

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Caracterização química e avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais de quatorze espécies vegetais frente ao *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*

Chemical characterization and evaluation of the fungicidal activity of the essential oils of fourteen plant species against *Fusarium solani* f.sp. *piperis* and *Thielaviopsis paradoxa*

Kézia Rayane Roncati dos Santos

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória

2019

Kézia Rayane Roncati dos Santos

Caracterização química e avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais de quatorze espécies vegetais frente ao *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração de Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges.

Vitória
2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S237c Santos, Kézia Rayane Roncati dos, 1988-
Caracterização química e avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais de quatorze espécies vegetais frente ao *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*. / Kézia Rayane Roncati dos Santos. - 2019.
102 f. : il.

Orientador: Warley de Souza Borges.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Óleos essenciais. 2. Atividade fungicida. 3. Citotoxicidade. 4. *Fusarium solani*. 5. *Thielaviopsis paradoxa*. I. Borges, Warley de Souza. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

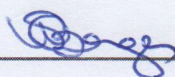
CDU: 54

Caracterização química e avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais de quatorze espécies vegetais frente ao *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*

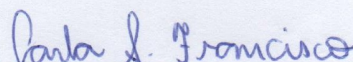
Kézia Rayane Roncati dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

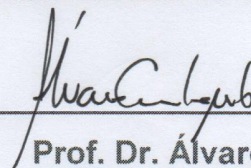
Aprovado(a) em 20/03/2019 por:



Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Dr.ª Carla Santana Francisco
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Deus, por possibilitar mais esta oportunidade de crescer em conhecimento, e nos momentos mais difíceis colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Ao meu esposo, pela infinita paciência, sacrifícios, motivação, apoio, e estar sempre disposto a cooperar para que eu pudesse realizar mais este sonho.

Aos meus familiares, por me apoiarem em todos os momentos da vida, me motivando e transmitindo a confiança necessária para superar cada obstáculo.

Ao Prof. Dr. Warley de Souza Borges, pela orientação, pela confiança, ensinamentos, pelos conselhos, por falar “calma” nos momentos de desespero e pela paciência de sempre. Ao senhor, todo o meu respeito, pelo exemplo de dedicação e determinação em alcançar seus objetivos.

À Carla, pela amizade, conhecimento e tranquilidade transmitidos, e apoio em todos os momentos que precisei.

À Diana, pela amizade, pela paciência, dicas e conhecimentos transmitidos.

Ao Rodrigo, extremamente generoso e prestativo, sempre disposto a ajudar.

Ao Jean, por ser tão prestativo e pelo auxílio na injeção das amostras no CG-EM.

Ao laboratório de Cromatografia (UFES-NCQP), por possibilitar as análises realizadas, em especial, ao prof. Dr. Ricardo Machado Kuster, por ceder espaço em seu laboratório e principalmente por todo conhecimento transmitido.

Aos professores Dr. Ricardo Machado Kuster, Dr. Álvaro Cunha Neto e à Dra. Cláudia Masrouah Jamal pelas sugestões proferidas no exame de qualificação deste trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e sua aluna Jéssyca Aparecida Paes Dutra, pela realização dos ensaios biológicos. Em especial, à Jéssyca, pela paciência e por todo conhecimento transmitido.

À Larissa, Tamires, Cristina por todo apoio prestado.

À Luana S. B. Calazans, Jaqueline Luber, João Paulo Fernandes Zorzanelli e Luciana Dias Thomaz, pelo apoio prestado na identificação e doação de algumas das espécies.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

À FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) PPE-Agro nº 76418880/16, pelo financiamento para realização deste projeto.

E àqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nas horas em que mais precisei: seja pra comemorar, seja pra rir, pra abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Origem de um fenilpropanoide.....	17
FIGURA 2. Hidrocarboneto terpênico e terpenos oxigenados.....	17
FIGURA 3. Estrutura química do isopreno, difosfato de isopentenila e do difosfato de dimetilalila.....	18
FIGURA 4. Formação dos produtos metabólicos advindos das rotas biossintéticas do MVA e MEP.	19
FIGURA 5. Estruturas químicas de monoterpenos	20
FIGURA 6. Estruturas químicas de sesquiterpenos	20
FIGURA 7. Estruturas químicas de sesquiterpenos oxigenados.....	21
FIGURA 8. Estruturas químicas de três compostos majoritários do óleo essencial de cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>).	24
FIGURA 9. Estrutura química da cânfora, terpenoide presente no óleo essencial de <i>Zhumeria majdae</i>	26
FIGURA 10. Estrutura química do componente majoritário presente no óleo essencial de <i>Vatica diospyroides</i> Symington.	27
FIGURA 11. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i>	29
FIGURA 12. Estruturas químicas de monoterpenos encontrados no óleo essencial de <i>C. alba</i> e <i>S. oblata</i>	30
FIGURA 13. Estrutura química do cinamaldeído, composto ativo extraído de diversas partes e espécies de plantas aromáticas.....	30
FIGURA 14. Pimenta do reino (<i>P. nigrum</i>) com sintomas avançados de fusariose. Necrose das folhas (A) Necrose das raízes (B).....	33
FIGURA 15. Sintomas da doença da podridão negra em frutos de abacaxi (A) e hemorragia do caule no coco (B)	35
FIGURA 16. Redução do sal de tetrazol (MTT) à formazana	45
FIGURA 17. Estruturas químicas do 1R- α -pineno e β -tujeno	49
FIGURA 18. Estruturas químicas dos terpenos α -Felandreno e β -Himachaleno.	50
FIGURA 19. Estruturas químicas dos terpenos \pm - <i>trans</i> -Nerolidol, α -Copaeno e α -Citral.....	54
FIGURA 20. Estruturas químicas do α -Gurjuneno e eugenol metil éter.....	60

FIGURA 21. Estruturas químicas dos terpenos 1,3-benzodioxole, 5-(2,2-dimetiletil), terpinoleno e α -Cubebeno.	63
FIGURA 22. Estrutura química do terpeno α -Terpineno.....	65
FIGURA 23. Estruturas químicas dos terpenos α -Selineno e δ -Cadinol.....	67
FIGURA 24. Proporção de terpenos por amostra de óleo essencial.	70
FIGURA 25. Atividade citotóxica de óleos essenciais sobre linhagem de macrófagos murinos (RAW 267.4 ATCC TIB-71) após 24 horas de exposição. Nível de significância (* $p < 0,05$) de acordo com o post hoc de Bonferroni.	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Dados referentes à massa vegetal hidrodestilada, e resultado dos rendimentos dos óleos essenciais.	47
TABELA 2. Composição química do óleo essencial de <i>B. platypoda</i>	49
TABELA 3. Composição química do óleo essencial de <i>B. trinervis</i>	51
TABELA 4. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>C. macrobracteolata</i>	52
TABELA 5. Composição química do óleo essencial dos frutos de <i>C. macrobracteolata</i>	55
TABELA 6. Composição química do óleo essencial de <i>E. elatior</i>	57
TABELA 7. Composição química do óleo essencial de <i>L. lundiana</i>	59
TABELA 8. Composição química do óleo essencial de <i>P. alata</i>	60
TABELA 9. Composição química do óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	62
TABELA 10. Composição química do óleo essencial de <i>P. miquelianum</i>	64
TABELA 11. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Protium</i> sp.....	65
TABELA 12. Composição química do óleo essencial de <i>S. brasiliensis</i>	67
TABELA 13. Componentes majoritários por amostra de óleo essencial.	68
TABELA 14. Atividade antifúngica expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleos essenciais sobre isolados de fungos fitopatogênicos.	71
TABELA 15. Índice citotóxico (IC) expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$, sobre linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) obtido pela técnica do MTT-tetrazólio das substâncias de uso agrícola e dos óleos essenciais com atividade antifúngica sobre a espécie de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> e <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABD – Ágar dextrose batata
- CBD – Caldo de batata dextrose
- CFM – Concentração fungicida mínima
- CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CI_{50} - Concentração de inibição em 50%
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (do inglês, Instituto de Padrões clínicos e laboratoriais)
- DMAPP – Difosfato de dimetilalila
- DMEM – Dulbecco's modified eagle medium
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- IPP – Difosfato de isopentenila
- IR – Índice de retenção
- IR^c – Índice de retenção calculado
- IR^L – Índice de retenção da literatura
- m/z – Razão massa/carga
- MEP – Metileritritol
- MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- MVA – Mevalonato
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
- NIST – National Institute of Standards and Technology
- OE – Óleo essencial
- SFB – Soro fetal bovino
- UFC – Unidade formadora de colônia

RESUMO

A perda de produtos agrícolas devido a fungos fitopatogênicos é uma questão de grande impacto no mundo. Os fungicidas sintéticos têm sido amplamente utilizados no controle de doenças fúngicas. A aplicação de óleos essenciais é um método alternativo de controle de infecções fúngicas, justificado pela toxicidade e resistência dos fungos patogênicos aos fungicidas sintéticos. O objetivo deste estudo foi encontrar novos agentes antifúngicos entre quatorze espécies de plantas da Mata Atlântica Capixaba. As espécies foram hidrodestiladas, e seus respectivos rendimentos foram calculados, e a análise para caracterização química de seus componentes foi examinada por CG-EM. As composições dos óleos essenciais foram caracterizadas pela presença predominante de maiores quantidades de sesquiterpenos, seguido de monoterpenos, indicados como os responsáveis pelo efeito inibitório mais efetivo dos óleos voláteis. Em seguida, as propriedades antifúngicas destes óleos foram determinadas pelo método de microdiluição contra *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*. Todos os óleos essenciais apresentaram alguma inibição contra os fungos testados. Ensaio *in vitro* mostraram que as espécies de *Siparuna brasiliensis*, *Campomanesia macrobracteolata* (folhas e frutos), *Piper miquelianum* C. DC., *Peperomia alata*, *Baccharis platypoda* DC., e *Lantana lundiana* Schauer foram as melhores para o controle do crescimento de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, apresentando concentrações de inibição de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para os ensaios contra *Thielaviopsis paradoxa*, os óleos voláteis de *Protium* sp. e *Etlíngera elatior* mostraram baixas concentrações de inibição, considerados fungicidas na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação aos ensaios de citotoxicidade realizados com macrófagos murinos (Raw 264.7) pelo método de redução do MTT, os óleos essenciais não apresentaram citotoxicidade nas concentrações as quais foram considerados fungicidas e inibitórios frente ao *T. paradoxa* e *F. solani* f. sp. *piperis*, respectivamente. Estes resultados sugerem que os óleos estudados neste trabalho têm potencial para serem utilizados no controle de infecções fúngicas causadas por estes fitopatógenos.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Atividade fungicida. Citotoxicidade. *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. *Thielaviopsis paradoxa*.

ABSTRACT

The loss of agricultural products due to phytopathogenic fungi is a matter of great impact in the world. Synthetic fungicides have been widely used in the control of fungal diseases. The application of essential oils is an alternative method of controlling fungal infections, justified by the toxicity and resistance of pathogenic fungi to synthetic fungicides. The aim of this study was to find new antifungal agents among fourteen species of plants of the Brazilian Atlantic Forest. The species were hydrodistilled, and their respective yields were calculated, and the analysis for chemical characterization of their components was examined by GC-MS. The compositions of the essential oils were characterized by the predominant presence of larger amounts of sesquiterpenes, followed by hydrocarbon monoterpenes, indicated as responsible for the more effective inhibitory effect of volatile oils. Next, the antifungal properties determined by the microdilution method against *Fusarium solani* f.sp. *piperis* and *Thielaviopsis paradoxa*. All essential oils showed some inhibition against fungi tested. In vitro assays showed that the species of *Siparuna brasiliensis*, *Campomanesia macrobracteolata* (leaves and fruits), *Piper miquelianum* C. DC., *Peperomia alata*, *Baccharis platypoda* DC., And *Lantana lundiana* Schauer were the best for growth control of *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, exhibiting inhibition concentrations of 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For the tests against *Thielaviopsis paradoxa*, the volatiles of *Protium* sp. and *Etilingera elatior* showed low inhibition concentrations, considered as fungicides at the concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In relation to the cytotoxicity assays performed with murine macrophages (Raw 264.7) by the MTT reduction method, the essential oils did not present cytotoxicity at the concentrations which were considered fungicidal and inhibitory against *T. paradoxa* and *F. solani* f. sp. *piperis*, respectively. These results suggest that the oils studied in this work have the potential to be used in the control of fungal infections caused by these phytopathogens.

Keywords: Essential oils. Fungicidal activity. Cytotoxicity. *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. *Thielaviopsis paradoxa*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Óleos essenciais	13
1.2 Metabolismo vegetal.....	15
1.3 Atividade antifúngica de óleos essenciais	22
1.4 Fungos Fitopatogênicos.....	31
1.4.1 <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i>	32
1.4.2 <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	34
1.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 Geral.....	39
2.2 Específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Coleta das amostras.....	40
3.2 Extração do óleo essencial e cálculo do rendimento	40
3.3 Caracterização do óleo essencial	41
3.4 Teste de susceptibilidade antifúngico contra <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> e <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	42
3.4.1 Preparo do meio.....	42
3.4.2 Culturas de micro-organismos	42
3.4.3 Preparo do inóculo.....	42
3.4.4 Teste de microdiluição	43
3.4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	43
3.5 Determinação da citotoxicidade basal em células de macrófagos murinos (Raw 264.7)	44
3.5.1 Manutenção da linhagem celular.....	44
3.5.2 Avaliação da citotoxicidade basal	45
3.5.3 Análise estatística	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Extração e rendimento dos óleos essenciais	47
4.2 Análise da composição química dos óleos essenciais	48

4.2.1. Caracterização química do óleo essencial de <i>Baccharis platypoda</i> DC.	49
4.2.2. Caracterização química do óleo essencial de <i>Baccharis trinervis</i> Pers.	50
4.2.3. Caracterização química do óleo essencial das folhas de <i>Campomanesia macrobracteolata</i>	52
4.2.4. Caracterização química do óleo essencial dos frutos de <i>Campomanesia macrobracteolata</i>	54
4.2.5. Caracterização química do óleo essencial <i>Etilingera elatior</i>	57
4.2.6. Caracterização química do óleo essencial de <i>Lantana lundiana</i> Schauer	58
4.2.7. Caracterização química do óleo essencial de <i>Peperomia alata</i>	60
4.2.8. Caracterização química do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	61
4.2.9. Caracterização química do óleo essencial de <i>Piper miquelianum</i> C. DC.	63
4.2.10. Caracterização química do óleo essencial de <i>Protium</i> sp.	64
4.2.11. Caracterização química do óleo essencial de <i>Siparuna brasiliensis</i> ...	66
4.3 Atividade antifúngica.....	69
4.4 Citotoxicidade	74
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS	81
ANEXOS.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óleos essenciais

A fascinação da humanidade por substâncias aromáticas e por odores agradáveis remonta há milhares de anos. No antigo Egito, há relatos da utilização de plantas na mumificação de corpos e na Roma antiga, eram bastante conhecidas as casas de banho, locais em que a higiene ficava a cargo de extratos e essências vegetais que perfumavam as pessoas. Na Bíblia, a mirra, uma goma resinosa e odorífera, é tratada como um produto muito importante e até hoje é utilizada em cerimônias religiosas por todo o mundo (EDRIS, 2007).

A história dos óleos essenciais (OEs) inicia-se antes de 3.500 a.C., data da mais antiga destilaria conhecida utilizada para extração de óleos essenciais (BASER e BUCHBAUER, 2010). Percebe-se, portanto, que, apesar de não possuir nenhum conhecimento de química ou biologia, o homem, desde a antiguidade, já buscava formas de utilizar substâncias aromáticas. Com o passar do tempo e a sistematização do conhecimento nas mais diversas áreas, percebeu-se que os odores e as fragrâncias, tão apreciados, eram resultado de metabólitos secundários produzidos por determinadas plantas. A partir destas características, convencionou-se, então, o termo óleo essencial. Hoje os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, possuem atuação significativa nos ramos de alimentação, perfumaria e medicamentos, porém, sua utilização pode ser bem diversificada, sobretudo em razão de sua composição química ser complexa (SIMÕES et al., 2010).

Ao contrário do que se acreditava no início dos estudos dos metabólitos secundários, os óleos essenciais não se caracterizavam por um desperdício fisiológico, mas sim, apresentavam uma grande variedade de funções biológicas na planta que os produziam. Essas funções envolvem desde a atração de polinizadores até a regulação hormonal. Entretanto, a principal função, está ligada a proteção do vegetal contra a ataques externos de herbívoros ou de micro-organismos fitopatogênicos. A capacidade dos óleos essenciais de repelir e até eliminar os predadores naturais da planta suscitou a hipótese de que tais substâncias presentes nesta mistura pudessem possuir atividades biológicas. Efetivamente muitos estudos

já comprovaram as diversas atividades dos óleos voláteis contra fungos (SIMÕES et al., 2010).

Entretanto, o uso disseminado de pesticidas levou à ocorrência frequente de resíduos de compostos químicos em alimentos, além de causarem poluição ao meio ambiente. Diante da atual tendência de mercado em utilizar produtos naturais, o estudo da aplicação de óleos essenciais como fungicidas naturais tem atraído novos olhares para essa classe de compostos, mitigando os problemas causados por fungicidas sintéticos (VILLAVERDE et al., 2016).

Recentemente, estudos utilizando óleos essenciais têm mostrado o potencial destes compostos no que diz respeito às suas funções biológicas, especialmente sua ação no controle de fungos fitopatogênicos (JING et al., 2018). Na década atual, foi dada particular ênfase às suas atividades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas e antioxidantes. Uma gama de óleos essenciais como os extraídos de *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata*, *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca leucadendron*, *Ocimum canum*, *Citrus Medica*, *Cymbopogon citrates*, *Caesulia axillaris*, *Mentha arvensis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Adenocalymma alliaceum*, *Lippia alba*, *Cymbopogon flexuosus*, *Ocimum sanctum*, *Lantana indica*, *Citrus maxima*, *Citrus sinensis*, *Zanthoxylum alatum*, *Anethum graveolens*, *Trachyspermum ammi*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha spicata*, *Melissa officinalis*, entre outros, foram relatados como agentes antifúngicos contra inúmeras espécies de fungos. A atividade antimicrobiana dos OEs é atribuída principalmente devido ao principal composto ou ao efeito sinérgico de todos os compostos que estão presentes em maiores e menores quantidades no óleo essencial (MISHRA et al., 2013; XIE et al., 2017; OUADI et al., 2017).

Como destacado, é possível verificar a potencialidade dos óleos essenciais frente a micro-organismos fitopatogênicos. Em decorrência da relevância da busca por tratamentos das infecções fúngicas que afetam cultivares de grande interesse econômico no país e a capacidade de contaminação desses patógenos, objetiva-se determinar o potencial inibitório de óleos essenciais de *Baccharis platypoda* DC. (folhas), *Baccharis trinervis* Pers. (folhas), *Campomanesia macrobracteolata* (folhas), *Campomanesia macrobracteolata* (frutos), *Campomanesia schelechtendaliana* (folhas), *Costus spicatus* (folhas), *Etlingera elatior* (folhas), *Lantana lundiana* Schauer (folhas), *Peperomia alata* (folhas), *Petiveria tetrandra* (folhas), *Piper aduncum* (folhas),

Piper miquelianum C. DC. (folhas), *Protium* sp. (folhas e caules com botões), *Siparuna brasiliensis* (frutos) e *Solanum cinnamomeum* (folhas), frente aos fungos *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*.

1.2 Metabolismo vegetal

O metabolismo é o conjunto de transformações e reações químicas que ocorrem nas células, proporcionadas por ação enzimática. Estas reações visam, inicialmente, sintetizar compostos como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, alguns polímeros, dentre outros compostos. As plantas possuem duas rotas metabólicas extremamente úteis para a sua sobrevivência e adaptação, sendo elas caracterizadas como metabolismo primário, que possui funções vitais bem definidas; e metabolismo secundário, produzidos a partir dos metabólitos primários, por rotas biossintéticas diversas. A princípio, os metabólitos primários referem-se aos produtos dos processos fotossintéticos, implicando na produção de recursos considerados vitais à planta como divisão e crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução. Já os metabólitos secundários, como são chamados os produtos derivados do metabolismo secundário, não estão diretamente ligados à manutenção da vida do vegetal, porém, aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma determinada espécie, permitindo melhor adaptação. A complexidade da composição dos óleos essenciais e a concentração dos seus constituintes são o resultado dos diferentes processos metabólicos que ocorrem no interior das células, cuja biossíntese é afetada por fatores como variações ambientais, ação de fatores como micro-organismos, insetos, plantas, luz, temperatura e estresse hídrico, entre outros que são capazes de gerar situações de estresse a planta, modificando sua composição química (GROS et al., 1985).

Durante muito tempo, a comunidade científica acreditou que os metabólitos secundários produzidos pelas plantas não tinham função específica, mas simplesmente considerados como produtos finais das reações. Muitos estudos, entretanto, demonstraram que essas substâncias não só têm uma função como sua presença é muitas vezes fundamental para o desenvolvimento e adaptação da espécie vegetal (SIMÕES et al., 2010). Os metabólitos secundários são essenciais para a defesa e proteção das plantas, por isso, esses compostos atuam como auxiliares na proteção contra herbívoros, insetos e infecção microbiana, além de

possuírem função na atração de polinizadores e atuarem como agentes alelopáticos. Vale ressaltar que as rotas metabólicas que os originam, provavelmente, só são ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento (GARCÍA e CARRIL, 2009). Em se tratando de óleos essenciais, estes podem atuar como: mensageiros internos para comunicação; substâncias defensivas contra herbívoros; substâncias voláteis direcionando não apenas inimigos naturais a herbívoros e hospedeiros como também atrair insetos polinizadores. (HARREWIJN et al., 2001; CSEKE et al., 2006).

Dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os óleos essenciais se destacam, representando a segunda classe de compostos naturais, com maior número de constituintes ativos (SIMÕES et al., 2010). Os OEs, são misturas complexas de constituintes voláteis, lipofílicos, odoríferos e líquidos. São biossintetizados, armazenados e liberados por meio de estruturas do mesófilo ou da epiderme da planta. São comumente extraídos de folhas, galhos, flores, frutos ou tecido de casca de plantas superiores. Assim, nas coníferas, como o pinheiro, por exemplo, o óleo volátil é encontrado na maioria das partes da árvore. Por outro lado, na rosa, o óleo é confinado à flor; e, no caso da canela, às cascas e às folhas, com pequena presença na parte da raiz desta planta. Ainda que todos os órgãos de um vegetal possam conter óleos essenciais, a composição química destes pode variar de acordo com a sua localização. Assim, uma essência obtida das flores pode ser diferente daquela obtida dos galhos, ainda que seja proveniente de uma mesma planta (PARRY, 1992; SOUZA et al., 2009; SIMÕES et al., 2010; SADGROVE e JONES, 2015).

Segundo Simões et al., (2010), quimicamente, os constituintes dos OEs das plantas incluem principalmente, duas classes químicas: os terpenoides e fenilpropanoides, sendo que o primeiro, prepondera. Geralmente, quando presentes nos óleos essenciais, os fenilpropanoides, ocorrem em quantidades significativas e tendem a ser os compostos majoritários. Os fenilpropanoides se formam a partir do ácido chiquímico, e estes compostos possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação e podem ter um grupo funcional com oxigênio, como representado na figura 1 (TAIZ e ZEIGER, 2004).

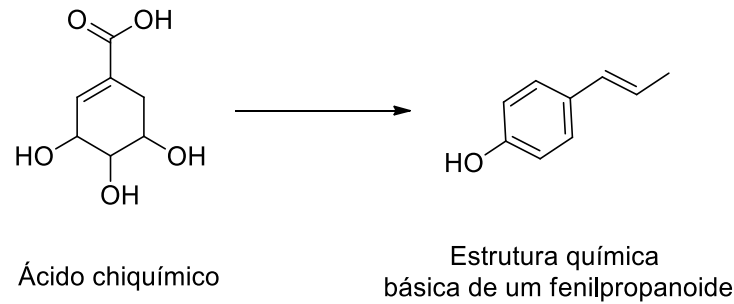


Figura 1. Origem de um fenilpropanoide

Os terpenos são extremamente variáveis, mostrando diferentes esqueletos de carbono com uma grande diversidade estrutural de compostos como hidrocarbonetos **(1)** e derivados oxigenados, incluindo álcoois **(2)**, ésteres **(3)**, fenóis **(4)**, aldeídos **(5)**, cetonas **(6)**, éteres **(7)** e epóxidos **(8)** como exemplificados na figura 2. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. (SIMÕES et al., 2010; ZUZARTE e SALGUEIRO, 2015).

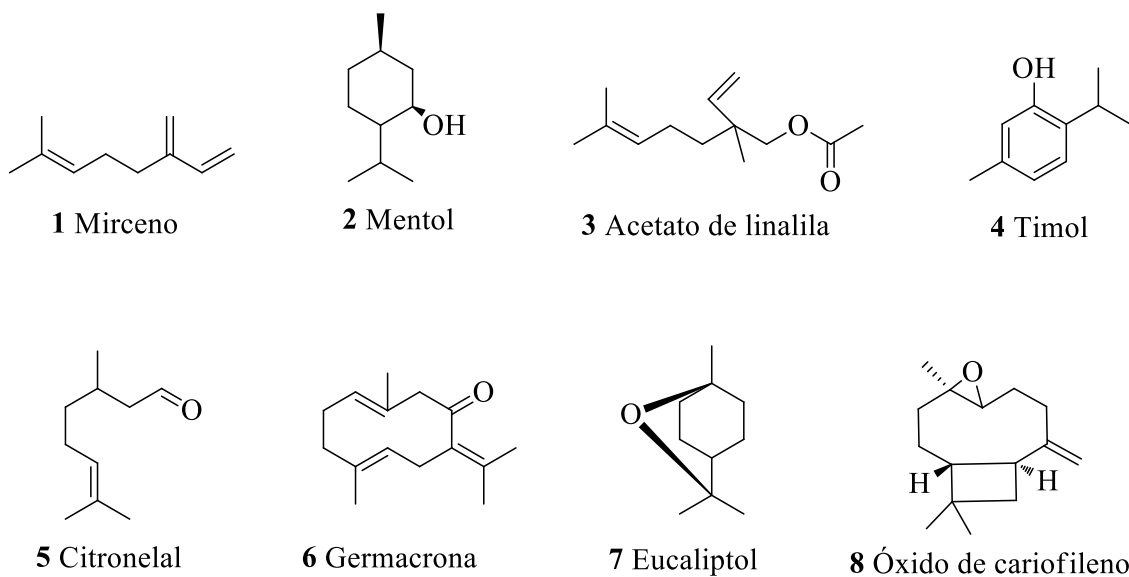


Figura 2. Hidrocarboneto terpênico e terpenos oxigenados. Fonte: SIMÕES et al., 2010; ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015.

Por sua vez, os terpenóides, são biossintetizados pela condensação de unidades isoprênicas **(9)**, o difosfato de isopentenila (IPP) **(10)** e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP) **(11)** que estão ilustrados na figura 3 (DEWICK, 2002).

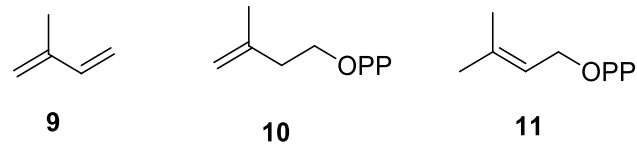


Figura 3. Estrutura química do isopreno, difosfato de isopentenila e do difosfato de dimetilalila.

O IPP pode ser sintetizado pelas plantas por, no mínimo, duas rotas biossintéticas: a rota clássica ou também conhecida como rota do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, que ocorre preferencialmente no citosol, cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a rota alternativa ou rota do metileritritol fosfato (MEP), onde são biossintetizados os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, ocorrendo preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. A reação entre uma molécula de IPP e uma molécula de DMAPP tem como produto o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos (C₁₀). À medida que são adicionadas unidades de IPP contendo cinco carbonos, serão formados o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C₁₅), e o difosfato de geranil geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀), exemplificadas na figura 4. Uma vez biossintetizados, os terpenos são diversificados através de variadas reações enzimáticas, como por exemplo, isomerização e oxidação, dando origem aos óleos essenciais, terebentinas e resinas (DEWICK, 2002).

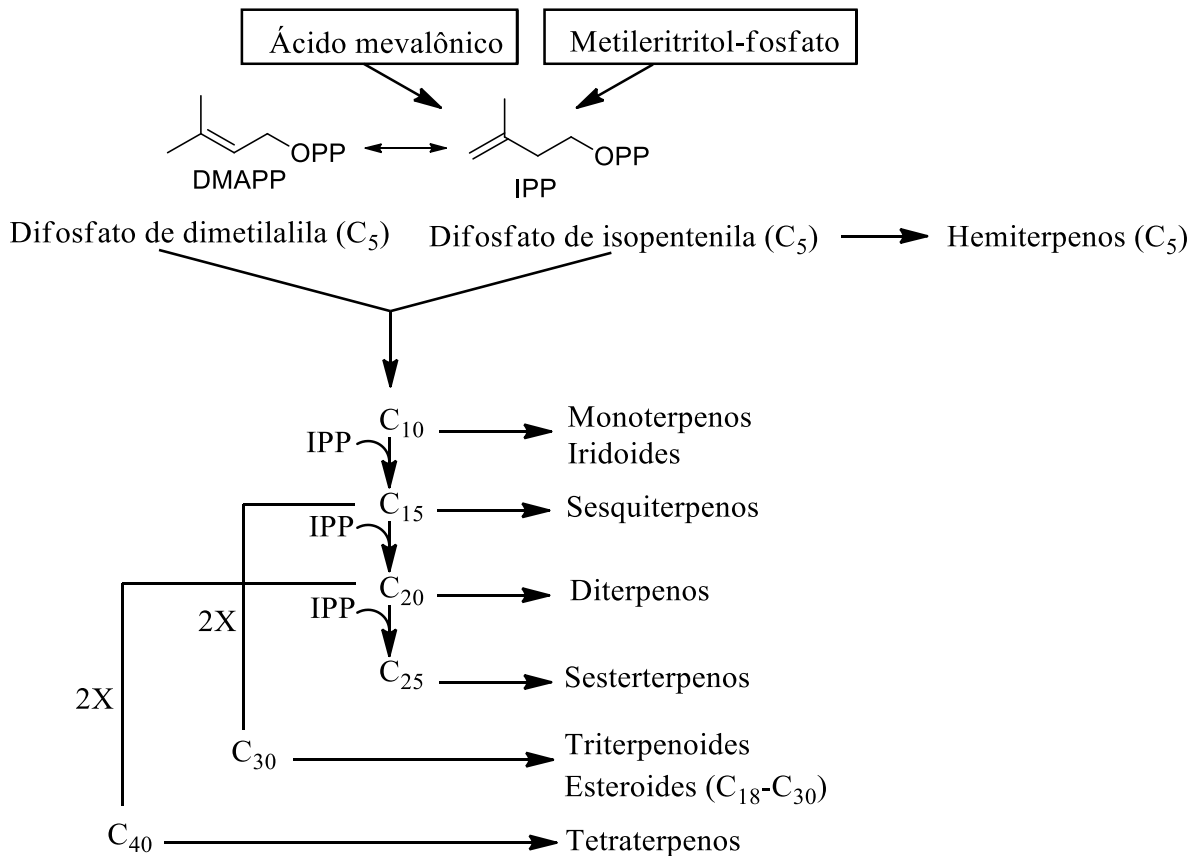


Figura 4. Formação dos produtos metabólicos advindos das rotas biossintéticas do MVA e MEP. Fonte: Adaptado de Dewick, 2002

Bakkali e colaboradores (2008) definem os monoterpenos a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (dez carbonos), sendo esta a menor unidade dos terpenos. São consideradas as moléculas mais representativas, que constituem 90% dos óleos essenciais, além de permitir uma grande variedade de estruturas químicas. Alguns monoterpenos estão exemplificados na figura 5, são eles: citronelol (**12**), linalol (**13**), mentol (**14**), mentona (**15**), α -pineno (**16**) e β -pineno (**17**), carvona (**18**) e o limoneno (**19**). Estes monoterpenos podem ser encontrados em espécies da família Lamiaceae, por exemplo. Alguns desses compostos possuem atividade biológica como o timol (**20**) e o carvacrol (**21**), monoterpenos isômeros, que possuem ação antioxidante, atividade antimicrobiana e inseticida. Além desses, o citronelal (**22**) e o citral (**23**) também são monoterpenos que podem ser encontrados em espécies do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Myrtaceae (LIMA e CARDOSO, 2007; BIZZO, HOVELL e REZENDE, 2009).

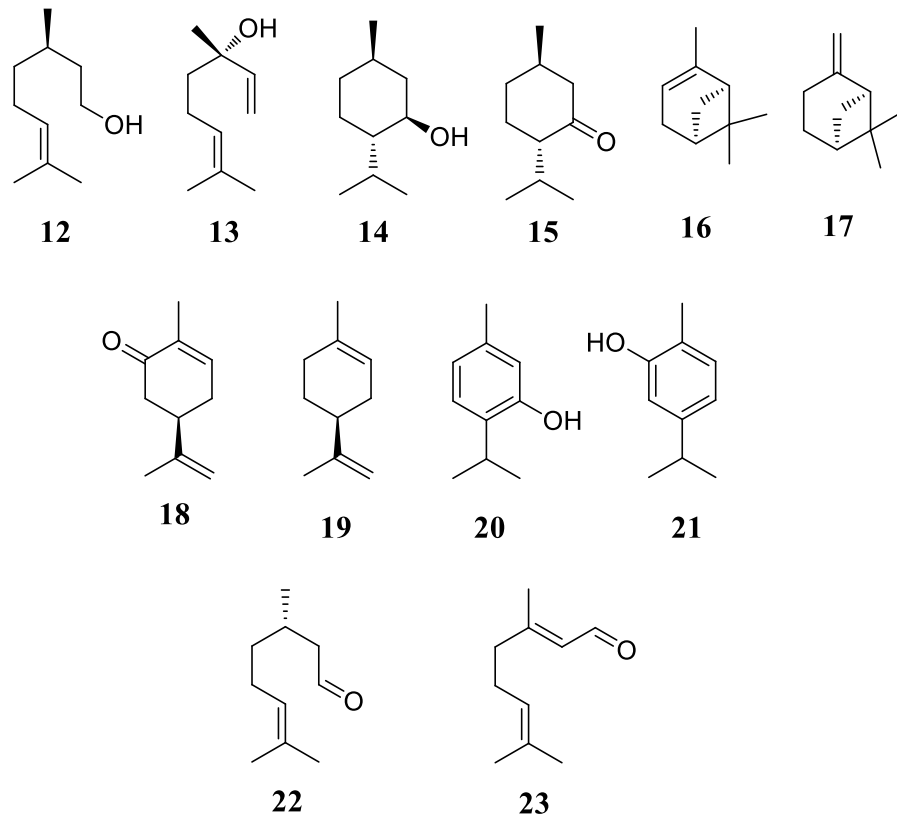


Figura 5. Estruturas químicas de monoterpenos. Fonte: Bakkali et al., 2008.

Já os sesquiterpenos possuem quinze carbonos em sua estrutura, formada a partir de três unidades isoprênicas. Proporcionalmente, com a condensação dessas unidades de isopreno há um aumento das reações de ciclização, permitindo uma maior diversificação de estruturas para essa classe de compostos. A função e o esqueleto dos sesquiterpenos são similares a dos monoterpenos (BAKKALI et al., 2008). Em espécies do gênero *Piper*, da família Piperaceae, podem ser encontrados alguns sesquiterpenos ilustrados na figura 6, como o β -cariofileno (**24**), germacreno D (**25**) e o espatulenol (**26**) (POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA, 2006).

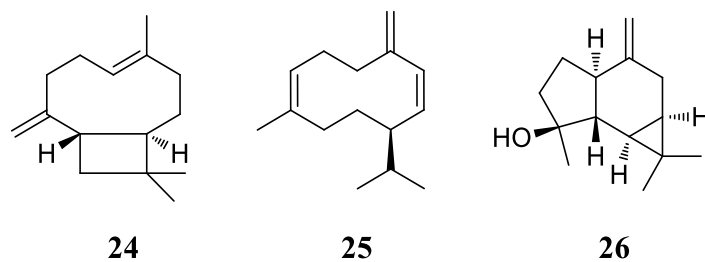


Figura 6. Estruturas químicas de sesquiterpenos. Fonte: BAKKALI et al., 2008.

São também abundantes em espécies do gênero *Baccharis* (SALAZAR, SOUSA e LIMA, 2018), apresentando alguns sesquiterpenos oxigenados em sua composição química como o óxido de cariofileno (**8**), α -cadinol (**27**) e o veridiflorol (**28**) representados na figura 7.

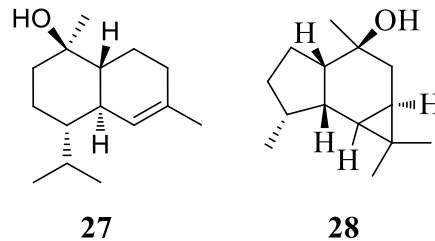


Figura 7. Estruturas químicas de sesquiterpenos oxigenados. Fonte: LAGO, et al., 2008.

Graças à composição química complexa e características físico-químicas interessantes, os OEs são metabólitos secundários bastante estudados e vem ganhando relevância, principalmente nas indústrias de agricultura, onde são utilizados como pesticidas naturais para controle de micro-organismos fitopatogênicos que afetam cultivares de grande interesse econômico (BAKKALI et al., 2008).

A produção de óleos essenciais é limitada a alguns vegetais, sendo raramente encontrados em gimnospermas - com exceção das coníferas - e em angiospermas monocotiledôneas - exceto em espécies do gênero *Cymbopogon*, *Vetiveria*, *Alpinia*, *Curcuma*, entre outras. Por outro lado, em angiospermas dicotiledôneas, ocorre um grande número de famílias com espécies produtoras de óleo essencial, principalmente: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (SIMÕES et al., 2010). Os OEs extraídos de espécies das famílias Apiaceae e Myrtaceae, por exemplo, são conhecidos por apresentarem diferentes atividades, como: antifúngicas (SINGH et al., 2004; ZABKA, PAVELA e SLEZAKOVA, 2009); antibacterianas (TINOCO, MARTINS e CRUZ-MORAIS, 2007; SALVAGNINI et al., 2008); antitumorais (MADHULIKA et al., 2008; CALCABRINI et al., 2004); anticancerígenas (CABRAL, et al., 2007; BONG e RYONG, 2010) e antivirais (SNENE et al., 2017; SRWILAJAROEN et al., 2012).

As atividades biológicas dos óleos essenciais estão relacionadas à sua composição, que pode variar de acordo com fatores como: variabilidade genética, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita, aplicação de fertilizantes, localização

geográfica, clima, variações sazonais e estresse durante o crescimento ou maturidade da planta. Além disso, o tipo de material vegetal utilizado e o método de extração determinam o rendimento e podem alterar a composição de um OE, conferindo diferentes atividades biológicas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; HUSSAIN et al., 2008; MORAIS, 2009).

1.3 Atividade antifúngica de óleos essenciais

A utilização de fungicidas sintéticos é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, pragas agrícolas, porém, vem sendo questionado pela sociedade, em consequência dos diversos problemas gerados para a saúde humana e ao meio ambiente, em virtude do uso de excessivas doses ou da utilização inadequada dos produtos químicos, sem contar que seu uso constante pode propiciar a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, tornando esse controle ineficaz (GURJAR et al., 2012).

Devido à imensa variedade de compostos, os óleos essenciais, assim como os metabólitos secundários como um todo, têm uma extensa gama de efeitos e atividades tanto para as plantas que os originam como para os animais e seres humanos que entram em contato com essas substâncias. O controle desses fitopatógenos empregando produtos naturais ainda é muito incipiente esbarrando, sobretudo, na falta de estudos a respeito da viabilidade econômica. Observa-se, porém, que a literatura tem registrado em trabalhos a eficiência e potencialidade dos óleos essenciais de uma vasta variedade de espécies botânicas em promover a inibição de fitopatógenos de natureza fúngica, e existem alguns resultados com essa classe de compostos que podem ser considerados promissores (SANTOS, 2015).

A ação fungitóxica dos produtos naturais tanto atuam diretamente no patógeno, desacelerando o crescimento micelial, reduzindo a esporulação e a germinação de esporos, quanto pela ativação dos mecanismos de defesa do vegetal que é um processo iniciado com a percepção do estímulo agressor do patógeno indicando a presença de compostos de características elicitoras (GARCIA et al., 2012). Uma das vantagens de se utilizar os produtos naturais na agricultura é o motivo da rápida degradação no ambiente e da sua baixa toxicidade, em contrapartida, os fungicidas sintéticos podem ocasionar problemas como desequilíbrio biológico, alteração da

ciclagem dos nutrientes, contaminação dos solos e da água, intoxicação aos produtores rurais, resistência de patógenos, eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (GHINI, NAKAMURA, e SHAWT, 2001).

Conforme Amorim et al., (2011), devido à multiplicidade de componentes químicos que os extratos vegetais e os óleos essenciais possuem, estes podem minimizar o surgimento de micro-organismos resistentes. As plantas são consideradas fontes inesgotáveis de moléculas, muitas delas desconhecidas, que em muitos casos podem servir de modelo para síntese química, com geração de produtos de baixo custo, de fácil aquisição e uma alternativa menos custosa, em países onde os fungicidas sintéticos são escassos e representam um alto custo aos agricultores (BETTIOL e GHINI, 2009).

Como definido por Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos, lipofílicos, odoríferos e são formados, principalmente, por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, com baixo peso molecular. Os terpenóides e compostos fenólicos são os principais constituintes de óleos essenciais e, conseqüentemente, exibem propriedades lipofílicas. A natureza lipofílica dos óleos essenciais desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana; visto que, na maioria dos casos, os óleos voláteis com atividade antimicrobiana causam danos estruturais e funcionais nas células fúngicas patogênicas.

De acordo com Walker (2012), as paredes celulares dos fungos são principalmente compostas por diferentes polissacarídeos, podendo variar de acordo com o grupo taxonômico (quitina, glucanos, manoproteínas, quitosana, celulose), com quantidades menores de proteínas e glicoproteínas.

Devido a lipofilicidade dos óleos essenciais, estes se deslocam com facilidade através da membrana plasmática, causando partição nos lipídios presentes na membrana dos fungos, ocasionando vazamento do conteúdo da célula, ou seja, devido ao potencial de seus componentes romperem a membrana celular destes micro-organismos, os compostos lipofílicos deixam o conteúdo celular desprotegido e mais suscetível a ação dos óleos essenciais. Além disso, os OEs têm a capacidade de afetar a biossíntese do esterol fúngico, reduzindo significativamente a quantidade de ergosterol (PINTO et al., 2009). Tian e colaboradores (2012), também analisaram o modo de ação antifúngico dos óleos essenciais, quantificando a produção total de ergosterol nas células fúngicas, adicionando concentrações crescentes de OE. A

diminuição da taxa de ergosterol com o aumento da concentração de OE aponta que a membrana plasmática é um alvo importante para futuras pesquisas envolvendo o mecanismo antifúngico de OEs.

Vários fungos fitopatogênicos, são susceptíveis a OEs. A eficiência da inibição varia de acordo com o organismo alvo e o óleo essencial testado.

Sharma e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322. Dentre os óleos essenciais testados, o que se apresentou mais ativo foi o óleo de cravo, exibindo uma inibição completa do crescimento micelial e germinação de esporos a uma concentração de 125 ppm, com CI_{50} de 18,2 e 0,3 ppm, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de cravo foi de 31,25 ppm pelo método de microdiluição de caldo. A composição química do óleo essencial de cravo foi determinada por cromatografia gasosa, acoplada ao espectrômetro de massas, e foram identificados como componentes majoritários eugenol 75,41% (**29**), *E*-cariofileno 15,11% (**30**), α -humuleno 3,78% (**31**) e óxido de cariofileno 1,13% (**8**) sinalizados na figura 8. As CIMs obtidas para os óleos essenciais de capim limão, hortelã e eucalipto foram consideradas altas. Com isso, os autores puderam concluir que OE de cravo tem uma potente atividade antifúngica, podendo ser utilizado como biofungicida para controle do fungo em questão.

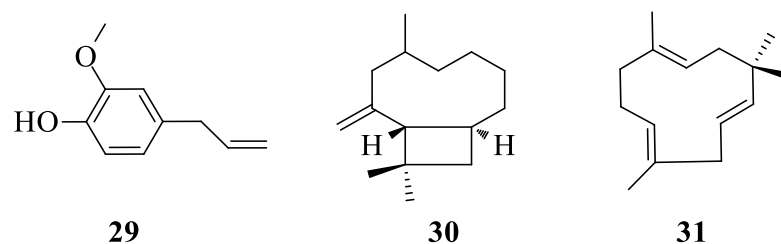


Figura 8. Estruturas químicas de três compostos majoritários do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*).

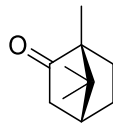
Zhao et al. (2013) também avaliaram a atividade do óleo essencial das flores de *Inula britannica* contra fungos patogênicos de plantas para sua potencial aplicação como fungicida botânico. A obtenção do óleo essencial foi realizada por metodologia que utiliza dióxido de carbono sulfídico supercrítico (SF-CO₂). Segundo os autores é uma técnica inovadora para a extração de sabores, fragrâncias e flavorizantes de

fontes vegetais. Os estudiosos afirmam que o CO₂ comprimido pode solubilizar os principais constituintes do óleo essencial, consistindo em hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos. O OE foi examinado através de testes *in vitro* e *in vivo* contra *Alternaria alternata*, *A. solani*, *A. brassicae*, *A. mali*, *Botrytis cinerea*, *Cercosporium personata*, *Colletotrichum dematium*, *C. Orbiculare*, *Fusarium graminearum*, *F. monilifome*, *F. f. sp.vasinfectedum*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Gibberella zeae*, *Gloeosporium fructigenum*, *Phytophthora capsici*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia cerealis*, *R. Solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*. Os resultados mostraram a inibição completa do crescimento micelial de *Gaeumannomyces graminis var. Tritici*. Constatou-se também que o óleo essencial foi capaz de inibir 83,76 e 64,69% do crescimento radial de *Phytophthora capsici* e *Fusarium monilifome*, respectivamente. Houve inibição da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectedum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum orbiculare* e *Pyricularia grisea*, exibindo taxas de inibição de 98,26; 96,54; 87,89 e 87,35%, respectivamente. O presente estudo demonstrou que o óleo essencial das flores de *I. britannica* extraídas através da técnica de SF-CO₂ pode ser um agente antimicótico potencial e promissor para ser usado como fungicida botânico.

Em um estudo realizado por Stević e colaboradores (2014) foram avaliados os efeitos inibitórios *in vitro* de uma série de óleos essenciais, com composição química variada, contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium subclutinans*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium* sp., *Chaetomium* sp., *Gliocladium roseum*, *Curvularia lunata*, *Verticillium dahliae*, *Trichoderma viride*, *Trichotechium roseum*, *Phomopsis* sp., *Phoma* sp. e *Myrothecium verrucaria*. Todos os óleos testados apresentaram alguma atividade antifúngica contra os fungos utilizados. Contudo, os autores puderam concluir que os óleos essenciais de *Satureja hortensis*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Rosa damascena* apresentam potencial para serem utilizados como antifúngicos naturais, demonstrando que todos os fungos testados foram mais suscetíveis aos quatro óleos. Além disso, a combinação de óleos específicos mostrou redução dos valores das concentrações inibitórias mínimas.

Davari e Ezazi (2017), analisaram a composição química das plantas *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* (plantas endêmicas iranianas) e *Eucalyptus* sp. quanto a concentração de OEs, juntamente com sua atividade contra alguns fungos

fitopatogênicos importantes, como: *Fusarium graminearum*, *Fusarium asiaticum*, *Fusarium redolens* f. sp. dianthus, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. lentis, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Botrytis cinerea* e *Cladosporium cladosporioides*. O óleo essencial de *Z. majdae*, foi identificado por CG-EM e apresentou a melhor atividade antifúngica dentre os OEs testados, inibindo 100% do crescimento dos fungos *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. redolens* f. sp. dianthus, *S.sclerotiorum* e *B. cinerea*, numa concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$, diferente das outras espécies; embora a *Eucalyptus* sp tenha mostrado uma inibição de 100% para a *S. sclerotiorum*, na mesma concentração, somente. A figura 9 mostra a estrutura química da cânfora (**32**), que juntamente com o linalol (**13**), representam os componentes principais de *Z. majdae*, num total de 80,6%. De tal modo, o monoterpene oxigenado eucaliptol (**7**) representa o constituinte majoritário presente no OE de *Eucalyptus* sp. e *H. persicum*. Tal atividade de *Z. majdae* é correlacionada pelos autores quanto à sua composição química, que similarmente também é relatado por Imani e cooperantes (2015) e por Rustaiyan e colaboradores (1992).

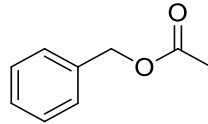


32

Figura 9. Estrutura química da cânfora, terpenoide presente no óleo essencial de *Zhumeria majdae*.

Boukaew e colaboradores (2017) verificaram que os óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) e vática (*Vatica diospyroides* Symington) inibiram fortemente o crescimento de nove entre 10 cepas de *Aspergillus flavus*. Identificaram 14 compostos no óleo de cravo, sendo 62,4% eugenol (**29**) como principal componente; e 24 compostos no óleo de vática, e 48,8% de acetato de benzila (**33**) como principal componente ilustrado na figura 10. A atividade antifúngica foi atribuída aos componentes majoritários presentes nos óleos. A única cepa que apresentou resistência foi selecionada para estudos adicionais, e o óleo de cravo causou 84,7% de inibição na germinação conidial, na concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, enquanto a inibição completa da infecção em sementes de milho ocorreu a 10 $\mu\text{L L}^{-1}$. O óleo de vática a 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou forte atividade antifúngica, pois inibiu completamente o crescimento, a esporulação, a germinação conidial e a infecção da

doença, tanto *in vitro* como em sementes de milho; porém, apresentou maior atividade fitotóxica que o óleo de cravo.



33

Figura 10. Estrutura química do componente majoritário presente no óleo essencial de *Vatica diospyroides* Symington.

Investigando as propriedades antifúngicas do óleo essencial de açafreão (*Curcuma longa* L.) contra *Aspergillus flavus* Yichen, Hu e colaboradores (2017) observaram significativa atividade antifúngica no crescimento micelial, germinação de esporos e produção de aflatoxinas. Encontraram uma elevada taxa de inibição do peso de micélio de *A. flavus*, onde concentrações de 1, 2, 3, 4 e 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inibiram 63,31%, 71,15%, 78,99%, 91,03% e 93,41%, respectivamente. Da mesma forma, houve a redução na porcentagem de germinação de esporos com o aumento da concentração. Os efeitos inibitórios na germinação de esporos nas concentrações de 1 a 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$ variaram de 17,01 a 85,47%. Os autores relacionam o efeito antifúngico com a capacidade de perturbar a integridade da membrana plasmática e a disfunção mitocondrial, induzindo estagnação metabólica no fungo.

Além dos fungos mencionados acima, durante o armazenamento, as frutas e vegetais estão frequentemente sujeitos a várias contaminações microbianas, principalmente devido a fungos patogênicos que infectam o hospedeiro durante a colheita, como também podem infectar a fruta no meio do plantio, durante o manuseio, processamento e armazenamento (EL-GHAOUTH et al., 2002). Visto isso, em um teste antifúngico *in vitro*, Falasca e colaboradores (2016) avaliaram o efeito do óleo essencial de bagas verdes e maduras de *Juniperus communis* L. como inibidor do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*, causador de inúmeras doenças pós-colheita em muitas frutas e vegetais. Os resultados do ensaio antifúngico mostraram que o óleo essencial de frutos verdes e maduros inibe o crescimento de *Sclerotium rolfsii*.

Avanço e colaboradores (2016) investigaram a composição e ação antifúngica do óleo essencial de *Curcuma longa* L. O mesmo demonstrou atividade contra o fungo *Fusarium verticillioides*, diminuindo seu desenvolvimento. Esses dados indicam que

este óleo pode ser utilizado como conservante de alimentos, pois sua ação antifúngica aumentaria a vida útil dos produtos agrícolas.

Recentemente, Ouadi e colaboradores (2017) discutiram a atividade contra fungos da pós-colheita em maçãs, a partir do óleo essencial extraído, caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de *Melissa officinalis*. Os componentes ilustrados na figura 11 como *p*-menta-1,2,3-triol 13,1% **(34)**, *p*-menta-3-en-8-ol 8,8% **(35)**, pulegona 8,8% **(36)** e óxido de piperitona 8,4% **(37)** foram considerados os quatro principais contidos neste óleo, sendo que, todos estes compostos apresentaram atividade significativa ($p < 0,05$) e inibiram o crescimento micelial dos três patógenos utilizados: *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*. Em valores, a taxa de inibição para *P. expansum*, numa concentração de $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, foi de 73,2%, e de 100% numa concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$; enquanto a inibição para *R. stolonifer* foi de 16,27%, numa concentração de $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ e de 100%, a $2 \mu\text{L mL}^{-1}$. Para *B. cinerea* mostrou uma maior resistência, atingindo um valor máximo de 76,81%, a $2 \mu\text{L mL}^{-1}$, constatando, assim, a potente atividade antifúngica do óleo essencial extraído de *M. officinalis*. A atividade antifúngica também foi avaliada por Munhuweyi e colaboradores (2017), *in vitro* e *in vivo*, contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Pilidiella granati*, a partir da quitosana, combinada com óleos essenciais (canela, limão e orégano). Com base na investigação *in vitro*, a combinação de quitosana-orégano ou canela, de seus óleos essenciais, numa concentração de 10 g L^{-1} , apresentou efeito inibitório completo contra os três patógenos. A combinação de quitosana com o óleo essencial da canela obteve efeitos inibitórios máximos, dependentes da concentração do OE, inibindo em concentrações de 10, 50 e 50 g L^{-1} os patógenos *P. granati*, *B. cinerea* e *P. expansum*, respectivamente. O estudo antifúngico *in vivo* foi realizado em frutas de romã, artificialmente inoculadas com *Botrytis* sp., e tratadas com a combinação de quitosana-orégano, em concentrações variáveis de 2,5, 5,0 e $10,0 \text{ g L}^{-1}$, resultando em $33,69 \pm 8,15\%$, $46,64 \pm 7,21\%$ e 100% de inibição do patógeno. Dessa forma, observa-se a atividade fungicida de um óleo essencial simples, como também a partir de combinações.

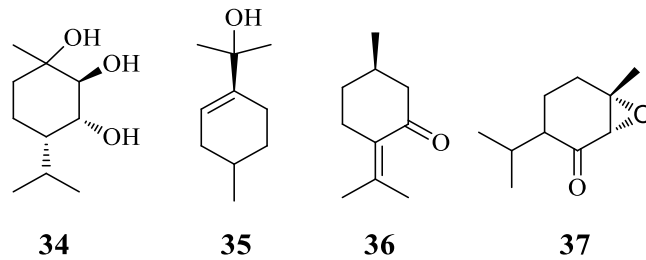


Figura 11. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *Melissa officinalis*.

Estudos de Bravo e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos, identificando e quantificando os OEs de espécies da planta chilena *Cryptocarya alba* utilizada contra *Nosema ceranae* (doença das abelhas do tipo C), bem como o seu uso para o controle da Nosemose. Os monoterpenos como α -terpineol (**38**) e β -felandreno (**39**), estão ilustrados na figura 12, e juntamente com o eucaliptol (**7**) constituem os principais compostos encontrados no OE de *C. alba* e mostraram efeitos significativos contra *N. ceranae*. Porém, o efeito antifúngico do óleo essencial completo ($4\mu\text{g abelha}^{-1}$) em *N. ceranae* foi maior do que o efeito dos monoterpenos, separadamente, mostrando que o óleo de *C. alba* é um forte candidato para o tratamento dessa doença. Diferente de Bravo e seu grupo de pesquisa, Jing e colaboradores (2018) observaram uma concentração mínima maior para a inibição de um fitopatógeno. A pesquisa abrangeu o teste do óleo essencial retirado do broto da *Syringa oblata* Lindl para o combate a *Alternaria alternata*, um patógeno que origina uma doença caracterizada por uma mancha marrom no tabaco. Doze compostos foram identificados por CG-EM, sendo os principais o eugenol 40,426% (**29**), β -cariofileno 21,989% (**24**) e α -cariofileno 3,456% (**40**), também retratado na figura 12. O eugenol (**29**) exibiu inibição completa do crescimento micelial, sendo considerado o componente antifúngico mais ativo, mostrando uma concentração inibitória mínima de 150 mg mL^{-1} e a concentração fungicida mínima de 250 mg mL^{-1} . Um ensaio *in vivo* mostrou que a emulsão do eugenol (**39**) foi eficaz na proteção do tabaco, a partir da infecção da mancha marrom, indicando que este OE é um potente fungicida controlador desta doença.

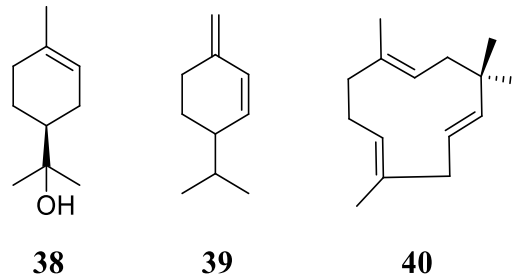
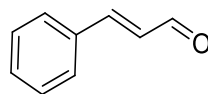


Figura 12. Estruturas químicas de monoterpenos encontrados no óleo essencial de *C. alba* e *S. oblata*.

Também foi investigada a composição química e a atividade antifúngica do óleo essencial das espécies de *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus officinalis 'Prostrates'*, *Salvia officinalis*, plantas medicinais da família Lamiaceae. O estudo concluiu que os constituintes predominantes: carvacrol (**21**), timol (**20**) e linalol (**13**), encontrados nas espécies, atuam no biocontrole contra o fitopatógeno *Pilidiella granati*, que age no período pós-colheita dos frutos de *Punica granatum* (THOMIDIS e FILOTHEOU, 2016).

A biodegradação de madeira por algumas espécies de fungos é um dos problemas mais sérios que comprometem a estrutura da madeira e inviabilizam o manejo florestal. Como é sabido, os óleos essenciais têm uma significativa capacidade em exibir atividades antifúngicas contra uma grande diversidade de fungos de degradação da madeira (HO et al., 2010; CHENG et al., 2012). Essas atividades podem ser atribuídas ao sinergismo dos compostos presentes em óleos essenciais ou devido à potencialidade dos seus compostos majoritários individuais (TASCIOGLU et al., 2013). Esses compostos ativos, extraídos do óleo essencial de várias espécies de plantas aromáticas, tais como carvacrol (**21**), citral (**23**), citronelol (**12**), cinamaldeído (**41**) (figura 13), eugenol (**29**), e timol (**20**), contribuíram significativamente para as atividades antifúngicas testadas contra fungos causadores do apodrecimento da madeira como, por exemplo, *Trametes hirsuta*, *Laetiporus sulphureus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* e *Coniophora puteana* (XIE et al. 2017; ZHANG et al., 2016; VODA et al., 2003).



41

Figura 13. Estrutura química do cinamaldeído, composto ativo extraído de diversas partes e espécies de plantas aromáticas.

1.4 Fungos Fitopatogênicos

Os micro-organismos fitopatogênicos são aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais. Estes, por sua vez, diante de estresses bióticos e abióticos, tornam-se patógenos e causam doenças nas plantas por meio de distúrbios em seu metabolismo celular (BOMFIM et al., 2013).

Doenças em plantas causadas por fungos fitopatogênicos são responsáveis por uma parcela de 10% de perda na produção agrícola mundial, o que causa grande impacto na economia. Atualmente, são conhecidas 800 espécies de fungos que são patógenos de vegetais, principalmente em cultivares importantes do nosso país (BOMFIM et al., 2013). Dentre os fungos de grande importância para a agricultura mundial encontra-se o gênero *Fusarium*, não só por causar patologias em plantas, mas também, pelo fato de algumas espécies serem capazes de produzir toxinas específicas como por exemplo o ácido fusárico (TINOCO, 2010). O mecanismo de ação dos fungos fitopatogênicos irá depender exclusivamente do estado fisiológico da planta. Geralmente, traumatismos causados por insetos são responsáveis pela origem da infecção e desenvolvimento fúngico (CALIGIORNE et al., 2010).

Durante o seu desenvolvimento em tecidos hospedeiros ou em cultura, os fungos fitopatogênicos podem produzir uma vasta gama de compostos tóxicos e uma variedade de estruturas bioquímicas com diferentes modos de ação para a retirada de nutrientes da célula para seu próprio consumo e crescimento. A retirada desses nutrientes, que seriam aproveitados pelo próprio hospedeiro, podem ser o suficiente para levar a planta a exibir sintomas típicos de colonização fúngica. Contudo, existem evidências consideráveis de que certos fungos produzem toxinas seletivas para os organismos invasores (KONO et al., 1981).

O conhecimento da fisiologia do patógeno, bem como suas condições ótimas de desenvolvimento, que compreendem pH, umidade, temperatura do solo e do ar, são imprescindíveis para adotar práticas e medidas de controle adequadas para a patologia (DUARTE et al., 2005).

1.4.1 *Fusarium solani* f.sp. *piperis*

Por volta de 1959, Albuquerque observou alguns sintomas da doença que se estabeleceu nas plantações de *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino), e seu agente etiológico, o fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. Este fungo foi isolado pelo pesquisador e identificado por uma nova forma de *Fusarium* com alto grau de patogenicidade e rápida propagação, destruindo, em curto prazo de tempo, grandes áreas do cultivo da pimenta-do-reino, acarretando em prejuízos imensuráveis aos pipericultores (ALBUQUERQUE, 1961).

A fusariose, foi constatada há mais de 50 anos no Brasil, e vem sendo um problema desde a década de 1960 com a disseminação do *F. solani* f. sp. *piperis*, doença pela qual, é conhecida também por podridão do pé, podridão das raízes ou mal de mariquita, considerada a doença mais devastadora e problemática deste cultivo (NAIR, 2004).

A infestação normalmente inicia-se em pequenas reboleiras e o ataque pelo *F. solani* f. sp. *piperis* pode originar-se tanto pelas raízes como também ramos ainda jovens, ambos levam a secagem e morte das pimenteiras. Os sintomas notados na planta quando atacada por este fungo é a descoloração e queda prematura das folhas e em períodos de frutificação acarreta na perda dos frutos, o que leva a uma produção reduzida. Além disso, um dos grandes problemas em detectar o ataque por este fungo é que as toxinas liberadas por ele, contaminam a pimenteira através do sistema radicular acarretando no apodrecimento das raízes e radículas, e posteriormente, quando a doença atinge maiores proporções, nota-se graves lesões a região nodal, ocasionando o secamento dos ramos, tais fatos podem ser observados na figura 14. Ao entrar em contato com outra pimenteira pode ocorrer o alastramento da doença, pois o patógeno produz conidióforos que originam os microconídios, macroconídios e peritécios vermelhos, contendo em seu interior os ascósporos, e em substrato nascem novas hifas e novos ascos (DUARTE et al., 2005). Neste estágio da doença, o alastramento se dá pelo vento ou pela percolação da chuva, atingindo plantas sadias e disseminando a patologia na plantação, tornando o controle deste patógeno ainda mais dificultoso (ALBUQUERQUE e DUARTE, 1991).



Figura 14. Pimenta do reino (*P. nigrum*) com sintomas avançados de fusariose. Necrose das folhas (A) Necrose das raízes (B). Fonte: TREMACOLDI, 2010.

Trabalhos sobre contaminação de plantas por fungos do gênero *Fusarium* tem mostrado que sua permanência no solo afetado é em decorrência da grande produção de estruturas reprodutivas do patógeno, principalmente os clamidósporos, que é um estágio do ciclo de vida dos fungos que os garante sobrevivência em condições adversas como, por exemplo, variação de umidade e temperatura, fazendo com que prolifere nos pimentais, permanecendo viáveis por muitos anos, sem apresentarem alterações morfológicas. A umidade é um fator que favorece a multiplicação do patógeno e o avanço da enfermidade nos tecidos das raízes da planta, assim como a propagação da doença entre pimenteiras vizinhas. Os fungos utilizam uma diversidade de substratos como fontes de carbono, entretanto, alguns grupos se especializaram em degradar substratos particulares, tornando-se mais competitivos perante outros micro-organismos. Por esse motivo os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta (DUARTE et al., 2005).

Neste cenário, os métodos que são utilizados são pouco eficientes, utilizando-se fungicidas sintéticos tais como, benomyl, cabendazin, tebuconazol e tiabendazol. Contudo, não há nenhum registro de fungicida recomendado para a fusariose em pimenta-do-reino no sistema de agrotóxicos fitossanitários. No entanto, nenhuma das cultivares de pimenta-do-reino existentes até o momento são resistentes ou tolerantes ao *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Segundo Rocha Neto (2013), por esse motivo, torna-se necessário adotar medidas preventivas e práticas de manejo que possam reduzir a taxa de progresso da doença.

De acordo com dados obtidos na literatura, óleos essenciais surgem como uma fonte interessante de compostos ativos contra o fungo fitopatogênico *F. solani* f. sp. *piperis* (BENCHIMOL, SUTTON, e BASTOS, 2017).

1.4.2 *Thielaviopsis paradoxa*

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* é um patógeno vegetal, e na natureza causa doenças em cultivos agrônômicos, árvores frutíferas e madeireiras, como também em plantas de folhagens ornamentais. A variedade de hospedeiros de *T. paradoxa* inclui cultivos economicamente importantes, como abacaxi, coco, cana-de-açúcar, tamareiras, banana, sorgo, cacau, batata-doce e milho (PLOETZ et al., 2003).

Os primeiros relatos de *T. paradoxa* são datados de 1886 na França, onde foi estudado por ser o agente causador de doença em frutos de abacaxi. Já em 1893, Went verificou a podridão na cana-de-açúcar e classificou o fungo causador dessa doença *Thielaviopsis ethacetica* Went. Como, nos primeiros estágios da doença, a cana-de-açúcar liberava um odor semelhante ao odor de abacaxi, notou que se tratava do mesmo fungo identificado em 1886 no abacaxi, e assim, o pesquisador nomeou a doença como “podridão abacaxi”, e desde então, o fungo tem sido relatado a partir de uma variedade de culturas. No Brasil, os primeiros relatos de sua ocorrência em coqueiros surgiram em 2004 e desde então, a doença tem se disseminado gradualmente aumentando o número de propriedades com infestação a cada ano (HEWAJULIGE e WIJESUNDERA, 2014).

O gênero *Thielaviopsis* abrange fungos saprófitas causadores de podridão preta de raízes em diversas espécies como mencionado anteriormente. A porta de entrada para o *T. paradoxa* ocorre através de cortes ou ferimentos existentes nas mudas. Esta observação é particularmente importante em cana-de-açúcar, uma vez que os colmos são seccionados por ocasião do plantio, propiciando a entrada para o patógeno (WISMER, 1961).

Segundo Hewajulige e Wijesundera (2014), somente no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr.), o *T. paradoxa* causa três doenças distintas, a mancha foliar, a podridão basal e podridão dos frutos. A podridão das frutas (figura 15-A), também conhecida como podridão negra, causa sérios danos econômicos à cultura, quando compado com as manchas foliares. Já nas espécies de coco (*Cocos nucifera*), o fitopatógeno é responsável por causar a doença hemorrágica do caule (figura 15-B). O fungo provoca não apenas doença hemorrágica no caule, mas uma variedade de outras doenças, incluindo podridão das raízes e dos botões, mancha foliar, entre outras.



Figura 15. Sintomas da doença da podridão negra em frutos de abacaxi (A) e hemorragia do caule no coco (B). Fonte: HEWAJULIGE; WIJESUNDERA, 2014.

Quando se trata da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), a doença economicamente mais importante é a do abacaxi da cana-de-açúcar. O nome se dá desta forma, pois os sintomas causados pela doença são semelhantes aos sintomas da doença da podridão negra do abacaxi. Visto que a podridão abacaxi afeta, principalmente, o desenvolvimento de tecidos jovens (brotação das gemas), causando falhas na brotação, e, conseqüentemente, afeta o processo de absorção de água e elementos minerais, podendo retardar ou inibir o desenvolvimento das raízes. Neste contexto, também pode-se citar a doença causada na espécie *Phoenix dactylifera*, também chamada de queima negra. Esta é a doença economicamente mais importante da tamareira, sendo relatada em todas as áreas de plantio do mundo, de igual modo, causada pelo *T. paradoxa*. Os sintomas da queima negra incluem podridão na polpa do fruto, que se liquefaz rapidamente à temperatura ambiente e emite um odor característico, adocicado e etéreo. Após este estágio, à medida que o fungo se desenvolve, formando conídios na superfície ferida, o tecido doente vai escurecendo, devido a cor preta do micélio fúngico (HEWAJULIGE; WIJESUNDERA, 2014).

Diante do exposto, não se pode deixar de mencionar a potencialidade que tem os óleos essenciais em suprimir, ou amenizar os danos causados por esse patógeno, como descreve Cruz e colaboradores (2018), utilizando o óleo essencial de genótipos de *Lippia gracilis* contra *T. paradoxa*, obtendo portanto, uma boa alternativa para o controle eficiente de *T. paradoxa* em coqueiros. Em contraste a esses grandes problemas mencionados até aqui, nota-se uma grande carência na pesquisa voltada

aos óleos contra essa espécie de fungo em questão. Levando em consideração a capacidade que essa classe de compostos possui, em detrimento com os prejuízos que este patógeno pode causar, torna-se extremamente importante a pesquisa voltada para os OEs, com atividade antifúngica frente ao *T. paradoxa*.

1.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

Como mencionado, os óleos essenciais são misturas complexas e para caracterização dos compostos presentes nessas amostras, os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais abrangentemente utilizados na atualidade, principalmente na identificação e análise de misturas, como ocorre em amostras de óleos essenciais. A Cromatografia Gasosa (CG), por exemplo, tem como objetivo separar componentes a partir de misturas de compostos voláteis com eficiência, reprodutibilidade e sobretudo em um tempo de análise relativamente curto. Aliado a esses benefícios, também pode-se incluir a alta seletividade e a possibilidade de utilização de uma quantidade reduzida de amostra. Nas aplicações analíticas, é possível o acoplamento com um sistema de espectrometria de massas (CG-EM), que é extremamente vantajoso na separação e identificação de estruturas químicas (SIMÕES et al., 2010; BASER e BUCHBAUER, 2010).

A introdução da cromatografia gasosa, em 1952, por James e Martin, foi um importante marco na química analítica, que mais tarde contribuiu para que importantes estudos envolvendo esta técnica tivessem êxito (JAMES e MARTIN, 1952). A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas de melhor desempenho. A cromatografia gasosa é considerada um método dinâmico de separação de misturas de compostos voláteis, que podem se distribuir entre duas fases, móvel e estacionária. O método baseia-se no movimento da fase gasosa móvel quimicamente inerte através da fase estacionária e numa distribuição diferente dos componentes da mistura entre as duas fases. A interação do analito com a fase estacionária pode ocorrer em diferentes graus de afinidade dependendo da diferença de polaridade ou da massa molecular dos componentes presentes na mistura (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

No acoplamento com o espectrômetro de massas, a amostra a ser analisada inicialmente é injetada e movida ao longo da coluna cromatográfica pelo gás de arraste, em seguida separada, ocasionando em um tempo de retenção específico para cada composto. Após serem separados na coluna cromatográfica, chegam até a fonte de íons. A ionização por impacto de elétrons (“electron ionization”) – IE, é um dos métodos de ionização mais empregados em CG-EM, onde os compostos são bombardeados por um feixe de elétrons de alta energia, geralmente 70 eV. A colisão entre os elétrons e as moléculas do analito, podem desencadear vários processos, dentre eles, o mais simples é aquele em que o analito absorve esta energia, e é ionizado pela remoção de um único elétron (M^+). Este processo requer tipicamente 10 eV, e o restante da energia gera a fragmentação dos compostos, que a partir das informações dos valores de massa molecular de cada um dos fragmentos, é possível descrever a estrutura da molécula (ARDREY, 2003).

Após a ionização dos componentes, os íons gerados são acelerados em direção ao analisador de massas que tem função de separar tais íons de acordo com a razão de massa/carga (m/z). Os íons separados são então detectados e o sinal da corrente de íons que vem do analisador é amplificado e em seguida, esses sinais são transferidos para sistema de processamentos de dados, onde serão gerados os cromatogramas (DABROWSKI, 2018).

Neste caso, o cromatograma consiste em várias bandas, onde em um caso ideal, cada uma delas corresponde a exclusivamente um componente da amostra (KOLOMNIKOV et al., 2018).

O tempo de retenção – tempo decorrido entre a injeção de uma amostra e o ápice da banda cromatográfica – é relativo às substâncias polares e apolares com a mudança na polaridade da fase estacionária. Os compostos eluídos de uma fase estacionária apolar se encontram em ordem crescente do ponto de ebulição. Quanto mais fortemente polar for à fase estacionária, mais fortemente a coluna irá reter as substâncias polares (HARRIS, 2001).

Em alguns casos, o fato de as bibliotecas não serem suficientemente capazes de identificar completamente determinados compostos devido à complexidade de algumas matrizes, é possível utilizar o cálculo do índice de retenção em relação a uma substância padrão como uma ferramenta valiosa no auxílio da identificação (VIEGAS e BASSOLI, 2007).

Embora muito útil, a CG-EM não é suficiente para identificar inequivocamente os componentes de uma amostra, pois existem moléculas distintas com padrões de fragmentação semelhantes. Considerando que os óleos essenciais são constituídos de muitos isômeros, identificações inadequadas podem ser comuns. Desde o princípio da utilização da técnica de cromatografia gasosa, os dados de retenção publicados não apresentavam padronização, desta maneira, sua utilização em diferentes laboratórios era limitada, uma vez que, variações instrumentais impediam uma reprodutibilidade confiável dos tempos de retenção de um mesmo composto, ou seja, dois laboratórios com cromatógrafos idênticos, utilizando a mesma metodologia e os mesmos reagentes obteriam tempos de retenção distintos. Isso se deve ao fato de que o tempo de retenção varia com o comprimento da coluna, a composição química e a espessura da fase estacionária, bem como as temperaturas de operação, o fluxo e o tipo de gás carreador (KOVÁTS, 1958).

Então, para contornar esse problema, vislumbrou-se a possibilidade de se medir o tempo de retenção de um composto em relação a uma substância padrão. Foi quando em 1958, Kováts introduziu o conceito de índice de retenção e com esse advento, padronizou-se as informações a respeito da retenção de compostos com a elaboração do conceito de índice de retenção de Kováts. O valor de um índice de retenção denota a posição de um composto desconhecido em relação a um conjunto de n-alcenos, os quais são injetados utilizando o mesmo método dos compostos. Eles são usados em comparações de análises feitas em um mesmo laboratório ou entre laboratórios diferentes, em condições idênticas, com o objetivo de identificar bandas cromatográficas, com uniformidade dos dados de retenção (MUHLEN e MARRIOTT, 2011).

Vale ressaltar que os índices estão fortemente ligados à polaridade da coluna, desta maneira, um composto eluído em uma coluna do tipo DB-5 necessariamente apresentará um índice de retenção diferente se eluído em uma coluna DB-Wax (BIANCHI *et al.*, 2007).

Diante do exposto, é notável que o acoplamento do cromatógrafo gasoso com o espectrômetro de massas combina vantagens da alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia com a obtenção de informação estrutural, massa molecular e aumento adicional da seletividade da espectrometria de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Obtenção de óleos essenciais de plantas aromáticas encontradas na Mata Atlântica Capixaba, para estudo da sua composição química e avaliação das atividades fungicida e citotóxica.

2.2 Específicos

- Detectar e identificar, os compostos químicos no óleo essencial das plantas coletadas empregando-se o método de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) e comparar os espectros de massas com os existentes na biblioteca NIST, com a literatura e pelo índice de Kovat's.
- Estimar o rendimento dos óleos essenciais em cada espécie;
- Verificar através do teste de susceptibilidade antifúngica contra *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa* o potencial de inibição dos óleos essenciais testados.
- Verificar através do teste de citotoxicidade basal frente a células de macrófagos murinos (Raw 264.7) a citotoxicidade dos óleos essenciais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi efetuada sempre no período matutino em Parques Estaduais e Reservas Biológicas no estado do Espírito Santo. Os locais de coleta tratam-se do bioma de Mata Atlântica, como o Parque Serra do Valentim localizado em Iúna; Parque Estadual Paulo César Vinha localizado em Guarapari; Parque Estadual de Forno Grande em Castelo; área de Mata Atlântica em Coqueiral de Aracruz e na Reserva Biológica de Duas Bocas em Cariacica. As espécies *B. platypoda*, *C. spicatus*, *L. lundiana*, *P. alata*, *P. tetrandra* e *P. miquelianum* foram coletadas no outono; assim como as espécies *B. trinervis*, *C. macrobracteolata*, *C. schelechtendaliana*, *E. elatior*, *P. aduncum*, *S. brasiliensis* e *S. cinnamomeum* foram coletadas no inverno e a espécie de *Protium* sp. foi coletada na primavera.

Após coletado, o material foi devidamente herborizado para a confecção das exsiccatas, as quais foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo. A identificação taxonômica foi realizada com a colaboração de Luana S. B. Calazans, técnica do Herbário VIES, DCBIO/UFES; M. Sc. Jaqueline Lubert, doutoranda da Escola Nacional de Botânica Tropical do Rio de Janeiro; M. Sc. João Paulo Fernandes Zorzanelli, doutorando em Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre; e à Dra. Luciana Dias Thomaz, professora do curso de pós-graduação em Botânica do Campus Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.2 Extração do óleo essencial e cálculo do rendimento

Para a obtenção dos óleos voláteis foram utilizadas plantas aromáticas coletadas na mata atlântica. Os OEs foram obtidos a partir do material vegetal fresco. As partes do material foram coletadas separadamente, pesadas para obtenção de seu peso fresco, fragmentadas em um liquidificador e submetidas à extração do óleo essencial por hidrodestilação em aparelho de Clevenger durante duas à três horas. O óleo extraído foi armazenado a uma temperatura menor que 0 °C para remoção da água, devido ao fato de a mesma solidificar-se, proporcionando a separação do óleo.

Após a remoção da água, acondicionou-se as amostras em frascos de vidro âmbar com peso conhecido e pesou-se posteriormente em balança analítica para obtenção do rendimento do óleo. Estas soluções foram homogeneizadas e mantidas em frascos âmbar, para proteção da luminosidade, e armazenou-se em geladeira a 4 °C.

O cálculo do rendimento foi realizado através da equação:

$$R (\%) = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \times 100$$

Onde:

$R (\%)$ = rendimento da produção de óleo essencial;

$m_{\text{óleo}}$ = massa de óleo obtida (em gramas);

m_{planta} = massa das partes aéreas, flores e folhas (em gramas)

3.3 Caracterização do óleo essencial

Parte do óleo essencial extraído foi submetido à análise para caracterização dos seus compostos, utilizando-se cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), modelo QP5050 (SHIMADZU). A coluna cromatográfica utilizada é do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5, de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, utilizando-se hélio como gás de arraste. Ajustou-se as temperaturas de 220 °C no injetor e 300 °C no detector. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240°C. Injetou-se uma mistura de alcanos de cadeia linear (C₈-C₂₈), utilizando-se nas mesmas condições as quais foram injetados os óleos essenciais. Para cálculo dos índices de retenção, utilizou-se os tempos de retenção dos compostos em questão e dos alcanos eluídos antes e depois do respectivo componente a ser determinado. A identificação dos compostos foi realizada por comparações dos espectros de massas com os existentes na biblioteca NIST, com a literatura e pelo índice de Kovat's. A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de suas respectivas bandas, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando o cromatógrafo gasoso.

3.4 Teste de susceptibilidade antifúngico contra *Fusarium solani* f.sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*

3.4.1 Preparo do meio

Preparou-se os meios deste ensaio utilizando-se caldo de batata dextrose (CBD) e ágar dextrose batata (ABD) de acordo com o fabricante.

3.4.2 Culturas de micro-organismos

As cepas de *F. solanif* sp. *piperis* (E053) e *Thielaviopsis paradoxa* (E748) foram doadas pelo professor José Aires Ventura do Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e colaborador do programa de pós-graduação em Biotecnologia da Ufes.

Para a realização dos testes, uma alíquota de cada suspensão foi coletada e inoculada com ágar batata dextrose e incubada em estufa bacteriológica, variando-se a temperatura de 35 a 25 °C por 8 a 10 dias.

3.4.3 Preparo do inóculo

Inicialmente cobriu-se as colônias em ABD com aproximadamente 1mL de solução salina estéril a 0,85% e preparou-se uma suspensão mexendo-se delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta de transferência. Retirou-se a mistura resultante contendo conídios ou esporangiosporos e fragmentos de hifas e transferiu-se para um tubo de ensaio estéril. Após 3 a 5 minutos, quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo do tubo de ensaio, transferiu-se a suspensão homogênea para um tubo de ensaio estéril, fechando-se a tampa firmemente, e em seguida, homogeneizou-se em um agitador de tubos durante 15 segundos. Leram-se as densidades das suspensões de conídios ou esporangiosporos e ajustou-se para uma densidade óptica (DO) variando-se entre 0,15-0,17. A diluição do inóculo foi feita ajustando-se em salina na proporção 1:50 em CBD, que correspondem a duas vezes a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC mL⁻¹, aproximadamente. O inóculo

do teste foi reproduzido em quantidades suficientes para inocular diretamente cada poço com 0,1mL da correspondente suspensão de inóculo diluído.

3.4.4 Teste de microdiluição

O teste foi realizado utilizando-se microplacas estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U), de acordo com o documento M-38A (2002), publicado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Realizou-se o procedimento experimental em cabine de segurança biológica classe IIA.

Em uma microplaca, inoculou-se 100 µL da suspensão de micro-organismo (2x concentrado) e 100 µL das amostras a serem testadas. Paralelamente, efetuaram-se controles positivos de crescimento, onde na mesma microplaca inoculou-se 100 µL da suspensão sem adição de amostra, completando-se o volume final do poço para 200µL com meio. Realizou-se o controle negativo adicionando-se 100 µL de amostra e 100 µL de meio. Realizou-se também o controle de esterilidade, que consistiu em adicionar meio CBD aos poços da microplaca, evidenciando-se a eficácia do sistema e ausência de contaminação no meio puro. Para os padrões as concentrações 2X da amostra são dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100 µL. Deve-se conter na fileira 1 a maior concentração da droga (64 ou 16 µg mL⁻¹) e na fileira 10 a menor concentração da droga (0,12 ou 0,03 µg mL⁻¹). Em seguida, incubaram-se as placas a 28 °C e analisou-se o resultado em 48 horas, por inspeção visual de turvação. Utilizou-se como padrão antifúngico o fungicida sistêmico, tebuconazol. Considerou-se a menor concentração onde não houve turvação a concentração mínima inibitória (CIM).

3.4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM é definida como a menor concentração da substância na qual a linhagem fúngica não apresenta capacidade de crescimento.

Após a leitura dos resultados da CIM das amostras testadas, alíquotas de 10 µL dos poços em que não apresentaram crescimento fúngico, foram retirados e

semeados em placas de cultura, juntamente com 10 mL de ABD estéril, e em seguida, incubou-se o sistema por 48 horas à temperatura de 28°C.

Após 48 horas de incubação, caso ocorra crescimento fúngico mediante a diluição da alíquota do meio contendo o agente antifúngico, este é considerado um agente fungistático. Se não houver crescimento fúngico, é considerado um agente fungicida. A determinação da CFM foi realizada de acordo com Prakash e cooperantes (2012), com algumas alterações na metodologia.

3.5 Determinação da citotoxicidade basal em células de macrófagos murinos (Raw 264.7)

3.5.1 Manutenção da linhagem celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em parceria com o prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa do Departamento de Ciências Farmacêuticas do CCS/Ufes. A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB 71™) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ COD. 0212) e cedidas pelo professor doutor Marcio Fronza/Universidade Vila Velha.

Os macrófagos murinos são células imunitárias retiradas de camundongos, amplamente utilizadas como modelo em ensaios de inflamação, as quais se fixam na superfície do local onde estão sendo cultivadas, permitindo que o descarte e troca de meio ocorram sem perda de células.

Para a manutenção da cultura, as células foram mantidas em garrafas de cultivo com meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), em seguida, foram incubados a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

Decorridos 3 a 4 dias de incubação, após as células apresentarem confluência de 70-90%, foram removidas das garrafas com o auxílio de cell scraper, homogeneizadas em meio DMEM completo e contadas em câmara de Neubauer para obtenção dos valores de concentração celular e em seguida, foram transferidas para outras garrafas.

3.5.2 Avaliação da citotoxicidade basal

A determinação das concentrações citotóxicas das amostras fora obtida a partir do ensaio de citotoxicidade, através do ensaio do MTT-tetrazólio (MOSMANN, 1983). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) à formazana (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) (Figura 16) por reação enzimática. Contudo, a redução do MTT a formazana, é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, ou à viabilidade celular.

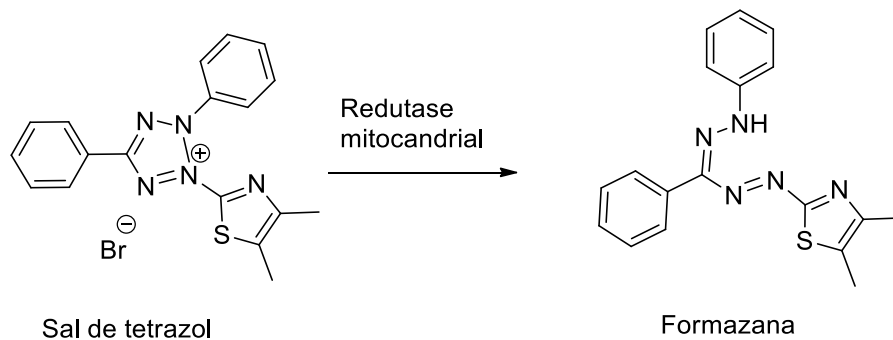


Figura 16. Redução do sal de tetrazol (MTT) à formazana. Fonte: STOCKERT et al., 2012.

Para a avaliação da citotoxicidade basal, inicialmente adicionou-se 200 μL da suspensão de macrófagos em DMEM suplementado, contendo 10^5 células mL^{-1} em cada poço da microplaca de 96 poços e incubou-se a 37 $^{\circ}\text{C}$ em 5% de CO_2 , até atingir confluência (70 - 90%). Após confluência, descartou-se o meio e as células aderidas tratadas com 200 μL de diferentes concentrações das substâncias em DMEM suplementado. Os óleos essenciais foram avaliados nas concentrações de 800 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o controle de viabilidade, adicionou-se 200 μL do meio. Posteriormente, incubou-se as microplacas por 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% de CO_2 . Após incubação, dispensou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL da solução de MTT-tetrazólio (1 mg mL^{-1}) em DMEM (não suplementado) e incubou-se a 37 $^{\circ}\text{C}$ a uma atmosfera de 5% de CO_2 durante 3 horas.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado, e adicionou-se 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço da microplaca para solubilizar os

cristais de formazana formados pelas células viáveis. Realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 540nm com filtro de referência em 620nm. Os testes foram acompanhados com crescimento controle, realizados em triplicata e reproduzidos no mínimo 3 vezes.

3.5.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média de três ensaios realizados \pm desvio padrão. A análise dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste post-hoc de Bonferroni, onde o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

A curva dose-efeito (concentração x absorbância) para determinação do IC_{50} , concentração do agente que reduz em 50% a absorbância espectrofotométrica, foi obtida através de análise de regressão linear. Para as análises foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e rendimento dos óleos essenciais

A hidrodestilação das quatorze espécies estudadas resultou em rendimentos de até 0,39% conforme pode ser observado na tabela 1. A hidrodestilação de *C. schelechtendaliana*, *C. spicatus*, *S. cinnamomeum* e *P. tetrandra* não produziram quantidades detectáveis de óleo essencial, embora o material vegetal apresentasse aroma no campo. Desta maneira, não foi possível calcular o rendimento, pois, após as três horas de extração, ainda não havia óleo sendo destilado. Extrações exaustivas, utilizando tempos maiores de destilação podem levar a extração de compostos com maiores pesos moleculares, como é o caso dos sesquiterpenos que, muito embora, tempos mais elevados podem ocasionar a perda de alguns compostos, principalmente por degradação ou volatilização (monoterpenos) (CANNON *et al.*, 2013).

Levando em consideração a variabilidade na composição devido a fatores bióticos e abióticos, e comparações com dados possivelmente encontrados na literatura da mesma planta podem não ser suficientemente significativos, pois a influência de alguns fatores externos influencia na quantidade de óleo, bem como na sua composição (BAKKALI *et al.*, 2008).

Tabela 1. Dados referentes à massa vegetal hidrodestilada, e resultado dos rendimentos dos óleos essenciais.

	Espécie	Família	Órgão vegetal	Peso	Rendimento
1	<i>B. platypoda</i>	Asteraceae	Folhas	121,8149g	0,30%
2	<i>B. trinervis</i>	Asteraceae	Folhas	85,4937g	0,38%
3	<i>C. macrobracteolata</i>	Myrtaceae	Folhas	121,2512g	0,23%
4	<i>C. macrobracteolata</i>	Myrtaceae	Frutos	101,9466g	0,28%
5	<i>C. schelechtendaliana</i>	Myrtaceae	Folhas	99,5061g	0,0%
6	<i>C. spicatus</i>	Costaceae	Folhas	113,1919g	0,0%
7	<i>E. elatior</i>	Zingiberaceae	Folhas	122,0230g	0,05%
8	<i>L. lundiana</i>	Verbenaceae	Folhas	41,4766g	0,26%
9	<i>P. alata</i>	Piperaceae	Folhas	105,9089g	0,20%
10	<i>P. tetrandra</i>	Phytolaccaceae	Folhas	73,4379g	0,0%
11	<i>P. aduncum</i>	Piperaceae	Folhas	119,9902g	0,39%

12	<i>P. miquelianum</i>	Piperaceae	Folhas	108,4440g	0,11%
13	<i>Protium</i> sp.	Burseraceae	Folhas e caules com botões	76,9293g	0,27%
14	<i>S. brasiliensis</i>	Siparunaceae	Frutos	24,8198g	0,11%
15	<i>S. cinnamomeum</i>	Myrtaceae	Folhas	60,8568g	0,0%

Geralmente a quantidade de óleo presente em espécies vegetais é baixa, normalmente inferior a 1%. Rendimentos superiores a 1% são mais comuns em espécies do gênero *Eucalyptus* e também em botões florais de *Syzygium aromaticum*, os quais podem ser encontradas porcentagens de até 15% de óleo essencial (BRUNETON, 1991).

4.2 Análise da composição química dos óleos essenciais

Os OEs das espécies *B. platypoda*, *B. trinervis*, *C. macrobracteolata* (folhas e frutos), *E. elatior*, *L. lundiana*, *P. alata*, *P. aduncum*, *P. miquelianum*, *Protium* sp. e *S. brasiliensis* foram analisados por CG-EM e os Índices de Kovats foram calculados a partir do padrão de hidrocarbonetos lineares (C₈-C₂₈).

Como já mencionado, os óleos essenciais constituem uma mistura extremamente complexa, tal resultado pode ser constatado ao analisar a composição química individual destes óleos que serão mostrados nas tabelas 2 a 12. Apontada como muito útil, a CG-EM pode identificar inequivocamente alguns componentes de uma amostra. Considerando que os óleos essenciais são constituídos de muitos isômeros, identificações inadequadas podem ser comuns. Além disso, a grande quantidade de isômeros de compostos sesquiterpênicos (muito maior do que nos monoterpenos) muitas vezes coeluem, e podem apresentar espectros de massa e índices de retenção praticamente idênticos, dificultando a identificação, sendo necessário utilizar como por exemplo, separações cromatográficas empregando colunas de separações enantioméricas (BASER e BUCHBAUER, 2010).

Embora determinada geneticamente, a composição química dos óleos essenciais também pode variar significativamente em função de variações ambientais como a temperatura, regime de chuvas, a duração e a hora do dia, o tempo de exposição e a intensidade de luz, a estação do ano e a altitude, além de outros fatores

que podem fazer com que a composição química, bem como a quantidade de princípios ativos produzidos pelas plantas sofram alterações (SIMÕES et al., 2010).

4.2.1. Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis platypoda* DC.

Analisando-se a amostra de OE de *B. platypoda* constatou-se a presença de 21 compostos, dentre eles, o 1*R*- α -pineno (**42**), β -tujeno (**43**) e β -pineno (**17**) como componentes majoritários, representados na figura 17, com porcentagens de 37,69; 19,08; e 9,97% respectivamente. Esse óleo essencial contou com uma porcentagem de aproximadamente 71,0% de sua composição de monoterpenos e 28,0% de sesquiterpenos. A tabela 2 mostra o resultado da análise por CG-EM, e os compostos seguem listados em ordem dos seus índices de retenção.

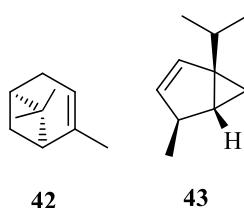


Figura 17. Estruturas químicas do 1*R*- α -pineno e β -tujeno.

A singularidade da composição química encontrada no presente trabalho se contrasta com os resultados obtidos anteriormente por Ferracini e colaboradores (1995), que avaliaram os voláteis da *B. platypoda* coletada em Minas Gerais, e constatou-se a presença do espatulenol, α -cadinol e α -terpineol como compostos majoritários.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *B. platypoda*.

Composto	IR _c	IR _L	(%)
1 β -Tujeno	921	971 ^a	19,08
2 1 <i>R</i> - α -Pineno	927	937 ^b	37,69
3 β -Pineno	970	980 ^a	9,97
4 Sabineno	976	976 ^a	0,80
5 Mirceno	990	991 ^a	4,73
6 α -Felandreno	999	1005 ^a	0,26
7 α -Terpineno	1011	1018 ^a	1,98

8	Limoneno	1022	1031 ^a	6,52
9	<i>m</i> -Cimeno	1021	1082 ^a	0,51
10	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	0,25
11	γ -Terpineno	1052	1062 ^a	3,79
12	(+)-4-Careno	1081	1001 ^c	0,98
13	Linalol	1098	1098 ^a	1,10
14	Terpinen-4-ol	1170	1177 ^a	5,79
15	α -Terpineol	1184	1189 ^a	0,91
16	Elixeno	1332	1430 ^e	0,32
17	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	0,98
18	Germacreno D	1437	1480 ^a	1,98
19	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	0,76
20	<i>t.</i> -Cadinol	1628	1644 ^d	1,17
21	<i>t.</i> -Murolol	1629	1635 ^a	0,44

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; a- ADAMS, 2007; b- DICKENS, 1999; c- LE QUERE e LATRASSE, 1990; d- NAWAZ, et al., 2017; e- NIST, 2002; % = porcentagem do componente.

4.2.2. Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis trinervis* Pers.

A análise e identificação revelaram a presença de 25 compostos na *B. trinervis*, com 32,0% de monoterpenos, 56,0% de sesquiterpenos, onde, 8,0% são contabilizados sesquiterpenos oxigenados. Os principais compostos do óleo foram α -felandreno (**44**) (31,16%), β -himachaleno (**45**) (24,56%), representados na figura 18, e germacreno D (**25**) (10,38%). Estes dados apresentam conformidade com os resultados encontrados por Morais e Castanha (2011), que ao examinarem o OE de uma espécie de *Baccharis*, igualmente observaram uma maior concentração de sesquiterpenos quando comparados aos monoterpenos. Lago e colaboradores (2008) analisaram o óleo volátil de *B. trimera* (Less.) DC. e também observaram que sesquiterpenos são mais recorrentes nesta espécie.

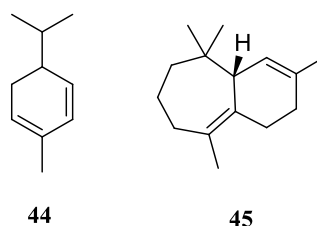


Figura 18. Estruras químicas dos terpenos α -Felandreno e β -himachaleno.

A composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial desta espécie, determinada após análise por CG-EM, está apresentada na tabela 3, listada em ordem de seus índices de retenção, juntamente com suas porcentagens.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial de *B. trinervis*.

	Composto	IRc	IRL	(%)
1	α -Tujeno	928	931 ^a	0,43
2	α -Pineno	931	939 ^a	1,62
3	β -Pineno	970	980 ^a	0,60
4	Sabineno	976	976 ^a	0,00
5	Mirceno	990	991 ^a	1,12
6	α -Felandreno	999	1005 ^a	31,22
7	α -Cimeno	1020	1022 ^a	5,71
8	Limoneno	1022	1031 ^a	0,15
9	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	0,93
10	Elixeno	1332	1430 ^b	1,86
11	α -Cubebeno	1345	1351 ^a	0,38
12	8-Isopropenil-1,5-dimetil-1,5-ciclododecadieno	1388	1386 ^c	0,34
13	α -Gurjuneno	1409	1409 ^a	0,72
14	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	5,02
15	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1430	1436 ^a	1,36
16	Germacreno D	1437	1480 ^a	10,38
17	β -Farneseno	1448	1458 ^a	0,29
18	α -Humuleno	1456	1454 ^a	0,51
19	γ -Elemeno	1476	1476 ^a	0,38
20	Zingibereno	1495	1495 ^a	0,65
21	β -Eudesmeno	1479	1485 ^a	0,42
22	β -Himachaleno	1497	1499 ^a	24,56
23	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	0,19
24	Isolongifolan-8-ol	1531	1531 ^a	9,71
25	Veridiflorol	1594	1590 ^a	0,27

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; a- ADAMS, 2007; b- NIST, 2002; c- ZHAO et al., 2014; % = porcentagem do componente.

4.2.3. Caracterização química do óleo essencial das folhas de *Campomanesia macrobracteolata*

De acordo com estudos reportados por Landrum (2001), a espécie *C. macrobracteolata*, até o ano de 2000, ainda não estava descrita dentre as espécies de *Campomanesia*, se tratando então, de uma planta nova e por isso, são escassos trabalhos que descrevem sua composição química, bem como, suas atividades biológicas, além do fato de estarem restritas ao Espírito Santo e Bahia.

A análise por CG-EM da amostra do óleo essencial das folhas de *C. macrobracteolata*, detectando-se uma grande quantidade de constituintes contabilizando um total de 60 compostos. Os três primeiros compostos que se destacam por sua presença em maiores quantidades são linalol (**13**) (27,29%), β -pineno (**17**) (17,40%) e 1*R*- α -pineno (**42**) (11,28%). A composição deste óleo tem predominância de sesquiterpenos (66,12%), entre eles 20,96% são oxigenados. O restante dos constituintes inclui cetona, éster, entre outros. Estes compostos, bem como suas porcentagens e índices de retenção estão listados na tabela 4.

Tabela 4. Composição química do óleo essencial das folhas de *C. macrobracteolata*.

	Composto	IRc	IRL	(%)
1	β -Tujeno	921	971 ^a	1,00
2	1 <i>R</i> - α -Pineno	927	937 ^d	11,28
3	Canfeno	941	953 ^a	0,09
4	β -Pineno	969	980 ^a	17,40
5	α -Felandreno	999	1005 ^a	1,44
6	α -Terpineno	1011	1018 ^a	0,48
7	<i>p</i> -Cimeno	1018	1026 ^a	1,08
8	Limoneno	1022	1031 ^a	7,33
9	Eucaliptol	1030	1033 ^a	0,07
10	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	0,06
11	γ -Terpineno	1052	1062 ^a	1,33
12	Terpinoleno	1081	1088 ^a	0,34
13	Linalol	1098	1098 ^a	27,29
14	Fenchol	1106	1114 ^a	0,07
15	4-Isopropil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol	1114	1129 ^e	0,06
16	Terpinen-4-ol	1170	1177 ^a	1,52
17	α -Terpineol	1184	1189 ^a	0,63
18	(-)-Mirtenol	1190	1194 ^a	0,02

19	(-)- <i>trans</i> -Pinocarvil acetato	1296	1297 ^a	0,31
20	δ-Elemeno	1333	1339 ^a	0,02
21	α-Cubebeno	1345	1351 ^a	0,13
22	Ylangeno	1365	1372 ^a	0,19
23	α-Copaeno	1370	1376 ^a	1,24
24	β-Bourboneno	1385	1384 ^a	0,23
25	β-Elemeno	1386	1391 ^a	0,16
26	β-Cubebeno	1390	1390 ^a	0,34
27	Isolongifoleno, 4,5-dehidro	1391	-	0,01
28	δ-Selineno	1495	1495 ^b	0,02
29	β-Cariofileno	1411	1418 ^a	6,86
30	α-Guaieno	1433	1439 ^a	0,15
31	Germacreno D	1437	1480 ^a	0,03
32	(-)-Aristoleno	1439	1424 ^j	0,05
33	α-Cariofileno	1444	1454 ^a	1,47
34	Aromadendreno	1453	1439 ^a	0,36
35	γ-Muroleno	1471	1477 ^a	0,95
36	γ-Elemeno	1476	1476 ^a	0,17
37	β-Eudesmeno	1479	1485 ^a	1,04
38	1-Isopropil-4-metil-7-metileno- 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	1486	-	0,10
39	α-Selineno	1489	1494 ^a	1,38
40	α-Amorfenno	1496	1485 ^a	0,28
41	γ-Cadineno	1509	1513 ^a	0,73
42	Calameneno	1518	1519 ^a	0,14
43	δ-Cadineno	1519	1524 ^a	2,54
44	Naftaleno, 1,2,3,4,6,8a-hexahidro-1- isopropil-4,7-dimetil	1527	1528 ^g	0,14
45	Patchoulano	1530	1532 ^a	0,20
46	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,4a,5,6,8a- hexahidronaftaleno	1532	1520 ^f	0,11
47	α-Calacoreno	1537	1542 ^a	0,08
48	±- <i>trans</i> -Nerolidol	1562	1564 ^a	2,78
49	Espatuleno	1570	1576 ^a	0,25
50	Óxido de Cariofileno	1581	1581 ^a	1,26
51	Germacreno D-4-ol	1584	1574 ^a	0,28
52	4a,7-Metano-4aH-naft[1,8a-b]oxireno, octahidro-4,4,8,8-tetrametil	1590	-	0,75
53	Carotol	1593	1594 ^a	0,19
54	Veridiflorol	1594	1590 ^a	0,26

55	Óxido de Aromadendreno II	1599	1678 ⁱ	0,76
56	<i>t</i> -Cadinol	1628	1644 ^h	0,53
57	Cubenol	1642	1642 ^a	0,25
58	Cânfora Juniper	1691	1691 ^a	0,48
59	α -Cadinol	1652	1653 ^a	0,62
60	<i>cis</i> -Lanceol	1684	1525 ^c	0,66

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-) ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- ALBUQUERQUE et al., 2004; c- BAHARUM et al., 2010; d- DICKENS, 1999; e- ELZAAWELY et al., 2007; f- FENG, JING e LI, 2014; g- HAMM et al., 2003; h- NAWAZ, et al., 2017; i- PASDARAN et al., 2012; j- VERMA, PADALIA, e CHAUHAN, 2014; % = porcentagem do componente.

4.2.4. Caracterização química do óleo essencial dos frutos de *Campomanesia macrobracteolata*

A análise por CG-EM revelou a presença de 65 constituintes nos frutos de *C. macrobracteolata*, dos quais aproximadamente 42,0% são classificados como monoterpenos e 52,1% como sesquiterpenos. Como pode ser visto na figura 19, os três compostos presentes em maiores quantidades foram \pm -*trans*-Nerolidol (**46**) (10,57%), α -Copaeno (**47**) (10,06%) e α -Citral (**48**) (9,68%).

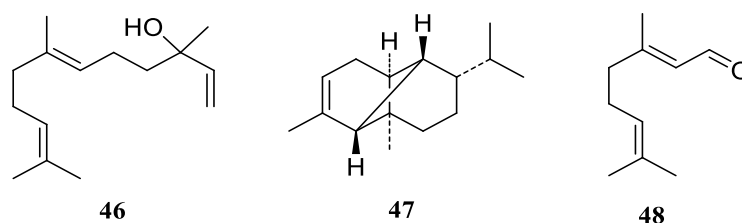


Figura 19. Estruturas químicas dos terpenos \pm -*trans*-Nerolidol, α -Copaeno e α -Citral.

A composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial desta espécie, determinada após análise por CG-EM, é apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Composição química do óleo essencial dos frutos de *C. macrobracteolata*.

	Composto	IRc	IRL	(%)
1	β -Tujeno	921	971 ^a	0,21
2	1 <i>R</i> - α -Pineno	927	937 ^d	2,55
3	Canfeno	941	953 ^a	0,10
4	β -Felandreno	967	1031 ^a	0,06
5	β -Pineno	970	980 ^a	1,56
6	α -Felandreno	999	1005 ^a	1,22
7	3-Careno	1004	1011 ^a	0,07
8	α -Terpineno	1011	1018 ^a	0,03
9	Limoneno	1022	1031 ^a	8,29
10	Eucaliptol	1030	1033 ^a	1,48
11	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	6,60
12	β - <i>trans</i> -Ocimeno	1050	1050 ^a	0,03
13	γ -Terpineno	1052	1062 ^a	0,09
14	(+)-4-Careno	1081	1001 ^g	0,10
15	Linalol	1098	1098 ^a	0,20
16	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dienol	1111	1113 ^f	3,18
17	Isopulegol	1138	1146 ^a	0,04
18	Verbenol	1160	1140 ^a	0,18
19	Terpineno-4-ol	1170	1177 ^a	0,20
20	α -Terpineol	1184	1189 ^a	0,56
21	Citronelol	1226	1228 ^a	0,16
22	<i>cis</i> -Carveol	1229	1229 ^a	0,03
23	β -Citral	1237	1240 ^a	5,68
24	Nerol	1253	1228 ^a	0,34
25	α -Citral	1269	1270 ^a	9,68
26	5-Isopropenil-2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	1278	1352 ⁱ	0,08
27	Metil geranato	1323	1323 ^a	0,13
28	α -Cubebeno	1345	1351 ^a	0,11
29	α -Copaeno	1370	1376 ^a	10,06
30	1 <i>R</i> ,4 <i>R-p</i> -Menta-2,8-dieno, 1-hidroperóxido	1381	1329 ^c	0,27
31	8-Isopropenil-1,5-dimetil-1,5-ciclodecadieno	1388	1386 ^k	0,05
32	β -Cubebeno	1390	1390 ^a	1,76
33	α -Gurjuneno	1409	1409 ^a	0,24
34	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	3,01
35	Aromadendreno	1431	1439 ^a	1,83
36	Elixeno	1332	1430 ^h	0,07
37	Isolongifoleno	1384	1387 ^a	1,14

38	α -Guaieno	1433	1439 ^a	0,04
39	α -Cariofileno	1444	1454 ^a	1,23
40	Aloaromadendreno	1453	1461 ^a	2,00
41	γ -Gurjuneno	1472	1473 ^a	4,64
42	γ -Elemeno	1476	1476 ^a	5,64
43	β -Selineno	1478	1485 ^a	0,06
44	(+)-Epi-biciclosesquifelandreno	1482	1482 ^a	0,11
45	Humuleno-(v1)	1494	-	0,14
46	δ -Selineno	1495	1495 ^b	0,13
47	α -Muroleno	1499	1499 ^a	0,38
48	γ -Cadineno	1505	1513 ^a	0,66
49	Calameneno	1518	1519 ^a	0,29
50	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	7,24
51	Naftaleno, 1,2,3,4,6,8a-hexahidro-1-isopropil-4,7-dimetil	1527	1528 ^f	0,05
52	α -Panasinseno	1526	1530 ^a	0,05
53	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,4a,5,6,8a-hexahidronaftaleno	1532	1520 ^e	0,09
54	\pm - <i>trans</i> -Nerolidol	1562	1564 ^a	10,57
55	Espatuleno	1570	1576 ^a	1,16
56	Globulol	1576	1583 ^a	1,60
57	Ledol	1583	1565 ^a	0,47
58	Veridiflorol	1594	1590 ^a	0,14
59	β -Eudesmol	1640	1649 ^a	0,52
60	δ -Cadinol	1622	1636 ^a	0,05
61	Cubenol	1642	1642 ^a	0,13
62	α -Cadinol	1652	1653 ^a	0,45
63	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimetil	1656	-	0,17
64	Farnesol	1666	1722 ^a	0,11
65	Farnesal	1676	1711 ⁱ	0,18

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- ALBUQUERQUE et al., 2004; c-COLLIN, 2015; d- DICKENS, 1999; e- FENG, JING e LI, 2014; f- HAMM et al., 2005; g- LE QUERE e LATRASSE, 1990; h- NIST, 2002; i- VILLA-RUANO et al., 2015; j- YE, LI, e WEI, 2013; k- ZHAO et al., 2014; % = porcentagem do componente.

4.2.5. Caracterização química do óleo essencial *Etilingera elatior*

Na análise por CG-EM da amostra do óleo essencial de *E. elatior*, mostrou uma grande quantidade de constituintes e identificou-se 47 destes. Os três primeiros compostos que se destacam por sua presença em maiores quantidades são β -Pineno (**17**) (16,41%), β -Cariofileno (**24**) (16,28%) e β -Felandreno (**39**) (13,02%). Sua composição conta 52% de monoterpenos, onde 32% são monoterpenos oxigenados e 36% de sesquiterpenos, no qual, 12% são oxigenados. O restante dos constituintes inclui hidrocarbonetos, éster e aldeído. Estes compostos, bem como suas quantidades relativas estão na tabela 6.

A composição química do OE de *E. elatior* tem significativas semelhanças com os resultados encontrados por Jaafar et al., (2007), que também encontrou β -Pineno e β -Cariofileno compostos em maiores quantidades, representando 19,17% e 15,36%, respectivamente.

Tabela 6. Composição química do óleo essencial de *E. elatior*.

	Composto	IR _c	IR _L	(%)
1	1-Metil-1,4-ciclohexadieno	896	-	1,12
2	5-Isopropil-2-metilbicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol	926	-	0,34
3	α -Canfolenal	935	1125 ^a	0,13
4	4-Isopropenil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol	939	-	0,78
5	β -Felandreno	967	1031 ^a	13,02
6	β -Pineno	970	980 ^a	16,41
7	Borneol	971	1165 ^a	0,32
8	Sabineno	976	976 ^a	0,43
9	Mirceno	990	991 ^a	1,32
10	α -Felandreno	999	1005 ^a	1,65
11	Octanal	1001	1001 ^a	0,22
12	2-Careno	1002	1001 ^a	0,06
13	Bornil acetato	1012	1099 ^a	0,16
14	α -Cimeno	1020	1022 ^a	0,67
15	Eucaliptol	1030	1033 ^a	0,03
16	γ -Terpineno	1052	1062 ^a	0,15
17	Isoterpinoleno	1064	1086 ^a	0,04
18	Linalol	1098	1098 ^a	0,16
19	<i>trans</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dienol	1111	1113 ^b	1,58
20	β -Citronelal	1153	1153 ^a	0,11

21	Verbenol	1160	1140 ^a	5,39
22	<i>cis</i> -Verbenol	1161	1144 ^a	4,87
23	Terpinen-4-ol	1170	1177 ^a	0,44
24	α -Terpineol	1184	1189 ^a	0,06
25	(-)-Mirtenol	1190	1194 ^a	0,64
26	4- <i>cis</i> -Decenal	1193	1193 ^a	0,21
27	<i>trans</i> -Carveol	1206	1217 ^a	1,78
28	β -Citral	1237	1240 ^a	0,15
29	α -Citral	1269	1270 ^a	0,14
30	α -Cubebeno	1345	1351 ^a	0,04
31	α -Copaeno	1370	1376 ^a	0,23
32	α -Bourboneno	1374	1374 ^a	0,24
33	β -Cubebeno	1390	1390 ^a	0,63
34	α -Gurjuneno	1409	1409 ^a	4,08
35	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	16,28
36	α -Humuleno	1454	1454 ^a	2,18
37	Aromadendreno	1453	1439 ^a	1,97
38	γ -Elemeno	1476	1476 ^a	10,11
39	Germacreno D	1480	1480 ^a	5,51
40	α -Bulneseno	1510	1505 ^a	0,20
41	δ -Cadineno	1514	1524 ^a	1,03
42	Palustrol	1562	1566 ^a	2,68
43	Espatuleno	1570	1576 ^a	0,37
44	Ledol	1583	1565 ^a	2,52
45	Carotol	1593	1594 ^a	0,60
46	<i>t.</i> -Murolol	1629	1635 ^a	0,52
47	Cubenol	1642	1642 ^a	0,16

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- HAMM et al., 2005; % = porcentagem do componente.

4.2.6. Caracterização química do óleo essencial de *Lantana lundiana* Schauer

Na análise cromatográfica da amostra de óleo de *L. lundiana*, identificou-se 27 compostos, e pôde-se constatar que a maior fração deste óleo é composta por sesquiterpenos, ou seja, 59,25% caracterizados como monoterpenos; dentre eles, 40,73% identificados como hidrocarbonetos monoterpênicos. Os componentes majoritários presentes nesse óleo são: β -cariofileno (**24**) (45,62%), germacreno D (**25**) (25,43%) e α -humuleno (**31**) (5,77%), mostrados na tabela 7.

O β -cariofileno destaca-se por apresentar um anel de ciclobutano, uma raridade entre os compostos naturais. Este composto possui diversas atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antialérgica, anestésica local, cardiovascular, antifúngica e anticarcinogênica segundo estudos realizados por Fernandes et al., (2007). Este composto geralmente ocorre em uma mistura com o α -humuleno, também conhecido por α -cariofileno, que se constitui de um isômero de anel aberto do β -cariofileno. Tais compostos podem ser observados no óleo essencial da *L. lundiana* (SIMÕES et al., 2010).

Tabela 7. Composição química do óleo essencial de *L. lundiana*.

	Composto	IRc	IRL	(%)
1	1 <i>R</i> - α -Pineno	927	937 ^c	0,89
2	α -Tujeno	928	931 ^a	0,11
3	Canfeno	941	953 ^a	0,35
4	β -Pineno	970	980 ^a	0,45
5	Sabineno	976	976 ^a	4,65
6	Limoneno	1022	1031 ^a	3,85
7	Eucaliptol	1030	1033 ^a	0,85
8	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	0,26
9	β - <i>trans</i> -Ocimeno	1050	1050 ^a	2,25
10	Isoterpinoleno	1064	1086 ^a	0,05
11	Terpinen-4-ol	1170	1177 ^a	0,11
12	Elixeno	1332	1430 ^d	0,85
13	α -Copaeno	1370	1376 ^a	2,20
14	α -Bourboneno	1374	1374 ^a	0,24
15	β -Bourboneno	1385	1384 ^a	0,13
16	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	45,62
17	Germacreno D	1437	1480 ^a	25,43
18	Aloaromadendreno	1453	1461 ^a	1,06
19	α -Humuleno	1454	1454 ^a	5,77
20	(+)-Epi-biciclosesquifelandreno	1482	1482 ^a	0,23
21	<i>Z,E</i> - α -Farneseno	1486	1483 ^b	0,17
22	α -Muroleno	1499	1499 ^a	0,45
23	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	1,28
24	Óxido de Cariofileno	1581	1581 ^a	1,66
25	β -Eudesmol	1644	1649 ^a	0,26
26	α -Cadinol	1652	1653 ^a	0,60

27	10,10-Dimetil-2,6-dimetilenobicyclo[7.2.0]undecan-5-ol	-	1677	0,22
----	--	---	------	------

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- DAVIES, 1990; c- DICKENS, 1999; d- NIST, 2002; % = porcentagem do componente.

4.2.7. Caracterização química do óleo essencial de *Peperomia alata*

Para a análise do óleo de *P. alata*, foi revelada a presença de 21 compostos, contabilizando 33,33% de monoterpenos e 61,9% de sesquiterpenos. Esses resultados são semelhantes com aqueles obtidos anteriormente por Silva et al. (2014), que concluíram em seu trabalho que as composições voláteis das espécies de *Peperomia* estudadas apresentaram sesquiterpenos como a maior fração. A espécie *P. aleyreanum*, *P. anonifolium* e *P. hispidum* obtiveram uma porcentagem de 56,7%, 38,6% e 52,2%, respectivamente, de hidrocarbonetos sesquiterpênicos em seu óleo essencial. Os principais compostos encontrados no OE de *P. alata*, estudada no presente trabalho, foram α -gurjuneno (**49**) (47,63%), eugenol metil éter (**50**) (24,65%), ilustrados na figura 20, e Limoneno (**19**) (7,35%).

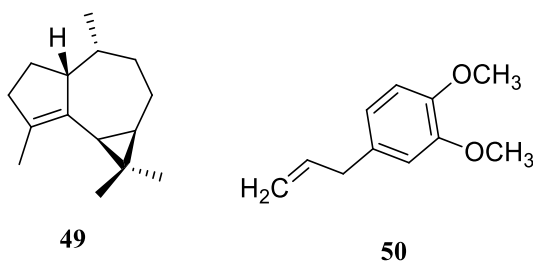


Figura 20. Estruturas químicas do α -gurjuneno e eugenol metil éter.

A composição química dos constituintes identificados no OE de *P. alata*, com suas quantidades relativas e índices de Kovat's são mostrados na tabela 8.

Tabela 8. Composição química do óleo essencial de *P. alata*.

Composto	IRc	IRL	(%)
1 Sabineno	976	976 ^a	0,17
2 Limoneno	1022	1031 ^a	7,35
3 Eucaliptol	1030	1033 ^a	0,22

4	β - <i>trans</i> -Ocimeno	1050	1050 ^a	0,23
5	Isoterpinoleno	1064	1086 ^a	0,68
6	α -Terpineol	1184	1189 ^a	1,27
7	4,7-Dimetilundecano	1205	-	0,56
8	Elixeno	1332	1430 ^b	6,41
9	δ -Elemeno	1333	1339 ^a	0,63
10	8-Isopropenil-1,5-dimetil-1,5-ciclodecadieno	1388	1386 ^d	0,56
11	Eugenol metil éter	1397	1401 ^a	24,65
12	(-)-Aristoleno	1439	1424 ^c	1,00
13	α -Gurjuneno	1409	1409 ^a	47,63
14	α -Guaieno	1433	1439 ^a	0,47
15	α -Panasinseno	1526	1530 ^a	0,24
16	Hediacariol	1528	1528 ^b	0,40
17	Espatuleno	1570	1576 ^a	0,99
18	Germacreno D-4-ol	1584	1574 ^a	1,82
19	δ -Cadinol	1622	1636 ^a	1,11
20	Brevifolina	1628	1625 ^a	2,03
21	α -Cadinol	1652	1653 ^a	1,57

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- NIST, 2002; c- VERMA, PADALIA, e CHAUHAN, 2014; d- ZHAO et al., 2014; % = porcentagem do componente.

4.2.8. Caracterização química do óleo essencial de *Piper aduncum*

Como pode ser observado na tabela 9, se trata de uma amostra complexa, onde detectou-se 36 substâncias no óleo essencial da *P. aduncum*. Entre elas, destacou-se o monoterpeno oxigenado linalol (**13**), que sozinho compõem mais da metade da amostra com 56,60% na composição total, seguido do sesquiterpeno oxigenado \pm -*trans*-nerolidol (**46**) com 12,41% e com 4,91% o germacreno D (**25**), classificado como hidrocarboneto monoterpênico. O linalol é um monoterpeno alcoólico terciário de cadeia aberta. Pode ser encontrado normalmente sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira ligação dupla. Possui um átomo de carbono assimétrico e, por isso, podem existir enantiômeros, apresentando-se dessa forma em várias espécies (GOTTLIEB et al., 1965). Tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, e testado como fungicida (EDRIS e FARRAG, 2003).

Essa planta tem capacidade de produzir uma grande variedade de compostos que contam com monoterpenos oxigenados e também sesquiterpenos oxigenados, entre outros.

Tabela 9. Composição química do óleo essencial de *P. aduncum*.

	Composto	IR _C	IR _L	(%)
1	Santolina trieno	901	908 ^a	0,23
2	1 <i>R</i> - α -Pinoeno	927	937 ^d	0,55
3	Canfeno	941	953 ^a	0,62
4	β -Pinoeno	970	980 ^a	1,07
5	Mirceno	990	991 ^a	0,20
6	Limoneno	1022	1031 ^a	0,35
7	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	3,35
8	β - <i>trans</i> -Ocimeno	1050	1050 ^a	0,66
9	1,5-Heptadieno-4-ol, 3,3,6-trimetil	1068	-	0,45
10	<i>p</i> -Menta-3,8-dieno	1072	1072 ^a	0,12
11	Linalol	1098	1098 ^a	56,60
12	Hotrienol	1101	1101 ^b	0,06
13	(E)-5-Eteniltetrahidro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-2-furanmetanol	1102	-	1,13
14	Mircenol	1118	1118 ^a	0,11
15	Isotujol	1133	1133 ^a	0,59
16	α -Terpineol	1184	1189 ^a	0,49
17	2-Decanona	1192	1192 ^a	0,45
18	Elixeno	1332	1430 ^f	0,49
19	β -Elemeno	1386	1391 ^a	1,02
20	8-Isopropenil-1,5-dimetil-1,5-ciclodecadieno	1388	1386 ^g	0,57
21	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	3,03
22	Germacreno D	1437	1480 ^a	4,91
23	<i>E,Z</i> - α -Farneseno	1475	1477 ^e	0,31
24	γ -Elemeno	1476	1476 ^a	0,87
25	<i>Z,E</i> - α -Farneseno	1486	1483 ^c	0,13
26	α -Muroleno	1499	1499 ^a	0,20
27	α -Farneseno	1508	1508 ^a	1,16
28	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	0,96
29	\pm - <i>trans</i> -Nerolidol	1562	1564 ^a	12,41
30	Veridiflorol	1594	1590 ^a	2,48
31	2-(4a,8-Dimetil-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-2-naftalenil)-2-propanol	1598	-	0,33

32	δ -Cadinol	1622	1636 ^a	0,42
33	α -Bisabolol	1625	1683 ^a	0,91
34	Cubenol	1642	1642 ^a	0,41
35	α -Cadinol	1652	1653 ^a	1,71
36	3,7-Ciclundecadien-1-ol, 1,5,5,8-tetrametil	1719		0,63

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- BOULANGER, CHASSAGNE e CROUZET, 1999; c- DAVIES, 1990; d- DICKENS, 1999; e- DUQUESNOY, CASTOLA e CASANOVA, 2007; f- NIST, 2002; g- ZHAO et al., 2014; % = porcentagem do componente.

4.2.9. Caracterização química do óleo essencial de *Piper miquelianum* C. DC.

O óleo essencial de *P. miquelianum* foi caracterizado pela presença de monoterpenos e sesquiterpenos, em quantidades de 43,75% e 50,0%, respectivamente. Detectou-se 16 componentes, dentre eles, os constituintes mais significativos foram surpreendentemente o 1,3-benzodioxole, 5-(2,2-dimetiletil) (**51**) com 72,34%, seguido do monoterpeno terpinoleno (**52**) com 9,76% e o sesquiterpeno α -cubebeno (**53**) com 5,89%, que se apresentam na figura 21.

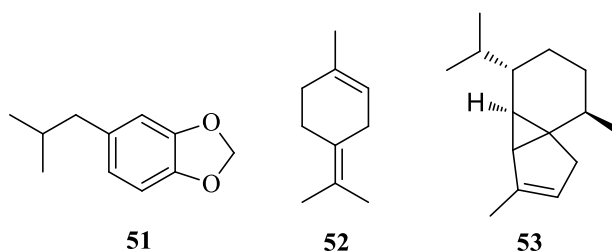


Figura 21. Estruturas químicas dos terpenos 1,3-benzodioxole, 5-(2,2-dimetiletil), terpinoleno e α -cubebeno.

Os compostos identificados com suas porcentagens relativas estão dispostos na tabela 10. Existe uma significativa semelhança entre os resultados obtidos na presente pesquisa e os anteriormente encontrados por Moreira et al., (1997), que constatou um composto heterocíclico derivado de benzeno, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, como componente principal em uma espécie de Piperaceae.

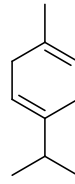
Tabela 10. Composição química do óleo essencial de *P. miquelianum*.

Composto	IRc	IRL	(%)
1 1 <i>R</i> - α -Pinoeno	927	937 ^b	0,96
2 Mirceno	990	991 ^a	0,70
3 α -Felandreno	999	1005 ^a	0,57
4 3-Careno	1004	1011 ^a	1,23
5 Limoneno	1022	1031 ^a	0,49
6 γ -Terpineno	1052	1062 ^a	0,08
7 Terpinoleno	1081	1088 ^a	9,76
8 Elixeno	1332	1430 ^c	2,71
9 α -Cubebeno	1345	1351 ^a	5,89
10 1,3-Benzodioxol, 5-(2,2-dimetiletil)	1372	-	72,34
11 β -Cariofileno	1411	1418 ^a	0,90
12 Germacreno D	1437	1480 ^a	0,31
13 α -Humuleno	1454	1454 ^a	3,46
14 α -Zingibereno	1460	1460 ^a	0,03
15 δ -Cadineno	1519	1524 ^a	0,41
16 Naftaleno, 1,2,3,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)	1529	1537 ^d	0,16

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- DICKENS, 1999; c- NIST, 2002; d- ZHAO et al., 2007; % = porcentagem do componente.

4.2.10. Caracterização química do óleo essencial de *Protium* sp.

Analisando-se a amostra de óleo essencial de *Protium* sp., constatou-se a presença de 48 constituintes, dentre eles, os compostos majoritários foram β -Cariofileno (**24**) (27,38%), Terpinoleno (**52**) (16,81%) e na figura 22, está exposta a estrutura química do α -Terpineno (**54**) (9,44%). Na composição química deste óleo essencial pode-se estimar uma porcentagem de aproximadamente 43,13% de monoterpenos, entre eles, oxigenados e aromáticos, além de quase 60% de compostos sesquiterpênicos, dos quais, os oxigenados encontram-se em menores proporções e os hidrocarbonetos em maiores.



54

Figura 22. Estrutura química do terpeno α -Terpineno.

A tabela 11 mostra o resultado da análise por CG-EM, listados em ordem dos seus índices de retenção.

Tabela 11. Composição química do óleo essencial das folhas de *Protium* sp.

	Composto	IR _c	IR _L	(%)
1	β -Tujeno	921	971 ^a	0,22
2	1 <i>R</i> - α -Pineno	927	937 ^d	1,85
3	Fencheno	939	951 ^a	0,10
4	1 <i>S</i> - α -Pineno	947	941 ^c	0,02
5	β -Pineno	969	980 ^a	1,50
6	Sabineno	976	976 ^a	0,19
7	α -Felandreno	999	1005 ^a	1,06
8	α -Terpineno	1011	1018 ^a	9,44
9	1,4-Cineol	1016	1016 ^a	0,04
10	<i>p</i> -Cimeno	1018	1026 ^a	0,03
11	<i>o</i> -Cimeno	1020	1022 ^a	0,52
12	Limoneno	1022	1031 ^a	5,39
13	Eucaliptol	1030	1033 ^a	0,04
14	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1039	1040 ^a	0,18
15	γ -Terpineno	1052	1062 ^a	3,00
16	Isoterpinoleno	1064	1086 ^a	0,07
17	Terpinoleno	1081	1088 ^a	16,81
18	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1153	1166 ^a	0,04
19	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1179	1183 ^a	0,46
20	Butirato de <i>cis</i> -3-Hexenil	1184	1166 ^f	0,08
21	Metil salicilate	1188	1190 ^a	0,13
22	Fenol, 2-etil-6-metil	1197	-	0,18
23	5-Isopropenil-2-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol		1352 ^g	
		1278		0,18
24	Elixeno	1332	1430 ^e	6,96
25	α -Cubebeno	1345	1351 ^a	0,96

26	α -Copaeno	1370	1376 ^a	0,15
27	β -Elemeno	1386	1391 ^a	0,86
28	α -Longipineno	1389	1351 ^a	0,22
29	β -Cubebeno	1390	1390 ^a	1,12
30	α -Gurjuneno	1409	1409 ^a	0,96
31	β -Cariofileno	1411	1418 ^a	27,38
32	α -Cariofileno	1444	1454 ^a	4,56
33	Aromadendreno	1453	1439 ^a	0,47
34	β -Chamigreno	1455	1475 ^a	0,26
35	Acoradieno	1461	1463 ^a	0,70
36	Di-epi- α -cedreno	1468	1391 ^a	2,43
37	(+)-Epi-biciclosesquifelandreno	1482	1482 ^a	0,50
38	δ -Selineno	1495	1495 ^b	0,08
39	β -Bisaboleno	1506	1509 ^a	0,12
40	Calameneno	1518	1519 ^a	1,28
41	δ -Cadineno	1519	1524 ^a	0,27
42	β -Sesquifelandreno	1520	1524 ^a	0,63
43	Naftaleno, 1,2,3,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)	1529	1537 ^h	1,43
44	\pm - <i>trans</i> -Nerolidol	1562	1564 ^a	0,23
45	Espatuleno	1570	1576 ^a	4,56
46	Óxido de cariofileno	1581	1581 ^a	1,16
47	Ledol	1583	1565 ^a	0,90
48	Veridiflorol	1594	1590 ^a	0,15

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-)- ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- ALBUQUERQUE et al., 2004; c- CHAFTAR, GIRARDOT e QUELLARD, 2015; d- DICKENS, 1999; e- NIST, 2002; f- OSORIO et al., 2006; g- YE, LI, e WEI, 2013; h- ZHAO et al., 2007; % = porcentagem do componente.

4.2.11. Caracterização química do óleo essencial de *Siparuna brasiliensis*

O resultado da análise cromatográfica referente ao óleo essencial derivado dos frutos de *S. brasiliensis*, revelou uma acentuada quantidade de estruturas sesquiterpênicas (77,27%), incluindo, hidrocarbonetos e oxigenados. A composição química conta com 22 constituintes, sendo o espatuleno (**26**) com a maior porcentagem, igual a 18,73%. E na figura 23, estão ilustrados dois dos componentes majoritários deste OE, que são α -selineno (**55**) (12,62%) e δ -cadinol (**56**) (10,20%).

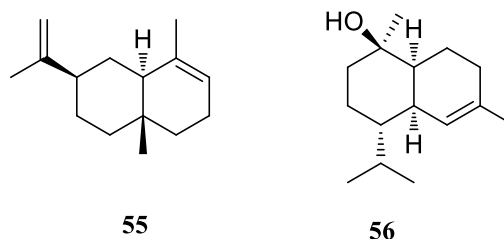


Figura 23. Estruturas químicas dos terpenos α -selineno e δ -cadinol.

Em um estudo anterior feito por Akisue (1977), constatou-se a presença de carvona, limoneno, cineol, cariofileno, citral, humuleno, nerol, cedrol, mirceno e bisabolol nos óleos essenciais de espécies do gênero *Siparuna*, incluindo *S. brasiliensis*. Os constituintes identificados com suas quantidades relativas estão resumidos na tabela 12.

Tabela 12. Composição química do óleo essencial de *S. brasiliensis*.

Composto	IR _C	IR _L	(%)
1 Limoneno	1022	1031 ^a	0,38
2 2,4-Diisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexane	1053	-	8,18
3 Isoterpinoleno	1064	1086 ^a	1,58
4 β -Citral	1237	1240 ^a	2,97
5 α -Citral	1269	1270 ^a	6,72
6 <i>trans</i> - α -Bergamoteno	1430	1436 ^a	3,86
7 α -Cubebeno	1345	1351 ^a	4,89
8 α -Copaeno	1370	1376 ^a	4,89
9 Germacreno D	1437	1480 ^a	2,62
10 γ -Muroleno	1471	1477 ^a	5,23
11 γ -Elemeno	1476	1476 ^a	3,89
12 <i>1R,4R</i> -p-Menta-2,8-dieno, 1-hidroperoxido	1381	1329 ^b	1,68
13 α -Selineno	1489	1494 ^a	12,62
14 α -Amorfeno	1496	1485 ^a	0,71
15 α -Muroleno	1499	1499 ^a	1,41
16 Calameneno	1518	1519 ^a	1,15
17 Patchoulano	1530	1532 ^a	3,08
18 α -Calacoreno	1537	1542 ^a	0,85
19 Espatuleno	1570	1576 ^a	18,73
20 δ -Cadinol	1622	1636 ^a	10,20
21 α -Cadinol	1652	1653 ^a	3,29

22	7-Acetil-2-hidroxi-2-metil-5-isopropil [4.3.0] nonano	biciclo	1734 ^c	1685	0,44
----	--	---------	-------------------	------	------

*IRc = Índice de retenção calculado; IRL = Índice de retenção encontrado na literatura; (-) - ainda não descritos na literatura; a- ADAMS, 2007; b- COLLIN, 2015; c- KIM e CHUNG, 2011; % = porcentagem do componente.

A tabela 13, traz resumidamente os cinco componentes majoritários de cada OE, e percebe-se, que as espécies estudadas demonstraram preferência pelas rotas metabólicas do ácido mevalônico (MEV) e do metileritritol fosfato (MEP) em detrimento daquela do ácido chiquímico, pelo qual são biossintetizados os fenilpropanoides. Apenas a espécie *P. alata* apresentou em sua composição química um fenilpropanoide, o eugenol metil éter.

Tabela 13. Componentes majoritários por amostra de óleo essencial.

ÓLEO ESSENCIAL	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS				
	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4	Composto 5
<i>B. platypoda</i>	1R- α -Pinoeno	β -Tujeno	β -Pinoeno	Limoneno	Terpinen-4-ol
<i>B. trinervis</i> .	α -Felandreno	β -Himachaleno	Germacreno D	Isolongifolan-8-ol	α -Cimeno
<i>C. macrobracteolata</i> (Folha)	Linalol	β -Pinoeno	1R- α -Pinoeno	Limoneno	β -Cariofileno
<i>C. macrobracteolata</i> (Fruto)	\pm -trans-Nerolidol	α -Copaeno	α -Citral	Limoneno	δ -Cadineno
<i>L. lundiana</i>	β -Cariofilen	Germacreno D	α -Humuleno	Sabineno	Limoneno
<i>P. alata</i>	α -Gurjuneno	Eugenol metil éter	Limoneno	Elixeno	Brevifolin
<i>P. miquelianum</i>	1,3-Benzodioxole, 5-(2,2-dimetiletil)	Terpinoleno	α -Cubebeno	α -Humuleno	Elixeno
<i>P. aduncum</i>	Linalol	\pm -trans-nerolidol	Germacreno D	(Z)-Ocimeno	β -Cariofileno
<i>Protium</i> sp.	β -Cariofileno	Terpinoleno	α -Terpineno	Elixeno	Limoneno
<i>S. brasiliensis</i>	Espatuleno	α -Selineno	δ -Cadinol	2,4-Diisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexano	α -Citral

Ainda, pode-se constatar de acordo com os dados da tabela 13, que os óleos essenciais de diferentes órgãos de uma mesma espécie apresentaram rendimentos e composições químicas distintas, corroborando com os resultados obtidos por Haghighi e colaboradores (2017). Além disso, plantas de uma mesma família ou até de um mesmo gênero não mostraram semelhanças significativas em sua composição química, na maioria dos casos, afirmando as conclusões de Imatomi et al., (2013) de que a produção de metabólitos secundários não segue padrões por gênero ou família.

4.3 Atividade antifúngica

A participação percentual dos componentes reflete bem nas características biológicas de cada óleo. Na maioria dos óleos testados neste estudo, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e monoterpênicos estão representando o dobro em proporções quando comparados aos sesquiterpenos e monoterpênicos oxigenados, enquanto fenilpropanóides, hidrocarbonetos, ésteres e outros grupos de compostos estão sub-representados (Figura 24). Sendo assim, pode-se dizer que a capacidade de inibição dos óleos essenciais está diretamente associada a presença dos sesquiterpenos e monoterpênicos. Segundo Bakkali, et al., (2008), os sesquiterpenos possuem função protetora contra fungos, bactérias, insetos e outras pragas, explicando assim, a inibição dos óleos essenciais que possuem esses compostos em maiores quantidades.

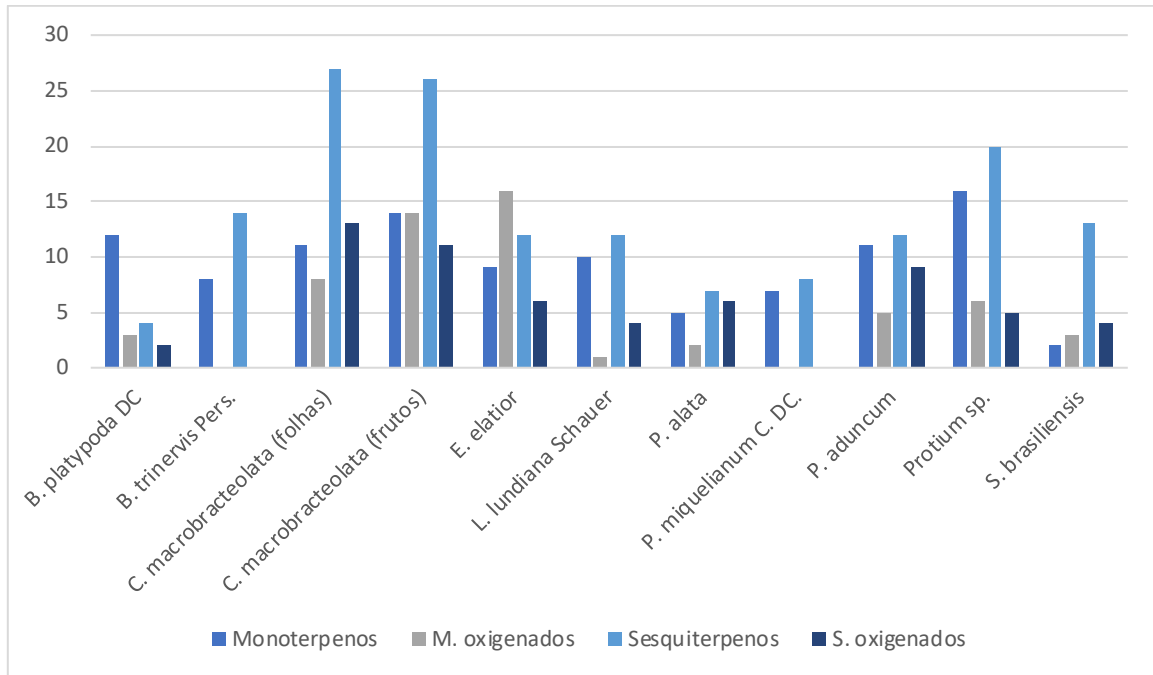


Figura 24. Proporção de terpenos por amostra de óleo essencial.

As amostras dos óleos que tiveram rendimento suficiente foram testadas contra micro-organismos através do método da microdiluição em placa, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e em seguida, a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Algumas espécies não foram testadas frente aos fungos devido ao fato de não disporem de quantidades adequadas para caracterização química e todos os ensaios biológicos a serem realizados.

Os resultados da tabela 14 mostram a atividade fungicida que os óleos essenciais exibiram frente aos micro-organismos, *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Tabela 14. Atividade antifúngica expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleos essenciais sobre isolados de fungos fitopatogênicos.

ÓLEOS ESSENCIAIS	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> (E053)		<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (E748)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>B. platypota</i>	800	>800	400	>1600
<i>B. trinervis</i>	>900	-	400	>1600
<i>C. macrobacteolata</i> (folhas)	800	>800	800	800
<i>C. macrobacteolata</i> (frutos)	800	>800	400	800
<i>E. elatior</i>	-	-	200	200
<i>L. lundiana</i>	800	>800	800	800
<i>P. aducum</i>	>900	-	400	>1600
<i>P. alata</i>	800	>800	100	400
<i>P. miquelianum</i>	800	>800	400	>1600
<i>Protium</i> sp.	>800	-	100	200
<i>S. brasilienses</i>	800	>800	400	-

CIM – Concentração Inibitória Mínima, CFM – Concentração Fungicida Mínima, (-) – Não foram testados.

A partir dos resultados contra o fungo *T. paradoxa*, verificou-se que os óleos essenciais tiveram bom desempenho em inibir o crescimento fúngico. Destacando-se entre eles, o OE de *Protium* sp., *P. alata* e *E. elatior*, que além de apresentarem baixa concentração de inibição do crescimento do patógeno, também foram classificados como fungicidas, eliminando totalmente o fungo utilizando concentrações entre 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em resumo, os OEs de *P. miquelianum*, *B. platypota*, *B. trinervis* e *P. aducum* tiveram eficácia, inibindo totalmente o crescimento fúngico com concentração igual a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, revelaram altas concentrações como fungicidas, ou seja, acima de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, os OEs dos frutos e folhas de *C. macrobacteolata* e *L. lundiana* apresentaram concentrações de inibição entre 400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e foram classificadas como substâncias fungicidas utilizando concentração equivalente a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Com base nisto, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Baraka e colaboradores (2011), que testaram os óleos essenciais de três espécies vegetais frente ao *T. paradoxa*, obtendo-se a concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, considerada a mais

efetiva, capaz de reduzir de 60,58% do crescimento fúngico, seguida de 100 µg mL⁻¹, com inibição de 44,01%. Estas concentrações se mostram relativamente altas, em comparação as que foram testadas no presente estudo que obteve concentrações de 100 µg mL⁻¹, capazes de inibir 100% do crescimento fúngico, como é o caso do óleo essencial de *Protium* sp.

Os resultados do presente estudo se tornam ainda mais interessantes, quando comparados por exemplo, com os encontrados por Cruz et al., (2018), que avaliaram a atividade do OE de *Lippia gracilis* contra *T. paradoxa*, obtendo-se CIM de 890 µg mL⁻¹, exaltando o potencial antifúngico dos óleos das espécies *E. elatior* e *Protium* sp. e *P. alata*.

Pode-se dizer que a atividade biológica dos terpenos é determinada com relação à estrutura química, grupos funcionais e estereoquímica dos compostos identificados na amostra (HENRIQUES et al., 2006). Uma vez que, a maior fração de monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados estejam presentes nas amostras de *E. elatiore Protium* sp, *S. brasiliensis*, *C. macrobracteolata* (frutos) e *C. macrobracteolata* (folhas). Os resultados indicam que esses fatores tenham possibilitado uma inibição maior, de forma que atividade antimicrobiana da maioria dos terpenoides está ligada a seus grupos funcionais (HYLDGAARD et al., 2012). Para comprovar tal fato, estudos realizados por Xie et al., (2014) e Zhang et al., (2016), nos quais avaliaram a atividade antifúngica de monoterpenos e seus análogos oxigenados isoladamente, mostraram em seus resultados uma maior inibição quando utilizou-se os monoterpenos oxigenados. A toxicidade relativamente baixa dos hidrocarbonetos monoterpênicos é atribuída a sua maior taxa de volatilidade em comparação aos monoterpenos oxigenados.

Como já mencionado neste trabalho, devido a lipofilicidade dos compostos presentes nos óleos essenciais, eles estão mais propensos a se deslocar através da membrana plasmática, causando partição nos lipídios da membrana dos fungos, aumentando a permeabilidade da membrana celular, resultando no vazamento do conteúdo da célula. Ainda, os OEs são capazes de afetar a biossíntese do esterol fúngico, reduzindo significativamente a quantidade de ergosterol (PINTO et al., 2009).

O presente trabalho avaliou também a atividade do OE de algumas espécies frente ao fungo fitopatogênico da pimenta do reino *F. solani* f.sp. *piperis*. Por ser tratar de um fungo de maior resistência, conseqüentemente as concentrações de inibição, bem como seu potencial fungicida apresentaram concentrações mais elevadas.

Dentre os OEs, os OEs de *Protium* sp., *P. aduncum* e *B. trinervis* exibiram concentrações acima de 800 µg mL⁻¹. Em contrapartida, os voláteis de *S. brasiliensis*, *C. macrobracteolata* (frutos), *C. macrobracteolata* (folhas), *P. miquelianum*, *P. alata*, *B. platypoda* e *L. lundiana* foram mais eficazes na inibição do crescimento fúngico, atingindo inibição de 100% utilizando a concentração de 800 µg mL⁻¹.

Essa atividade, está diretamente relacionada à sua composição química, devendo-se ao fato destas espécies conterem maiores quantidades de terpenos oxigenados e sesquiterpenos em seus óleos essenciais (ZHANG et al., 2016).

Segundo dados reportados por Derno et al. (2005), os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana relatada nas espécies de *Baccharis* são os terpenoides, os principais constituintes de seus óleos essenciais. Somente em espécies de *Baccharis*, na Argentina foram identificados mais de 100 constituintes em estudos sobre composição química.

A espécie *P. alata*, foi uma das únicas que em seu óleo continha fenilpropanoide, o eugenol metil éter, que é um éter metilado do eugenol. Segundo Simões e colaboradores (2010), assim como os terpenoides, esta classe de compostos, exerce uma função importante nos vegetais, ou seja, os fenilpropanoides desempenham um papel de defesa contra insetos herbívoros e também contra fungos. Explicando então, que o poder de inibição deste óleo essencial, não se deve apenas ao seu composto majoritário e sim ao efeito sinérgico de todos os seus constituintes.

Embora o eugenol metil éter possa apresentar atividade contra crescimento de vários micro-organismos, a literatura dispõe de poucos trabalhos relacionado as suas propriedades inibitórias contra fitopatógenos (MEEPAGALA, STURTZ e WEDGE, 2002). Sua atividade frente ao *F. solani* f.sp. *piperis* foi estudada, no entanto, não apresentou nenhuma atividade contra isolado deste patógeno (DAN et al, 2010).

Os demais OEs, exibiram concentrações acima de 800 µg mL⁻¹.

Os resultados frente a esse fitopatógeno reportados por Meireles (2014), permitem dizer que o óleo volátil de *P. aduncum* não demonstrou inibição contra *F. solani* f. sp. *piperis* em nenhuma das concentrações testadas, que foram superiores a 900 µg mL⁻¹. Em contraste, o óleo volátil de *Piper divaricatum* e seus compostos majoritários apresentaram valores CIM de 750 µg mL⁻¹.

Embora o óleo de *P. aduncum* não tenha demonstrado atividade contra *F. solani* f. sp. *piperis*, estudos anteriores com subprodutos da destilação do óleo essencial, incorporados ao solo infestado com o fitopatógeno mostraram uma redução

na mortalidade e prolongamento da sobrevivência de mudas de pimenta do reino (BENCHIMOL, SUTTON, e BASTOS, 2017).

Cakir et al., (2005), avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial que apresentava como componentes majoritários o δ -cadineno (6.9%), (Z)- β -farneseno (5.2%), γ -muroleno (5.5%), espatulenol (4.8%), hexahidrofarnesil acetone (4.5%) e α -selineno (4.0%). Contudo, testando a concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não obtiveram nenhuma porcentagem de inibição. Em um estudo anterior, Cakir et al., (2004), descreveram a atividade antifúngica de compostos isolados de óleos voláteis, como por exemplo, o α -Pineno, β -Pineno, α -felandreno, Mirceno, Limoneno, α -Terpineol, Isocariofileno, β -Cariofileno, α -Longipineno, *p*-Cimeno, *n*-Decane e *n*-Undecane. Dentre os compostos citados, utilizando-se a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o óxido de β -cariofileno foi o que exibiu um efeito de inibição pronunciado (72%) sobre o crescimento de fungos patogênicos da espécie *Fusarium*. Em especial, para o *Fusarium solani*, a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi responsável por inibir o crescimento de apenas 33% do micélio fúngico.

Também pode-se mencionar Bomfim et al., (2015), que descreveram sobre o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., e foi observado que a uma concentração de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, houve 72% de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Já Daferera e colaboradores (2003), constataram uma inibição de 72% do crescimento de *Fusarium* sp. utilizando uma concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, os resultados deste trabalho mostram 100% de inibição usando uma concentração de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, uma concentração próxima das que foram obtidas pelos demais pesquisadores, porém com maior potencial de inibição.

Como pode-se observar, as diferentes atividades antifúngicas das espécies testadas são atribuídas à presença de componentes ativos que estão presentes em cada óleo essencial.

4.4 Citotoxicidade

Os resultados de viabilidade celular foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. A porcentagem de viabilidade celular das amostras foi comparada com o controle, não tratado com óleo essencial, o qual foi definido como 100% de viabilidade celular. Os dados de cada ensaio foram analisados estatisticamente e as

diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Os resultados estão representados na figura 25.

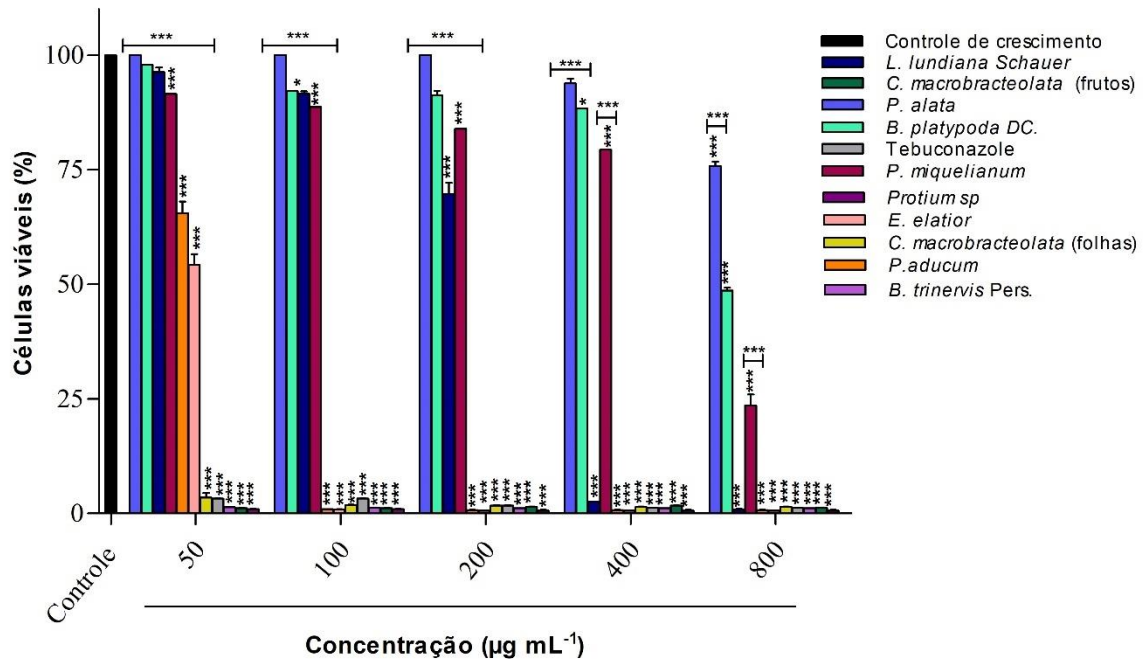


Figura 25. Atividade citotóxica de óleos essenciais sobre linhagem de macrófagos murinos (RAW 267.4 ATCC TIB-71) após 24 horas de exposição. Nível de significância ($*p < 0,05$) de acordo com o post hoc de Bonferroni.

O método colorimétrico de redução do MTT é uma das técnicas mais rápidas e precisas para avaliação da citotoxicidade de um composto. Na literatura pode-se encontrar relatos da toxicidade de substâncias provenientes de produtos naturais. O uso inadequado dos óleos essenciais pode acarretar riscos à saúde humana devido a eventos mutacionais, efeitos carcinogênicos e danos genéticos. Um exemplo são os efeitos tóxicos ocasionados pelo uso citral e geraniol quando administrados em concentrações mais altas, exibem citotoxicidade significativa, revelando redução na viabilidade celular (SINHA et al., 2014).

Pelo fato de os óleos essenciais serem produtos naturais, não se exclui a possibilidade de apresentarem toxicidade. Diante desses e outros relatos encontrados na literatura, estudos que visem à determinação dos aspectos toxicológicos de produtos de origem vegetal são de fundamental importância, para que, além da comprovação da sua eficácia, possam ser também, comprovadamente seguros. O

produto, para ser viável no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte das células, nem afetar suas funções celulares.

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se tornado cada vez mais constante em trabalhos para a determinação da toxicidade de óleos essenciais. Gonçalves (2015), avaliou a viabilidade celular através do bioensaio do MTT dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. Tu e colaboradores (2018), realizaram pesquisas com os óleos essenciais de *Pimpinella anisum*, *Mentha haplocalyx*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Zanthoxylum bungeanum*, *Cymbopogon nardus*, e *Cinnamomum camphora*. Ao concluir o estudo, os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) mostraram toxicidade de 100% a uma concentração de 7,69 $\mu\text{L L}^{-1}$, enquanto os outros OEs mostraram toxicidade moderada ou fraca na mesma concentração.

A tabela 15 mostra o resultado da análise de citotoxicidade obtidos no presente estudo, e é possível notar que os óleos essenciais se mostraram menos citotóxicos para células basais do que o padrão, tebuconazol, utilizado na prática agrícola contra fungos filamentosos.

Tabela 15. Índice citotóxico (IC) expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$, sobre linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) obtido pela técnica do MTT-tetrazólio das substâncias de uso agrícola e dos óleos essenciais com atividade antifúngica sobre a espécie de *F. solani* f. sp. *piperis* e *Thielaviopsis paradoxa*.

AMOSTRAS	LINHAGEM
	RAW 264.7 (IC ₅₀)
SUBSTÂNCIAS DE USO AGRÍCOLA	
Carbendazim	25.98 ± 0.07
Tebuconazol	23.83 ± 0.72
ÓLEOS VOLÁTEIS	
<i>B. platypoda</i>	824,4 ± 0,66
<i>B. trinervis</i>	33,12 ± 0,70
<i>C. macrobacteolata</i> (folhas)	110,0 ± 2,2
<i>C. macrobacteolata</i> (frutos)	61,45 ± 2,0
<i>E. elatior</i>	53,31 ± 0,74
<i>L. lundiana</i>	213,2 ± 1,6

<i>P. aducum</i>	64,61 ± 0,39
<i>P. alata</i>	869,9 ± 1,1
<i>P. miquelianum</i>	463,3 ± 0,6
<i>Protium</i> sp.	28,84 ± 1,7
<i>S. brasiliensis</i>	-

Valores expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos diferentes realizados em triplicata. (-) – não foi testado.

Os voláteis das espécies *P. alata* e *B. platypoda* mostraram-se promissores por não apresentarem citotoxicidade até a mais alta concentração testada, 800 µg mL⁻¹, concentração tida como inibitória para a espécie de *F. solani* f. sp. *piperis*. Já os óleos essenciais das espécies *C. macrobacteolata* (frutos), *P. aduncum*, *E. elatior* e *B. trinervis* e *Protium* sp. descritas em ordem crescente de toxidez, apresentaram citotoxicidade similar ao padrão, apresentando alta toxicidade nas concentrações das quais foram considerados inibidores.

Alguns óleos essenciais se apresentaram tóxicos, mesmo quando testados em baixas concentrações, como é o caso das substâncias citadas acima. Isso induz a aferir que nas concentrações onde essas substâncias poderiam ser consideradas fungicidas, é inviável seu uso devido ao fato da sua alta toxicidade. Um exemplo a ser mencionado, é o óleo da espécie *B. trinervis* que é considerado fungicida a concentrações superiores a 1600 µg mL⁻¹, para a espécie de *T. paradoxa*, porém, segundo o bioensaio de viabilidade celular, este óleo exibiu toxicidade quando testado à concentração de 33,12 µg mL⁻¹.

Para o uso frente ao fitopatógeno *T. paradoxa*, o óleo essencial de *P. alata* não apresentou citotoxicidade na concentração em que essa substância foi considerada fungicida. Utilizando-se a concentração de 400 µg mL⁻¹, o OE de *P. alata* foi considerado fungicida, levando em conta que este óleo exibe toxidez na concentração de 869,9 µg mL⁻¹. Já as espécies *B. platypoda* e *P. miquelianum*, apresentaram-se como potentes inibidores do crescimento fúngico, utilizando-se concentrações inferiores das quais são consideradas tóxicas.

Esta razão faz com que estes compostos possam ser utilizados como fungicidas promissores contra esse fitopatógeno, pois não apresentam riscos quando utilizadas como substâncias antifúngicas ou até mesmo inibitórias. Diferentemente, o restante dos óleos essenciais, como por exemplo, o da espécie *Protium* sp., tem

capacidade de exterminar o fungo em uma concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultado interessante, bem abaixo do encontrado na literatura, porém, este óleo apresenta uma maior citotoxicidade frente as células basais, com um índice citotóxico de $28,84 \pm 1,7$. Com base nestas atividades antifúngicas apresentadas, os dados obtidos acabariam por promover a utilização de alguns OEs como potenciais antifúngicos naturais, além dos benefícios de serem ambientalmente seguros, pois são biodegradáveis.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho propôs avaliar a atividade antifúngica frente a alguns micro-organismos, a citotoxicidade e composição química dos óleos essenciais das diferentes espécies vegetais coletadas na mata atlântica do Espírito Santo. Estabeleceu-se que a composição química, bem como o rendimento dos óleos essenciais dependem das espécies de plantas, e podem variar de acordo alguns fatores. Devido a isso, suas atividades biológicas podem igualmente variar.

As análises químicas revelaram uma predominância de sesquiterpenos e monoterpenos na maior parte das amostras estudadas, apesar de algumas amostras, como é o caso do óleo essencial dos frutos de *C. macrobracteolata*, possuir grandes quantidades de monoterpenos e sesquiterpenos com funções oxigenadas. O motivo da literatura não apresentar dados da caracterização química dos óleos essenciais de algumas espécies estudadas neste trabalho, faz deste estudo uma ferramenta valiosa para futuros trabalhos com essa abordagem.

Os ensaios biológicos demonstraram que todos os óleos essenciais tiveram concentrações inibitórias interessantes, quando comparados a trabalhos semelhantes. Contudo, o *T. paradoxa* exibiu maior sensibilidade aos óleos testados, principalmente, frente aos compostos de *Protium* sp., *E. elatior* e *P. alata*, exibindo concentrações muito baixas de inibição. Por se tratar de um fitopatógeno mais resistente, o *F. solani* f. sp. *piperis*, foi inibido em concentrações pouco maiores. Ainda assim, de acordo com achados na literatura, expressam resultados positivos. Com isso, pode-se dizer que a sensibilidade dos patógenos testados pode depender das características morfológicas e fisiológicas de cada fungo. Ainda, a inibição do crescimento de patógenos fúngicos pode ser devido a um componente importante de cada espécie, como também, de seus compostos majoritários, ou, o sinergismo de todos os compostos. Contudo, para confirmação deste dado, seria necessário estudos posteriores para teste dos constituintes majoritários de cada amostra de óleo essencial.

Em relação as atividades citotóxicas as espécies se comportaram como atóxicas, em concentrações interessantes, o que contribui para a segurança e qualidade destes óleos, tornando-se promissores para uso como fungicidas naturais.

Quando considerados tóxicos, ainda podem ser utilizados como potentes inibidores, sem prejuízos à saúde humana ou ao meio ambiente.

Além disso, este é o primeiro trabalho na literatura, que aborda a caracterização química e atividade antifúngica do óleo essencial de algumas espécies, como é o caso das folhas e frutos de *C. macrobracteolata*, contribuindo para ampliação do conhecimento científico sobre as plantas aromáticas da Mata Atlântica Brasileira.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4ª. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

AKISUE, G. Contribuição ao conhecimento do óleo essencial e dos alcalóides do gênero *Siparuna Aubl.* (*Siparuna apiosyce* (Martius) A.DC. *Siparuna cujabana* (Martius) A.DC. *Siparuna brasiliensis* (Sprengel) A.DC. In: An. Farm. Quim., **17(2)**, 107-108, 1977.

ALBUQUERQUE, F. C. Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino. Belém: Instituto Agrônômico do Norte, 1961, 45 p.

ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino, em área de ocorrência de Fusariose no Estado do Pará. Belém: *EMBRAPA-CPATU*, 40 p. 1991.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SILVEIRA, E. R.; UCHÔA, D. E. A.; LEMOS, T. L. G.; SOUZA, E. B.; SANTIAGO, G. M. P.; PESSOA, O. D. L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J. Agric. Food Chem.*, **52** (22), 6708- 6711, 2004.

AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. *Rev. Bras. Frutic.*, **33**, 392-398, 2011.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

ARDREY, R. E.; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley: Huddersfield, 2003.

AVANÇO, G. B.; FERREIRA, F. D.; BONFIM, N. S.; SANTOS, P. A. S. R.; PERALTA, R. M.; BRUGNARI, T.; MALLMANN, C. A.; FILHO, B. A. A.; MIKCHA, J. M. G.; JÚNIOR, M. M. Curcuma longa L. essential oil composition, antioxidante effect, and

effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production *Food Control*, **73**, 806-813, 2016.

BAHARUM, S. N.; BUNAWAN, H.; GHANI, M. ABD. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of *Polygonum minus* Huds. Using Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*, **15**, 7006-7015, 2010.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem. Toxicol*, **45**, 446-475, 2008.

BARAKA, M.A.; RADWAN, F. M.; SHABAN, W.I.; ARAFAT, K.H. Efficiency of some plant extracts, natural oils, biofungicides and fungicides against root rot disease of date palm. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.*, **6(2)**, 405-429, 2011.

BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential oils: Science, technology and applications. CRC Press: Taylor & Francis Group, New York, 2010.

BENCHIMOL, R.I.; SUTTON, J.C.; BASTOS, C.N. By-products of *Piper aduncum* in the control of fusariosis in black pepper plant. *Agrária*, **12**, 303-308, 2017.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, DEGT.; MENEZES, M. (Eds.). Ecologia manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE - Imprensa Universitária, 2009.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Data base creation and evaluation of precision and robustness. *J. Sep. Sci.*, **30**, 563-572, 2007.

BIZZO, H., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, **32**, 588-594, 2009.

BOMFIM, A. G. J., ALBUQUERQUE, G. M. R., BEZERRA, J. D. P., SILVA, D. C. V., SVEDESE, V. M., PAIVA, L. M., SOUZA-MOTTA, C. M. Fungos fitopatogênicos de *Opuntia fícus-indica* (L.) Mill. Cultivada em área de floresta tropical seca no Brasil. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* **10**, 27-33, 2013.

- BOMFIM, N. S.; NAKASSUGI, L. P.; OLIVEIRA, J. F. P. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*, **166**, 330-336, 2015.
- BONG, S.; RYONG, H. Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells. *J. Med. Plants Res.*, **4**, 891-896, 2010.
- BOUKAEW, S.; PRASERTSAN, P.; SATTAYASAMITSATHIT, S. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Ind. Crops Prod.*, **97**, 558–566, 2017.
- BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D. E.; CROUZET, J. Componentes de sabor livre e ligado de frutas da Amazônia. 1: Bacuri. *Sabor Fragr. J.* **14**, 303-311. 1999.
- BRAVO, J., CARBONELL, V., SEPÚLVEDA, B., DELPORTE, C., VALSOVINOS, C. E., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M. Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **149**, 141-147, 2017.
- BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.
- CABRAL, C.; POÇAS, J.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M.T.; SALGUEIRO, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Ind. Crops Prod.*, **65**, 56-61, 2007.
- CAKIR, A.; KORDALI, S.; KILIC, H.; KAYA, E. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**, 245–256, 2005.
- CAKIR, A.; KORDALI, S.; ZENGIN, H.; IZUMI, S.; HIRATA, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour Fragr. J.* **19**, 62–68, 2004.

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; ARANCIA, G.; MOLINARI, G.; SALVATORE, G.; MONDELLO, F. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 349-360, 2004.

CALIGIORNE, R.B., RESENDE, M.A., OLIVEIRA, R.C.B.W., CORDEIRO, R.A., AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Rev. Biotec. Ciên. e Desenvolvimento*, **11**. 22-25, 2010.

CANNON, J. B. et al. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Ind. Crop. Prod.*, **41**, 214-220, 2013.

CHAFTAR, N.; GIRARDOT, M.; QUELLARD, N. Activity of six essential oils extracted from Tunisian plants against *Legionella pneumophila*. *Chem. Biodiversity*, **12**, 1565-1574, 2015.

CHENG, S.S., CHUNG, M.J., LIN, C.Y., WANG, Y.N., CHANG, S.T., Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata act as antifungal agents. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 124–128, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; ESTADUAL, U. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova.* **31**, 623-636, 2008.

COLLIN, G. Chemical composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*: A review. *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.*, **2(3)**, 06-11, 2015.

CRUZ, E. M. O.; MENDONÇA, M. C.; BLANK, A. F.. *Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*. *Ind. Crops Prod.*, **117**, 245-251, 2018.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L.; Natural Products from Plants. 2. ed. New York: Taylor & Francis Group, 569 p., 2006.

- DABROWSKI, L.; Multidetector systems in gas chromatography, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **102**, 185-193, 2018.
- DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., & POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot.*, **22**, 39–44, 2003.
- DAN, Y.; LIU, H.; GAO, W.; CHEN, S. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *Mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Prot.*, **29**, 295–299, 2010.
- DAVARI, M.; EZAZI, R. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. *J. Mycol. Med*, **27**, 463- 468, 2017.
- DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr.* **503**, 1-24, 1990.
- DERNO, M.; OLIVA, M. M.; LOPEZ, M. L.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO. J.; Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharm. Biol.*, **43**, 129-134, 2005.
- DEWICK, P., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2th. ed. New York: John Wiley & Sons Ltd, 514 p., 2002.
- DICKENS, J.C. Predator-prey interactions: olfactory adaptations of generalist and specialist predators. *Agric. For. Entomol.*, **1**, 47-54. 1999.
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Doenças da Pimenta-do-reino. In: Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 58, p. 507-522, 2005.
- DUQUESNOY, E.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J., Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica, *Flavour Fragr. J.*, **22**, 293-299, 2007.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, **21**, 308-323, 2007.

EDRIS, A. E.; FARRAG, E. S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/food*, **47**, 117-121, 2003.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; SMILANICK, J. L.; KORSTEN, L.; Biological Control of Crop Diseases. Samuel S. Gnanamanickam., eds.; New York: 2002, cap. 2.

ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T; KOYAMA, H, TAWATA, S. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chemistry*, **104**, 1648-1653, 2007.

FALASCA, A.; CAPRARIA, C.; FELICE, V.; FORTINI, P.; SAVIANO, G.; ZOLLO, F.; IORIZZI, M.; GC-MS analysis of the essential oils of *Juniperus communis* L. berries growing wild in the Molise region: Seasonal variability and in vitro antifungal activity. *Biochem. Syst. Ecol.*, **69**, 166-175, 2016.

FENG, X.; JING, N.; LI, Z. Ultrasound-Microwave Hybrid-Assisted Extraction Coupled to Headspace Solid-Phase Microextraction for Fast Analysis of Essential Oil in Dry Traditional Chinese Medicine by GC–MS. *Chromatographia*, **77**, 619-628, 2014.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenácea*. *J. Ethnopharmacol.*, **110**, 323–333, 2007.

FERRACINI, V.L., PARAIBA, L.C., LEITÃO FILHO, H.F., SILVA, A.G., NASCIMENTO, L.R., MARSALOLI, A.J., *J. Essent. Oil Res.* **7**, 355, 1995.

GAIA, J.M.D; MOTA, M.G.C; COSTA, M.R; MARTINS, C.S; POLTRONIERI, M.C. Análise comparativa de fenograma gerados por dois coeficientes similares baseados em isoenzimas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Rev. de Ciências Agrárias*, **42**, 9-23, 2004.

- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E.P. Metabolismo secundario de plantas. Reduca(Biología). Serie Fisiología Vegetal. **2**, 119-145, 2009.
- GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C ; BARBOSA, K. A. G ; CASSEMIRO, T. A. Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, **28**, 2012.
- GHINI. R.; NAKAMURA, D. SHAWT K. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* em microcosmo e in vivo. *Summa Phytopathol.*, **27**, 318-322, 2001.
- GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, **30**, 374-381, 2007.
- GOTTLIEB, O. R.; FINEBERG, M.; GUIMARÃES, M. L.; MAGALHÃES, M. T.; MARAVALHAS, M.; Associação Brasileira de Pesquisas sobre Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais. 1965, 11, 1.
- GROS, E.G.; POMILIO, A.B.; SELDES, A.M. & BURTON, G. Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Washington. The General Secretariat of the Organization of the American States. 1985.
- GURJAR, M. S.; ALI, S.; AKHTAR, M.; SINGH, K. S.; KANGABAM, S. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agric. Sci.*, **03**, 425-433, 2012.
- HAGHIGHI, T. M.; SAHARKHIZ, M. J.; KHOSRAVI, A. R. Essential oil content and composition of *Vitex pseudo-negundo* in Iran varies with ecotype and plant organ. *Ind. Crops Prod.*, **109**, 53-59, 2017.
- HAMM, S.; BLETON, J.; CONNAN, J.; TCHAPLA, A. A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochem.* **66**, 1499-1514, 2005.
- HARREWIJN, P., VAN A.M. OOSTEN, AND P.G.M. PIRON. Natural Terpenoids as Messengers. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2001.
- HARRIS, Daniel C. Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 862p, 2001.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M.A. Química de produtos naturais, novos fármacos e a medicina farmacognosia. Itajaí: Univali, 2006, 1-303.

HEWAJULIGE, I.G.N.; WJESUNDERA, R.I.C. Thielaviopsis paradoxa, Thielaviopsis basicola (Black Rot, Black Root Rot). Postharvest Decay, 2014, 287-308.

HO, C. L., HSU, K. P., WANG, E. I. C., LIN, C. Y., SU, Y. C. Composition and anti-wooddecay fungal activities of the leaf essential oil of *Machilus philippinensis* from Taiwan. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 337–340, 2010.

HU, Y.; ZHANG, J.; KONG, W.; ZHAO, G.; YANG, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, **220**, 1–8, 2017.

HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., HUSSAIN SHERAZI, S. T., PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, **108**, 986–995, 2008.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front. Microbiol.*, **3**, 1-24, 2012.

IMANI, Z., ASGARPANAH, J., HASHEMI, F., HASHEMI HEZAVEH, J. Composition and antifungal activity of *Zhumeria majdae* essential oil. *Curr. Med. Mycol.*, **1**, 13-19, 2015.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potencial of the family Myrtaceae. *Acta Bot. Bras.*, **27**, 70-77, 2013.

JAAFAR, F. M.; OSMAN, C. P.; ISMAIL, N. H.; AWANG, K.. Analysis of essential oils of leaves, stems, flowers and rhizomes of *Etilingera elatior* (jack) r. M. Smith. *MJAS*, **11**, 269-273, 2007.

JAMES, A T.; MARTIN, A J. P. Quantitative Structure Chromatographic Retention Relationship. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1987. 303p.

JING, C., ZHAO, J., HAN, X., HUANG, R., CAI, D., ZHANG, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Crop Prot.*, **104**, 41-46, 2018.

KIM, J.; CHUNG, H. Profiling of Volatile Components Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Commercial Pine Needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) Powder. *Prev. Nutr. Food Sci.*, **16**, 45-54, 2011.

KOLOMNIKOV, I. G.; EFREMOV, A. M., TIKHOMIROVA, T.; I., SOROKINA, N. M.; ZOLOTOV, Y. A., Early Stages in the History of Gas Chromatography, *J. Chromatogr.* **1537**, 109-117, 2018.

KONO, Y., KNOCHE, H.W. & DALY, J.M. Structure: Fungal hostspecific. In: Durbin, R.D. (Ed.) *Toxin in Plant Disease*. Academic Press. 1981, 221-257.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1; Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helv. Chim. Acta*, **41**, 1915, 1958.

LAGO, J. H. G., ROMOFF, P., FÁVERO, O. A., SOARES, M. G., BARALDI, P. T., CORRÊA, A. G., SOUZA, F. O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista. *Quim. Nova*, **31**, 727-730, 2008.

LANDRUM, L. R. Two new species of *Campomanesia* (Myrtaceae) from Espírito Santo and Bahia, Brazil. *Brittonia*. **53**, 534-538, 2001.

LE QUERE, J.-L., LATRASSE, A. Composição dos óleos essenciais de brotos de groselha preta (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **38**, 3-10. 1990.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. *Rev. Fitos*, **3**, 14-24, 2007.

MADHULIKA, P.; SRIBHUWANESWARI, S.; KARTHIKENYAN, D.; SUNITA, M.; PAVANI, S.; ATUL, N. C.; UMESH, M.; KAMALAKANNAN, K.; SARAVANANKUUMAR, A.; SIVAKUMAR, T. In-vitro Cytoprotection Activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in Cultured Human Blood Lymphocytes and

Antitumour Activity against B16F10 Melanoma Cell Line. *J. Pharm. Technol.* **1**, 450-452, 2008.

MEEPAGALA, K. M.; STURTZ, G.; WEDGE, D. E. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6989–6992, 2002.

MEIRELES, E. N. **Influência dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região amazônica no controle do *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Causador da fusariose em pimenta-do-reino.** 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

GONÇALVES, J. M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano.** 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

MISHRA P.K, SINGH P., PRAKASH B., KEDIA A., DUBEY N.K, CHANOTIYA C.S. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *Int Biodeter Biodegr*, **80**, 16-21, 2013.

MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.*, **27**, 4050-4063, 2009.

MORAIS, L.A.S.; CASTANHA, R.F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, **13**, 628-632, 2011.

MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.C.; GUIMARÃES, E. F. 1-Butyl-3,4-Methylenedioxybenzene as the Major Constituent of Essential Oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). *J. Essent. Oil Res.*, **9**, 565-568, 1997.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63, 1983.

MUHLEN, C. V.; MARRIOTT, P. J. Retention indices in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2351-2360, 2011.

MUNHUWEYI K., CALEB, O. J., LENNOX, C. L., REENEN, A. J., OPARA, U. L. In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *Postharvest Biol. Technol.*, **129**, 9-22, 2017.

NAIR, K. P. P. The Agronomy and economy of black pepper (*Piper nigrum* L.) – The “King of Spices”. New Delhi, India, Academic Press, v.2, 2004, 119 p.

National Committee for Clinical Laboratory Standards; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard M-38A, 2th ed., NCCLS: Wayne, 2002.

NAWAZ, H.; HANIF, M. A.; AYUB, M. A. Raman spectroscopy for the evaluation of the effects of different concentrations of Copper on the chemical composition and biological activity of basil essential oil. *Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **185**, 130-138, 2017.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. 2002. J. Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

OSORIO, C.; ALARCON, M.; MORENO, C.; BONILLA, A.; BARRIOS, J.; GARZON, C.; DUQUE, C., Characterization of Odor-Active Volatiles in Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.), *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 509-516, 2006.

OUADI, Y. EI; MANSSOURI, M.; BOUYANZER, A. Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microb. Pathog.*, **107**, 321-326, 2017.

PARRY, E. J. The chemistry of essential oils and artificial perfumes. Vol. II. London: Scott, Greenwood and Son. 4^a ed., 1922, 365 p.

PASDARAN, A.; DELAZAR, A.; NAZEMIYEH, H.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chemical Composition, and Antibacterial Against *Staphylococcus aureus* and Free-Radical-Scavenging Activities of the Essential Oil of *Scrophularia amplexicaulis* Benth, *Rec. Nat. Prod.* **6:4**, 350 -355, 2012.

PILLAY, V.S. Project report on research and development of black pepper (*Piper nigrum* L.) in the humid tropics of Brazil. Belém: EMBRAPA-CPATU, 27p., 1995.

PINTO E.; SILVA, L. V.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol*, **58**, 1454-1462, 2009.

PLOETZ, R.C., Diseases of Tropical Fruit crops. CABI Publishing, Wallingford. 2003.

POTZERNHEIM, M. C. L., BIZZO, H. R. VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**, 246-251, 2006.

PRAKASH, B., SINGH, P., KEDIA, A., DUBEY, N.K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Res. Int.* **49**, 201-208, 2012.

ROCHA NETO, F. C. **Progresso espaço-temporal da fusariose em plantios de pimentado-reino - ES**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São Mateus, 2013. 44 p.

SADGROVE, N., JONES, G. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*, **5**, 48-102, 2015.

SALAZAR, G. J. T.; SOUSA, J. P.; LIMA, C. N. F. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crops Prod.*, **122**, 591-595, 2018.

SALVAGNINI, L. E., OLIVEIRA, R. S., SANTOS, L. E., MOREIRA, R. R. D. PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **18**, 241-244, 2008.

SANTOS, D. V. **Controle alternativo da podridão seca de caule e raiz de graviola (*Annona muricata* L.) causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon &**

Maubl no estado de Alagoas. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015. 59 f.

SHARMA, A.; RAJENDRAN, S.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; KUNDU, B.. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 308–313, 2017.

SILVA, J. K. R.; PINTO, L. C.; BURBANO, R. M. R.; MONTENEGRO, R. C. ; GUIMARÃES, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind. Crops Prod.*, **58**, 55-60, 2014.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVIK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora UFRGS. Porto Alegre, 2010.

SINGH, G.; MAURYA, S.; CATALAN, C.; LAMPASONA, M.P. Chemical constituents, Antifungal and Antioxidative Effects of Ajwain Essential Oils and its Acetone Extract. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3292-3296, 2004.

SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **68**, 71-77, 2014.

SNENE, A; MOKNI, R; JMII, H; JLIASSI, I; JAÏDANE, H; FALCONIERI, D; PIRAS, A; DHAOUADI, H; PORCEDDA, S; HAMMAMI, S; In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. *Ind. Crops Prod.*, 109, 109-115, 2017.

SOUZA J. I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. *Rev. Biotemas.* **22**, 77-83, 2009.

SRIWILAJAROEN, N., FUKUMOTO, S., KUMAGAI, K., HIRAMATSU, H., ODAGIRI, T., TASHIRO, M., SUZUKI, Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.*, **94**, 139-146, 2012.

STEVIĆ, T.; BERIĆ, T.; ŠAVIKIN, K.; SOKOVIĆ, M.; GOĐEVAC, D.; DIMKIĆ, I.; STANKOVIĆ, S. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Ind.Crops Prod.* **55**, 116, 2014.

STOCKERT, J.C.; CASTRO, A.B.; CANETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*, **114**, 785-796, 2012.

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

TASCIOGLU, C., YALCIN, M., SEN, S., AKCAY, C., Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *Int. Biodeter. Biodeg.* **85**, 23–28, 2013.

THOMIDIS, T; FILOTHEOU, A. Evaluation of five essential oils as biofungicides on the control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. *Crop Prot.*, **89.**, 66-71, 2016.

TIAN, J., HUANG, B., LUO, X., ZENG, H., BAN, X., & HE, J. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand. - Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, **130**, 520-527, 2012.

TINOCO, M. L. P. **Silenciamento trans-específico in vivo entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticilloides***. BRA. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília. 2010, 48 p.

TINOCO, M; MARTINS, M; CRUZ-MORAIS, J. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. *Rev. de Ciências Agrárias.* **30**, 2007.

TREMACOLDI, C.R. Principais Doenças Fúngicas da Pimenteira-do-Reino no Estado do Pará e Recomendações de Controle. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, p.25, 2010.

TU, X.; HU, F.; THAKUR, K.; LI, L.; ZHANG, Y.; WEI, Z. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Ind. Crops Prod.*, **124**, 192-200, 2018.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; CHAUHAN, A. Chemical Composition of Root Essential Oil of *Acorus calamus* L. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, **38**, 121-125, 2014.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para a caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Quim. Nova*, **30**, 2031-2034, 2007.

VILLA-RUANO, N.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y.; RUBIO-ROSAS, E. Essential oil composition and biological/pharmacological properties of *Salmea scandens* (L.) DC. *Food Control*, **57**, 177-184, 2015.

VILLAVERDE, J.J., SANDÍN-ESPAÑA, P., SEVILLA-MORÁN, B., LÓPEZ-GOTI, C., ALONSO-PRADOS, J. L., Biopesticides from natural products: current development, legislative framework, and future trends. *BioResources*, **11**, 5618–5640, 2016.

VODA, K.; BOH VODA, K.; BOH, B.; VRTAČNIK, M.; POHLEVEN, F.; Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **51**, 51-59, 2003.

WALKER, G., WHITE, N. Introduction to fungal physiology. In: Kavanagh K, editor. *Fungi: biology and applications*. UK: John Wiley and Sons Ltd; 2012.

WISMER, C. A. Pineapple disease. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGHES, C. G. *Sugar Cane Diseases of the World*. Elsevire Publishing Company, **1**, 223-235, 1961.

XIE, Y.; WANG, K.; HUANG, Q.; LEI, C.; Evaluation toxicity of monoterpenes to subterranean termite, *Reticulitermes chinensis* Snyder. *Ind. Crops Prod.*, **53**, 163-166, 2014.

XIE, Y.; WANG, K.; HUANG, Q.; ZHANG, D. Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. *Ind. Crops Prod.*, **108**, 278-285, 2017.

YE, Z.; LI, Z.; WEI, D. Microwave-Assisted Extraction/Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with DSI-GC-IT/MS for Analysis of Essential Oil from Three Species of Cardamom. *Chromatographia*, **77**, 347-358, 2013.

ZABKA, M., PAVELA, R., SLEZAKOVA, L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Ind. Crops Prod.*, **30**, 250-253, 2009.

ZHANG, Z.; YANG, T.; M. I. Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. *Int. Biodeterior Biodegrad.*, **106**, 157, 2016.

ZHAO C.; ZHANG, M.; HE, J.; DING, Y.; LI, B. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil from the flowers of *Artemisia austro-yunnanensis*. *J. Chem. Pharm. Res.*, 6(7), 1583-1587, 2014.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LIANG, Y. Conversion of programmed-temperature retention indices from one set of conditions to another. *J. Chromatogr. UMA*, **1144**, 245-254, 2007.

ZHAO, T.; GAO, F.; ZHOU, L.; SONG, T. Essential Oil from *Inula britannica* Extraction with SF-CO₂ and Its Antifungal Activity. *J. Integr. Agric.*, **12**, 1791-1798, 2013.

ZUZARTE. M., SALGUEIRO, L. Essential oil chemistry. Bioactive essential oils and cancer. 2^o cap., 2015, 19-61.

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Baccharis platypoda</i> DC	98
FIGURA 2A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Baccharis trinervis</i> Pers.	98
FIGURA 3A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Siparuna brasiliensis</i>	98
FIGURA 4A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Etlíngera elatior</i>	99
FIGURA 5A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Piper miquelianum</i> C. DC.	99
FIGURA 6A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	99
FIGURA 7A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Peperomia alata</i>	100
FIGURA 8A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Lantana lundiana</i> Schauer	100
FIGURA 9A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Campomanesia macrobracteolata</i> (frutos)	100
FIGURA 10A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Campomanesia macrobracteolata</i> (folhas)	101
FIGURA 11A Cromatograma da amostra de óleo essencial de <i>Protium</i> sp.	101

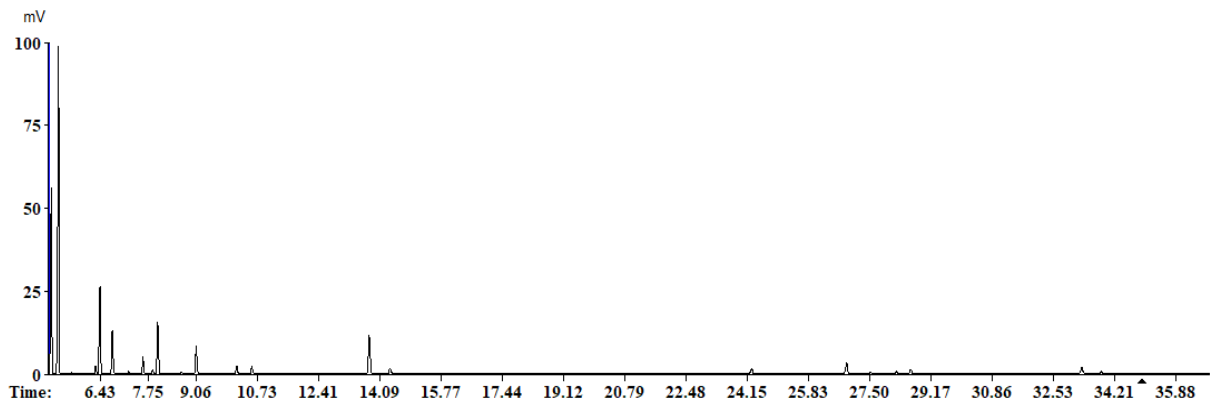


FIGURA 1A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Baccharis platypoda* DC.

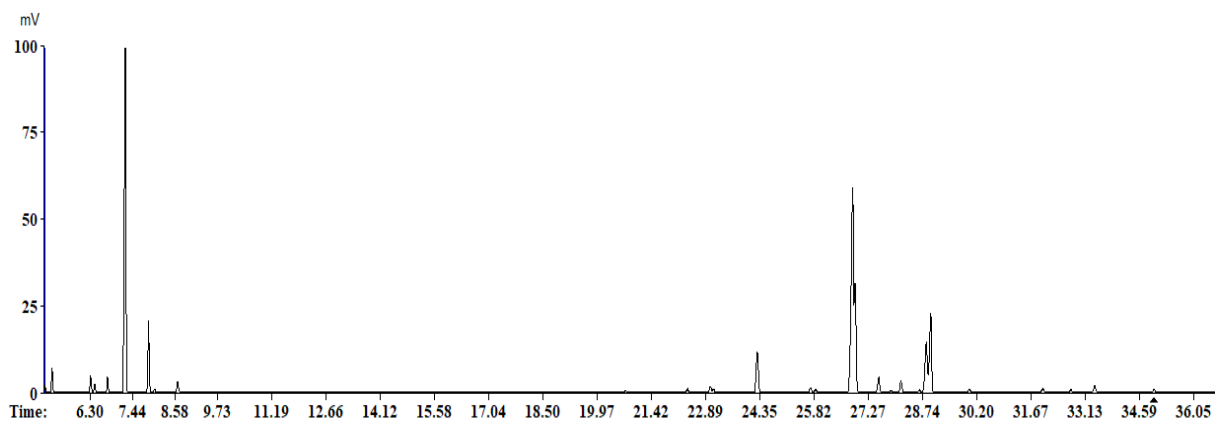


FIGURA 2A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Baccharis trinervis* Pers.

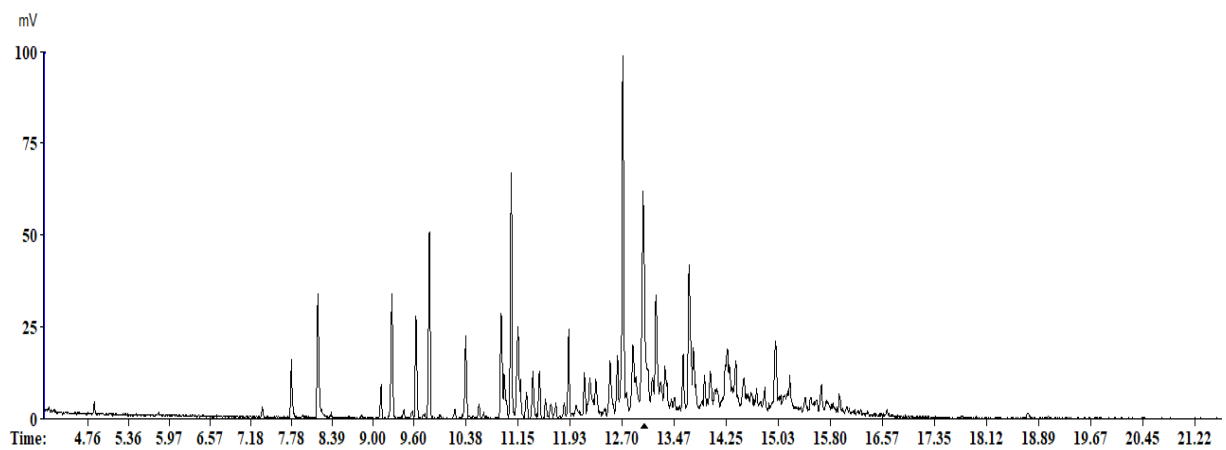


FIGURA 3A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Siparuna brasiliensis*

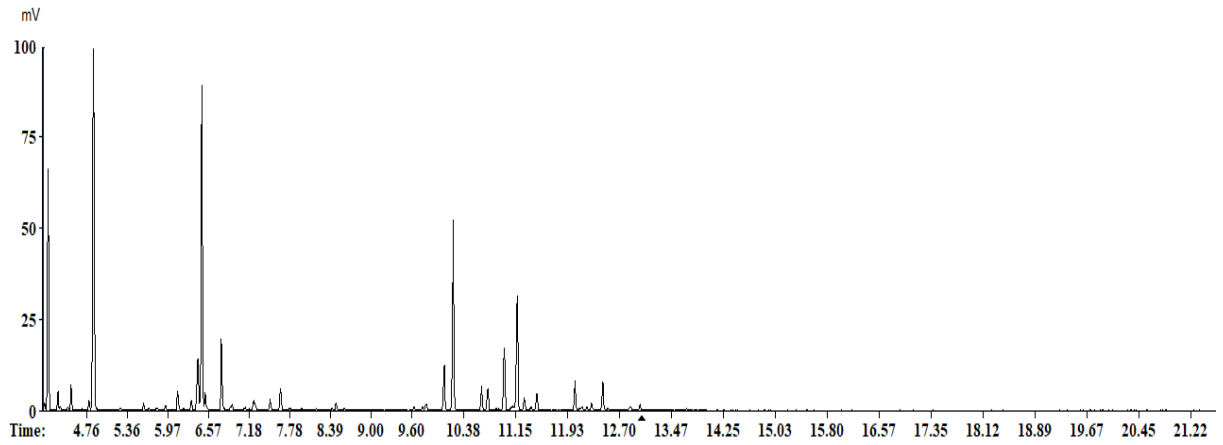


FIGURA 4A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Etingera elatior*

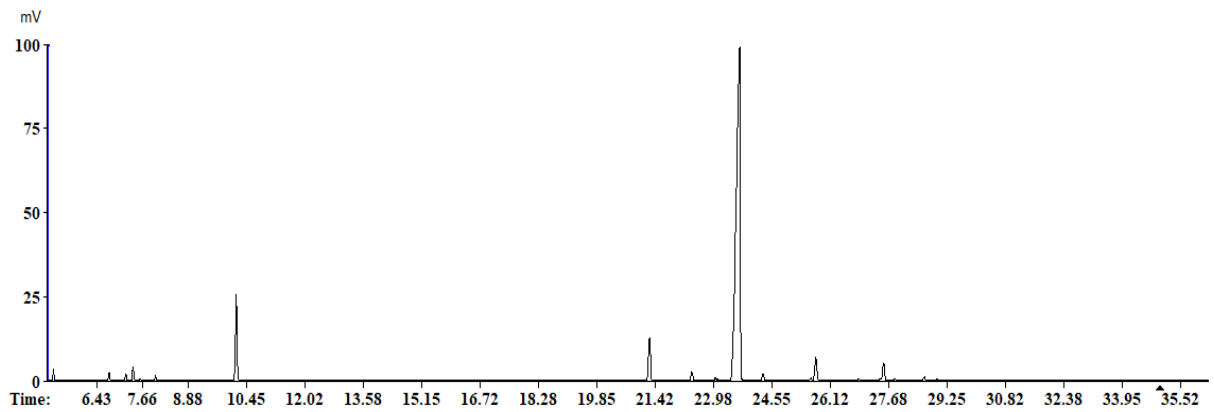


FIGURA 5A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Piper miquelianum* C. DC.

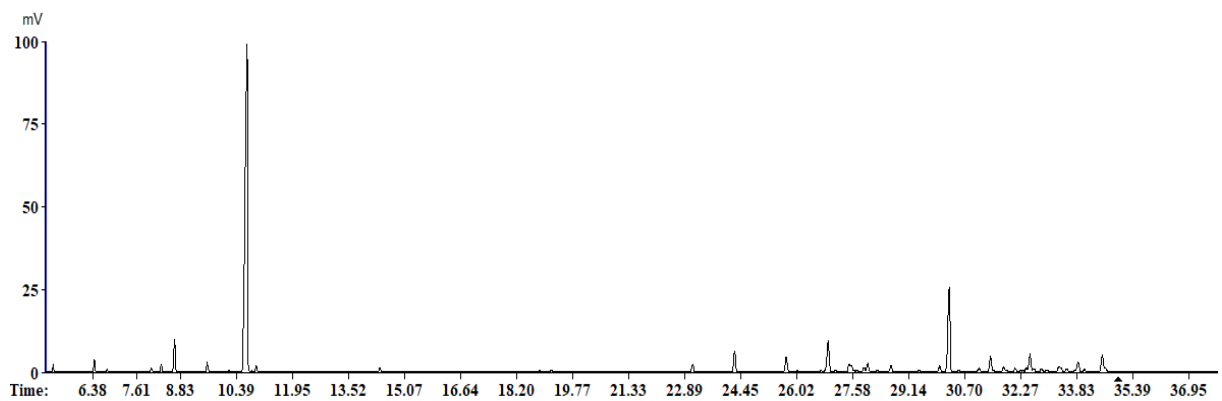


FIGURA 6A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Piper aduncum*

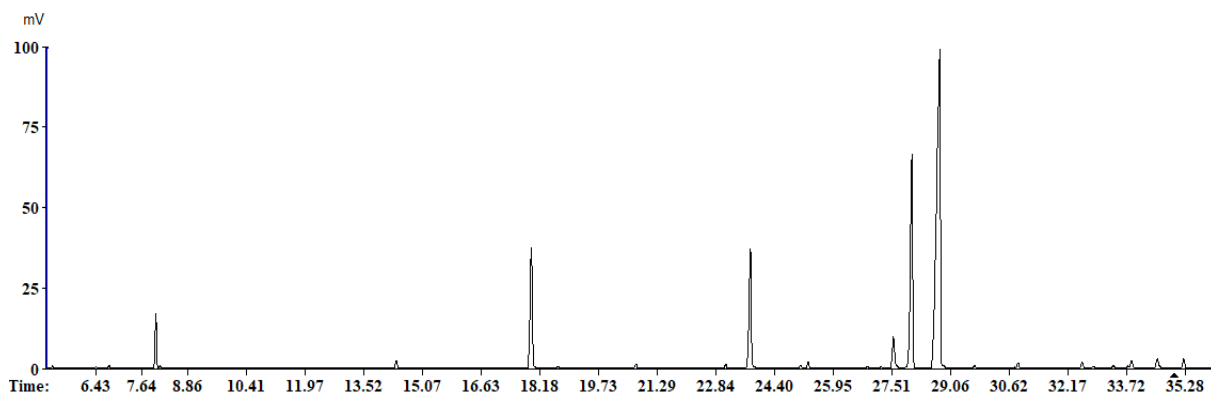


FIGURA 7A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Peperomia alata*

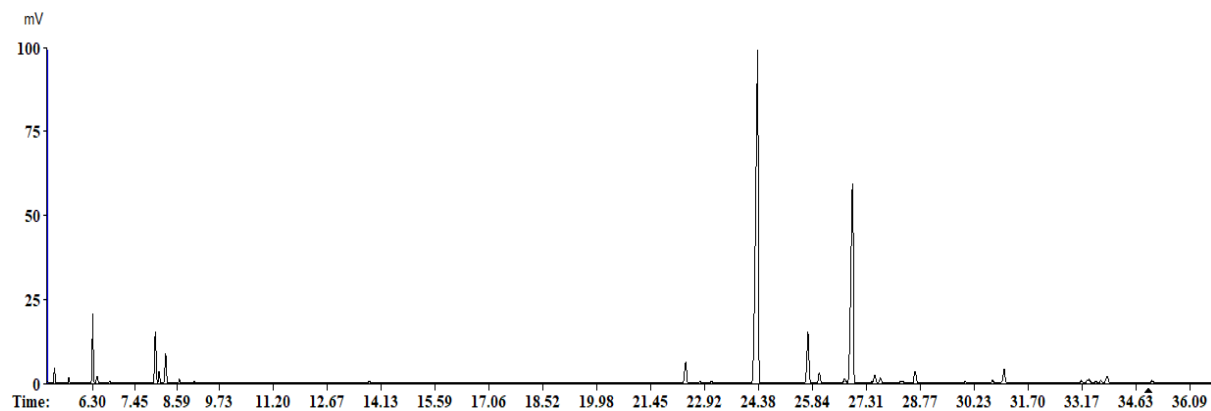


FIGURA 8A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Lantana lundiana* Schauer

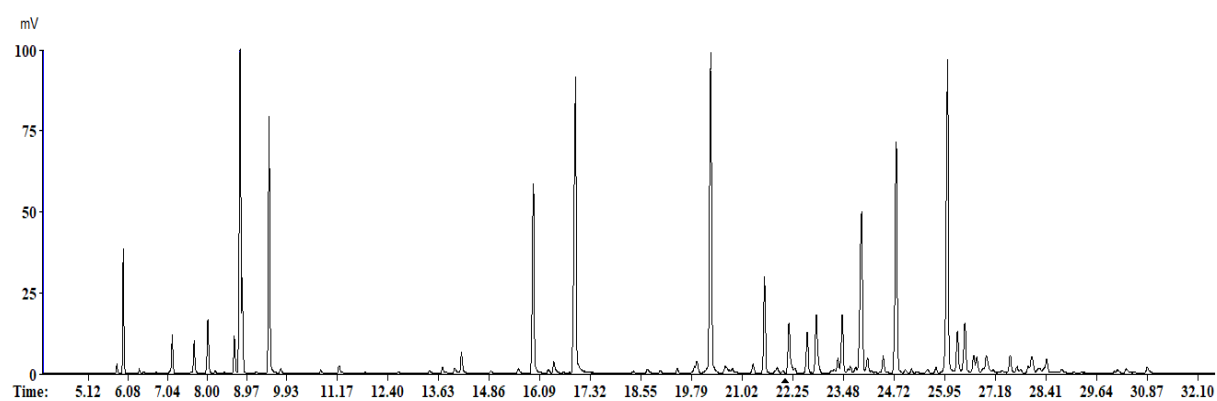


FIGURA 9A. Cromatograma da amostra de óleo essencial dos frutos *Campomanesia macrobracteolata*

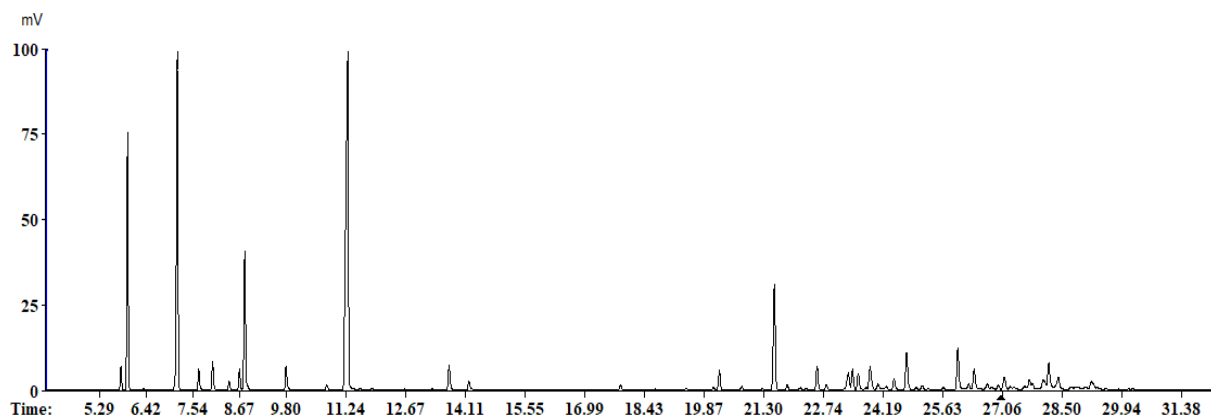


FIGURA 10A. Cromatograma da amostra de óleo essencial das folhas *Campomanesia macrobracteolata*

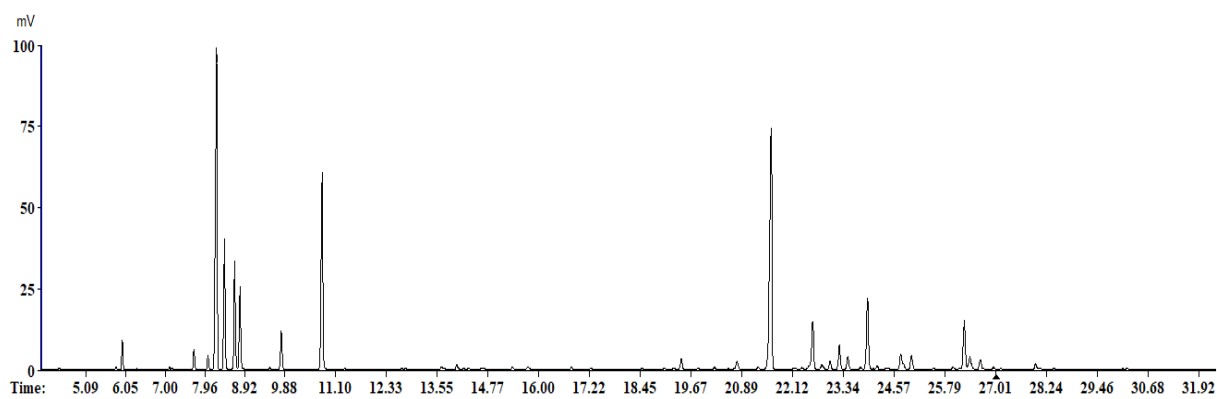


FIGURA 11A. Cromatograma da amostra de óleo essencial de *Protium* sp.