amostras com a temperatura, de tal modo que conforme essa variável aumenta os grupos, estes vão dispersando. Janeiro, abril, novembro e dezembro formam um grupo por apresentar temperaturas semelhantes, houve uma variação de apenas 2,1 ºC nestes meses (15,7-17,8 ºC), sendo que devido aos índices pluviométricos nos meses de dezembro e abril, períodos de menor precipitação, estes estão um pouco deslocados do grupo. As amostras coletadas durante o verão, fevereiro e março formam um grupo caracterizando os meses nos quais apresentaram os índices de precipitação e temperatura e rendimento mais elevados.

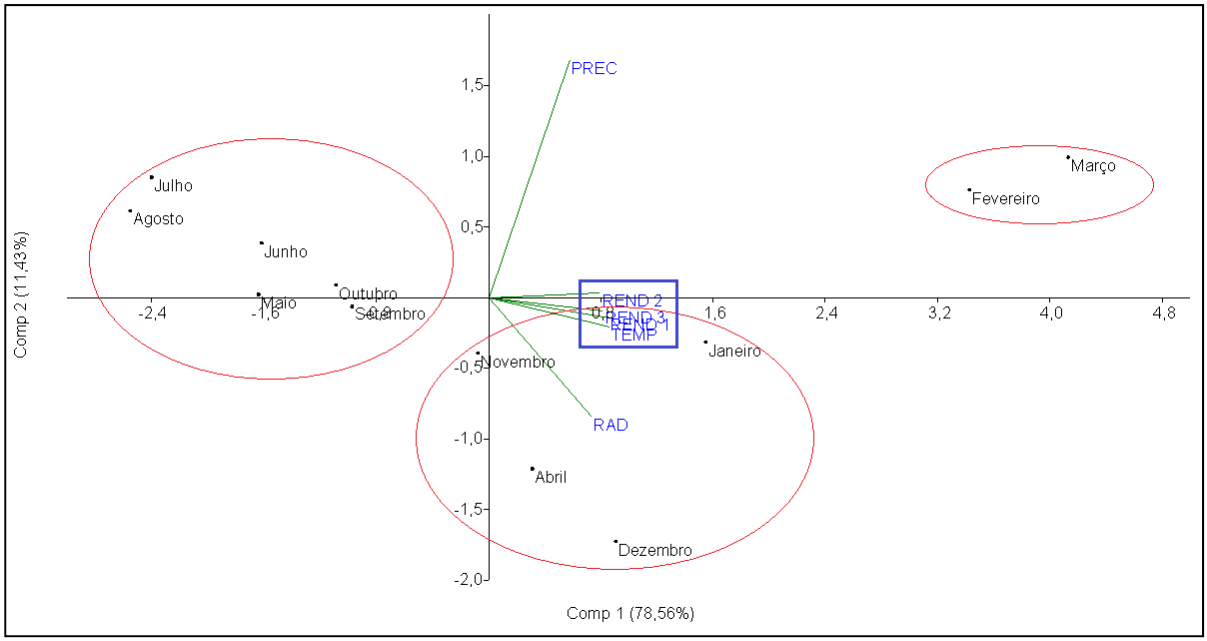


Figura 15. Análise de componentes principais do rendimento óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais.

A correlação de Pearson entre as variáveis, tabela 6, expressa o grau de correlação entre elas. Fávero *et al.*[86] justifica que a matriz de correlação deve ter valor acima de 0,30 para justificar a análise de componentes principais (ACP). Assim os dados obtidos na tabela 6 justificam a ACP.

Tabela 6. Matriz de correlação de Pearson do rendimento óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais.

	Rendimento M1 (%)	**Rendimento M2 (%)**	**Rendimento M3 (%)**
Temperatura (ºC)	0,95	0,85	0,95
Precipitação (mm)	0,57	0,56	0,56
Radiação (KJ/m^2) /10	0,79	0,68	0,72

4.3. Caracterização do óleo essencial

Através dos ensaios de cromatografia gasosa CG-DIC e CG-EM foi possível a identificação de trinta e cinco compostos no óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus,* sendo o β-pineno (IRL 974), D-germacreno (IRL 1484), e o biciclogermacreno (IRL 1500), os compostos majoritários. A tabela 7 apresenta os compostos identificados.

Tabela 7. Compostos detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.*

Composição Química	IRL[1]	Composição Química	IRL[1]
α-tujeno	924	Citronelato de metila	1257
α-pineno	932	Isoledeno	1374
Sabineno	969	β-bourboneno	1387
β-pineno	974	β-cariofileno	1417
Mirceno	988	α-humuleno	1452
α-terpineno	1014	Aromadendreno(dehidro)	1460
p-cimeno	1020	D-germacreno	1484
Limoneno	1024	Biciclogermagreno	1500
Trans ocimeno	1044	Cubebol	1514
γ-terpineno	1054	Éter italiceno	1515
Isoterpinoleno	1085	1-fenil-heptanona-3	1524
Linalool	1095	Epoxido italiceno	1547
Propanoato de ciclohexila	1130	Espatulenol	1577
Isotujol	1134	Globulol	1590
Terpinenol -4	1174	Cariofileno(14 hidroxi 9-epi-E)	1668
Cis-butanoato de hexenila	1184	β-davanona-2-ol	1718
α-terpineol	1186	Cedril metil cetona	1775
Mirtenol	1194		

[1] Índice de Retenção, segundo Adams .[79]

Qualitativamente, a classe dos monoterpenos apresentou uma maior variedade de compostos, visto que dezessete dos trinta e cinco presentes no óleo essencial, são desta classe. A figura 16 mostra as estrutura dos monoterpenos, do propanoato de ciclohexila e do cis butanoato de hexenila identificados no óleo essencial de *Myrocarpus frondosus*.

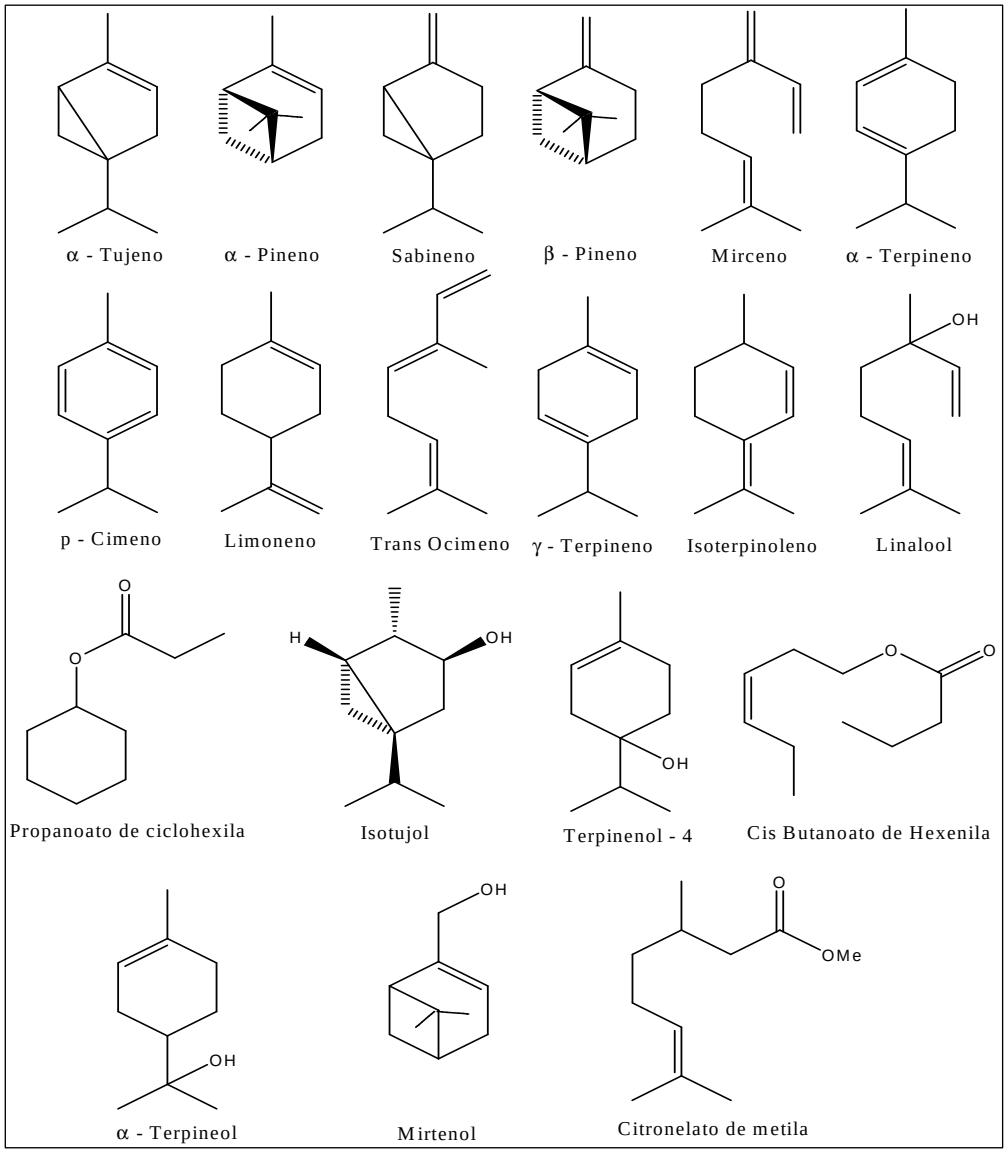


Figura 16. Estrutura dos monoterpenos, do propanoato de ciclohexila e do cis butanoato de hexenila detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.*

As estruturas dos quinze sesquiterpenos e a 1-fenil-heptanona-3 identificados no óleo essencial estão apresentadas na figura 17.

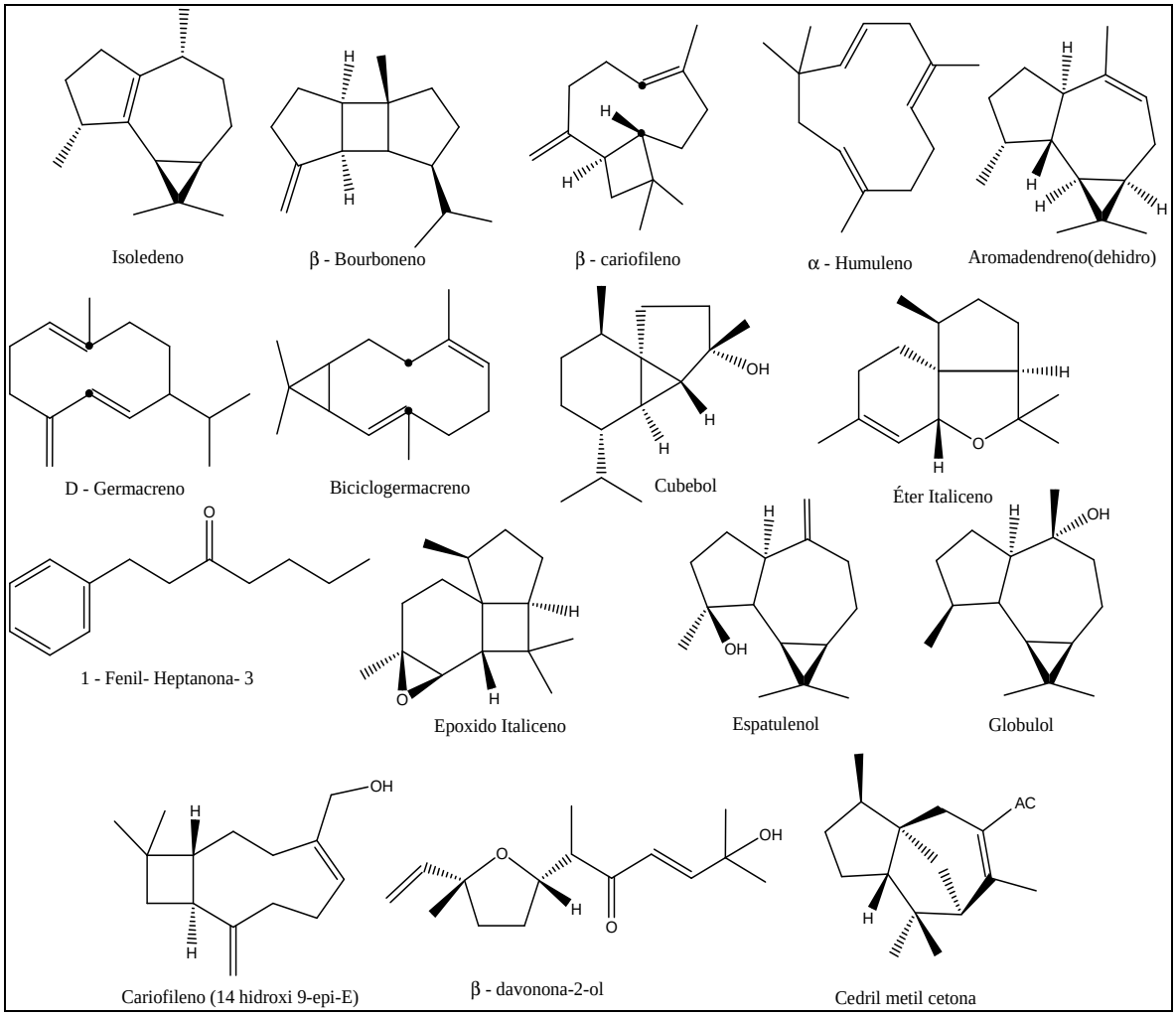


Figura 17. Estrutura dos sesquiterpenos e da 1-fenil-heptanona-3 detectados no óleo essencial das folhas da M1, M2, M3 de *Myrocarpus frondosus.*

4.4. Características específicas de cada matriz

Em trabalhos com matrizes próximas entre si, há uma tendência de diminuição dos efeito de fatores externos na biossíntese de metabólitos secundários,[3,9,13,18] visando assim a caracterização das espécies situadas naquela região. Mesmo assim, características específicas de espécies nativas, como a idade, ataque de parasitas, nutrição do solo, podem atribuir propriedades intrínsecas a cada árvore.[18]

4.4.1 Matriz 1

A variação na composição química da M1 está apresentada na tabela 8, onde destacam-se características predominantes durante cada estação do ano. O hidrocarboneto sesquiterpeno biciclogermacreno (IRL 1500) apresentou teores mais elevados no verão, com média de 42,29%. Também nessa estação, apenas no mês de fevereiro, foi detectada pequena quantidade, 0,10%, do monoterpeno trans ocimeno (IRL 1044).

No outono, o monoterpeno β-pineno (IRL 974) teve maior concentração, com média de 24,34% e somente nesta estação, nos meses de maio e junho, o composto aromadendreno (dehidro) (IRL 1460) foi detectado.

O inverno se caracterizou por apresentar a maior média de sesquiterpenos oxigenados, 8,32%, dentre eles os compostos espatulenol (IRL 1577) e o globulol (IRL 1590) onde apresentaram maior concentração nesta estação durante o mês de julho, 5,70% e 1,47% respectivamente. Esses compostos pertencem ao mesmo precursor em sua rota biossintética conforme mostra a figura 25. E apenas neste mês, monoterpeno oxigenado citronelato de metila (IRL 1257) foi detectado.

Em dezembro, na primavera, foi o período de maior concentração de monoterpenos oxigenados, 2,68%, principalmente o terpinenol-4 (IRL 1174) que apresentou neste mês concentração de 1,53%. Somente nesta estação dois compostos oxigenados linalool (IRL 1095) e o cariofileno (14 hidroxi 9-epi-E) (IRL 1668) foram detectados.

A primavera e o verão representam o período de maior índice de precipitação e maiores temperaturas (tabela 5), exclusivamente nestas estações foi possível identificar a presença de compostos com o isoterpinoleno (IRL 1085) e o cubebol (IRL 1514).

E durante todo o período de coleta os compostos β-pineno (IRL 974), limoneno (IRL 1024), isoledeno (IRL 1374), β-cariofileno (IRL 1417), α-humuleno (IRL 1452), D-germacreno (IRL 1484), biciclogermagreno (IRL 1500) e espatulenol

(IRL 1577) foram detectados todos os meses sendo os compostos característicos da M1.

Tabela 8. Composição química do óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*.

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho
			Concentração %[3]					
Sabineno	969	990	N.D	N.D	1,28bc	1,50cd	1,65de	4,58f
β-pineno	974	992	11,80d	12,43e	21,46f	33,20g	16,60h	23,22i
Mirceno	988	1001	0,52d	1,93e	0,39f	N.D	0,43fg	1,13h
α-terpineno	1014	1024	0,09b	0,39c	N.D	N.D	N.D	0,22d
Limoneno	1024	1033	0,38d	1,42e	0,27f	0,31f	0,43g	0,95h
Trans ocimeno	1044	1047	N.D	0,10	N.D	N.D	N.D	N.D
γ-terpineno	1054	1062	0,17b	0,70c	0,10d	N.D	0,26e	0,37f
Isoterpinoleno	1085	1089	0,09b	0,35c	N.D	N.D	N.D	N.D
terpinenol -4	1174	1177	0,50c	1,61d	0,23e	0,30f	0,70g	0,57h
α-terpineol	1186	1191	0,28c	0,61d	N.D	N.D	0,30c	N.D
Isoledeno	1374	1378	0,71d	0,83c	0,72d	0,63e	1,21f	1,62g
β-bourboneno	1387	1385	0,17a	0,28b	0,42c	0,33be	0,66f	0,82g
β- cariofileno	1417	1421	11,07c	6,23d	10,60e	9,26f	11,80g	12,04h
α-humoleno	1452	1454	1,78c	0,91d	1,69e	1,56a	2,65f	2,74g
Aromadendreno (dehidro)	1460	1461	N.D	N.D	N.D	N.D	0,38a	0,51b
D-germacreno	1484	1485	23,50a	19,18d	20,99e	17,30f	20,33g	17,84h
Biciclogermagreno	1500	1502	42,05d	48,03e	36,80f	31,39g	29,29h	24,57i
Cubebol	1514	1515	0,27b	0,24c	0,14d	N.D	N.D	N.D
Éter italiceno	1515	1514	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,45b
1-fenil-heptanona -3	1524	1525	1,55b	1,46c	1,47c	1,42c	3,11d	2,48e
Espatulenol	1577	1579	1,41d	0,68e	1,40d	1,21b	2,85f	0,92g
Globulol	1590	1585	0,70d	N.D	0,54e	N.D	1,37f	N.D
Total (%)			97,02	97,38	98,48	98,41	94,03	95,02
Monoterpenos total (%)			13,82	19,54	23,72	35,31	20,37	31,04
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			13,04	17,32	23,49	35,01	19,38	30,47
Monoterpenos oxigenados (%)			0,78	2,23	0,23	0,30	1,00	0,57
Sesquiterpenos total (%)			83,20	77,84	74,76	63,10	73,66	63,98
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			37,22	27,43	34,41	29,08	37,03	35,57
Sesquiterpenos oxigenados (%)			3,93	2,38	3,55	2,63	7,33	3,85
Compostos identificados			18	18	16	12	17	17

Tabela 8: Continuação...

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
			Concentração %[3]					
Sabineno	969	990	4,29f	2,20g	1,53ce	0,65a	1,11b	N.D
β-pineno	974	992	26,13j	14,89k	11,42d	10,73a	20,52b	27,95c
Mirceno	988	1001	0,86i	0,54d	0,47g	0,18a	0,30b	0,93c
α-terpineno	1014	1024	0,14e	0,10b	0,15f	N.D	N.D	0,27a
Limoneno	1024	1033	0,66i	0,51j	0,46g	0,11a	0,21b	0,75c
γ-terpineno	1054	1062	0,24g	0,20h	0,30i	N.D	N.D	0,48a
Isoterpinoleno	1085	1089	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,24a
Linalool	1095	1100	N.D	N.D	N.D	N.D	0,25a	0,21b
Terpinenol -4	1174	1177	0,85i	0,50c	0,53j	N.D	0,62a	1,53b
α-terpineol	1186	1191	0,42e	0,17f	0,19f	N.D	0,37a	0,95b
Citronelato de metila	1257	1261	0,51	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Isoledeno	1374	1378	0,96h	1,21i	1,58g	0,45a	0,54b	0,86c
β-bourboneno	1387	1385	0,37ce	0,91h	1,18i	N.D	N.D	0,14a
β-cariofileno	1417	1421	5,98i	11,09c	11,48j	8,85a	8,91a	10,83b
α-humoleno	1452	1454	1,15h	2,70fg	3,01i	1,49a	1,87b	1,92b
D-germacreno	1484	1485	20,71egi	20,93ei	21,62j	23,72a	26,48b	16,30c
Biciclogermagreno	1500	1502	22,93j	29,04h	27,91k	42,53a	30,54b	28,20c
Cubebol	1514	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,40a
Éter italiceno	1515	1514	N.D	N.D	N.D	N.D	1,50a	N.D
1-fenil-heptanona -3	1524	1525	2,20f	2,82g	3,51h	1,24a	N.D	1,58b
Espatulenol	1577	1579	5,70h	3,99i	2,74f	3,77a	1,19b	1,88c
Globulol	1590	1585	1,47	1,33cf	1,18b	0,94a	1,20b	1,30c
Cariofileno (14 hidroxi 9-epi-E)	1668	1593	N.D	N.D	N.D	0,25	N.D	N.D
Total (%)			95,58	93,15	89,26	94,92	95,59	96,7
Monoterpenos total (%)			34,10	19,13	15,05	11,68	23,37	33,31
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			32,32	18,46	14,32	11,68	22,14	30,62
Monoterpenos oxigenados (%)			1,78	0,67	0,72	0,00	1,23	2,68
Sesquiterpenos total (%)			61,48	74,02	74,22	83,24	72,22	63,40
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			29,17	36,84	38,87	34,51	37,80	30,05
Sesquiterpenos oxigenados (%)			9,38	8,14	7,44	6,20	3,89	5,15
Compostos identificados			18	17	17	13	15	19

[1] Índice de Retenção, segundo Adams .[79]

[2] Índice de Retenção médio calculado com base na mistura de hidrocarbonetos de C7 –C30.

[3] Concentração baseada na normalização da área dos picos, as médias (de 3 injeções) seguidas de letras iguais entre colunas não apresentam diferença, num nível de significância de 5% pelo teste Tukey .

N.D – Não detectado.

O dendrograma apresentado na figura 18 foi elaborado apenas com os dados de concentração dos compostos de maior incidência da M1, foi possível observar a formação de dois grandes grupos. O primeiro formado por janeiro, fevereiro e outubro (amostras da primavera e verão e as quais tem o maior teor de biciclogermacreno, conforme tabela 8) e outro grupo com as demais amostras. Subgrupos formados do grupo maior são divididas nas estações primavera e verão (grupo novembro e março), outono e inverno (grupo maio, agosto e setembro) e outro subgrupo com amostras, cuja a composição total de mono e sesquiterpenos são similares, formado por amostras do outono, inverno e primavera (abril, junho, julho e dezembro). Mesmo sem influencia das variáveis ambientais na análise de agrupamento, podemos caracterizar as amostras por época de coleta, e cabe ressaltar que o outono e inverno são as estações onde ocorre menor variação na composição química.

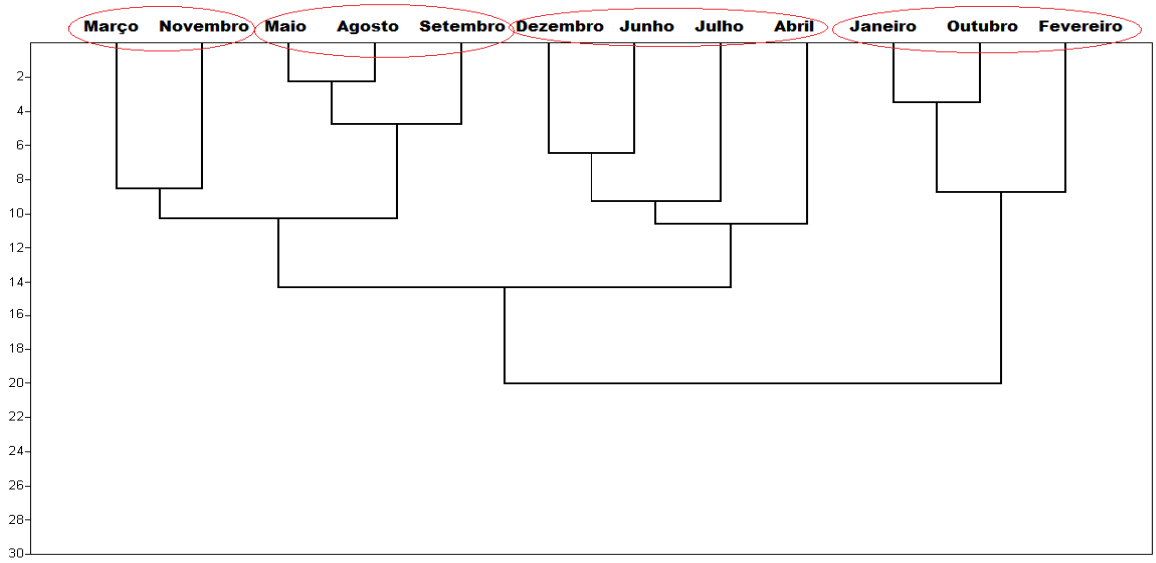


Figura 18. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*.

Também foi elaborada com os compostos de maior ocorrência da M1 uma matriz de correlação de Pearson (Tabela 9), demonstrando pouca correlação entre as variáveis. A correlação mais forte é entre os sesquiterpenos β-cariofileno (IRL

1417) com o α-humuleno (IRL 1452), compostos precursores da mesma rota biossintética (figura 25 na página 71).

Tabela 9. Matriz da correlação de Pearson para os compostos de maior incidência do óleo essencial das folhas da M1 de *Myrocarpus frondosus*.

	β-pineno	Limoneno	Isoledeno	β-cariofileno	α-humuleno	D-germacreno	Biciclogermagreno
Limoneno	0,00						
Isoledeno	-0,11	0,38					
β-cariofileno	-0,10	-0,30	0,49				
α-humuleno	-0,18	-0,17	0,76	0,85			
D-germacreno	-0,56	-0,55	-0,35	-0,10	-0,03		
Biciclogermagreno	-0,54	0,10	-0,56	-0,29	-0,54	0,26	
Espatulenol	-0,09	-0,24	0,11	-0,24	0,02	0,16	-0,37

4.4.2 Matriz 2

A variação da composição química do óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus* da M2, apresentada na tabela 10, exibe quatro compostos detectados todos os meses, foram o β-pineno (IRL 974), β-cariofileno (IRL 1417), D-germacreno (IRL 1484) e o biciclogermagreno (IRL 1500). A tabela 10 também mostra algumas características pertinentes a cada estação, principalmente entre os compostos oxigenados.

Os monoterpenos oxigenados linalool (IRL 1095) e o mirtenol (IRL 1194), só foram detectados no verão. Somente no outono os compostos oxigenados cubebol (IRL 1514) e o cis-butanoato de hexenila (IRL 1184), foram detectados. O inverno se caracterizou pelo período de maior média de sesquiterpenos oxigenados 7,60%.

A primavera se caracterizou pela presença exclusiva dos compostos α-tujeno (IRL 924) e α-pineno (IRL 932) e compostos como o α-humuleno (IRL 1452) e o citronelato de metila (IRL 1257) não foram observados nesta estação.

Tabela 10. Composição Química do óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus*.

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho
			Concentração %[3]					
Sabineno	969	993	N.D	N.D	N.D	N.D	5,54b	5,67b
β-pineno	974	992	74,70d	50,32e	6,75f	13,63c	26,56b	28,32g
Mirceno	988	1001	2,70b	2,60b	0,59cd	0,51ac	1,53e	1,89f
α-terpineno	1014	1023	0,35a	0,95c	0,14b	0,09b	0,30a	0,45d
p-cimeno	1020	1024	0,16b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Limoneno	1024	1034	1,59c	3,90	0,39a	N.D	1,26bc	1,56bc
Trans ocimeno	1044	1050	0,34a	0,35a	N.D	0,17	N.D	N.D
γ-terpineno	1054	1062	0,75b	1,98c	0,23a	N.D	0,57d	0,81e
Isoterpinoleno	1085	1089	0,35c	0,92d	0,10b	N.D	0,28e	N.D
Linalool	1095	1100	0,12a	N.D	0,17b	N.D	N.D	N.D
Terpinenol-4	1174	1177	0,87b	2,13c	0,51d	0,41e	1,00f	1,63g
cis- Butanoato de hexenila	1184	1185	N.D	N.D	N.D	0,11	N.D	N.D
α-Terpineol	1186	1191	0,25c	N.D	0,24cd	0,20d	0,33a	0,50e
Mirtenol	1194	1197	0,09	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Citronelato de metila	1257	1261	N.D	N.D	0,55a	0,44b	N.D	N.D
Isoledeno	1374	1376	0,44b	0,99d	0,98d	0,87e	1,31f	1,30f
β-bourboneno	1387	1385	N.D	N.D	0,45d	0,35be	0,68f	0,78g
β-cariofileno	1417	1420	0,54a	0,88d	7,28e	7,81f	6,08g	6,23h
α-humoleno	1452	1454	N.D	N.D	1,06a	1,24bc	1,29bcd	1,22bd
Aromadendreno (dehidro)	1460	1461	N.D	N.D	N.D	N.D	0,73b	0,72b
D-germacreno	1484	1484	3,78d	6,56e	24,80f	19,88g	14,60h	13,21b
Biciclogermagreno	1500	1501	11,03d	22,69e	47,40b	42,58f	26,61g	26,89g
Cubebol	1514	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	0,42	N.D
Éter italiceno	1515	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,32b
1-fenil-heptanona-3	1524	1525	0,32c	N.D	1,93b	1,66d	2,54e	1,71d
Espatulenol	1577	1579	0,36d	N.D	2,19e	4,17f	2,03c	1,22g
Globulol	1590	1585	N.D	N.D	0,65d	1,07c	0,88e	0,44b
Total (%)			*98,75*	*94,27*	*96,39*	*95,19*	*94,55*	*94,86*
Monoterpenos total (%)			*82,28*	*63,16*	*9,66*	*15,57*	*37,37*	*40,82*
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			*80,94*	*61,03*	*8,19*	*14,41*	*36,04*	*38,69*
Monoterpenos oxigenados (%)			*1,34*	*2,13*	*1,46*	*1,16*	*1,33*	*2,13*
Sesquiterpenos total (%)			*16,47*	*31,12*	*86,73*	*79,63*	*57,18*	*54,04*
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			*15,79*	*31,12*	*81,96*	*72,73*	*51,30*	*50,35*
Sesquiterpenos oxigenados (%)			*0,68*	*0,00*	*4,77*	*6,90*	*5,88*	*3,69*
Compostos identificados			*18*	*12*	*19*	*17*	*20*	*19*

Tabela 10: Continuação...

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
			Concentração %[3]					
α-tujeno	924	924	N.D	N.D	N.D	0,38	N.D	N.D
α-pineno	932	931	N.D	N.D	N.D	1,86	N.D	N.D
Sabineno	969	993	4,03c	3,81c	2,86a	2,52a	N.D	N.D
β-pineno	974	992	29,63h	21,78i	20,45j	37,97a	26,55b	14,59c
Mirceno	988	1001	1,06g	1,07g	0,67d	0,44a	N.D	0,40a
α-terpineno	1014	1023	0,30a	0,24e	0,13b	N.D	0,31a	0,11b
p-cimeno	1020	1024	N.D	N.D	N.D	0,12a	N.D	N.D
Limoneno	1024	1034	0,78ab	0,99abc	0,55ab	0,31a	1,12bc	0,28a
γ-terpineno	1054	1062	0,51f	0,55d	0,25a	N.D	N.D	0,21a
Isoterpinoleno	1085	1089	N.D	N.D	N.D	N.D	0,22a	0,11b
Terpinenol-4	1174	1177	1,03f	1,25h	0,40e	N.D	1,12a	0,81b
αterpineol	1186	1191	0,46e	0,38a	N.D	N.D	0,37a	0,70b
Citronelato de metila	1257	1261	0,80c	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Isoledeno	1374	1376	0,70g	1,10h	1,05h	N.D	0,51a	0,81b
β-bourboneno	1387	1385	0,40de	0,96h	0,78g	0,28a	0,32ab	0,11c
β-cariofileno	1417	1420	3,45i	4,81j	8,45k	0,49a	0,77b	1,17c
α-humoleno	1452	1454	0,62e	0,95f	1,74g	N.D	N.D	N.D
Aromadendreno (dehidro)	1460	1461	N.D	N.D	N.D	N.D	0,33a	N.D
D-germacreno	1484	1484	15,47h	15,57h	19,35i	8,84a	13,15b	17,52c
Biciclogermagreno	1500	1501	27,37g	31,51h	31,43h	35,43a	47,09b	52,07c
Éter italiceno	1515	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,20a
1-fenil-heptanona-3	1524	1525	2,25f	2,27f	2,72e	N.D	1,33a	2,03b
Espatulenol	1577	1579	5,87h	4,22f	2,81i	8,26a	1,50b	1,91c
Globulol	1590	1585	1,12c	0,76f	0,80f	0,52a	0,40b	1,10c
Total (%)			*95,87*	*92,23*	*94,45*	*97,42*	*95,07*	*94,12*
Monoterpenos total (%)			*38,61*	*30,08*	*25,31*	*43,60*	*29,68*	*17,21*
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			*36,32*	*28,45*	*24,91*	*43,60*	*28,19*	*15,70*
Monoterpenos oxigenados (%)			*2,29*	*1,62*	*0,40*	*0,00*	*1,49*	*1,51*
Sesquiterpenos total (%)			*57,25*	*62,15*	*69,14*	*53,82*	*65,39*	*76,92*
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			*48,01*	*54,90*	*62,81*	*45,03*	*62,16*	*71,67*
Sesquiterpenos oxigenados (%)			*9,24*	*7,25*	*6,33*	*8,78*	*3,23*	*5,25*
Compostos identificados			*18*	*17*	*16*	*13*	*15*	*17*

[1] Índice de Retenção, segundo Adams .[79]

[2] Índice de Retenção médio calculado com base na mistura de hidrocarbonetos de C7 –C30.

[3] Concentração baseada na normalização da área dos picos, as médias (de 3 injeções) seguidas de letras iguais entre colunas não apresentam diferença, num nível de significância de 5% pelo teste Tukey .

N.D – Não detectado.

Na figura 19, a análise de agrupamento apresenta a formação de dois grandes grupos, o primeiro formado por amostras do verão (janeiro e fevereiro) e outro grande grupo com as demais. Os subgrupos observados no grande grupo são constituídos de outono e inverno (maio, junho e julho com teores aproximados de mono e sesquiterpenos) que está ligado a um do inverno (agosto e setembro). A primavera forma dois subgrupos (novembro e outubro e um isolado com dezembro). Outono e verão formam um subgrupo com amostras do final do verão e inicio do outono (março e abril). O mês de dezembro forma um subgrupo isolado, mas está ligado com março e abril por formar com esses um grupo de amostras com menores teores de β-pineno, e também por compartilhar junto com o mês de abril períodos de menores índices de precipitação, a proximidade entre dezembro e abril também é observada na ACP entre o rendimento e as variáveis ambientais (figura 15). Mesmo com a ausência de dados ambientais na análise de agrupamento, é possível identificar novamente a formação de grupos de composto conforme o período de coleta do material vegetal.

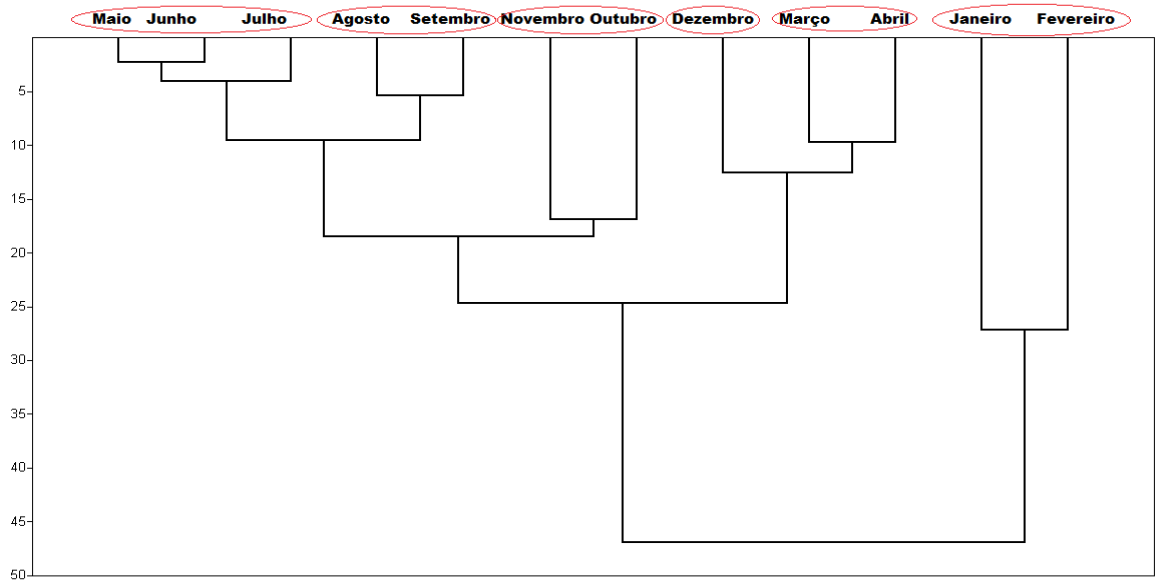


Figura 19. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus* .

As duas principais componentes da análise de componentes principais (ACP), figura 20, explicam 97,67% da variabilidade, ela exibe os mesmos grupos formados na análise de agrupamento, mesmo sendo a análise de agrupamento baseada na distância euclidiana, e a análise de componentes principais na matriz de correlação de Pearson. O mês de setembro está um pouco distante do mês de agosto nesta análise devido ao elevado teor do composto β-cariofileno (IRL 1417) de 8,45%. O único monoterpeno majoritário, o β-pineno (IRL 974), esta oposto aos sesquiterpenos. O ângulo formado entre o β-pineno (IRL 974) e o D-germacreno (IRL 1484) mostra sua relação inversa, quando a concentração de β-pineno é elevada, a de D-germacreno é baixa. Nesta distribuição biplotada as retas também indicam o período onde determinado terpeno teve seu pico de maior concentração.

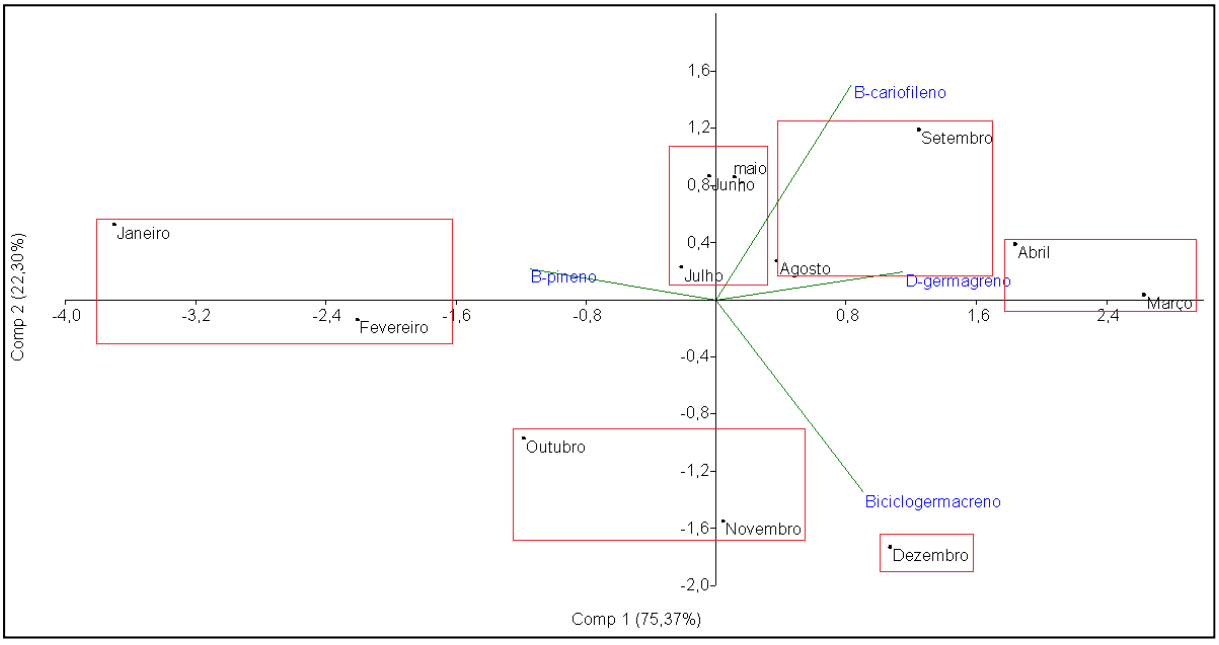


Figura 20. Análise de componentes principais dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M2 de *Myrocarpus frondosus*

4.4.3 Matriz 3

Para a M3 da espécie, a caracterização da composição química do óleo essencial das folhas está expressa na tabela 11, onde demonstram-se poucas peculiaridades entre as estações do ano. A primavera foi a que apresentou maior

variação, sendo que somente nesta estação os p-cimeno (IRL 1020), propanoato de ciclohexila (IRL 1130), isotujol (IRL 1134), cis-butanoato de hexenila (IRL 1184), mirtenol (IRL 1194) epóxido italiceno (IRL 1547), cariofileno (14 hidroxi 9-epi-E) (IRL 1668), β- davanona-2-ol (IRL 1718) e o cedril metil cetona (IRL 1775) foram detectados. Também nesta estação, no mês de novembro, o teor de β-pineno (IRL 974) foi o mais elevado para esta matriz (51,04%), e os compostos D-germacreno (IRL 1484) e o biciclogermagreno (IRL 1500) não foram detectados.

Outono se destaca apenas pela exclusividade do sesquiterpeno oxigenado éter italiceno (IRL 1515), e no verão, estação com menor média de monoterpenos (14,63%) e maior de sesquiterpenos (81,61%).

Os compostos β-pineno (IRL 974), limoneno (IRL 1024), terpinenol-4 (IRL 1174), β-cariofileno (IRL 1417), espatulenol (IRL 1577) e o globulol (IRL 1590) foram detectados durante todos os meses de execução do trabalho na M3.

Tabela 11. Composição Química do óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus*.

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho
			Concentração %[3]					
Sabineno	969	996	N.D	N.D	N.D	1,42b	2,38a	3,64c
β-pineno	974	994	10,25d	7,20e	11,86f	21,88g	15,48h	21,31i
Mirceno	988	1003	0,20b	0,77d	N.D	0,62e	0,73d	1,09c
α-terpineno	1014	1025	0,22ab	0,33c	0,19bd	N.D	0,15eg	0,27f
Limoneno	1024	1034	0,77d	0,94e	0,59f	0,38b	0,61f	0,91e
Trans ocimeno	1044	1047	1,55b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
γ-terpineno	1054	1062	0,38a	0,67b	0,32c	0,21d	0,31c	0,49e
Isoterpinoleno	1085	1089	0,20a	0,34b	0,14c	N.D	N.D	N.D
Linalool	1095	1100	0,38c	0,09d	N.D	N.D	N.D	N.D
Terpinenol-4	1174	1178	0,93d	1,73e	0,75f	0,58ag	0,69f	0,99d
αterpineol	1186	1191	0,55a	0,77b	0,31c	0,30c	0,32c	0,37c
Citronelato de metila	1257	1261	N.D	1,04d	0,45e	0,74a	0,86f	0,68g
Isoledeno	1374	1377	N.D	1,21d	0,94e	0,51a	1,28f	1,20d
β-bourboneno	1387	1385	N.D	0,36a	0,26ab	0,24b	0,78c	0,75cd
β-cariofileno	1417	1421	1,12c	7,64d	11,90e	0,89a	2,68f	3,56g
α-humoleno	1452	1454	N.D	0,98a	1,75b	N.D	0,49c	0,61d
Aromadendreno (dehidro)	1460	1461	0,29a	N.D	N.D	N.D	0,90b	0,76c
D-germacreno	1484	1485	17,93c	21,95d	25,61e	13,69f	15,95bf	15,44g
Biciclogermagreno	1500	1504	56,72b	46,68c	38,66d	48,72e	33,18f	32,28g
Cubebol	1514	1515	0,22a	N.D	0,28a	N.D	0,44b	N.D
Éter italiceno	1515	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	0,65a	0,54a
1-fenil-heptanona-3	1524	1525	1,46c	2,09d	1,80e	1,61f	3,34g	2,77h
Espatulenol	1577	1580	1,31cd	0,78e	1,18d	3,87f	7,76g	4,83h
Globulol	1590	1585	0,51c	0,44c	0,75ad	0,70ad	1,79e	1,14f
Total (%)			94,98	96,00	97,72	96,38	90,77	93,63
Monoterpenos total (%)			15,42	13,87	14,61	26,14	21,54	29,75
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			13,56	10,25	13,09	24,51	19,66	27,71
Monoterpenos oxigenados (%)			1,86	3,62	1,52	1,63	1,88	2,04
Sesquiterpenos total (%)			79,56	82,13	83,11	70,24	69,24	63,89
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			76,07	78,81	79,11	64,06	55,25	54,61
Sesquiterpenos oxigenados (%)			3,50	3,31	4,00	6,18	13,98	9,28
Compostos identificados			18	19	18	16	21	20

Tabela 11: Continuação ...

Composição Química	IRL[1]	IR[2]	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
			Concentração %[3]					
Sabineno	969	996	4,98d	2,92f	2,17a	N.D	1,99a	N.D
β-pineno	974	994	27,17j	22,74k	21,25i	14,00a	51,04b	12,35c
Mirceno	988	1003	1,24f	0,77d	0,60e	0,51a	0,19b	1,04c
α-terpineno	1014	1025	0,31c	0,16dg	0,19bg	N.D	N.D	0,23a
p-cimeno	1020	1024	N.D	N.D	N.D	N.D	0,44	N.D
Limoneno	1024	1034	0,93e	0,73d	0,51g	0,32a	0,38b	0,67c
Trans ocimeno	1044	1047	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,14a
γ-terpineno	1054	1062	0,52e	0,42a	0,36ac	N.D	N.D	0,38a
Isoterpinoleno	1085	1089	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,21a
Linalool	1095	1100	N.D	N.D	N.D	N.D	0,75a	0,41b
Propanoato de ciclohexila	1130	1137	N.D	N.D	N.D	N.D	0,28	N.D
Isotujol	1134	1139	N.D	N.D	N.D	N.D	1,86	N.D
Terpinenol-4	1174	1178	1,21h	0,98d	0,59g	0,51ag	0,86b	1,12c
Cis-butanoato de hexenila	1184	1186	N.D	N.D	N.D	N.D	0,21	N.D
α-terpineol	1186	1191	0,57a	0,36c	N.D	N.D	0,50a	0,77b
Mirtenol	1194	1197	N.D	N.D	N.D	N.D	2,14	N.D
Citronelato de metila	1257	1261	1,10h	N.D	N.D	0,77a	1,52b	1,40c
Isoledeno	1374	1377	0,89g	0,97e	0,78b	0,51a	0,76b	0,64c
β-bourboneno	1387	1385	0,45e	0,70d	0,59f	0,33a	N.D	N.D
β-cariofileno	1417	1421	5,69h	2,38i	3,12j	0,98a	0,41b	1,20c
α-humoleno	1452	1454	1,13e	0,37f	0,55cd	N.D	N.D	N.D
D-germacreno	1484	1485	15,54fg	16,14bf	16,73a	16,58a	N.D	16,12bf
Biciclogermagreno	1500	1504	22,81h	35,54i	35,09i	52,43a	N.D	56,24b
Cubebol	1514	1515	N.D	N.D	N.D	N.D	0,23a	N.D
1-fenil-heptanona-3	1524	1525	2,34i	2,58j	2,92k	1,39a	N.D	1,52b
Epoxido Italiceno	1547	1549	N.D	N.D	N.D	N.D	0,43	N.D
Espatulenol	1577	1580	5,53i	5,61i	6,12j	6,87a	16,46b	1,42c
Globulol	1590	1585	1,40g	0,86d	1,62b	0,74a	1,58b	0,67a
Cariofileno (14 hidroxi 9-epi-E)	1668	1671	N.D	N.D	N.D	0,22a	0,46b	N.D
β-davanona-2ol	1718	1720	N.D	N.D	N.D	N.D	1,46	N.D
Cedril metil cetona	1775	1782	N.D	N.D	N.D	N.D	0,41	N.D
Total (%)			93,81	94,24	93,18	96,15	84,33	96,52
Monoterpenos total (%)			38,04	29,08	25,67	16,10	62,14	18,72
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			35,16	27,73	25,08	14,82	54,03	15,02
Monoterpenos oxigenados (%)			2,88	1,34	0,59	1,28	8,11	3,70
Sesquiterpenos total (%)			55,78	65,16	67,51	80,05	22,19	77,8
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			46,51	56,11	56,85	70,83	1,17	74,2
Sesquiterpenos oxigenados (%)			9,26	9,05	10,66	9,22	21,02	3,61
Compostos identificados			18	17	16	14	22	18

[1] Índice de Retenção, segundo Adams .[79]

[2] Índice de Retenção médio calculado com base na mistura de hidrocarbonetos de C7 –C30.

[3] Concentração baseada na normalização da área dos picos, as médias (de 3 injeções) seguidas de letras iguais entre colunas não apresentam diferença, num nível de significância de 5% pelo teste Tukey.

N.D – Não detectado.

O dendrograma apresentado na figura 21, foi elaborado utilizando os compostos de maior ocorrência da M3, os teores de D-germacreno e biciclogermagreno mesmo não sendo detectados em novembro de 2011 foram inseridos na análise de agrupamento. Mais uma vez, mesmo sem a inserção de dados ambientais, foi possível identificar grupos de amostra pela época de coleta do material vegetal. Inicialmente há formação de dois grupos, um com o mês de novembro, provavelmente devido ao elevado ter de β-pineno e ausência de D-germacreno e o biciclogermacreno, e outro grande grupo com as outras amostras. Neste ultimo grupo, foi formado dois grandes subgrupos, onde temos amostras da primavera e verão (outubro, dezembro e janeiro), amostras do inverno (abril) e amostras apenas do verão (grupo com os meses de fevereiro e março). A amostra de abril de certo modo sempre se apresenta próxima a de dezembro para todas as matrizes conforme exibido na figura 18 e 19, são épocas de menor precipitação (tabela 5). Outro subgrupo é formado por amostras do outono e inverno (maio, junho, agosto e setembro) e a amostra de julho referente ao inverno. Essa amostra do inverno forma um pequeno grupo separado devido a baixa concentração de biciclogermacreno.

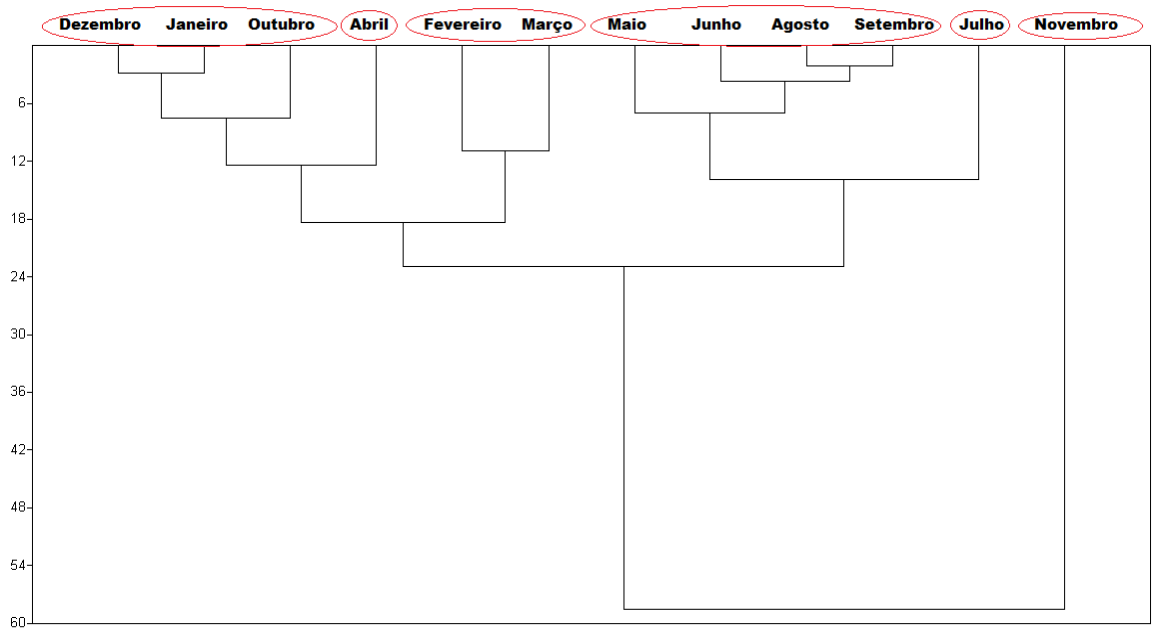


Figura 21. Dendrograma dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus.*

Pela análise de componentes principais dos compostos de maior incidência da M3, mesmo utilizados para a análise de agrupamento, observa-se que há formação dos mesmos grupos de amostras. O mês de outubro, embora no mesmo grupo, se distancia mais de dezembro e janeiro por apresentar menor teor de biciclogermagreno (IRL 1500), em relação a esse dois meses (figura 22). As duas componentes principais explicam 78,87% da variância. Há semelhança entre a relação dos compostos o β-pineno (IRL 974), β-cariofileno (IRL 1417), D-germacreno (IRL 1484) e o biciclogermagreno (IRL 1500) com a resposta obtida na M2. A relação do monoterpeno o β-pineno (IRL 974) os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (IRL 1577) e o globulol (IRL 1590) ocorre em função do teor elevado desses compostos no mês de novembro, maio e setembro, e também é identificado na figura 22 a relação próxima dos sesquiterpenos na sua biossíntese. Os monoterpenos limoneno (IRL 1024) e terpinenol-4 (IRL 1174) estão diretamente correlacionados, geralmente o aumento na concentração de um desses componentes resulta em elevação no teor do outro. Conforme ocorreu na M2, a organização das retas está conforme o período de maior ocorrência do composto.

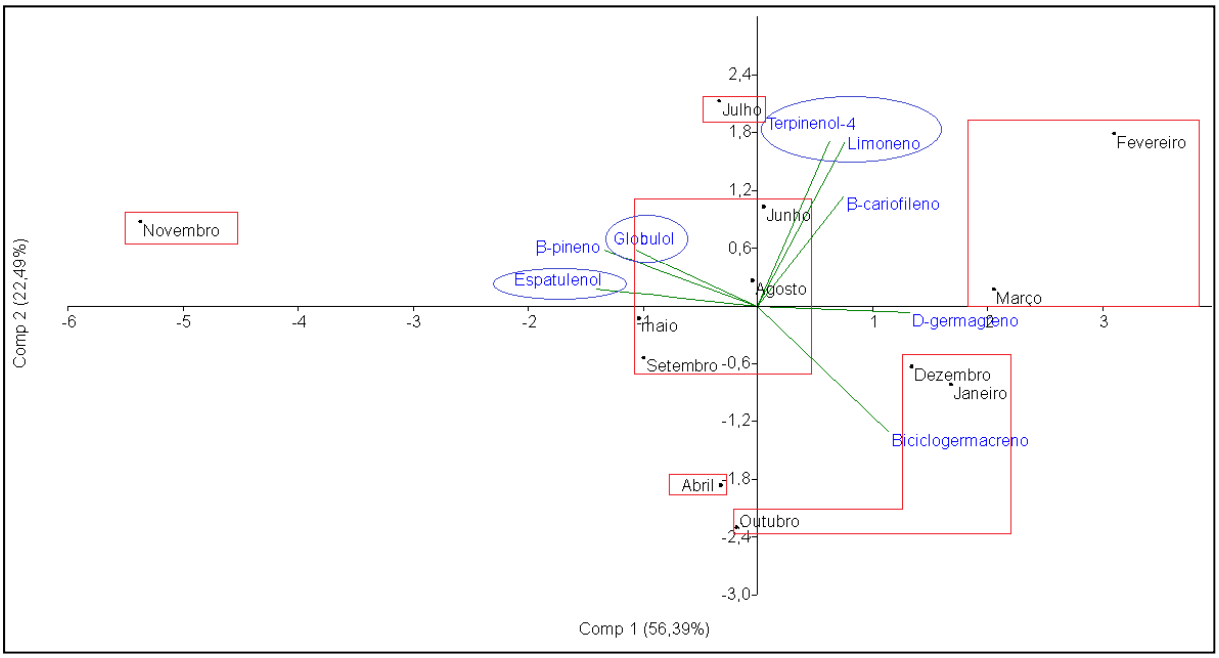


Figura 22. Análise de componentes principais dos compostos de maior incidência identificados no óleo essencial das folhas da M3 de *Myrocarpus frondosus.*

4.5. Relações entre as matrizes

O gráfico 6 apresenta a composição química do óleo essencial das três matrizes no período de um ano. Podemos observar que durante o outono e inverno, a variação entre a concentração dos compostos se torna mais constante. Assim, na primavera e verão são observadas algumas diferenças nas concentrações dos compostos presentes na *M. frondosus*.

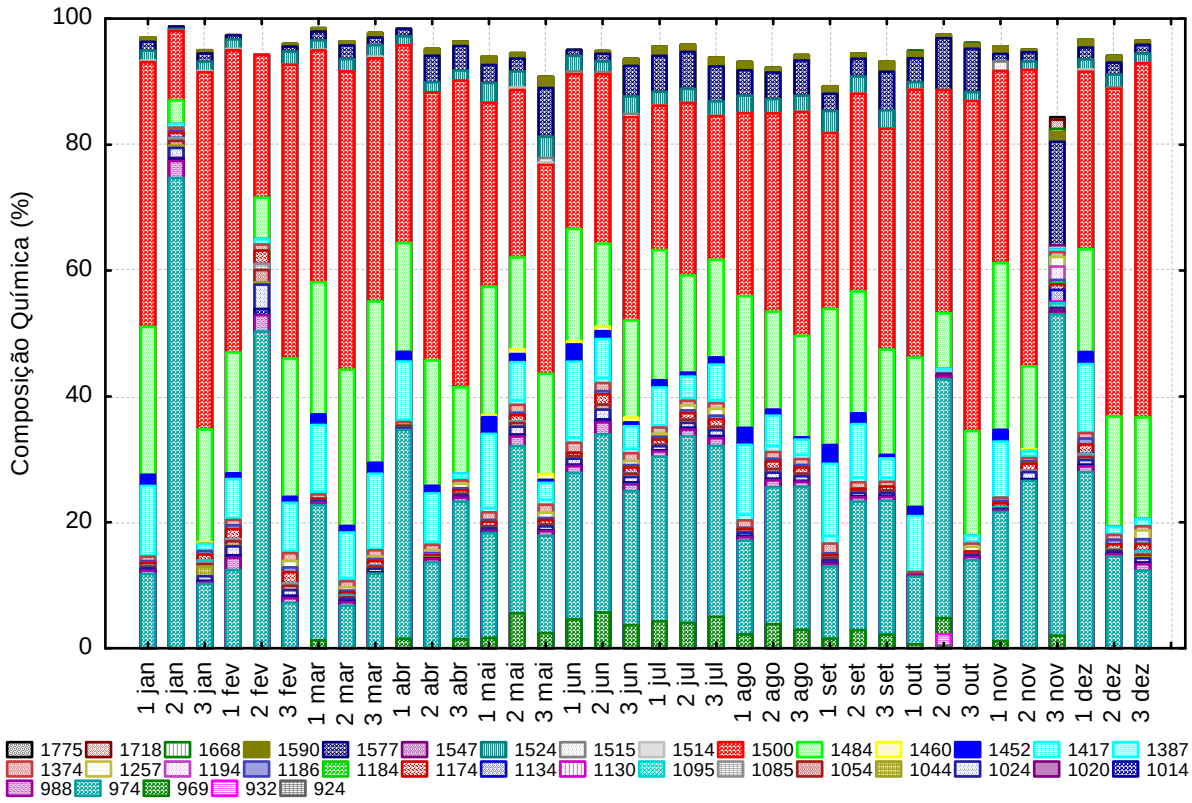


Gráfico 6: Composição química do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Os compostos de maior ocorrência encontrados nas três matrizes do óleo essencial da espécie foram o β-pineno (IRL 974), limoneno (IRL 1024), β- cariofileno (IRL 1417), D-germacreno (IRL 1484), biciclogermagreno (IRL 1500), e o espatulenol (IRL 1577). As concentrações dos compostos majoritários encontram-se no gráfico 7 onde exibe a semelhança nos teores dos compostos β-pineno (IRL 974) biciclogermacreno (IRL 1500) durante o outono e o inverno, principalmente no mês de julho.

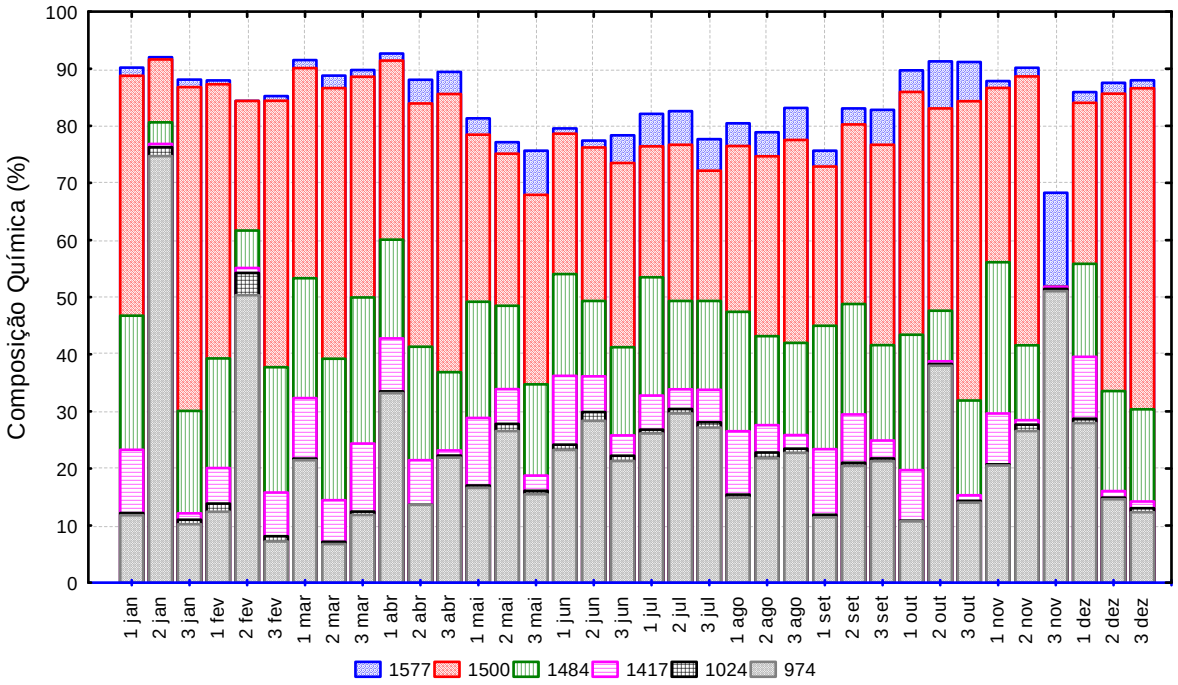


Gráfico 7: Compostos de maior ocorrência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Embora os monoterpenos tenham apresentado a classe de maior variedade de compostos com dezessete dos trinta e cinco detectados, os sesquiterpenos representam a classe de compostos de maior concentração para todas as três matrizes (média de 66,43%). O D-germacreno (IRL 1484) e biciclogermagreno (IRL 1500) são os compostos de maior concentração desta classe com média respectivamente de 17,52% e 35,82%. Os monoterpenos apresentam média de 28,47%, especialmente o β-pineno (IRL 974) é o composto de maior concentração entre eles com média de 22,73%.

Nos meses de janeiro e fevereiro para M2 e novembro para M3, devido ao elevado teor de β-pineno (74,70%, 50,32% e 51,04% respectivamente), a classe dos monoterpenos apresentou maior concentração em relação aos sesquiterpenos. Os compostos oxigenados apresentaram baixas concentrações, sendo seu máximo de 29,13% na M3 no mês de novembro. Destacam-se como oxigenados os sesquiterpenos o espatulenol (IRL 1577) e o globulol (IRL 1590) e os monoterpenos terpinenol-4 (IRL 1174) e o α-terpineol (IRL 1186).

Os sesquiterpenos D-germacreno e biciclogermacreno são compostos comumente encontrados em óleos essenciais, e também são majoritários nos óleos essenciais das folhas de *Eugenia neonitida,*[87] *Lantana camara L. e Lantana SP,*[88] *Casearia sylvestris,*[26] do óleo essencial de folhas e galhos de *Ocotea puberula*[23] e também do óleo essencial do fruto de uma planta tóxica de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae).[89] O biciclogermacreno foi isolado pela primeira vez no óleo de *Citrus junos* em 1969 por Nishimura,[90] juntamente com o D-germacreno e o B-germacreno. Na literatura de óleos essenciais, o monoterpeno β-pineno é identificado com um dos compostos majoritários do óleo essencial de diversas espécies, como das folhas de *Eugenia rotundifolia*.[87] *Sextonia rubra*,[91] do óleo essencial das folhas frutos e caule de *Pseudoxandra cuspidata.*[22]

Em espécies de Fabaceae, o limoneno (IRL 1024), está presente no óleo essencial de *Ceratonia siliqua*,[46] o α-humuleno (IRL 1454) e o biciclogermacreno (IRL 1500) no óleo essencial das folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel,[47] em espécies do gênero *Copaifera* o β-cariofileno (IRL 1417), D-germacreno (IRL 1484), α-humuleno (IRL 1454) e o biciclogermagreno (IRL 1500) também são detectados.[92]

4.6. Relações observadas na composição química do óleo essencial

A variação entre o total de mono e sesquiterpenos sempre ocorreu de modo recíproco, em geral o teor de sesquiterpenos sempre foi maior. Durante o outono e inverno a relação de mono e sesquiterpenos se mantém de maneira mais estável do que na primavera e verão, apresentado no gráfico 8. Esta relação recíproca também foi observada em óleo das folhas da angiosperma *Lippia alba.*[84]

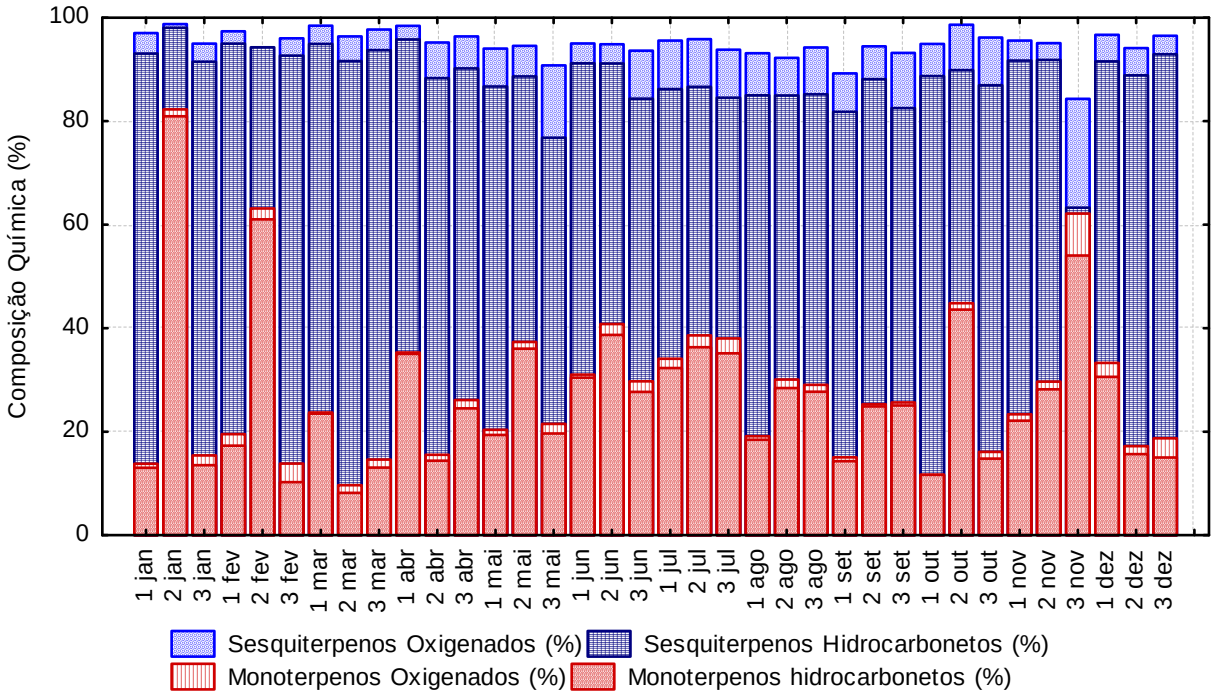


Gráfico 8: Relação entre monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Na figura 23, podemos observar que, analisando os compostos de maior incidência de todas as matrizes, com 81,38% da variância explicada, não há um composto específico que caracterize as estações do ano, e também que o composto majoritário Biciclogermacreno (IRL 1500) é o de menor influencia sobre as estações. Mas é possível visualizar a forte relação existente entre os compostos D-germacreno (IRL 1484) e β-cariofileno (IRL 1417) para a matriz 1. Na maioria dos períodos, o teor destes compostos na M1 era maior do que para as demais.

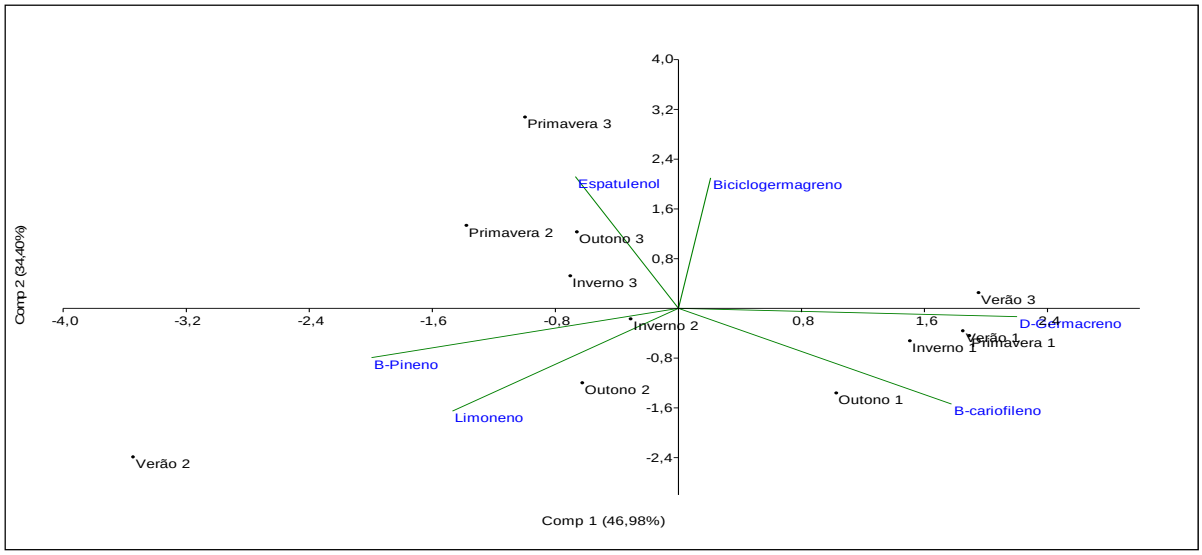


Figura 23. Análise de componentes principais entre os compostos de maior incidência de todas as matrizes e as estações do ano

4.7. Relações entre monoterpenos

Considerando a matriz de correlação de Pearson (r^2), tabela 12, para os monoterpenos de maior ocorrência β-pineno (IRL 974), mirceno (IRL 988), limoneno (IRL 1024) e o terpinenol-4 (IRL 1174), a correlação menor observada foi entre o composto com maior concentração (β-pineno) e o oxigenado (terpinenol-4). O monoterpeno β-pineno apresenta a menor correlação com os demais. Observando a variação da composição química dos compostos mirceno, limoneno e o terpinenol-4, é possível perceber a relação mutua na concentração desses compostos, de modo que o aumento na concentração de um desses compostos proporciona o aumento dos outros para todas as três matrizes, observado no gráfico 9.

Tabela 12. Matriz da correlação de Pearson para os monoterpenos de maior incidência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*

	β-Pineno	Mirceno	Limoneno
Mirceno	0,52		
Limoneno	0,48	0,79	
Terpinenol-4	0,19	0,62	0,76

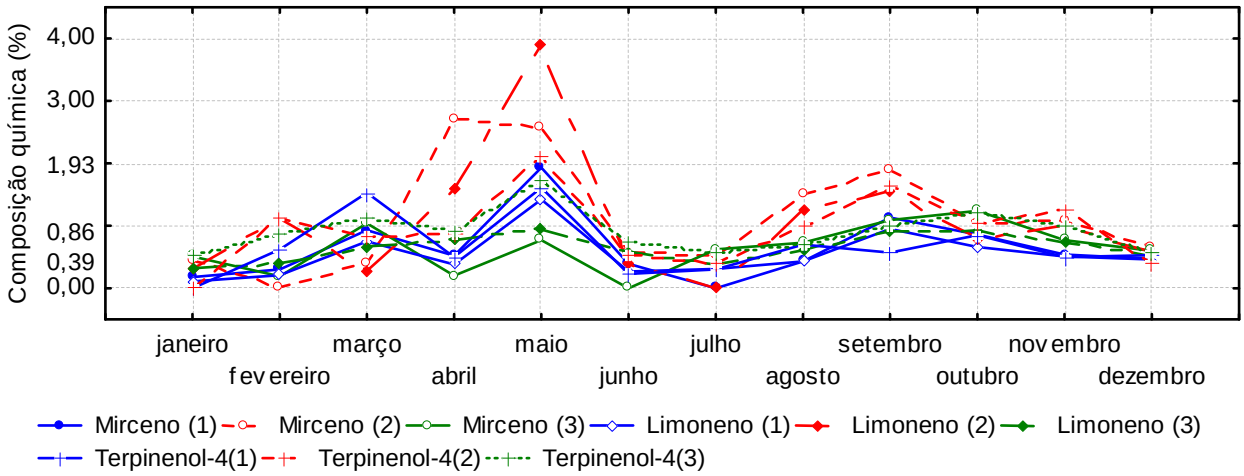


Gráfico 9: Relação entre a concentração dos monoterpenos mirceno, limoneno e terpinenol- 4 do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Na rota biossintética de monoterpenos, figura 24, os compostos α-tujeno (IRL 924), α-pineno (IRL 932), sabineno (IRL 969), β-pineno (IRL 974), mirceno (IRL 988), α-terpineno (IRL 1014), limoneno (IRL 1024), γ-terpineno (IRL 1054), isoterpinoleno (IRL 1085), linalool (IRL 1095), terpinenol-4 (IRL 1174), α-terpineol (IRL 1186) a proposta de rota foi obtida com base na literatura,[16,84] os demais compostos trans ocimeno (IRL 1044), isotujol (IRL 1134) e o mirtenol (IRL 1194) foram sugeridos neste trabalho.

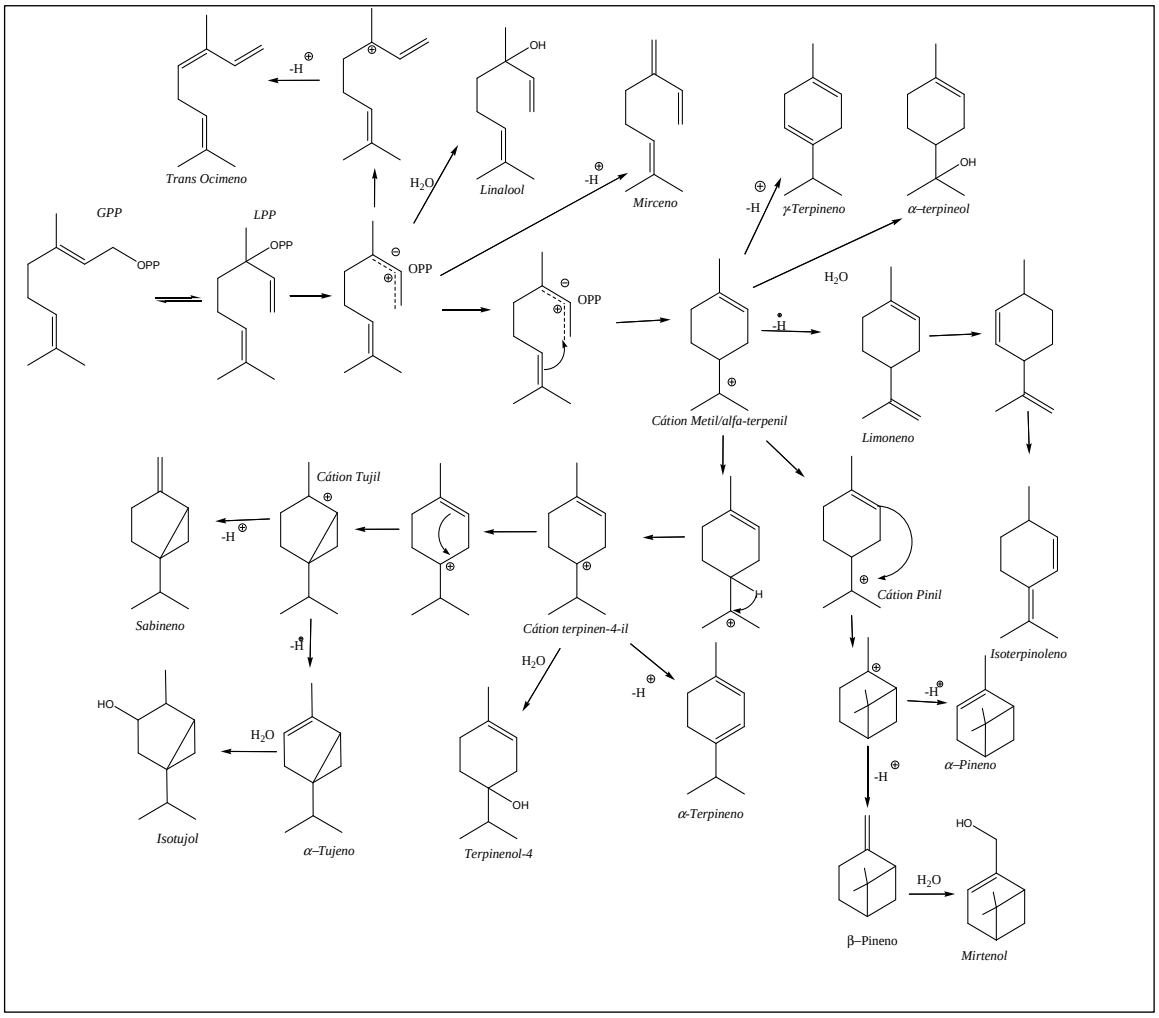


Figura 24. Biossíntese de monoterpenos detectados no óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus.*

4.8. Relação entre sesquiterpenos

A mesma analogia foi realizada para os compostos sesquiterpenos de maior incidência das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*, sendo eles o isoledeno (IRL 1374), β-cariofileno (IRL 1417), D-germacreno (IRL 1484), biciclogermagreno (IRL 1500) e espatulenol (IRL 1577). Assim segundo a matriz de correlação de Pearson (tabela 13) há correlação negativa entre os compostos hidrocarbonetos com o único oxigenado (espatulenol). Também exibe correlações menores do que as observadas

na matriz dos monoterpenos (tabela 12). O β-cariofileno e o D-germacreno mostram a maior correlação, também observada na figura 23, e uma regular variação entre seus teores durante o período do trabalho (gráfico 10).

Tabela 13. Matriz da correlação de Pearson para os sesquiterpenos de maior incidência do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

	Isoledeno	**β-cariofileno**	**D-germacreno**	**Biciclogermagreno**
β-cariofileno	0,48			
D-germacreno	0,19	0,69		
Biciclogermagreno	-0,33	-0,10	0,49	
Espatulenol	-0,10	-0,37	-0,43	-0,37

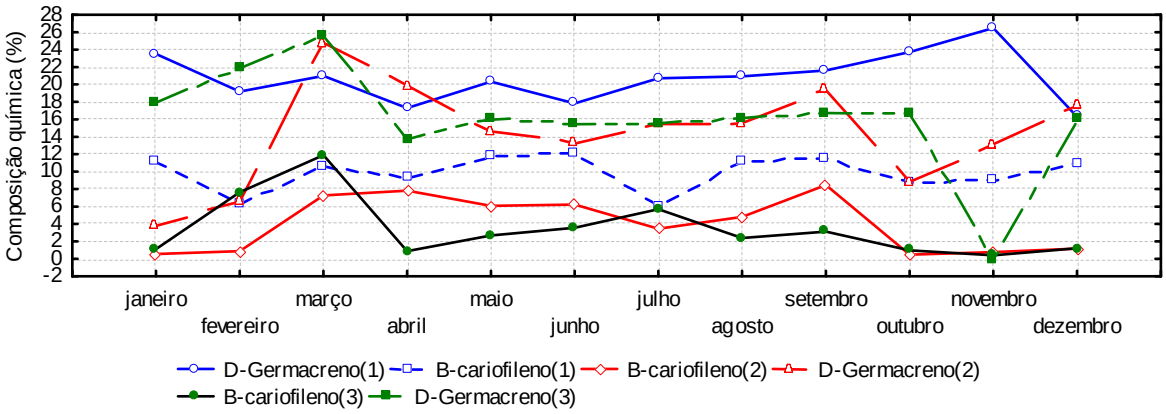
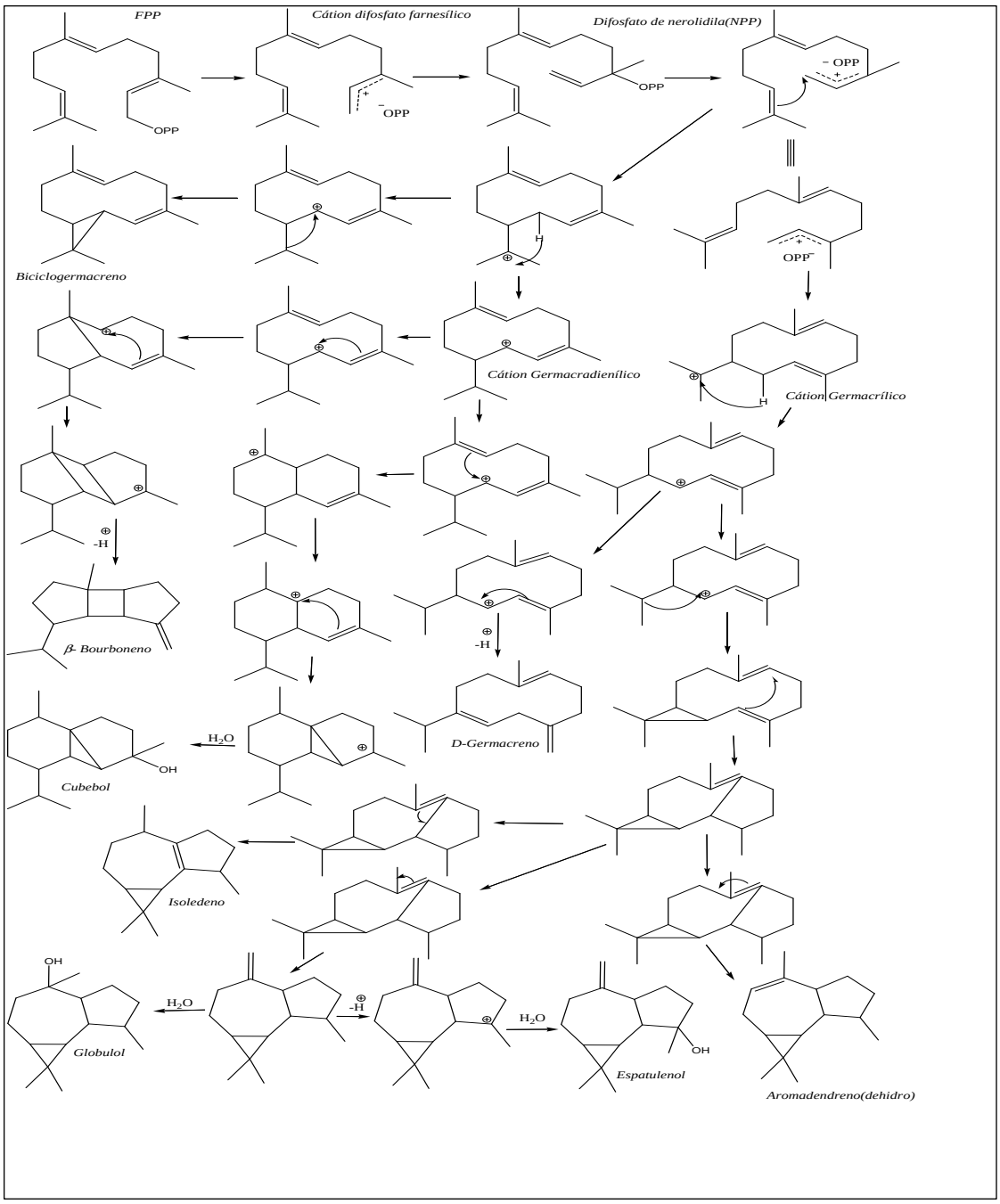


Gráfico 10: Relação entre a concentração dos sesquiterpenos β-cariofileno e o D-germacreno do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*

Para elaborar a rota biossintética dos sesquiterpenos, figura 25, os compostos β-bourboneno (IRL 1387), cubebol (IRL 1514), β-cariofileno (IRL 1417), α-humuleno (IRL 1452), D-germacreno (IRL 1484) e o biciclogermagreno (IRL 1500) a proposta de rota foi obtida com base na literatura,[16,84] os demais compostos isoledeno (IRL 1374), aromadendreno (dehidro) (IRL 1460), éter italiceno (IRL 1515), epóxido italiceno (IRL 1547), espatulenol (IRL 1577), globulol (IRL 1590), cariofileno (14 hidroxi 9-epi-E) (IRL 1668) e o β-davanona-2-ol (IRL 1718) foram propostos.


FPP
Cátion difosfato farnesílico
Difosfato de nerolidila(NPP)
OPP
Biciclogermacreno
Cátion Germacradienílico
Cátion Germacrílico
-H
β- Bourboneno
D-Germacreno
H2O
Cubebol
Isoledeno
Globulol
Espatulenol
Aromadendreno(dehidro)

Continua...

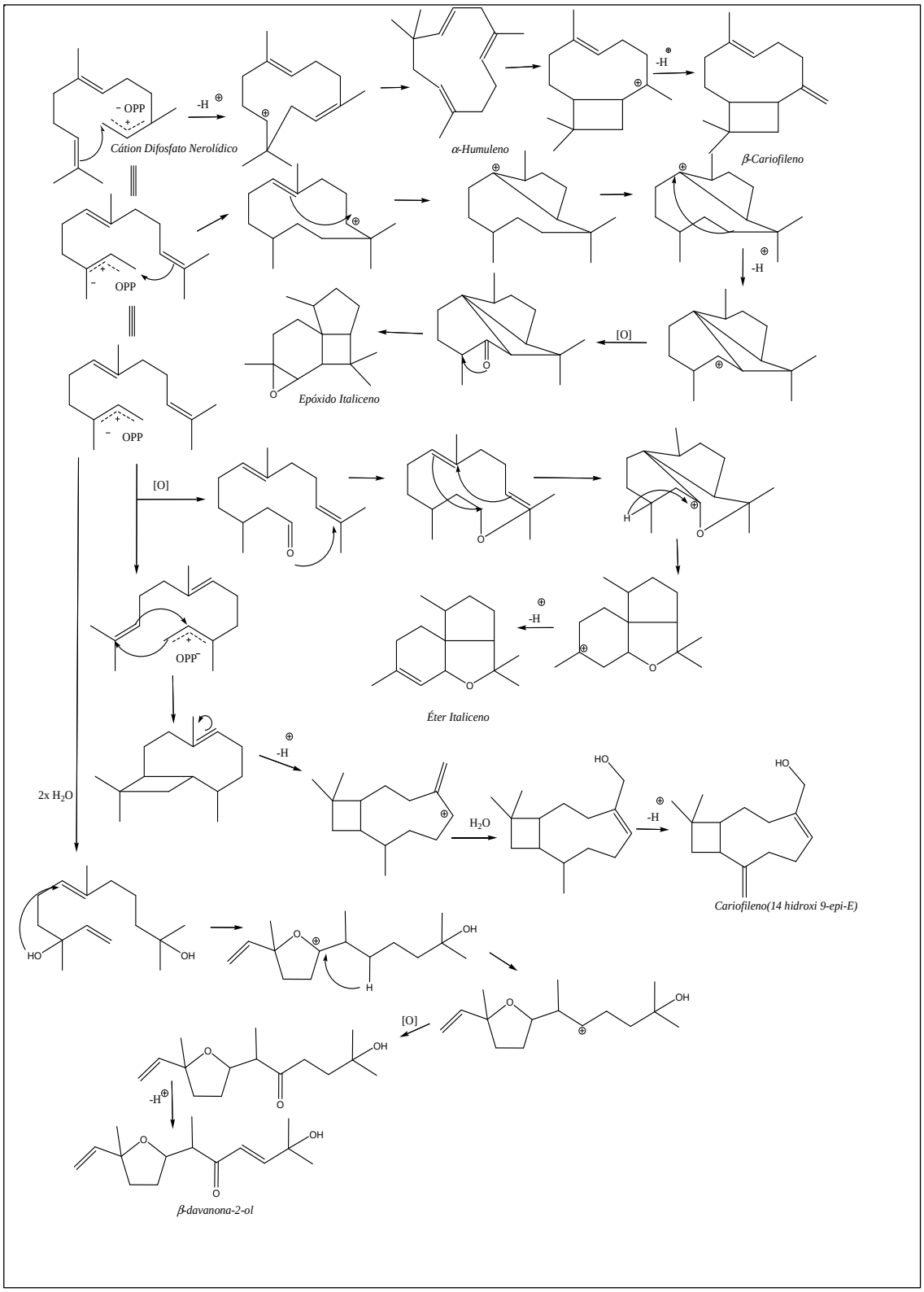


Figura 25. Biossíntese de sesquiterpenos detectados no óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

4.9. Atividade Antioxidante

Pelo método do DPPH, a 250 µg/mL de óleo essencial, a atividade antioxidante maior foi para a M3 nos meses de março e abril, 66,91% e 66,86% respectivamente. E o menor valor foi de 9,35% para M1 em junho. Os valores de atividade antioxidade das três matrizes de *Myrocarpus frondosus* pelo método DPPH estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Atividade antioxidante ao DPPH do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Matriz 1												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA%[1]	39,30a	12,98b	45,84c	53,92d	45,52c	9,35b	44,40c	33,79e	46,00**c**	33,14e	27,65f	29,76ef
Desvio Padrão	2,75	1,78	2,54	0,83	0,61	0,49	0,76	0,90	0,78	1,17	1,28	0,79
Matriz 2												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA%[1]	55,30ad	23,32b	34,16c	50,74ad	45,38e	16,69f	18,00f	24,81b	52,49ad	19,09bf	46,12de	48,72de
Desvio Padrão	0,54	0,62	0,57	3,82	1,04	1,69	1,37	1,39	0,48	0,66	1,85	2,81
Matriz 3												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA%[1]	21,68a	10,56b	66,91c	66,86c	21,82ad	36,89e	42,59f	15,95g	46,77f	17,31dg	31,60h	19,20ag
Desvio Padrão	3,34	1,54	1,69	0,51	0,62	1,75	0,62	0,44	0,45	0,71	2,72	1,69

[1] AA% é a concentração baseada na média (3 amostras) da atividade antioxidante a 250µg/mL de amostra de óleo essencial, os resultados seguidos de letras iguais entre colunas não apresentam diferença, num nível de significância de 5% pelo teste Tukey.

Os resultados obtidos pelo método FRAP estão apresentados na tabela 15, é possível observar que a atividade antioxidante foi menor 116,34 µM $FeSO_4$/g de óleo essencial, para novembro na M3. E a maior atividade antioxidante apresentada para M1 em janeiro,1660,74 µM $FeSO_4$/g de óleo essencial.

Tabela 15. Atividade antioxidante ao FRAP do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus*.

Matriz 1												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA [1]	1660,74	1330,85	1285,15	1571,41	788,70	650,12	1135,67	1156,17	498,68	1227,14	610,10	806,50
Matriz 2												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA [1]	1588,06	1108,60	1069,01	1615,04	688,09	900,84	322,21	318,57	365,79	1330,86	657,04	1371,00
Matriz 3												
Mês Ano	**Jan 2012**	**Fev 2012**	**Mar 2012**	**Abr 2012**	**Mai 2012**	**Jun 2012**	**Jul 2012**	**Ago 2012**	**Set 2012**	**Out 2011**	**Nov 2011**	**Dez 2011**
AA [1]	1260,82	1366,24	949,59	769,93	1004,85	324,08	424,22	218,97	743,55	1254,69	116,34	1416,04

[1] Atividade antioxidante em µM $FeSO_4$ / g de óleo essencial

O ensaio de atividade antioxidante, determinado pelos métodos DPPH e FRAP, em geral apresentou valores inferiores à de óleos essenciais de outras espécies como *Psidium guajava* L. (goiabeira),[93] das partes aéreas de três espécies de *Croton (C. zenhtneri e C. argyrophylloides e C. nepetaefolius.*),[94] os óleos de *Cinnamomum zeylanicum* Nees. (canela), *Myristica fragrans* Houtt. (noz-moscada), *Thymus vulgaris* L. (tomilho), *Eugenia caryophyllata* Thunb (cravo), *Ocimum basilicum* L. (manjericão) e *Origanum floribundum* Mumby (orégano).[95] Tomaino *et al.*,[95] relata a dificuldade de relacionar a atividade antioxidante com um composto terpênico especifico, visto a complexidade da composição química de óleos essenciais. Uma maneira útil para justificar estaria em uma ação de sinergismo entre os terpenos presentes no óleo essencial. Estudos sobre a ação antioxidante do isopreno em vegetais para combater o ozônio foi realizado por Loreto *et al.,*[96] mostrou que o isopreno é capaz de proteger as folhas. A atividade antioxidante de terpenos pode estar muitas vezes relacionada a compostos cíclicos com duplas na posição 1,4 do anel, como é o caso do γ-terpineno exemplificado no estudo do óleo essencial de *Satureja thymbra* L. [97]

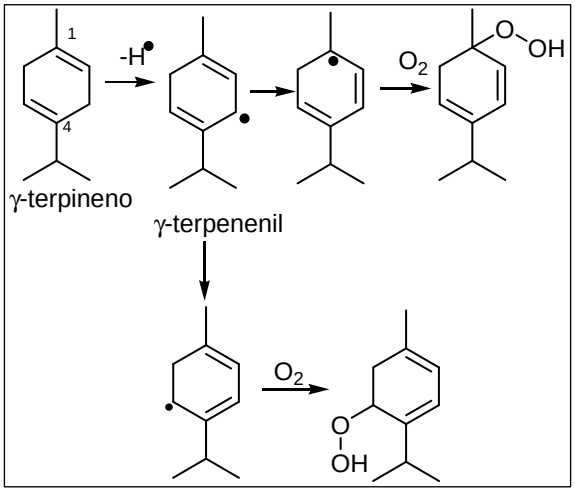


Figura 26. Mecanismo antioxidante do γ-terpineno, adaptado de Öztürk.[97]

Diferenças entre diferentes métodos de ensaio para análise antioxidante são observadas também em estudos com espécies de atividade antioxidante reconhecida como o manjericão (*Ocimum basilicum* L.)[98] e de duas espécies típicas do mediterrâneo, a *Pistacia lentiscus* L. e *Mytus communis* L.,[99] a tabela 16 mostra o resultado de alguns trabalhos encontrados na literatura para determinação de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP.

Tabela 16. Atividade antioxidante de diversas espécies vegetais pelos métodos DPPH e FRAP .

Amostra	**AA DPPH[1]**	**AA FRAP[2]**	**Referência**
Café torrado	47,25 % (10 mg/mL)	0,61 µM/L trolox/µg.mL^{-1}(0,90 mg/mL)	Vignoli *et al.*[100]
Café solúvel	80,22 % (8 mg/mL)	1,25 µM/L trolox/µg.mL^{-1}(0,45 mg/mL)	Vignoli *et al.*[100]
Alface (Extrato etanólico)	EC_{50} 17,07mg/mL	0,45 µM Fe^{2+}/mg	Tiveron[101]
Brócolis (Extrato etanólico)	EC_{50} 45,87mg/mL	0,18 µM Fe^{2+}/mg	Tiveron[101]
Salsa (Extrato etanólico)	EC_{50}109,82 mg/mL	0,10 µM Fe^{2+}/mg	Tiveron[101]
Ácido Ascórbico (Extrato etanólico)	N.R	16,23 µM Fe^{2+}/mg (5ppm)	Tiveron[101]
Cravo (óleo essencial)	34,8% (0,026µL/mL)	N.R	Tomaino *et al.*[95]
Canela (óleo essencial)	55,3% (0,065µL/mL)	N.R	Tomaino *et al.*[95]
Orégano (óleo essencial)	51,8% (0,263µL/mL)	N.R	Tomaino *et al.*[95]
Eugenol	43,5% (28,3µM)	N.R	Tomaino *et al.*[95]
Pistacia lentiscus L. (óleo essencial)	EC_{50} 11,0 mg/L	84,6 mmol Fe^{2+}/L	Chryssavgi *et al.*[99]
Myrtus communis L. (óleo essencial)	EC_{50} 11,0 mg/L	63,4 mmol Fe^{2+}/L	Chryssavgi *et al.*[99]
Mentha rotundifolia (óleo essencial)	EC_{50} 29,52 µg/mL	330,46 µM Fe^{2+}/g de óleo essencial	Riahi *et al.*[102]

[1] Atividade antioxidante pelo método DPPH
[2] Atividade antioxidante pelo método FRAP
N.R - Análise não realizada pelo método

4.10. Relações observadas com a análise de atividade antioxidante

Embora cada matriz tenha apresentado valores característicos de atividade antioxidante, para os ensaios realizados com DPPH, na maioria dos períodos, há relação direta entre as amostras. Apenas nos meses de junho e dezembro para a M3 e no mês de novembro para a M2, este comportamento foi inversamente proporcional. Com relação às análises realizadas pelo método FRAP, foi possível observar relação diretamente proporcional para as amostras nos meses de março, outubro, novembro e dezembro. As matrizes M1 e M2 também exibem essa relação nos meses de janeiro, fevereiro, abril, maio, e agosto. De todas as variáveis ambientais a precipitação mostra ter relação inversa com a atividade antioxidante para a maioria das amostras realizadas por ambos os métodos, conforme é apresentado no gráfico 11.

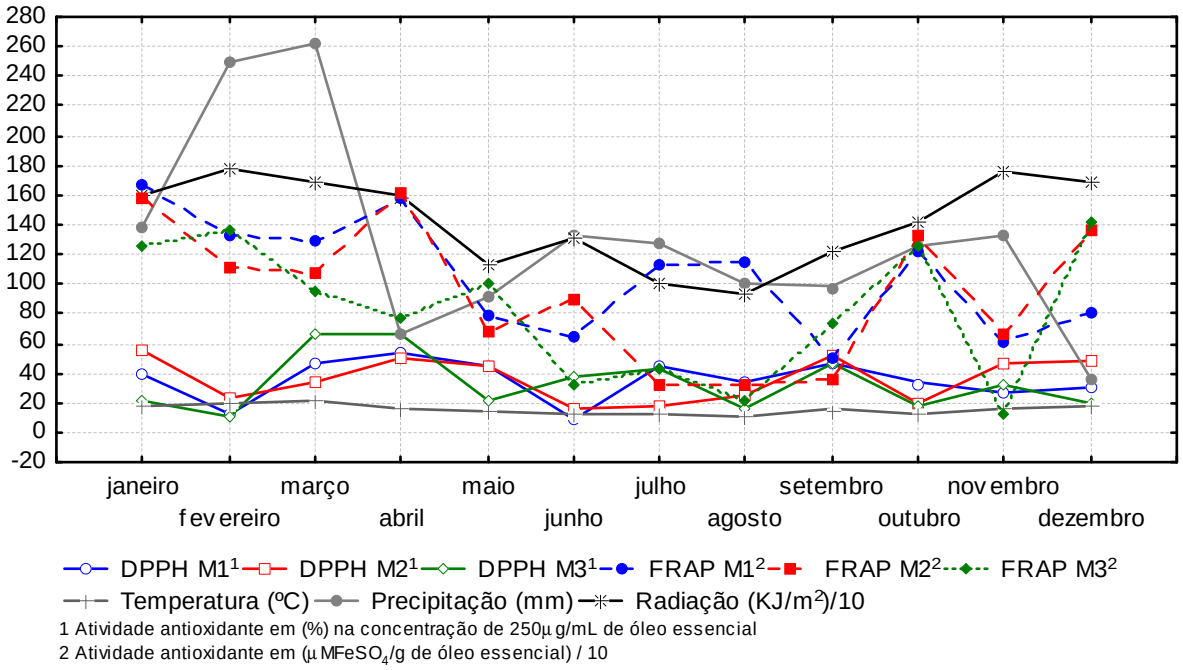


Gráfico 11: Relação entre atividade antioxidante do óleo essencial das folhas das três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais.

Através da matriz de correlação de Pearson (tabela 17), podemos confirmar a relação inversa entre a precipitação e a atividade antioxidante, principalmente com relação aos ensaios realizados com DPPH, onde os valores negativos representam

relação inversa. Também é possível visualizar a correlação entre ensaios e matrizes como o resultado da análise de DPPH da M1 que tem correlação forte com o da M2(0,50) e M3(0,56), e menor para o DPPH da M2 com a M3(0,20). Nos resultados de FRAP a M2 exibe correlação maior com a M1(0,59) e M3(0,67), do que a correlação entre M1 e M3(0,39). Entre os ensaios para a mesma matriz, os índices de correlação são maiores para as matrizes M1(0,26) e M2(0,29), sendo que essas duas matrizes sempre apresentaram fortes correlações, tanto entre ensaios como entre as matrizes.

Tabela 17. Matriz de correlação de Pearson da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de três matrizes de *Myrocarpus frondosus* e as variáveis ambientais.

	DPPH M1[1]	**DPPH M2[1]**	**DPPH M3[1]**	**FRAP M1[2]**	**FRAP M2[2]**	**FRAP M3[2]**
DPPH M2[1]	0,50					
DPPH M3[1]	0,56	0,20				
FRAP M1[2]	0,26	-0,03	0,08			
FRAP M2[2]	-0,01	0,29	0,04	0,59		
FRAP M3[2]	0,03	0,23	-0,28	0,39	0,67	
Temperatura (ºC)	0,01	0,37	0,25	0,35	0,56	0,57
Precipitação (mm)	-0,27	-0,39	0,10	0,28	0,01	0,12
Radiação (KJ/m^2) /10	-0,23	0,34	0,08	0,23	0,69	0,46

1 Atividade antioxidante em % na concentração de 250µg/mede óleo essencial
2 Atividade antioxidante em µM $FeSO_4$/g de óleo essencial

Mesmo sabendo da dificuldade de se relacionar um único terpeno especifico com a atividade antioxidante dos óleos essenciais,[95] foi proposta uma análise de componentes principais da composição química e a atividade antioxidante, visando determinar os compostos que exercem maior influência nesta atividade.

Com uma variância explicada de 47,84%, os dois sesquiterpenos majoritários, D-germacreno (IRL 1484) e biciclogermacreno (IRL 1500), exerceram maior influência utilizando o método FRAP. Para os ensaios com DPPH o composto α-humuleno (IRL 1452) exibe maior relação com a atividade antioxidante. Além desses o composto β-cariofileno (IRL 1417) também demonstra influenciar na atividade antioxidante determinada por ambos os métodos, conforme figura 27.

O α-humuleno não é um composto majoritário, mas está presente na maioria das amostras, principalmente durante o outono e inverno, e tem o mesmo precursor da rota biossintética do β-cariofileno conforme apresentado anteriormente na figura 25.

O β-cariofileno e D-germacreno também exibem forte relação como demonstrado anteriormente na figura 23 (principalmente para M1), e na relação entre sesquiterpenos (tabela 13 e gráfico 10).

Os compostos que exibem maior influência na atividade antioxidante são todos hidrocarbonetos sesquiterpenos que apresentam estruturas químicas semelhantes, apresentadas na figura 17.

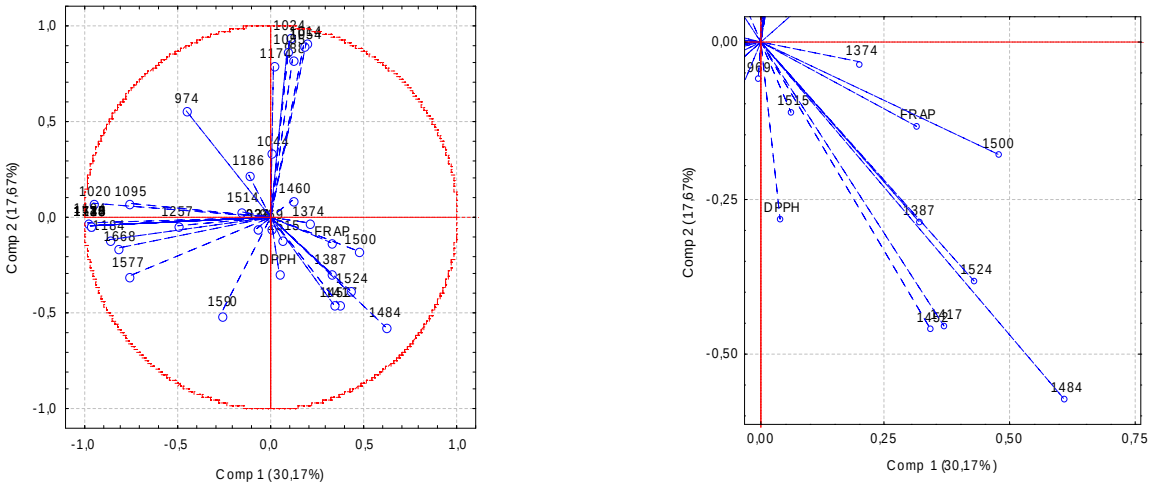


Figura 27. Análise de componentes principais entre os compostos detectados e a atividade antioxidante no óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus*

Esses quatro compostos também estão presentes em óleos essenciais com atividade antioxidante como no óleo de *Satureja thymbra* L.[97] e no óleo de *Mentha rotundifolia.*[102]

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho inédito foi possível identificar, através da cromatografia gasosa CG-DIC e CG-EM, trinta e cinco compostos no óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus,* sendo o β-pineno (IRL 974), D-germacreno (IRL 1484), e o biciclogermacreno (IRL 1500), os compostos majoritários. Além desses majoritários os compostos β-cariofileno (IRL 1417), limoneno (IRL 1024), e o espatulenol (IRL 1577) estão presentes na maioria das amostras. Desses compostos não foi possível identificar algum característico por estação, sendo que o biciclogermacreno é o que menos exerce influencia, e os compostos D-germacreno e β-cariofileno são os que têm maior relação para M1.

A variação entre o total de mono e sesquiterpenos sempre ocorreu de modo recíproco. A concentração média de monoterpenos foi de 28,47%, especialmente o β-pineno (IRL 974) com média de 22,73%, e os sesquiterpenos de 66,43%, sendo os compostos de maior concentração desta classe o D-germacreno (IRL 1484) com 17,52% e biciclogermagreno (IRL 1500) com média de 35,82%.

Houve variação no rendimento de óleo essencial extraído por hidrodestilação durante o período do trabalho, de 0,11-0,25% Sendo os maiores valores apresentados no verão e os menores no outono e inverno, de modo que a relação entre temperatura, radiação solar e rendimento se manteve, na maioria dos períodos, diretamente proporcional. Com relação à precipitação, isso só ocorreu nos meses onde a precipitação foi acima de 133 mm.

O óleo essencial das folhas de *Myrocarpus frondosus* apresentou atividade antioxidante ao DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Na concentração de 250 µg/mL de óleo essencial, a atividade antioxidante máxima foi de 66,91% e mínima de 9,35%. Pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power)* a atividade antioxidante variou de 116,34-1660,74 µM $FeSO_4$/g de óleo essencial. A precipitação é a variável ambiental, dentre as outras, a qual demonstra ter relação inversa com a atividade antioxidante por ambos os métodos. E a relação com a composição química mostra, através da análise de componentes principais, que o β-cariofileno

(IRL 1417), o α-humuleno (IRL 1452), D-germacreno (IRL 1484) e biciclogermagreno (IRL 1500) são os de maior relação com essa atividade.

Através da análise multivariada da composição química foi possível a identificação de grupos de amostras por períodos distintos, demonstrado a importância deste estudo pioneiro de metabólitos secundários das folhas da cabreúva para a identificação fitoquímica da espécie, bem como avaliação de seu potencial químico para trabalhos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gottilieb, O. R.; Borin, M. R. M. B.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2105.

2. Braz-Filho, R.; *Quím. Nova* **2010**, *33*, 229.

3. Morais, L.A.S; *Hortic. Bras*. **2009**, *27*, S4050.

4. Nascimento, I. B.; Innecco, R.; Matos, S. H.; Borges, N. S. S.; Marco, C. A.; *Rev. Caatinga* **2006**, *19*,123.

5. Mendes, E. C. **Avaliação da composição química do óleo essencial de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton fabaceae**. 2011. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Unochapecó, Chapecó,SC.

6. Sartori, A. L. B.; Tozzi, A. M. G. A.; *Acta Bot Bras.* **2004**, *18*, 521.

7. Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*, 5ª Ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, SP, 2008.

8. Perez, M. A. F. **Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão: Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** 2005. Dissertação de Mestrado do Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP.

9. Simões, C. M. O; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia:da planta ao medicamento*, 5ª ed.; Editora da UFSC/Editora UFRGS: Florianópolis/Porto Alegre, RS, 2003.

10. Biasi, L. A.; Deschamps, C.; *Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial*, 1ª ed.; Layer Studio Gráfico e Editora LTDA: Curitiba, PR, 2009.

11. Garcia, A. A.; Carrial, E. P. U. C.; *Recuca (biológica)* **2009**, *2(3),* 119.

12. Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; *Potencialidades e aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, 3ª ed.; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa: Lisboa, PT, 2007.

13. Cerqueira, M. D.; Marques, E. J.; Martins, D.; Roque, N. F.; Cruz, F. G.; Guedes, M. L. S; *Quím. Nova* **2009,** *32*, 1544.

14. Rowe, D. J.; *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances,* Blackwell Publishing LTD: Oxford, UK, 2005.

15. http://www.intracen.org, acessado em Abril de 2013.

16. Dewick, P.M.; *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2ª ed.; Jonh Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK, 2002.

17. Domínguez, X. A.; *Metodos de Investigacion Fitoquimica*, Editorial Limusar: Mexico, 1973.

18. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova*, **2007**, *30*, 374.

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

20. Petronilho, S.; Maraschin, M.; Delgadillo I.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M.; *Ind. Crops Prod.* **2011***, 34*, 1482.

21. Wang, H.; Liu, W.; Wei, S.; Yan, Z.; *Ind. Crops Prod.* **2012**, *36*, 229.

22. Trigo, J. R.; Oliveira, J.; Andrade, E. H. A.; Zoghbi, M. G. B.; *Rev. Bras. Pl. Med.*; **2007**, *9*, 113.

23. Araujo, A. J.; Lordello, A. L. L.; Maia, B. H. L. N. S.; *Rev. Vis. Academ.*, **2001**, *2*, 81.

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

25. Rosa, Y. R. S.; Blank, A. F.; Costa, L. N.; Blank, M. F. A.; Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; *Sci. Plena,* **2010**, *6*, 103102.

26. Tininis, A. G.; Assonuma, M. M.; Telascrea, M.; Perez, C. C.; Silva, M. R. S. R. M.; Favoreto, R.; Cavalheiro, A. J.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2006**, *8*, 132.

27. Castellani, D. C.; Casali, V. W. D.; Souza, A. L.; Cecon, P. R.; Cardoso, C. A.; Marques, V. B.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2006**, *8*, 62.

28. Deschamps, C.; Zanatta, J. L.; Bizzo, H. R.; Oliveira, M. C.; Roswalka, C.; *Ciênc. agrotec*. **2007**, *32*, 725.

29. Botrel, P. P.; Pinto, J. E. B. P.; Ferraz, V.; Bertolucci, S. K. V.; Figueiredo, F. C.; *Act. asci.agron*. **2010**, *32*, 533.

30. Chaves, F. C. M.; Bizzo, H. R.; Angelo, P. C. S.; Xavier, J. J. B. N.; Sá Sobrinho, A. F.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2006**, *8*, 117.

31. Mendes, E. L.; Casarin, F.; Ohland, A. L.; Flach, A.; Costa, L. A. M. A.; Denardin, R. B. N.; de Moura, N. F.; *Quím. Nova*. **2012**, *35*, 1787.

32. Vuuren, S. F. V.; Viljoen, A. M.; Özek, T.; Demirci, B.; Baser, K. H. C.; *S. Afr. J. Bot.* **2007,** *73*, 441.

33. Santos, A.; Paduan, R. H.; Gazin, Z. C.; Jacomassi, E.; Oliveira, P. S.; Cortez, D. A. G.; Cortez, L. E. R; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009,** *19*, 436.

34. Mann, J.; *Chemical Aspects of Biosynthesis,* Oxford University Press Inc.: New York, USA, 1994.

35. Martins, F. T.; Santos, M. H.; Polo, M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1203.

36. Forzza, R. C.; Leitman, P.; Coords. *Angiospermas*. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

37. Barroso, G. M. B.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil* V1, Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, SP, 1978.

38. Gao, T.; Yao, H.; Song, Y.; Liu, C.; Zhu, Y.; Ma, X.; Pang, X.; Xu, H.; Chen, S.; *J. Ethnopharm*. **2010**, *130*, 116.

39. http://www.agencia.cnptia.embrapa.br, acessado em janeiro de 2013.

40. Marchiori, J. N. C.; *Dendrologia das angiospermas: Leguminosas,* Editora UFSM:. Santa Maria, RS, 1997.

41. Barroso, G. M. B.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L.; Lima, H. C.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil* V2. UFV: Viçosa, MG, 1984.

42. Almeida, J. R. G. S.; Silva-Filho, R. N.; Numes, X. P.; Dias, C. S.; Pereira, F. O.; Lima, E. O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 638.

43. Pieri, F. A.; *Rev. Virtual Quím.* **2012**, *4*, 343.

44. Vasconcelos, K. R. F.; Veiga Junior, V. F.; Rocha, W. C.; Bandeira, M. F. C. L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *19*, 733.

45. Sachetti, C. G.; Fascineli, M. L.; Sampaio, J. A.; Lameira, O. A.; Caldas, E. D.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 937.

46. Hsouna, A. B.; Trigui, M.; Mansour, R. B.; Jarraya, R. M.; Damak, M.; Jaoua, S.; *Int. J. Food Microbiol.* **2011**,*148*, 66.

47. Santos, A. P.; Zatta, D. T.; Moraes, W. F.; Bara, M. T. F.; Ferri, P. H.; Silva, M. R. R.; Paula, J. R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 891.

48. Morais, S. M.; Dantas, J. D. P.; Silva, A. R. A.; Magalhães, E. F.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 169.

49. Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, A. T.; Munoz, V. M.; Callapa, J.; Le Men-Olivier, L.; Massiot, G.; Lavaud, C.; *Phytochemistry.* **1999,** *50*, 71.

50. Ampese, M. **Análise do uso de diferentes madeiras locais em vinho tinto.**2011. Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnologia em Viticultura e Enologia, IFRS, Bento Gonçalves, RS.

51. Baur, X.; Gahnz, G.; Chen, Z.; *J. Allergy clin. Immunol*. **2000**, *106*, 780.

52. Di Stasi, L. C.; Oliveira, G. P.; Carcalhaes, M. A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O. S.; Kakinami, S. H.; REIS, M. S.; *Fitoterapia* **2002,** *73*, 69.

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

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

55. Marriot, P. J.; Shellie, R.; Cornwell, C.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *936*, 1.

56. Huang, B.; Lei, Y.; Tang, Y.; Zhang, J.; Qin, L.; Liu, J.; *Food Chem.***2011**, *125*, 268.

57. Benyelles, B.; Allali, H.; Dib, M. E. A.; Djabou, N.; Tabti, B.; Costa, J.; *J. Sau. Chem. S*. in press

58. Zouari, S.; Ketata, M.; Boudhrioua, N.; Ammar, E.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 172.

59. Li, Y.; Kong, D.; Wu, H.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 269.

60. Tang, T. F.; Liu, X. M.; Ling, M.; Lai, F.; Zhang, L.; Zhou, Y. H.; Sun, R. R.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 1.

61. Bouzidi, L. E.; Jamali, A. C.; Bekkouche, K.; Hassani, L.; Wohlmuth, H.; Leach, D.; Abbad, A.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *43*, 450.

62. Can, O. D.; Ozkay, U. D.; Kryan, H. T.; Demirci, B.; *Phytomed*. **2012,** *19*, 306.

63. Golmakani, M. T.; Razaei, K.; *Food Chem.* **2008**, *109*, 925.

64. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de cromatografia*.Editora da UNICAMP: Campinas, SP, 2006.

65. Correa, S. M. B. B.; *Probabilidade e estatística,* 2ª ed.; PUC Minas Virtual: Belo Horizonte, MG, 2003.

66. Pinheiro, J. I.; Cunha, S. B.; Carvajal, S. R.; Gomes, G. C.; *Estatística Básica: A arte de trabalhar com dados,* Elsevier: Rio de Janeiro, RJ 2009.

67. Costa Neto, P. L. O.; *Estatística*, 3ª ed.; Editora Blücher: São Paulo, SP, 2002.

68. Walpole, R. E.; Myers, R. H.; Myers, S. L.; Ye, K.; *Probabilidade e estatística para engenharia e ciências,* 8ª ed.; Person Prentice Hall: São Paulo, SP, 2009.

69. Bakke, H. A.; Leite, A. S. M.; Silva, L. B.; *Rev. Gestão Ind.* **2008,** *4*, 01.

70. Hair, J.; Tatham, R.; Anderson, R. E.; Black, W.; *Análise Multivariada de Dados,* 5ª ed.; Bookman : Porto Alegre, RS, 2005.

71. Mingoti, S. A.; *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*, Editora Universidade Federal Minas Gerais: Belo Horizonte, MG, 2005.

72. Lima, A. R.; Pereira, R. G. F. A.; Abrahão, S. A.; *Quím. Nova* **2010**, *33*, 20.

73. Roginsky, V.; Lissi, E. A.; *Food Chem*. **2005**, *92*, 235.

74. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *Food Sci. Technol.* ***1995*****,** *28*, 25.

75. Motlhanka, D. M. T.; Habtemariam, S.; Houghton, P.; *A. J. Biomed. Resear.* **2008**, *11*, 55.

76. Molyneux, P.; *Songklanakarin J. ; Sci Technol*. **2004**, *26*, 211.

77. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396.

78. Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, A. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D.; Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125).

79. Adams, R. P.; Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy, 4ª ed.; Allured Publishing Coporantion: Carol Stream, US, 2007.

80. Costa, L. M.; Moura, N. F.; Marangoni, C.; Mendes, C. E.; Teixeira, A. O.; *Ciênci. Tecnol. Aliment.* **2010**, *30*, 51.

81. http://www.inmet.gov.br/sonabra, acessado em dezembro de 2012.

82. Hammer, O.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D.; 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica.,4(1):9pp.

83. Castro, N. E. A.; Carvalho, G. J.; Cardoso, M. G.; Pimentel, F. A.; Correa, R. M.; Guimarães, L. G. L.; *Rev. Bras. Pl .Med.* **2008**, *10*, 70.

84. Barros, F. M. C.; Zambarda, E. O.; Heinzmann, B. M.; Mallmann, C. A.; *Quím. Nova* **2009,** *32*, 861.

85. Nogueira, M. A.; Diaz, G.; Sakumo, L.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2007**, *28*, 273.

86. Fávero, L. P. L.; Chan, B. L.; Silva, F. L.; Belfiore, P. P. Análise de dados- Modelagem multivariada para tomada de decisões. Elsevier: Rio de Janeiro, RJ, 2009.

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

88. Costa, J. G. M.; Souza, E. O.; Rodrigues, F. F. G.; Lima, S. G.; Braz-Filho, R.; *Rev. bras. farmacogn.* **2009**, *19*, 710.

89. Marques, C. A.; Leitão, G. G.; Bizzo, H. R.; Kranz, W. M.; Peixoto, A. L.; Vieira, R. C. *Rev. Bras. Farmacogn*. **2008**, *18*, 415.

90. Nishimura, K.; *Tetrahedron Lett.* **1969**, *36*, 3097.

91. Alcântara, J. M.; Yamaguchi, K. K.; Veiga Junior, V. F.; *Acta Amaz.* **2013**, *43*, 113.

92. Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 273.

93. Lee, W. C.; Mahmud, R.; Pillai, S.; Perumal, S.; Ismail, S.; *APCBEE Procedia* **2012***, 2*, 86.

94. Morais, S. M.; Catunda Júnior, F. E. A.; Silva, A. R. A.; Martins Neto, J. S.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 907.

95. Tomaino, A.; Cimino, F.; Zimbalatti,V.; Venuti, V.; Sulfaro, V.; De Pasquale, A.; Saija, A.; *Food Chem.* **2005**, *89*, 549.

96. Loreto, F.; Mannozzi, M.; Maris, C.; Nascetti, P.; Ferranti, F.; Pasqualini, S. *Plant. Physiol.* **2001**, *126*, 993.

97. Öztürk, M.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 48.

98. Politeo, O.; Jukic, M.; Milos, M.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 379.

99. Chryssavgi, G.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Kibouris, T.; Michael, K.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 1120.

100. Vignoli, J. A.; Bassoli, D. G.; Benassi, M. T.; *Coffee Science* **2012**, *7*, 68.

101. Tiveron, A. P.; **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil.** 2010. Dissertação de Mestrado da Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP.

102. Riahi, L.; Elferchichi, M.; Ghazghazi, H.; Jebali, J.; Ziadi, S.; Aouadhi, C.; Chograni, H.; Zaouali, Y.; Zoghlami, N.; Mliki, A.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 883.