

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

TÉRCIO DA SILVA DE SOUZA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL
E DIVERSIDADE QUIMIOTÍPICA DE
Psidium guajava L.**

ALEGRE - ES

2015

TÉRCIO DA SILVA DE SOUZA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL
E DIVERSIDADE QUIMIOTÍPICA DE
Psidium guajava L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Produção Vegetal, na área de concentração em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Adésio Ferreira.

ALEGRE – ES

2015

S729p Souza, Tércio da Silva de, 1980-
Perfil cromatográfico do óleo essencial e diversidade quimiotípica de *Psidium guajava* L. / Tércio da Silva de Souza. – 2015.
97 f. : il.

Orientador: Adésio Ferreira.

Coorientadores: Luciano Menini; Marcia Flores da Silva Ferreira.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Diversidade genética. 2. Melhoramento vegetal. 3. Compostos bioativos. 4. Marcadores biológicos. 5. Quimiotipos. 6. Análise de fatores. I. Ferreira, Adésio. II. Menini, Luciano. III. Ferreira, Marcia Flores da Silva. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

TÉRCIO DA SILVA DE SOUZA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL
E DIVERSIDADE QUIMIOTÍPICA DE
Psidium guajava L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Produção Vegetal, na área de concentração em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.
Orientador: Prof. Dr. Adésio Ferreira.

Aprovada em 02 de Abril de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Adésio Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo - CCA
Orientador

Prof. Dr. Luciano Menini
Instituto Federal do Espírito Santo - Alegre
Coorientador

Prof. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo - CCA
Coorientadora

Prof. Dr. Demétrius Profeti
Universidade Federal do Espírito Santo - CCA
Membro externo ao PPGPV

Prof. Dr. Luiz Carlos Pimentel Almeida
Instituto Federal do Espírito Santo – Alegre
Membro externo a UFES

A Jaqueline, Luiz Cláudio, Livia e Júlia, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Todo Poderoso que por sua misericórdia nos permite viver e conhecer as maravilhas deste mundo;

A Universidade Federal do Espírito Santo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal;

Ao Ifes/*Campus de Alegre*;

Ao Prof. Dr. Adésio Ferreira, pela orientação, oportunidade, dedicação, compreensão e amizade;

À Prof. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira, pelos muitos auxílios prestados, pelas palavras de incentivo e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Luciano Menini, pelos muitos auxílios prestados, pela dedicação e amizade;

Aos professores Demétrius Profeti e Luiz Carlos Pimentel Almeida por participarem da lapidação deste trabalho;

Meu especial agradecimento à minha família, especialmente minha esposa Jaqueline e meus filhos Luiz Claudio, Lívia e Júlia pelo grandioso amor, auxílio e apoio em todos os momentos;

Aos colegas Tiago, José Henrique, Ludmila, Rafael, Paula, Wagner, Fúlvia que fizeram parte desta história;

Meu agradecimento à Prof^a. Luciana Alves Parreira pelos auxílios prestados na obtenção das análises de CG/MS;

Meu agradecimento ao Prof^o Jeferson Luis Ferrari pelo auxílio prestado na obtenção na elaboração da imagem de localização geográfica;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho;

A FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo e CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

“O verdadeiro químico vê Deus em todas as formas diversas do mundo exterior... E assim, à medida que contemplar a variedade e beleza do mundo exterior e lhe penetrar as maravilhas científicas saberá sempre se elevar até a Sabedoria Infinita, cuja bondade lhe permite provar as alegrias da ciência; tornar-se-á melhor ao mesmo tempo e mais sábio.”

Humphry Davy

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELA.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
INTRODUÇÃO	
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO.....	21
2.1. <i>Objetivo geral</i>	21
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	21
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1. <i>P.guajava e o perfil químico do seu óleo essencial</i>	23
3.2. <i>Quimiometria</i>	29
3.3. <i>Análise de fatores</i>	30
CAPÍTULO 1. Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de <i>Psidium guajava</i>	
Resumo.....	37
Abstract.....	38
1. Introdução.....	38
2. Material e Métodos.....	40
2.1. <i>Material Vegetal, Coleta e Preparação</i>	40
2.2. <i>Extração do Óleo essencial</i>	40
2.3. <i>Quantificação e Caracterização do Óleo Essencial</i>	41
2.4. <i>Análise Estatística de Dados</i>	42
3. Resultados e Discussão.....	42
3.1. <i>Composição Química</i>	42
3.2. <i>Perfil cromatográfico do óleo essencial</i>	46
4. Conclusão.....	51
5. Agradecimentos.....	52
6. Referências.....	52

CAPÍTULO 2. Diversidade quimiotípica de <i>Psidium guajava</i> L.....	59
Resumo.....	59
Abstract.....	60
1. Introdução.....	60
2. Parte Experimental.....	62
2.1. <i>Localização Geográfica dos experimentos e coleta do material vegetal.....</i>	62
2.2. <i>Extração do óleo essencial.....</i>	62
2.3. <i>Análise GC-FID-MS.....</i>	63
2.4. <i>Composição do Óleo essencial.....</i>	64
2.5. <i>Análise Estatística Univariada e Multivariada.....</i>	64
3. Resultados e Discussão.....	65
3.1. <i>Extração e Propriedades Físicas do Óleo Essencial.....</i>	65
3.2. <i>Composição do óleo essencial.....</i>	66
3.3. <i>Análise Fatorial.</i>	71
4. Conclusões.....	81
5. Agradecimentos.....	82
6. Referências.....	82
CONCLUSÃO	
CONCLUSÃO GERAL.....	88
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	89

SOUZA, Tércio Silva. **Perfil cromatográfico do óleo essencial e diversidade quimiotípica de *Psidium guajava* L.** 2015. 97p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal/Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas) Universidade Federal do Espírito Santo, ES.

RESUMO

Óleos essenciais de folhas de 22 genótipos de *Psidium guajava* provenientes de plantios experimentais em diferentes ambientes localizados no Espírito Santo – Brasil foram extraídos por hidrodestilação e caracterizados por análise de CG-DIC-EM. O rendimento médio de extração foi de 0,4% (m/m). No total, 33 compostos foram identificados representando 87,5-99,0% da composição total, com predominância de sesquiterpenos em todas as amostras. Dezesesseis compostos voláteis foram identificados como majoritários, dos quais os mais significativos foram: (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolene, Hinesol e *beta*-Bisabolol. Nos genótipos comerciais (PAL, P.S, SEC, ROX e PET) predominaram os compostos (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Selinene, Caryophyllene oxide, Hinesol, 14-hydroxy-9-*epi*-(E)-Caryophyllene e nos genótipos Cortibel (C1-C17) Limonene, (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *beta*-Bisabolene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolol, *alpha*-Bisabolol. Variações no perfil cromatográfico do óleo essencial entre os ambientes, foram mais expressivos nos genótipos C7, C13 e C17 e menos nos genótipos C1, C5, C16 e PET. Os genótipos C10, C13 e SEC mostraram altos níveis de (E)-*trans*-Cariofileno, C3 e C6 de *alfa*-Humuleno, C2, C8, C12, C15 e C16 de *beta*-Bisabolol, compostos que tiveram pouca influência ambiental e apresentaram atividade biológica comprovada, tornando viável a utilização destes genótipos como potencial fonte deste compostos e em programas de melhoramento, nos processos de seleção e de cruzamento. Além disso, o (E)-*trans*-Cariofileno aparece como um marcador químico potencial para a identificação da espécie, está presente de forma majoritária nos 22 genótipos estudados. Por análise de fatores foram definidos três quimiotipos a partir da composição química do óleo essencial: quimiotipo 1 (Comercial - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 e C17M) caracterizados por altos níveis de *beta*-Selineno, *alfa*-Selineno, Hinesol, 14-hidroxi-*epi*-(E)-Cariofileno, sendo o *beta*-Selineno e *alfa*-Selineno seus marcadores químicos; Quimiotipo 2 (C10 e C13) apresentaram níveis elevados de Elemol, *trans*-Nerolidol, *trans*- β -Eudesmol e (2Z, 6Z)-Farnesol, indicados como os seus marcadores químicos; Quimiotipo 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16,

C17L) caracteriza-se por níveis elevados de *alfa*-Cedreno, *cis-alfa*-Bergamotene, *alfa*-Humuleno, Humuleno epóxido, *epi-alfa*-Cadinol, *beta*-Bisabolol, *alfa*-Bisabolol, com *beta*-Bisabolol e *alfa*-Bisabolol indicados como os seus marcadores químicos.

Palavras-chave: variabilidade quimiotípica, melhoramento vegetal, compostos bioativos, marcadores químicos, quimiotipos, análise de fatores.

SOUZA, Tércio Silva. **Chromatographic profile of essential oil and chemotypes diversity on *Psidium guajava* L.** 2015. 97 p. Thesis (Doctorate in Vegetal Production / Biotechnology and Ecophysiology of Plants Development) Federal University of Espírito Santo, ES.

ABSTRACT

Essential oils from leaves of 22 genotypes *P.guajava* collected in an experimental plantations of different environments, located in Espírito Santo - Brazil, were extracted by hydrodistillation and characterized through analysis of FID-GC-MS. The average extraction yield was 0.4% (w/w). In total 33 compounds were identified representing 87.5 to 99.0% the total composition, with a predominance of sesquiterpenes in all samples. Sixteen volatile compounds have been identified as major, of which the most significant are: (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolene, *beta*-Bisabolol and Hinesol. In the commercial genotypes (PAL, PS, SEC, ROX and PET) the predominant compounds were: (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Selinene, Caryophyllene oxide, Hinesol, 14-hydroxy-9-*epi*-(E)-Caryophyllene, in the Cortibel genotypes (C1-C17) predominate Limonene, (E)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *beta*-Bisabolene, *trans*-Nerolidol, *beta* and *alpha*-Bisabolol. Were observed variations in the chromatographic profile of essential oil between environments, being more expressive in genotypes C7, C13 and C17 and less on genotypes C1, C5, C16 and PET. The different environmental conditions exerted influence in the variability of the chromatographic profile of the essential oil, being more expressive in the genotypes C7, C13 and C17 and less expressive in C1, C5, C16 and PET. The genotypes C10, C13 and SEC showed high levels of (E)-*trans*-Caryophyllene, C3 and C6 of *alpha*-Humulene, C2, C8, C12, C15 and C16 of *beta*-Bisabolol, compounds that showed little influence of environmental conditions and have biological activity proven, which makes it feasible to use these genotypes in breeding programs, in the selection and crossing processes. Furthermore, the (E)-*trans*-Caryophyllene appears as a potential chemical marker for identification of the species. From the chemical composition of *P.guajava* oil by multivariate analysis of factors, were defined three chemotypes: Chemotype 1 (Commercial - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 and C17M) characterized by high levels of *beta*-Selinene, *alpha*-Selinene, Hinesol, 14-Hydroxy-*epi*-(E)-Caryophyllene, with *beta*-Selinene and *alpha*-Selinene their chemical markers; Chemotype 2 (C10 and C13) showed elevated levels of Elemol, *trans*-Nerolidol, *trans-beta*-Eudesmol and (2Z, 6Z)-Farnesol, indicated as their

chemical markers; Chemotype 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16, C17LI) characterized by elevated levels of *alpha*-Cedrene, *cis-alpha*-Bergamotene, *alpha*-Humulene, Humulene epoxide, *epi-alpha*-Cadinol, *beta*-Bisabolol, *alpha*-Bisabolol, with *beta* and *alpha*-Bisabolol indicated as their chemical markers.

Keywords: chemotypes variability, plant improvement, bioactive compounds, chemical markers, chemotypes, factor analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Ambientes
AF - Análise Fatorial (Estatística Multivariada)
ANOVA - Análise de variância
C1 a C17 – Genótipos Cortibel
CG-FID ou CG/FID ou CG-DIC - Cromatografia Gasosa com detector de Ionização por Chama
CG-MS ou CG/MS ou CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMA – Dimetilacetamida
DMAPP - Dimetilalildifosfato
DXR - 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
eV – Elétrons volts
FDP- farnesil difosfato
FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
GDP - Geranil difosfato
GGDP - Geranilgeranil difosfato
g.cm⁻³ – Densidade em gramas por centímetro cúbico
HMGR - 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
Ifes – Instituto Federal do Espírito Santo
IPP - Isopentenil difosfato
IR ou IK – Índice de Retenção ou índice de Kováts
IRcal - Índice de Retenção Calculado
IRtab- Índice de Retenção Tabelado
KMO - Critério Kaiser-Meyer-Olkin
L – Linhares
M - Mimoso do Sul
m/z - Relação massa/carga
mL.min⁻¹ – Vazão em mililitros por minuto
mol.L⁻¹ – Concentração em mol por litro
MSA (Measure of Sampling Adequacy - Medida da Adequação da Amostra)
MVA – Ácido mevalônico
MEP - 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
NIST – National Institute of Standards and Technology
P.S – Variedade Pedro Sato
PAL – Variedade Paluma
% m/m – Porcentagem massa por massa com base em biomassa seca
PET – Variedade Petri
ROX - Variedade Roxa
RT - Tempo de Retenção em minutos
SEC - Variedade Século XXI
SSR - Simple Sequence Repeats ou microssatélites
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3. Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de <i>Psidium guajava</i>	36
Tabela 1. Identificação dos compostos majoritários do óleo essencial de 22 genótipos de <i>P. guajava</i> cultivados em dois ambientes (Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES) por IR e CG-MS.....	45
Tabela 2. Composição química em percentual de área relativa do óleo essencial de 22 genótipos de <i>P. guajava</i> cultivados em dois ambientes (Linhares = L e Mimoso do Sul = M), considerando os 16 compostos majoritários (Área Relativa > 5%).....	48
CAPÍTULO 4. Diversidade quimiotípica de <i>Psidium guajava</i> L.....	59
Tabela 1. Média do rendimento de extração e propriedades físicas dos óleos essenciais de 22 genótipos de <i>P. guajava</i> cultivados em dois ambientes (Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES).....	66
Tabela 2. Teor percentual de 33 compostos químicos encontrados nos óleos essenciais extraídos das folhas de 22 genótipos de <i>P. guajava</i> em dois ambientes (A), Mimoso (M) e (Linhares (L), considerando os compostos com Área Relativa > 1%.....	67
Tabela 3. Estimativas de autovalores relacionados a vinte compostos presentes no óleo essencial de <i>P. guajava</i>	75
Tabela 4. Autovetores obtidos após a rotação varimax nos vinte compostos presentes no óleo essencial de <i>P. guajava</i>	76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	17
Figura 1. Esquema das duas vias possíveis para a síntese de IPP (isopentenil difosfato) e DMAPP (dimetilalil difosfato).....	27
Figura 2. Proposta de reação para a biossíntese de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos.....	28
CAPÍTULO 3. Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de <i>Psidium guajava</i>	36
Figura 1. Fórmulas estruturais dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de <i>P.guajava</i>	44
Figura 2. Perfil cromatográfico do óleo essencial de 22 genótipos de <i>P.guajava</i> cultivados em Linhares/ES.....	46
Figura 3. Perfil cromatográfico do óleo essencial de 22 genótipos de <i>P.guajava</i> cultivados em Mimoso do Sul/ES.....	47
CAPÍTULO 4. Diversidade quimiotípica de <i>Psidium guajava</i> L.....	59
Figura 1. Localização das áreas experimentais em relação ao estado do Espírito Santo, Brasil.....	63
Figura 2. Fórmulas estruturais dos 33 compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>P. guajava</i>	71
Figura 3. Análise de correlação para os 33 compostos presentes no óleo essencial de <i>P. guajava</i>	72
Figura 4. Análise de correlação para os 20 compostos presentes no óleo essencial de <i>P.guajava</i> identificados como significativos para a composição dos fatores.....	74
Figura 5. Scree-plot relacionado a vinte compostos presentes no óleo essencial de <i>P.guajava</i>	75
Figura 6. Biplot baseado nas cargas fatoriais mostrando os 21 genótipos nos dois ambientes (M = Mimoso e L = Linhares) para vinte compostos presentes no óleo essencial da <i>P.guajava</i>	78
Figura 7. Triplot baseado nas cargas fatoriais mostrando os 21 genótipos nos dois ambientes (M = Mimoso e L = Linhares) para vinte compostos presentes no óleo essencial da <i>P.guajava</i>	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Psidium guajava L. pertencente à família *Myrtaceae* apresenta mais de 160 cultivares no mundo, é apreciada pelo sabor, aroma e valor nutritivo característicos de seus frutos e por suas potencialidades como fontes de fitoquímicos (ROTH, 2010; COSER ET AL., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2010; GOVAERTS, 2010; GUTIÉRREZ ET AL., 2008; KAMATH et al., 2008; GEIDAM et al., 2007). Parte das propriedades biológicas atribuídas à espécie estão relacionadas ao óleo essencial (MAILLOA et al., 2014; BISWAS et al., 2013; NIMISHAA et al., 2013; SAPKOTA et al., 2012; MOHAMED et al., 2012; METWALLY et al., 2011; SACCHETTI et al., 2010; METWALLI et al., 2010; JOSEPH et al., 2010; DEGUCHI e MIYAZAKI, 2010; JU-WEN WU et al., 2009; DAS et al., 2009), o qual possui matriz complexa e diversa com predominância de mono e sesquiterpenos (KHADHRI et al., 2014; SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011).

A literatura apresenta relatos de diferentes perfis cromatográficos para o óleo essencial de *P. guajava*, o que pressupõe a existência de variabilidade quimiotípica para a espécie (KHADHRI et al., 2014; SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011; JOSEPH et al., 2010; LIMA et al., 2009; CHEN et al., 2007; COLE e SETZER, 2007; SILVA et al., 2003). Esta variabilidade está relacionada a fatores genéticos que contribuem de forma determinante para a ocorrência de polimorfismo químico na espécie e também por fatores fisiológicos e ambientais que afetam de forma qualitativa e quantitativa a composição do óleo essencial de acordo com fatores climáticos, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade e ciclo circadiano (ALVES et al., 2013; BOTREL et al., 2010; BAKKALI et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade quimiotípica do óleo essencial de *P. guajava* pode direcionar o seu uso e orientar programas de domesticação, melhoramento genético (STESEVIC et al., 2014; RADULOVIC e DEKIC, 2013), pois permite a identificação e seleção de genótipos para diferentes finalidades e as condições ambientais mais favoráveis para produção agrônômica de frutos e a exploração do óleo essencial, afim de associá-los à sua potencial aplicação, seja na medicina popular, indústria

química, farmacológicos, estudos quimiotaxonômicos e agregar valor a cultura tornando-a mais sustentável.

Análises químicas do óleo essencial permitem conhecer quantitativamente e qualitativamente os compostos presentes, mesmo quando estes se encontram em quantidades muito pequenas (ppm). Os óleos essenciais podem conter dezenas de compostos e a identificação destes pode ajudar a delimitar diferenças existentes entre os genótipos, definir agrupamentos de genótipos semelhantes (quimiotipos) e substâncias com potencial para marcadores químicos (YAPIA et al., 2014; STESEVIC et al., 2014; RADULOVIC e DEKIC, 2013).

No estudo da diversidade quimiotípica dos óleos essenciais podem ser utilizadas várias análises multivariadas para avaliar a divergência entre genótipos e selecionar os descritores mais importantes para sua discriminação (OLIVEIRA et al., 2014; VALENTE et al., 2011; TORRES, 2008). Para a escolha do tipo de análise a ser aplicada, deve-se levar em consideração o fato de que plantas superiores apresentam duas vias metabólicas capazes de sintetizar precursores dos óleos essenciais (BISWAS et al, 2009; DEWICK, 2009; PHILLIPS, 2008), e estas vias estão inter-relacionadas, podendo gerar compostos com alta correlação entre si (multicolineares) (VALENTE et al., 2011).

A análise de fatores pode ser aplicada neste contexto (OLIVEIRA et al., 2014) e consiste em identificar um número menor de novas variáveis alternativas não correlacionadas e que, de algum modo, sumarizem as informações principais das variáveis originais encontrando os fatores ou variáveis latentes através das relações de covariância (OLIVEIRA et al., 2014; BAKKE et al., 2008; BELFIORE et al., 2006). Os novos grupos de variáveis representam um único constructo ou fator ou “supercaracterística”, que é responsável pelas correlações observadas (DAMÁSIO, 2012; BOMFIM et al., 2011; MINGOTI, 2005; HAIR JUNIOR et al., 2005; NOVAES, 2004) eliminando problemas de multicolinearidade e tornando os resultados mais confiáveis.

Considerando a existência de variabilidade quimiotípica, faz-se necessário conhecer o perfil químico de cada genótipo ou grupo de genótipos com quimiotipos semelhantes e as ambientais mais favoráveis para associá-los à sua potencial aplicação. O uso de material vegetal na indústria química para fins de química fina, aplicações farmacológicas e agronômicos, requer caracterização e identificação de quimiotipos (SANDASI et al., 2013; PAULA et al., 2011; POTZERNHEIM et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar a composição química e o perfil cromatográfico dos óleos essenciais extraídos das folhas de 22 genótipos de *P. guajava* cultivados em dois ambientes (Mimoso do Sul/ES e Linhares/ES);

Caracterizar a diversidade quimiotípica e identificar diferentes marcadores químicos para cada quimiotipo do óleo essencial extraído de folhas de 22 genótipos de *P. guajava* cultivados em dois ambientes (Mimoso do Sul/ES e Linhares/ES).

2.2. Objetivos específicos

Coletar e extrair óleo essencial das folhas de 22 diferentes genótipos de *Psidium guajava* L. cultivados em dois ambientes (Mimoso do Sul/ES e Linhares/ES);

Analisar os óleos essenciais de *P.guajava* por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização por Chama (CG-FID) e por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS);

Identificar a composição química dos óleos essenciais de *P.guajava* e caracterizar seus perfis cromatográficos;

Analisar os diferentes perfis cromatográficos por estatística multivariada via Análise Fatorial (AF);

Identificar os diferentes agrupamentos (Quimiotipos) e os compostos que mais contribuem para formação dos grupos;

Caracterizar os diferentes marcadores químicos para cada quimiotipo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *P.guajava* e o perfil químico do seu óleo essencial

Myrtaceae é uma família de plantas dicotiledôneas de regiões quentes amplamente distribuídas pelo mundo, aproximadamente 5600 espécies agrupadas em 132 gêneros (GOVAERTS et al., 2012; ROTH, 2010). Constituindo uma das 10 famílias com maior riqueza de espécies do Brasil, com 23 gêneros e 976 espécies (SOBRAL et al., 2012; FORZZA et al., 2010).

Dentre as espécies pertencentes à *Myrtaceae* tem-se a “goiabeira” (*Psidium guajava* L.), a espécie mais conhecida do gênero *Psidium*, devido à importância econômica do cultivo de seus frutos. Existe mais de 160 cultivares de “goiabeiras” espalhadas pelo mundo. Os países que se destacam na sua produção e atendem os mercados internacionais tanto com frutas *in natura* como em produtos processados são: Índia, Paquistão, Brasil, México, Tailândia, Peru, Filipinas (NIMISHAA ET AL., 2013; AGRIANUAL, 2013; PEREIRA e NACHTIGAL, 2009).

As principais variedades comerciais cultivadas no Brasil são: Paluma, Pedro Sato, Rica, Sassaoka, Ogawa Branca, Kumagai, White Selection of Florida, Banaras e Iwao. Destaca-se a cultivar Paluma que representa cerca de 70% das “goiabeiras” cultivadas no Brasil (PEREIRA e KAVATI, 2011). Existem ainda outros genótipos com grande potencial para produção e comercialização (COSER et al., 2012; PEREIRA; KAVATI, 2011).

A *P. guajava* é apreciada não apenas pelo seu sabor, aroma e valor nutritivo característicos de seu fruto, bem como por suas potencialidades como fontes de fitoquímicos com diversas atividades biológicas (ROTH, 2012; GOVAERTS et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008; KAMATH et al., 2008; GEIDAM, 2007).

Na medicina popular suas folhas e brotos são utilizados na forma *in natura* e no preparo de decocções, chás e banhos (ROTH, 2012; GUTIÉRREZ et al., 2008). A espécie está entre as principais plantas medicinais de interesse ao Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), devido à presença de uma gama de compostos bioativos com diversas propriedades biológicas como: anti-inflamatória (OJEWOLE, 2006), anticonvulsivante, analgésica, antidiarreica, antidiabéticas, hipoglicêmica e anti-hiperlipidêmicas (GUTIÉRREZ et al., 2008), inseticida (RAJENDRAN e SRIRANJINI, 2008), antimicrobiana (BISWAS et al., 2013; MOHAMED et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2008; RAJENDRAN e SRIRANJINI, 2008; OJEWOLE, 2006), anti-tosse (GUTIÉRREZ et al., 2008), antifúngica (ROZWALKA, 2008), anticestodal (TANGPU e YADAV, 2006) e antioxidante (HUI-YIN CHEN e GOW-CHIN YEN, 2007).

Parte de suas propriedades biológicas está relacionada ao óleo essencial (CHEN et al., 2007; COLE e SETZER, 2007). Estes são armazenados principalmente nas flores e folhas, em estruturas secretoras especializadas tais como, tricomas ou pelos glandulares; células modificadas do parênquima, em canais secretores e em bolsas secretoras lisígenas ou esquizolisígenas (BAKKALI et al., 2008), e ainda podem ser encontrados na casca do tronco, madeira, raízes, frutos e sementes (COUTINHO et al., 2006; JASSIM e NAJI, 2003).

Geralmente considera-se a composição do óleo essencial como quimiotipo único para a espécie. A quimiotipia é um fenômeno químico no qual óleos essenciais de uma mesma planta apresentam significativa diferença na produção de seus componentes químicos majoritários. A maioria da bibliografia publicada antes de 2010 descreve a quimiotipia como um evento que ocorre devido às diferenças de solo, altitude e clima. Com a evolução tecnológica e o avanço da genética verificou-se que a quimiotipia (variedades ou raças químicas) depende minimamente de fatores ambientais, mas sim da variação genotípica entre as plantas, isto é: da genética vegetal, normalmente relacionado com o processo de especiação, ou seja, de evolução entre as espécies. No entanto, a literatura apresenta relatos de diferentes perfis cromatográficos para o óleo essencial de *P. guajava*, o que pressupõe a existência de variabilidade quimiotípica (KHADHRI et al., 2014;

SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011; JOSEPH et al., 2010; LIMA et al., 2009; CHEN et al., 2007; COLE e SETZER, 2007; SILVA et al., 2003).

A maquinaria celular consta de uma unidade informativa, os genes, que controlam a formação dos catalisadores (enzimas) para a síntese de metabólitos primários e secundários. Portanto, as rotas metabólicas estão sob o controle da constituição genética do organismo, sendo as rotas que originam metabólitos secundários condicionados a variações temporais e espaciais (ROBERTS, 2007; ENFISSE et al., 2005; GEISSMAN & CROUT, 1969).

As proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e circadianos-diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Estes são resultados da especialização celular em que suas manifestações se devem à expressão diferencial dos genes. Moléculas de produtos naturais são biossintetizadas por uma sequência de reações que são consequência de complexos multienzimáticos, codificados a partir da expressão genética, os quais permitem eficiente conversão dos substratos em produtos (DEWICK, 2009).

A existência de variabilidade quimiotípica pode ser causada por fatores genéticos, que contribuem de forma determinante para a ocorrência de polimorfismo químico na espécie e por fatores fisiológicos e ambientais, que afetam de forma qualitativa e quantitativa a composição do óleo essencial, de acordo com fatores climáticos, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade e ciclo circadiano (ALVES et al., 2013; BOTREL et al., 2010; BAKKALI et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade quimiotípica do óleo essencial da *P.guajava* permite o direcionamento do uso como fitoquímicos, para identificação taxonômica da espécie, visto que óleo essencial obtido de uma planta serve como característica para a espécie. Como consequência prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos quimiosistemáticos (EDRIS, 2007; TROMBETTA et. al, 2005) e pode

orientar programas de melhoramento genético (STESEVIC et al., 2014; RADULOVIC e DEKIC, 2013), através da identificação e seleção de genótipos de interesse e identificação das condições ambientais mais favoráveis, não só para produção agrônômica de frutos, mais também para a exploração do óleo essencial, agregando valor a cultura e a tornando mais sustentável.

Assim, o conhecimento do perfil químico do óleo essencial de cada genótipo ou grupo de genótipos com quimiotipos semelhantes e as substâncias com potencial para marcadores químicos são importantes para associá-los à sua potencial aplicação quando utilizado na indústria química e em fins farmacológicos e agrônômicos e também como ferramenta para a identificação quimiotaxonômica da espécie e seus genótipos (SANDASI et al., 2013; PAULA et al., 2011; EDRIS, 2007; POTZERNHEIM et al., 2006; TROMBETTA et. al, 2005).

No estudo da diversidade quimiotípica podem ser utilizadas várias análises estatísticas multivariadas para avaliar a divergência ou similaridades entre genótipos e selecionar os descritores mais importantes para sua discriminação (OLIVEIRA et al., 2014; VALENTE et al., 2011; TORRES, 2008; CRUZ, 2008; BAKKE et al., 2008).

Na escolha do tipo de análise a ser aplicada, deve-se levar em consideração que plantas superiores apresentam duas vias metabólicas capazes de sintetizar os precursores universais dos óleos essenciais, o isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (**Figura 1**). No citosol, IPP é gerado pela via do ácido mevalônico (MVA), e através da ação da enzima IPP-isomerase, pode originar DMAPP; ao passo que a síntese nos cloroplastos ocorre via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (DEWICK, 2009; BISWAS, 2009; PHILLIPS, 2008).

A síntese de ácido mevalônico a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA é catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR), etapa que regula esta via. A conversão de MVA em IPP ocorre por uma sequência de ações enzimáticas por MVA quinase; fosfomevalonato quinase; e pirofosfomevalonato descarboxilase. Os isoprenoides plastídicos são sintetizados pela via do metileritritol fosfato, também

conhecida como via não-MVA ou via de Rohmer. Nesta, há a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, originando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), seguida pelo rearranjo e pela redução para MEP, pela enzima DXP reduto-isomerase (DXR). Por uma série de reações subsequentes, IPP e DMAPP são originados como produtos finais (ENFISSI et al., 2005).

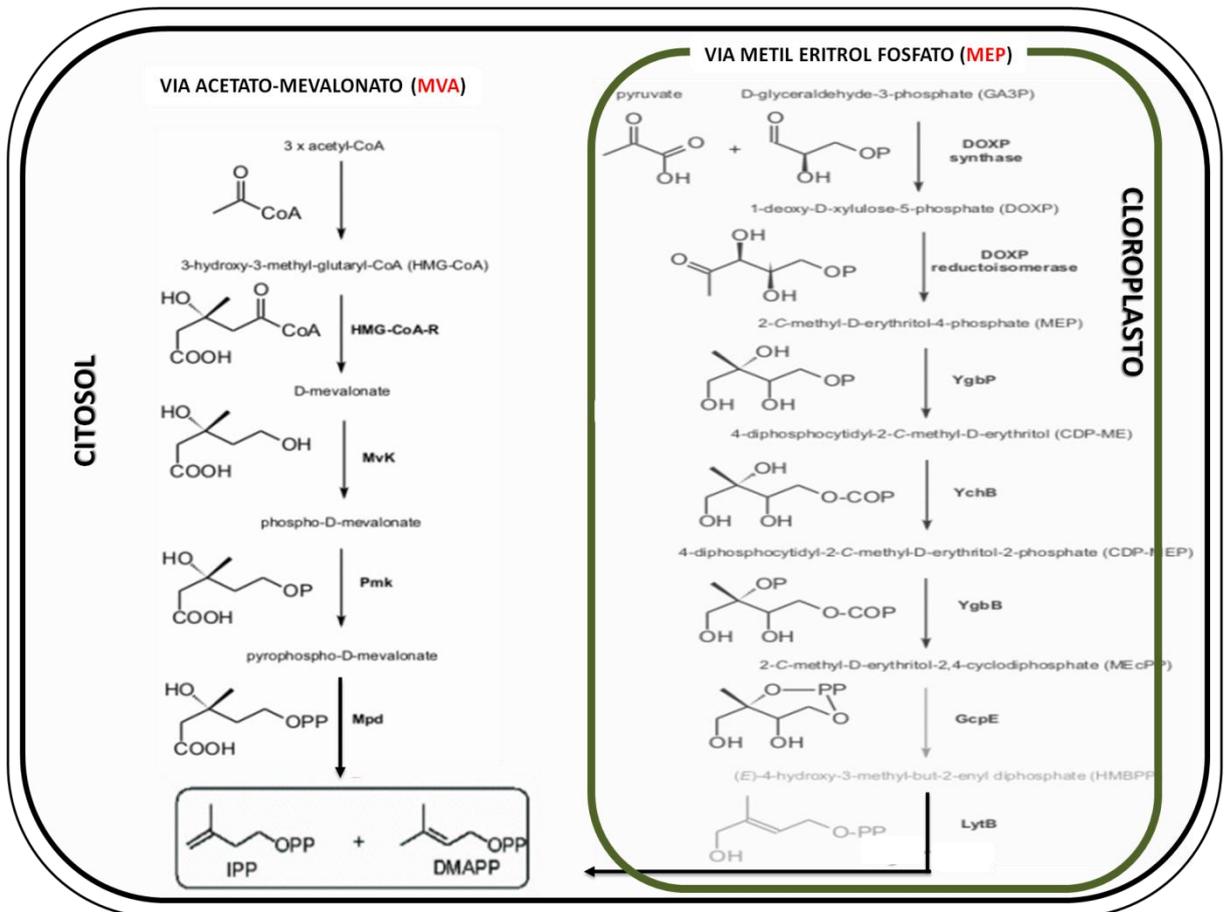


Figura 1. Esquema das duas vias possíveis para a síntese de IPP (isopentenil difosfato) e DMAPP (dimetilalil difosfato), mostrando a comunicação entre elas (adaptado de ROBERTS, 2007).

As primeiras pesquisas indicavam que o IPP sintetizado no citosol seria precursor do farnesil difosfato (FDP) para a síntese de sesquiterpenos (C15) e triterpenos (C30), da mesma forma que o IPP sintetizado nos cloroplastos seria precursor para o geranyl difosfato (GDP), utilizado na síntese de monoterpenos (C10), e geranylgeranyl difosfato (GGDP), utilizado na síntese de diterpenos (C20) e tetraterpenos (C40) (**Figura 2**). Porém, através do bloqueio das vias MVA e MEP por inibidores foi

demonstrado que a separação entre essas duas rotas é quase inexistente, uma vez que IPP e DMAPP sintetizados no citosol podem ser desviados para o metabolismo nos cloroplastos, e vice-versa (BISWAS et al., 2009).

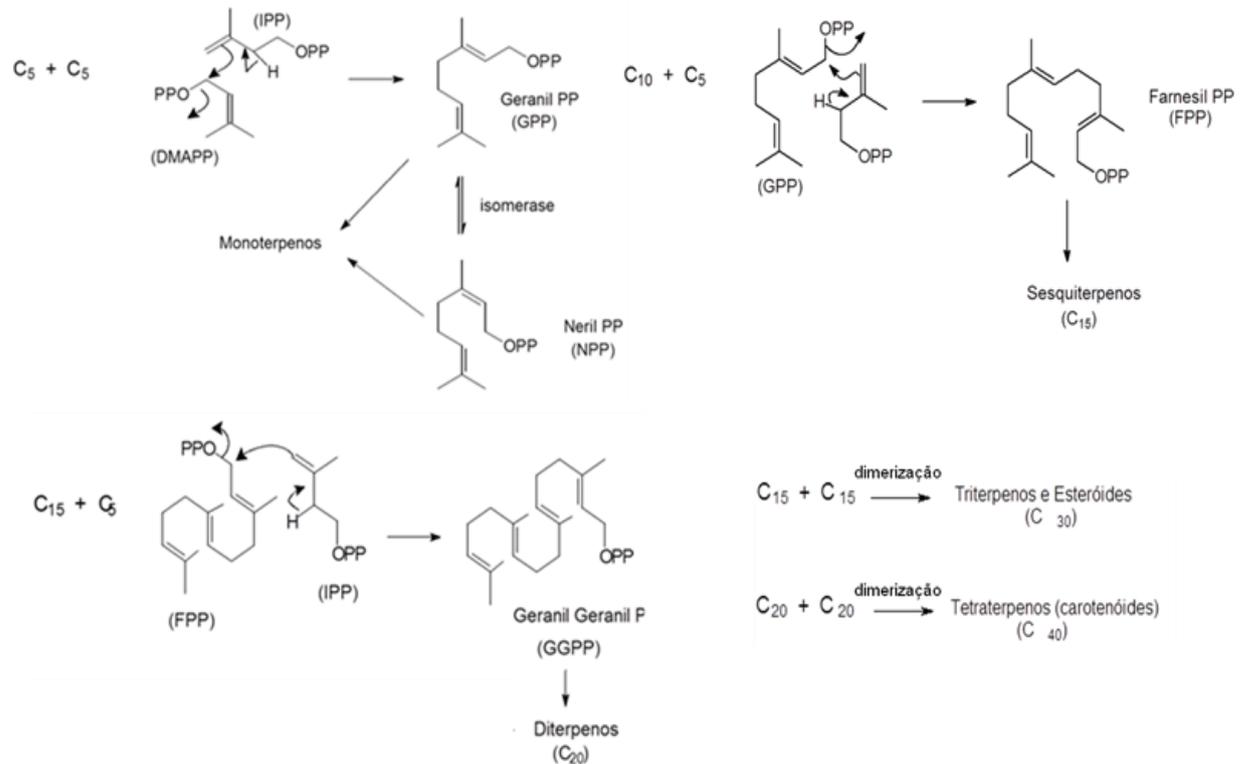


Figura 2. Proposta de reação para a biossíntese de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (Adaptado de GEISSMAN e CROUT, 1969).

Os óleos essenciais são derivados de unidades isoprênicas pentacarbonadas e classificados quanto ao número de unidades de isopreno em sua estrutura, sendo observados monoterpenos (2 unidades, 10C), sesquiterpenos (3 unidades, 15C), diterpenos (4 unidades, 20C), triterpenos (6 unidades, 30C) e carotenóides (8 unidades, 40C). Os esteróides são sintetizados a partir dos triterpenos. Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente o oxigênio é denominado terpenoide. Os óleos essenciais são constituídos principalmente por monoterpenos (90% dos óleos) e sesquiterpenos, assim seu perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze átomos de carbono (MARINHO, 2010).

Estas vias estão associadas entre si, o que normalmente geram compostos que estão correlacionados, neste caso, quando analisados estatisticamente geram funções de regressões diferentes que proporcionam bons ajustes para um mesmo conjunto de dados. Assim, os coeficientes de regressão estimados variam de uma amostra para outra quando as variáveis independentes estão altamente correlacionadas. Isso leva à informação imprecisa a respeito dos coeficientes verdadeiros, sendo esse fenômeno chamado de multicolinearidade (VALENTE et al., 2011).

3.2. Quimiometria

A Quimiometria, área da química que estuda a aplicação de métodos estatísticos multivariados. Entre as áreas de maior interesse em quimiometria está a resolução de sistemas multicomponentes. Uma série de métodos foi desenvolvida, visando à determinação do número de espécies presentes em misturas e a identificação dos padrões de similaridade e dissimilaridade existente entre elas (SCARMINIO et al., 1998).

A aplicabilidade de cada método depende da informação experimental disponível e do objetivo da análise e os problemas envolvendo sistemas multicomponentes podem ser classificados em três categorias: *sistemas brancos*, para os quais existe informação disponível sobre todas as espécies presentes; *sistemas cinzas*, para os quais a informação disponível é parcial; e *sistemas pretos*, para os quais não há qualquer informação disponível *a priori* sobre as espécies presentes.

Existe uma série de métodos bem conhecidos para a resolução de *sistemas brancos*, dos quais os principais são regressão linear múltipla (RLM), filtro de Kalman, método da matriz k, método da matriz p, regressão nas componentes principais (PCR, do inglês “principal component regression”) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, “partial least squares”) (ANDREW et al., 1999; MARTENS e NAES, 1989; BEEBE e KOWALSKI, 1987).

O método mais usado na resolução de *sistemas cinzas* é a análise de fatores por aniquilação do posto generalizada (GRAFA, “generalized rank annihilation factor analysis”). Para a resolução de *sistemas pretos*, podem ser citados: o método para análise de espectros correlacionados (DATAN, “data analysis”), a resolução de curvas por automodelagem (SMCR, “self-modeling curve resolution”), a análise de fatores (AF, “factor analysis”), a análise multivariada por automodelagem interativa (SIMPLISMA, “interactive self modeling multivariate analysis”), o método da projeção ortogonal (OPA, “orthogonal projection approach”), a análise de fatores por faixas usando um alvo teste (WTTFA, “window target-testing factor analysis”) e os métodos multidimensionais, tais como a análise paralela de fatores (PARAFAC, “parallel factor analysis”). Dentre os métodos citados acima os mais comuns são o AF e a PCR, ambos baseados na decomposição em componentes principais (CP) (SENA, 2000; LOHNES et al., 1999; SANCHEZ e KOWALSKI, 1988; MAEDER, 1987; WINDIG et al., 1987).

3.3. Análise de fatores

Inicialmente, é necessário diferenciar a AF da Análise de Componentes Principais (ACP). A AF e a ACP são duas técnicas que têm por objetivo reduzir um determinado número de itens a um menor número de variáveis. Ainda que haja uma significativa diferença entre essas duas técnicas de redução de dados, elas são, geralmente, utilizadas indiscriminadamente (WIDAMAN, 2007).

A ACP foi por muito tempo o método de redução de dados mais utilizado. Sua popularidade se deu, em grande medida, ao fato de que seus cálculos computacionais eram mais simples, e, portanto, mais rápidos e mais baratos, quando comparados à AF (COSTELLO & OSBOURNE, 2005). Devido ao seu amplo uso e ao fato de que ACP é, ainda hoje, o método padrão de redução de dados em muitos dos principais programas estatísticos, muitos pesquisadores erroneamente acreditam que ACP seja um tipo de AF (JOLLIFE, 2005).

As ACP geram componentes, enquanto as AF geram fatores. A diferença entre componentes e fatores está relacionada à forma como os itens são retidos. Ambos os métodos de redução de dados assumem que a variância de uma variável é composta por três aspectos: variância específica; variância comum; e variância de erro. A variância específica refere-se à porção de variância do item que não é compartilhada com nenhuma outra variável. A variância comum refere-se à variância que é compartilhada entre todos os itens que compõem determinado fator ou componente. A variância de erro refere-se à parcela do item não explicada pelo componente ou fator.

A ACP está baseada apenas na correlação linear das variáveis observadas, e não diferencia a variância comum da variância específica entre os itens. Quando os itens são retidos em um determinado componente, utilizando o método da ACP, os índices apresentados incluem tanto a variância comum quanto a variância específica. Já nas AF, apenas a variância comum (a parcela de variância que os itens compartilham entre si) é considerada. Uma vez que as AF têm por objetivo revelar construtos latentes que *explicam* a covariância entre os itens, as variâncias específicas (parcelas individuais dos itens) que não covariam entre si, não são consideradas.

Ao comparar os resultados de uma ACP com os resultados de uma AF, é possível perceber que, na ACP, os itens tendem a apresentar cargas fatoriais e comunalidades mais elevadas, e taxas de variância explicada infladas, quando comparadas a AF (WIDAMAN, 2007; COSTELLO & OSBOURNE, 2005). Isso ocorre porque a variância específica de cada item é considerada. Esses resultados, porém, são imprecisos quando se tem por objetivo compreender um construto latente que gera a covariância entre os itens (COSTELLO & OSBOURNE, 2005).

Devido ao fato de que a maioria dos estudos de quimiotipagem com óleos essenciais o interesse dos pesquisadores é observar um construto latente que melhor explique a inter-relação entre os compostos (YAPIA et al., 2014; STESEVIC et al., 2014; RADULOVIC e DEKIC, 2013; ROKBENI, 2013), o uso da ACP é

desaconselhado (COSTELO & OSBOURNE, 2005). Este fato está relacionado às vias biossintéticas dos óleos essenciais, que estão associadas entre si, o que normalmente gera compostos que estão correlacionados, neste caso, quando analisados estatisticamente geram funções de regressões diferentes que proporcionam bons ajustes para um mesmo conjunto de dados. Assim, os coeficientes de regressão estimados variam de uma amostra para outra quando as variáveis independentes estão altamente correlacionadas. Isso leva à informação imprecisa a respeito dos coeficientes verdadeiros, sendo esse fenômeno chamado de multicolinearidade (VALENTE et al., 2011).

A Multicolinearidade consiste em um problema comum em regressões, em que as variáveis independentes possuem relações lineares exatas ou aproximadamente exatas. O indício mais claro da existência da multicolinearidade é quando o R^2 é bastante alto, mas nenhum dos coeficientes da regressão é estatisticamente significativo segundo o teste t convencional. As consequências da multicolinearidade em regressão são a de erros padrão elevados no caso de multicolinearidade moderada ou severa e, até mesmo, a impossibilidade de qualquer estimação se a multicolinearidade for perfeita (GUJARATI, 2000).

Quando as variáveis independentes são correlacionadas, o coeficiente de regressão de uma variável independente depende de qual outra variável independente é incluída no modelo, pois adicionando ou deletando uma das variáveis independentes mudam-se os coeficientes de regressão. Assim, um coeficiente de regressão deixa de refletir os efeitos inerentes de particular variável independente sobre a variável dependente, mas reflete apenas efeito parcial (GUJARATI, 2000).

A Análise Fatorial é aplicada quando há um número grande de variáveis correlacionadas entre si (multicolineares). Consiste em identificar um número menor de novas variáveis alternativas, não correlacionadas e que, de algum modo, resumem as informações principais das variáveis originais encontrando os fatores ou variáveis latentes através das relações de covariância entre as variáveis, eliminando assim problemas de multicolinearidade e tornando os resultados mais

confiáveis (BAKKE et al., 2008; BELFIORE et al., 2006). Assim, obtém-se como resultado grupos com todas as variáveis altamente correlacionadas entre si, mas com baixas correlações com variáveis de um grupo diferente. Logo, cada grupo de novas variáveis representam um único constructo ou fator ou “supercaracterística”, que é responsável pelas correlações observadas (BOMFIM et al., 2011; DAMÁSIO, 2011; BELFIORE et al., 2006; MINGOTI, 2005; HAIR JUNIOR et al., 2005; NOVAES, 2004).

O modelo estatístico usado na análise fatorial explica a estrutura de correlação entre as características e é diretamente observado por meio de combinação linear de variáveis, as quais não são diretamente verificadas, denominadas fatores comuns, acrescidas de componente residual (VALENTE et al., 2011). Um modelo de análise fatorial pode ser apresentado na forma matricial:

$$X = \alpha F + \varepsilon$$

Em que:

X = o p -dimensional vetor transposto das variáveis observadas (características), denotado por $(Y' = y_1, y_2, \dots, y_k)$;

α = uma matriz (p, k) tal que cada elemento expressa α_{ij} a correlação entre o volume y_{ij} e o fator f_j , sendo Λ denominado matriz de cargas fatoriais com o número k de fatores menor que o número p de variáveis;

F = o q -dimensional vetor transposto de variáveis não observáveis ou variáveis latentes chamadas de fatores comuns, denotado por $F = (f_1, f_2, \dots, f_k)$, sendo $k < p$; e

ε = o p -dimensional vetor transposto de variáveis aleatórias ou fatores únicos, ou seja, vetor de componentes residuais, denotado por: $\varepsilon' = (e_1, e_2, \dots, e_k)$.

No modelo de análise fatorial, pressupõe-se que os fatores específicos são ortogonais entre si e com todos os fatores comuns. Normalmente $E(E) = E(F) = 0$ e $Cov(E, F) = 0$.

De certa maneira, os escores dos fatores obtidos na AF definem a similaridade entre objetos considerando as proporções entre eles. Ela procura os objetos mais distintos na matriz de dados, os quais são equivalentes aos compostos presentes ou aos vértices de um simplex. Os demais objetos deverão ser combinações lineares deste primeiro. O número mínimo de vértices ou membros terminais é determinado pela aproximação da matriz original por uma matriz de ordem menor, definindo, assim, o número de vetores linearmente independentes e a dimensionalidade do sistema. A composição de cada objeto é obtida por uma análise de autovetores, feita sobre uma matriz real e simétrica, a qual é obtida a partir da matriz de dados originais (HAIR et al., 2005; SANTANA, 2005).

Após a etapa anterior, é necessária a interpretação dos fatores obtidos. Entretanto, a matriz obtida na AF é apenas uma possibilidade dentro de uma infinidade de matrizes matematicamente equivalentes. Os eixos dos fatores precisam, portanto, ser rotacionados, buscando uma matriz que tenha significado adequado para a interpretação dos resultados. A rotação varimax gira rigidamente os eixos dos fatores, de modo que eles se aproximem o máximo dos vetores mais divergentes no espaço q-dimensional. O procedimento da rotação varimax maximiza a variância dos pesos dos fatores em cada vetor, sob a restrição de que os fatores permaneçam ortogonais. A matriz é rodada, produzindo uma nova matriz, F ,

$$\mathbf{F} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{R}$$

Onde $\mathbf{R}_{(q \times q)}$ é a matriz de rotação e $\mathbf{F}_{(n \times q)}$ é a matriz dos pesos dos fatores varimax. Cada linha de \mathbf{F} corresponde a um objeto e cada coluna de \mathbf{F} , a um fator.

Assim, os escores fatoriais podem ser utilizados posteriormente para construção de gráficos, diagramas, indicadores, como variáveis-resposta ou explicativas (MALHOTRA, 2001; JÖRESKOG et al., 1976). No contexto, de forma explicativa, pois os novos grupos de variáveis representam um único constructo ou fator ou “supercaracterística”, que é responsável pelas correlações observadas (DAMÁSIO, 2012; BOMFIM et al., 2011; MINGOTI, 2005; HAIR JUNIOR et al., 2005; NOVAES, 2004). Sendo assim, é possível avaliar a divergência entre genótipos, definir agrupamentos de genótipos semelhantes (quimiotipos) e as substâncias ou descritores mais importantes para a sua discriminação (marcadores químicos) com a eliminação dos problemas de multicolinearidade, tornando os resultados confiáveis.

CAPÍTULO 1

Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de *Psidium guajava*

Tércio da Silva de Souza^{1*}; Marcia Flores da Silva Ferreira²; Luciano Menini¹;
Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima Souza¹; Luciana Parreira³; Adésio
Ferreira⁴

¹ Laboratório de Química Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, Rua Principal S/N, Distrito de Rive – CEP: 29.500-000, Alegre – ES, Brasil;

² Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário s/n – Caixa Postal 16 – CEP 29500-000 – Alegre – ES, Brasil;

³ Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário s/n – Caixa Postal 16 – CEP 29500-000 – Alegre – ES, Brasil.

⁴ Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário s/n – Caixa Postal 16 – CEP 29500-000 – Alegre – ES, Brasil;

*Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: tssouza@ifes.edu.br; Tel.: +55-35-52-81-31, R.279; +55-35-52-82-34

Resumo: Óleos essenciais de folhas de 22 genótipos de *P. guajava* provenientes de plantios experimentais em diferentes ambientes, localizados no Espírito Santo – Brasil, foram extraídos por hidrodestilação e caracterizados por análise de GC-FID-MS. O rendimento médio de extração foi de 0,4% (m/m) e dezesseis compostos voláteis foram identificados como majoritários. Para os genótipos comerciais PAL, P.S, SEC, ROX e PET predominaram os compostos (E) trans-Caryophyllene, alpha-Selinene, Caryophyllene oxide, Hinesol, 14-hydroxy-9-epi-(E)-Caryophyllene e para os genótipos Cortibel C1-C17: limonene, (E) trans-Caryophyllene, alpha-Humulene, beta-Bisabolene, trans-Nerolidol, beta-Bisabolol, alpha-Bisabolol. As diferentes condições ambientais exerceram influência na variabilidade do perfil cromatográfico do óleo essencial, sendo mais expressivas nos genótipos C7, C13 e C17 e menos nos genótipos C1, C5, C16 e PET. Os teores de (E) trans-Caryophyllene nos genótipos C10, C13 e SEC; alpha-Humulene nos genótipos C3 e C6 e beta-Bisabolol nos genótipos C2, C8, C12, C15 e C16 apresentaram elevados teores e não foram influenciados pelas condições ambientais. Estes compostos possuem atividades biológicas testadas, podendo ser utilizados em programas de

melhoramento nos processo de seleção e cruzamento para a agregação de valor à cultura.

Palavras-chave: variabilidade quimiotípica; melhoramento vegetal; compostos bioativos.

Abstract: Essential oils from leaves of 22 genotypes *P.guajava* collected in an experimental plantations of different environments, located in Espírito Santo - Brazil, were extracted by hydrodistillation and characterized through analysis of FID-GC-MS. The average extraction yield was 0.4% (w/w). Sixteen volatile compounds have been identified as major. In the commercial genotypes (PAL, PS, SEC, ROX and PET) the predominant compounds were: (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Selinene, Caryophyllene oxide, Hinesol, 14-hydroxy-9-*epi*-(*E*)-Caryophyllene, in the Cortibel genotypes (C1-C17) predominate Limonene, (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *beta*-Bisabolene, *trans*-Nerolidol, *beta* and *alpha*-Bisabolol. It was observed variations in the chromatographic profile of essential oil between environments, being more expressive in genotypes C7, C13 and C17 and less in genotypes C1, C5, C16 and PET. The different environmental conditions exerted influence in the variability of the chromatographic profile of the essential oil, being more expressive in the genotypes C7, C13 and C17 and less expressive in C1, C5, C16 and PET. The genotypes C10, C13 and SEC showed high levels of (*E*)-*trans*-Caryophyllene, C3 and C6 of *alpha*-Humulene, C2, C8, C12, C15 and C16 of *beta*-Bisabolol, compounds that showed little influence of environmental conditions and have biological activity proven, which makes it feasible to use these genotypes in breeding programs, in the selection and crossing processes.

Keywords: chemotypes variability; plant improvement; bioactive compounds.

1. Introdução

Estudos etnofarmacológicos mostram a espécie *Psidium guajava* L. pertencente à família *Myrtaceae*, sendo utilizada para fins medicinais em muitas partes do mundo.

Na medicina popular suas folhas são utilizadas na forma *in natura* e no preparo de decocções, chás e banhos [1, 2]. A espécie está entre as principais plantas medicinais de interesse ao Brasil [3], devido à presença de uma gama de compostos bioativos com diversas propriedades biológicas como: anti-inflamatória [4], anticonvulsivante, analgésica, antidiarreica, antidiabéticas, hipoglicêmica e anti-hiperlipidêmicas [2], inseticida [5], antimicrobiana [2-6], antitosse [2], antifúngica [8], anticestodal [9] e antioxidante [10].

Grande parte das propriedades biológicas da *P. guajava* está relacionada ao óleo essencial [11, 12], que geralmente é considerado como quimiotipo único para a espécie. Entretanto, deve-se considerar a existência de variabilidade quimiotípica causada por fatores genéticos, ambientais e fisiológicos [13-15]. A literatura apresenta relatos de diferentes perfis cromatográficos para o óleo essencial de *P. guajava*, o que pressupõe a existência de variabilidade quimiotípica para a espécie [16-22].

As variações químicas causadas por fatores genéticos contribuem de forma determinante para a ocorrência de variabilidade química na espécie. As causadas por fatores fisiológicos e ambientais afetam de forma qualitativa e quantitativa a composição do óleo essencial de acordo com fatores climáticos, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade e ciclo circadiano [13-15]. O conhecimento da variabilidade quimiotípica direciona o seu uso, material vegetal na indústria química para fins de química fina, aplicações farmacológicas e agrônômicas, requerem caracterização e identificação de quimiotipos [23-25] e orienta programas de domesticação, melhoramento genético [26, 27], pois permite a identificação e seleção de genótipos para diferentes fins e as condições ambientais mais favoráveis para produção agrônômica de frutos e a exploração do óleo essencial, que agregam valor à cultura e a torna mais sustentável.

Este trabalho teve por objetivo identificar a composição química e o perfil cromatográfico do óleo essencial extraído de folhas de 22 genótipos *P. guajava* cultivados em dois ambientes, visando o conhecimento da variabilidade quimiotípica existente na espécie.

2. Material e Métodos

2.1. *Material Vegetal, Coleta e Preparação.*

Foram avaliados 22 genótipos de *P. guajava*, dos quais 17 são seleções de pomar de polinização cruzada em pomar no Espírito Santo, denominados de Cortibel (C1 a C17) e cinco são genótipos comerciais: Paluma (PAL), Pedro Sato (PS), Século XXI (SEC), Roxa (ROX) e a variedade Petri (PET). As plantas foram cultivadas em dois ambientes, com tratos culturais para a produção de frutos. Um no sul do Estado do Espírito Santo - Comunidade Rural da Palmeira (Mimoso do Sul) na latitude de 21° 01' 12,99" S, longitude 41° 17' 13,48" W e altitude 250 metros e outro no norte do Estado Espírito Santo - Fazenda de Produção da FruCafé (Sooretama) na latitude de 19° 23' 27" S, longitude 41° 04' 17" W e altitude 30 metros. O delineamento experimental adotado em cada ambiente foi em blocos ao acaso, com quatro repetições e duas plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi de 6m X 4m entre plantas.

As coletas das folhas para extração dos óleos essenciais dos 22 genótipos foram realizadas durante a primeira poda de produção, plantas com 2 anos, nos dias 15/06/2013 em Linhares e 21/06/2013 em Mimoso do Sul entre 7:00 e 9:00 horas. Foram coletadas cerca de duzentas folhas de cada uma das duas plantas da parcela nas quatro repetições para cada genótipo. A coleta foi realizada na altura do peito (1,3 m) e ao redor do diâmetro da copa. O material foi acondicionado em sacos de papel, identificado e transportado para o Laboratório de Química Aplicada do Ifes – Campus de Alegre. A secagem do material vegetal foi realizada na temperatura ambiente, à sombra, por uma semana para eliminação de umidade e estabilização do conteúdo enzimático. As folhas secas foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos selados e armazenadas em freezer a -20 °C até a extração do óleo essencial, totalizando 176 amostras.

2.2. *Extração do Óleo essencial*

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger de acordo com metodologia recomendada pela Farmacopeia brasileira [28], 100 g das folhas secas foram destiladas com 500 mL de água por 4 horas. O hidrolato foi coletado e submetido à centrifugação a 5200 G por 10 minutos. Após centrifugação, o óleo foi retirado com auxílio de micropipeta. O rendimento de extração foi determinado em triplicata para cada genótipo em todas as repetições experimentais com os resultados expressos em % (m/m). Os óleos essenciais extraídos foram armazenados em frasco protegidos da luz à temperatura de 0 °C para análises posteriores [29, 30].

2.3. Quantificação e Caracterização do Óleo Essencial

As amostras do óleo essencial foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (Shimadzu GC/MS-2010). Foram empregadas em ambas as análises as seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária RTX-5MS (0,25 µm de espessura do filme); N₂ (em análise de GC/FID) ou He (em análises de CG/MS) como gás de arraste com fluxo de 3,0 mL.min⁻¹, a temperatura do forno seguiu a programação em que permanece por 1 minuto a uma temperatura inicial de 60 °C e em seguida aumenta gradativamente 5 °C.min⁻¹ até atingir 220 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos; temperatura do injetor de 240 °C; temperatura do detector de 240 °C; razão de split de 1:30. Foi injetado um volume de 1,0 µL de uma solução de 3 % de óleo essencial dissolvido em hexano com DMA 0,1 mol.L⁻¹ (padrão externo para controle da reprodutibilidade) para as análises de GC/FID e em diclorometano para as análises de CG/MS. As análises por GC/MS foram realizadas em um equipamento operando por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/segundo e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z).

A identificação dos componentes foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados de espectroscopia (Wiley Registry of Mass Spectral Data) e NIST e pelos índices de Retenção de Kováts (IR). Para o cálculo dos IR, foi utilizada uma mistura de alcanos lineares C₇-C₂₀ (Sigma-USA). O IR calculado para cada composto foi comparado com os valores da literatura [31,32].

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral de seus respectivos picos e a área total de todos os constituintes da amostra e a garantia da reprodutibilidade de injeção (GC-FID) foi monitorada por adição de padrão externo DMA (0,1 mol.L⁻¹) – RT = 4,19 min, sendo considerado os compostos com área relativa acima de 5% de identificação do perfil cromatográfico e acima da 10% para a definição de compostos majoritários.

2.4. Análise Estatística de Dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias indicadas pelo teste F, sendo consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$. Médias diferentes foram testadas pelo teste de Scott & Knott, para $p < 0,05$, sendo considerados os resultados referentes ao pareamento de genótipos semelhantes para a comparação entre os ambientes; Ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso - M); Todos os resultados foram expressos pela média, calculadas pelo programa R [33].

3. Resultados e Discussão

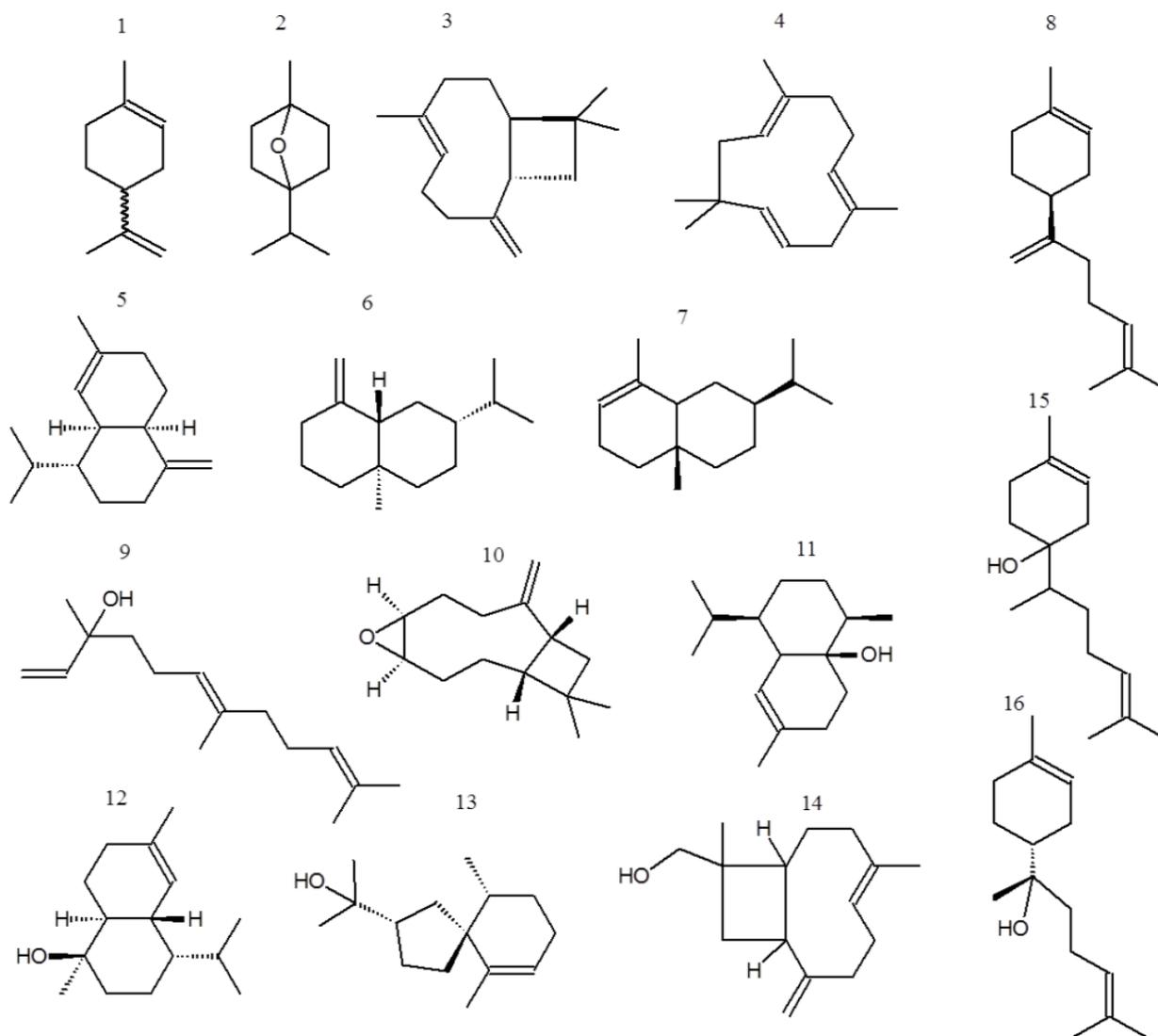
3.1. Composição Química

As análises de Cromatografia Gasosa (GC/FID) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS) permitiram a identificação de um total de 33 compostos presentes no óleo essencial obtidos das folhas dos 22 genótipos de

P.guajava nos dois ambientes estudados: Linhares/ES (L) e Mimoso do Sul/ES (M). Foram considerados majoritários 16 compostos voláteis que apresentaram área relativa obtida por normalização, sem fator de correção, acima de 5% (**Tabela 1** e **Figura 1**).

O rendimento de extração do óleo essencial (**Tabela 2**) dos genótipos variou de 0,17 a 0,54% em Mimoso do Sul/ES e de 0,22 a 0,56% em Linhares/ES (m/m, com base em biomassa seca), com destaque para os genótipos C6, C7, C11 e PAL que apresentaram maiores rendimentos em ambos os ambientes. Enquanto que os genótipos de C10 e C13 apresentaram os menores rendimentos. Os valores encontrados em média estão próximos aos descritos para genótipos de *P.guajava* da Tunísia que foram de 0,5% m/m [34].

A espécie apresenta em média bom potencial para produção de óleo essencial, principalmente para os genótipos que apresentaram maiores rendimentos de extração, que aliado à grande capacidade de produção de biomassa e ao manejo agrônômico de podas periódicas [35], possibilitam a agregação de valor econômico à cultura com a sua exploração.



1) Limonene; **2)** Eucalyptol; **3)** (E)-trans-Caryophyllene; **4)** alpha-Humulene; **5)** gamma-Muurolene; **6)** beta-Selinene; **7)** alpha-Selinene; **8)** beta-Bisabolene; **9)** trans-Nerolidol; **10)** Caryophyllene oxide; **11)** epi-beta-Cubenol; **12)** epi-alpha-Cadinol; **13)** Hinesol; **14)** 14-hydroxy-9-epi-(E)-Caryophyllene; **15)** beta-Bisabolol; **16)** alfa-Bisabolol.

Figura 1. Fórmulas estruturais dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*.

Tabela 1. Identificação dos compostos majoritários do óleo essencial de 22 genótipos de *Psidium guajava* cultivados em dois ambientes (Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES) por IR e CG-MS.

n	Compostos	RT	IRCal	IRTab	m/z (Intensity Relative)
1	Limonene	7.906	1031	1029	M+ = 136; 121(23); 107(22); 93(72); 67(72); 41(18); 68(100)
2	Eucalyptol	7.993	1035	1031	M+ = 154; 139 (35); 108 (53); 81 (65); 43 (100)
3	(E)-trans-Caryophyllene	18.672	1420	1418	M+ = 204; 189(19); 133(89); 69(87); 41(76); 93(100)
4	α -Humulene	19.518	1454	1452	M+ = 204; 147(23); 121(25); 80(32); 93(100)
5	γ -Muuroolene	20.156	1479	1478	M+ = 204; 161 (13); 134 (16); 105 (39); 93 (59); 79 (19); 119 (100)
6	β -Selinene	20.341	1486	1486	M+ = 204; 189 (44); 161 (63); 121 (61); 93 (96); 79 (71); 41 (49); 105 (100)
7	α -Selinene	20.546	1495	1494	M+ = 204; 161 (55); 133 (79); 107 (78); 93 (87); 81 (62); 41 (39); 189 (100)
8	β -Bisabolene	20.802	1506	1506	M+ = 204; 161 (26); 119 (36); 109 (33); 93 (95); 41 (65); 69 (100)
9	trans-Nerolidol	22.071	1560	1561	161 (24); 136 (27); 107 (43); 93 (71); 41 (62); 69 (100)
10	Caryophyllene oxide	22.686	1585	1583	161 (36); 121 (46); 109 (64); 93 (81); 79 (75); 55 (48); 43 (100)
11	epi- β -Cubenol	23.750	1633	1635	M+ = 222; 204 (22); 161 (23); 105 (30); 93 (42); 59 (25); 119 (100)
12	epi- α -Cadinol	23.824	1637	1638	200 (21); 157 (20); 135 (98); 132 (43); 91 (39); 69 (37); 43 (100)
13	Hinesol	23.935	1642	1643	204 (52); 134 (17); 119 (26); 105 (36); 95 (45); 81 (32); 59 (13); 161 (100)
14	14-hydroxy-9-epi-(E)-Caryophyllene	24.383	1661	1660	204 (70); 189 (47); 161 (53); 135 (77); 95 (64); 43 (99); 81 (100)
15	β -Bisabolol	24.632	1672	1671	M+ = 222; 204 (20); 119 (43); 111 (44); 93 (67); 69 (43); 82 (100)
16	α -Bisabolol	24.933	1685	1685	M+ = 222; 204 (20); 109 (15); 93 (67); 69 (43); 43 (27); 119 (100)

RT (Tempo de Retenção – minutos); IRcal (Índice de Retenção Calculado); IRtab (Índice de Retenção Tabelado) e m/z (relação massa/carga e intensidade relativa).

3.2. Perfil cromatográfico do óleo essencial

O perfil cromatográfico para o óleo essencial de *P.guajava* foi obtido para os 22 genótipos nos dois ambientes Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES, foram considerados compostos majoritários para fins de estudo de perfil cromatográfico os que apresentaram área relativa obtida por normalização da área, sem fator de correção, acima de 5% (**Figura 2 e 3**).

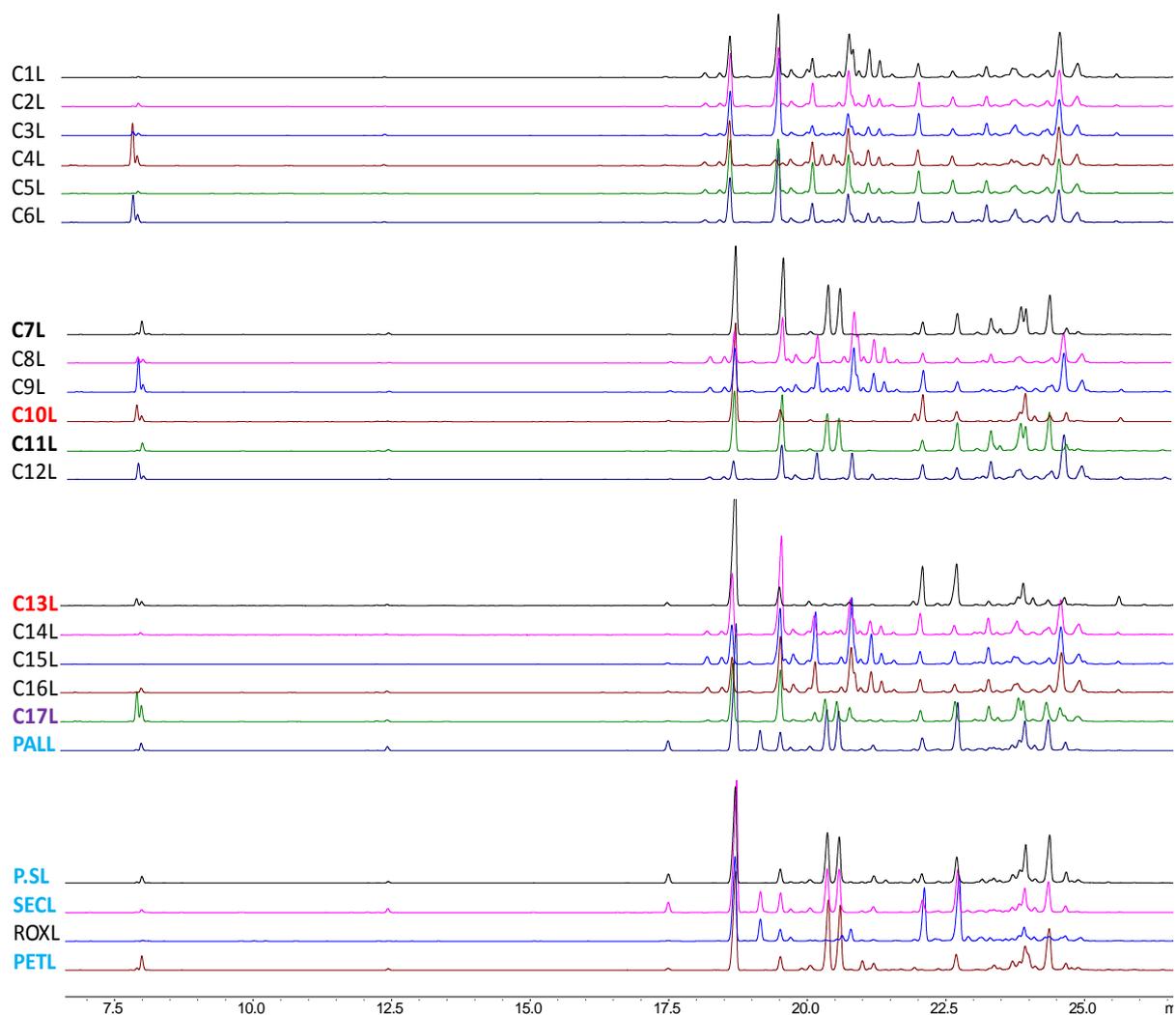


Figura 2. Perfil cromatográfico do óleo essencial de 22 genótipos de *Psidium guajava* cultivados em Linhares/ES (L).

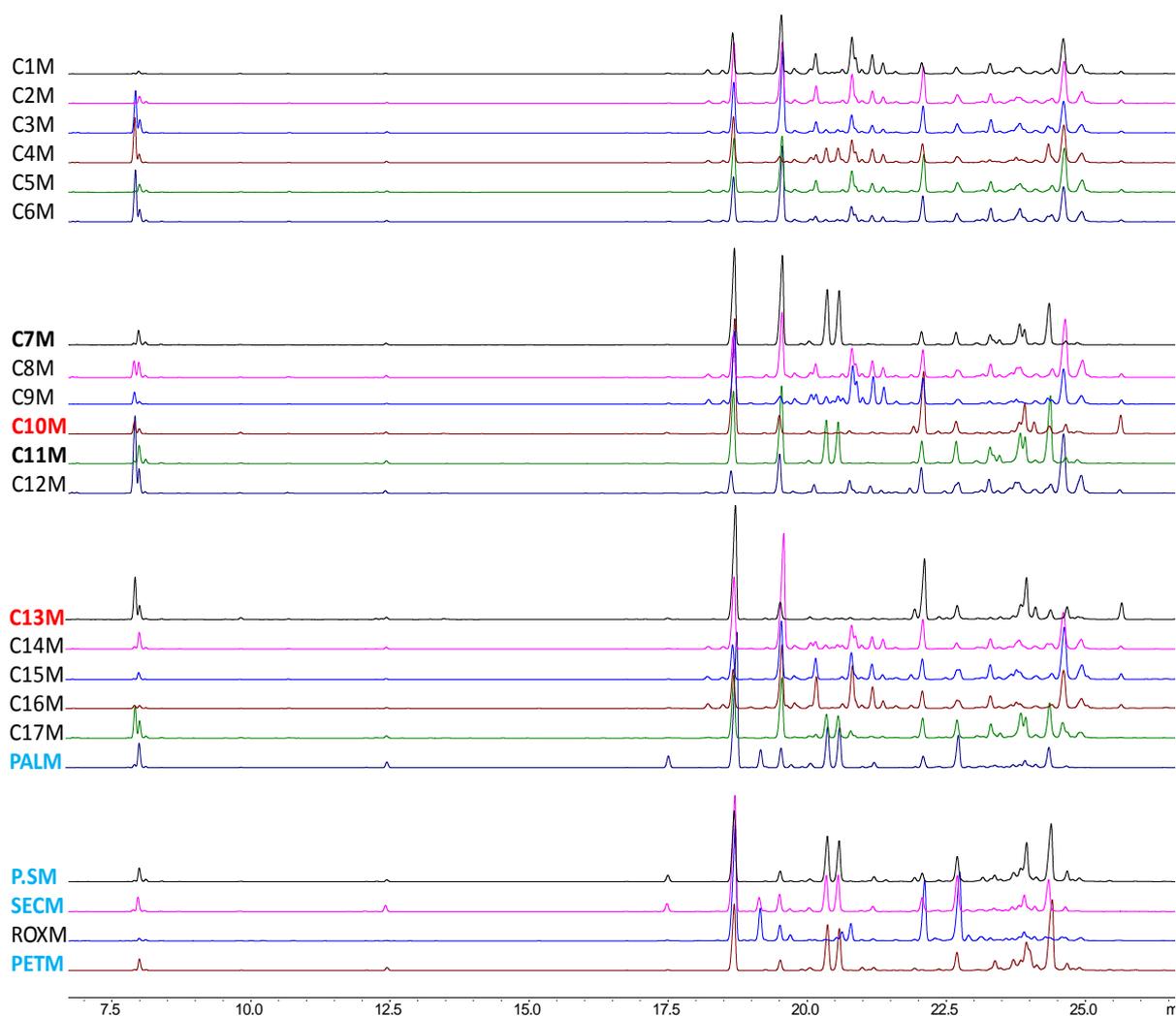


Figura 3. Perfil cromatográfico do óleo essencial de 22 genótipos de *Psidium guajava* cultivados em Mimoso do Sul/ES (M).

Os dezesseis compostos majoritários identificados em média totalizam de 70 a 90% da composição do óleo essencial das folhas dos genótipos estudados. Destes, a fração principal (80-99%), foi constituída pelas famílias químicas de sesquiterpenos. Os teores de monoterpenos observados foram relativamente baixos (0-7%), com exceção dos genótipos C4, C6, C9, C12 e C17, que apresentaram os maiores teores de monoterpenos hidrocarbonetos (6-16%) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Composição química em percentual de área relativa do óleo essencial de 22 genótipos de *Psidium guajava* cultivados em dois ambientes (Linhares = L e Mimoso do Sul = M), considerando os 16 compostos majoritários (Área Relativa > 5%).

COMPOSTOS	A	GENÓTIPOS																					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	PAL	P.S	SEC	ROX	PET
Limonene	L	0.1	—	0.8*	11.6	—	6.6*	0.2	2.0	9.7	4.5	0.3	11.0	3.3*	0.3	—	—	9.4*	—	—	0.2	—	0.5
	M	—	—	5.3*	11.6	—	8.9*	0.1	1.9	8.8	2.3	0.2	11.7	7.6*	0.3	—	—	5.5*	0.7	—	0.3	—	—
Eucalyptol	L	0.4	2.1*	0.5*	2.8*	2.0*	1.8*	2.8*	1.8	1.9	2.3	3.4	2.9	1.9*	2.6	0.7	1.0	3.1	1.3*	1.3*	2.3*	0.1	4.5*
	M	1.1	0.9*	1.7*	2.0*	1.0*	2.3*	1.7*	1.8	2.0	1.0	2.3	3.1	2.7*	2.8	0.7	1.1	2.6	5.3*	2.3*	3.6*	0.3	1.9*
(E)-trans-Caryophyllene	L	8.5	12.2	11.3	9.7*	11.8	10.4	15.1*	6.0	9.8*	32.3	11.5	4.3	28.3	10.0*	5.1	7.1	9.4*	24.1*	18.6	26.9	22.2*	17.1
	M	9.9	15.7	13.4	12.1*	15.8	10.5	19.7*	8.0	13.2*	32.2	16.1	5.1	25.6	12.6*	8.2	7.2	15.3*	27.4*	22.4	29.5	30.0*	18.6
α-Humulene	L	14.1*	14.0*	21.4	1.8	13.5*	19.1	13.7*	10.9*	1.7	4.0	11.5*	8.1	4.7	19.9*	11.8*	13.4	10.3*	2.9	2.5	3.1	2.7	2.2
	M	17.3*	17.1*	23.5	2.0	17.5*	19.1	18.6*	14.8*	1.9	4.7	16.1*	9.0	4.5	24.4*	15.5*	13.9	15.2*	3.3	2.9	3.5	3.5	2.6
γ-Murolene	L	4.4	3.1	2.5	3.3	3.9	1.7	—	3.8	4.4	—	—	3.3*	—	1.9	5.4	4.9	2.1	—	—	—	—	—
	M	6.4	3.5	2.9	2.4	3.5	1.5	—	3.1	2.8	—	—	1.6*	—	1.4	5.0	5.7	1.6	—	—	—	—	—
β-Selinene	L	—	—	0.6	2.2	—	0.5	8.6*	—	0.8*	—	2.5	—	0.7	0.5	—	—	2.7*	6.9	10.3*	7.6	0.5	12.8
	M	0.5	—	0.8	4.0	—	0.6	10.9*	—	1.3*	0.5	9.1	—	0.5	0.8	—	—	5.4*	7.5	13.3*	8.3	0.5	13.2
α-Selinene	L	—	—	0.6	2.3*	—	0.5	7.7*	—	0.7	—	6.5	—	0.6	0.5	—	—	2.1*	6.6	9.2*	7.2	0.3	11.2
	M	0.4	—	0.8	4.5*	—	0.6	10.3*	—	1.3	—	8.6	—	—	0.8	—	—	4.6*	7.1	12.4*	8.2	0.6	12.4
β-Bisabolene	L	9.7	9.0	5.9	6.0	7.5	5.4	—	8.7	8.8	—	—	4.3*	1.2*	4.9	9.5	8.7	4.1*	—	—	—	2.3	—
	M	9.7	8.6	6.5	4.6	8.4	3.9	—	7.2	7.4	1.0	—	—	4.6*	4.3	7.1	9.2	3.1*	—	—	—	3.4	—
trans-Nerolidol	L	3.2	7.5	6.0*	5.2	7.2	5.8	2.5	4.4*	6.8	13.6*	3.2	5.0	13.7*	6.2	4.3	4.3	4.2	3.1	2.1	2.8	11.2	—
	M	3.2	7.8	0.5*	4.9	8.4	6.3	3.3	5.2*	7.5	16.8*	3.7	5.8	19.9*	6.6	5.0	5.1	4.1	3.7	1.9	3.6	12.0	—
Caryophyllene oxide	L	1.8	2.7	2.5	2.7	3.1	2.5	6.1	1.8	2.6	4.6	7.8*	2.7	7.2*	2.7	2.9*	2.3	4.3	13.4	7.2*	11.7*	20.9*	4.5
	M	2.8	2.6	2.7	2.5	2.9	2.8	3.3	2.4	2.7	3.8	4.4*	3.7	3.1*	2.4	4.6*	3.4	3.6	11.6	4.7*	9.5*	18.1*	3.8
epi-β-Cubenol	L	2.4	—	—	2.2*	—	—	—	—	2.3	—	—	7.1*	—	6.9*	3.1	3.1	—	—	—	—	—	—
	M	4.3	1.6*	—	1.6*	—	—	—	2.2*	1.8	—	—	2.7*	—	4.6*	3.4	3.4	—	2.3*	—	—	—	—
epi-α-Cadinol	L	3.0*	5.3	7.1	2.2	5.6	6.4	10.9*	5.6*	2.2	4.6	12.0*	—	4.3	1.1*	3.0	3.1	7.6	3.1*	3.8	2.7	2.5	2.8
	M	—	2.9	4.5	1.4	3.9	5.3	6.4*	3.2*	1.8	3.4	5.8*	3.8*	3.7	—	2.5	1.7	6.2	—	2.5	1.7	1.3	2.4
Hinesol	L	—	—	—	—	—	—	7.0*	—	—	12.4*	7.7	—	10.0*	—	—	—	3.2	9.2	10.9	8.2	8.0*	11.5
	M	—	—	0.9	—	—	1.1	3.6*	—	—	8.1*	7.7	—	8.6*	1.0	—	—	3.9	6.4	7.0	5.0	4.0*	10.0
14-hydroxy-9-epi-(E)-Caryophyllene	L	2.8	3.0	3.5*	1.7	3.4	—	11.4	3.4	4.3	3.2*	13.7	4.7	3.0	3.3	3.3	3.2	—	9.3*	14.4	8.2*	4.0*	14.7*
	M	2.0	2.1	1.5*	—	2.1	2.1*	12.5	2.8	1.9	—	14.0	4.0	2.3	1.6	2.3	2.5	—	—	14.4	—	1.3*	19.3*
β-Bisabolol	L	14.5	15.3	13.1*	16.8*	14.7	12.2	2.2	16.3	16.9*	4.0	2.3	19.4	4.1	13.5	16.1	16.1	10.3*	2.6	3.1	2.2	3.1	2.4
	M	13.1	13.2	9.7*	13.2*	13.8	11.9	1.1	16.4	14.6*	2.8	1.5	20.1	2.8	11.4	17.2	16.6	5.8*	1.6	1.8	1.2	2.1	1.7
α-Bisabolol	L	4.7	5.5	5.0	5.8	5.5	4.7	1.3	6.4	6.0*	1.1	1.3	7.3	1.2	5.2	5.6	5.6	5.1*	0.5	1.2	0.5	2.1	1.1
	M	4.3	4.6	3.7	4.6	4.6	4.6	0.8	5.9	4.9*	1.4	1.0	7.9	1.7	4.4	5.7	5.5	2.9*	—	0.9	—	1.2	1.0

Tabela 2 (cont.)

Total identificado	L	69.5	79.8	80.9	76.1	78.1	77.6	89.5	71.1	79.0	86.7	83.6	80.3	84.4	79.6	70.8	72.6	77.8	83.0	84.5	83.5	79.9	85.4
	M	75.0	80.6	78.4	71.4	81.9	81.4	92.3	74.7	73.6	77.9	90.5	78.6	87.5	79.5	77.1	75.2	79.9	76.9	86.6	74.5	78.4	86.9
Monoterpenos hidrocarbonetos	L	0.1	—	0.9	15.2	—	8.5	0.3	2.8	12.3	5.2	0.4	13.7	3.9	0.4	—	—	12.0	—	—	0.3	—	0.6
	M	—	—	6.7	16.2	—	10.9	0.2	2.6	11.9	2.9	0.2	14.9	8.7	0.4	—	—	6.9	0.9	—	0.4	—	—
Monoterpenos Oxigenados	L	0.6	2.7	0.7	3.7	2.6	2.3	3.1	2.5	2.5	2.7	4.0	3.6	2.3	3.3	1.0	1.3	4.0	1.5	1.6	2.7	0.1	5.3
	M	1.5	1.1	2.2	2.8	1.2	2.9	1.9	2.4	2.7	1.3	2.6	4.0	3.0	3.5	0.9	1.5	3.3	6.9	2.7	4.8	0.4	2.2
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	L	52.7	48.1	52.3	33.2	47.0	48.3	50.4	41.3	33.3	41.9	38.1	25.1	42.1	47.5	45.0	46.9	39.4	48.8	48.0	53.8	35.1	50.8
	M	59.0	55.8	61.1	41.5	55.2	44.3	64.5	44.2	37.8	49.2	55.0	20.0	40.3	55.8	46.5	47.8	56.5	59.0	58.9	66.6	48.6	53.8
Sesquiterpenos Oxigenados	L	46.6	49.2	46.1	48.0	50.5	40.8	46.3	53.3	52.0	50.2	57.5	57.6	51.7	48.8	54.0	51.8	44.6	49.7	50.4	43.3	64.8	43.3
	M	39.6	43.0	30.1	39.4	43.6	41.9	33.5	50.8	47.5	46.6	42.1	61.1	47.9	40.3	52.6	50.8	33.3	33.2	38.5	28.2	51.0	44.0
Outros	L	30.5	20.2	19.1	23.9	21.9	22.4	10.5	28.9	21.0	13.3	16.4	19.7	15.6	20.4	29.2	27.4	22.2	17.0	15.5	16.5	20.1	14.6
	M	25.0	19.4	21.6	28.6	18.1	18.6	7.7	25.3	26.4	22.1	9.5	21.4	12.5	20.5	22.9	24.8	20.1	23.1	13.4	25.5	21.6	13.1
Rendimento extração	L	0.36	0.40	0.50	0.36	0.31	0.50	0.58	0.44	0.41	0.24	0.49	0.31	0.22	0.37	0.41	0.30	0.43	0.56	0.39	0.30	0.40	0.40
	M	0.44	0.44	0.44	0.33	0.29	0.51	0.50	0.44	0.40	0.20	0.54	0.32	0.17	0.30	0.42	0.29	0.44	0.52	0.39	0.33	0.39	0.44

*Médias diferentes foram testadas pelo teste de Scott & Knott, com diferenças significativas para $p < 0,05$, os resultados apresentados referem-se somente ao pareamento dos mesmos genótipos para a comparação das médias diferentes entre os ambientes; Ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso - M); Genótipos de *P. guajava*: Cortibel (C1 a C17), Paluma (PAL), Pedro Sato (P.S), Século XXI (SEC), Roxa (ROX) e Petri (PET); Dados expressos pela % média da área relativa obtida por normalização da área do pico, sem fator de correção; Rendimento de extração expresso em % (m/m).

Em todos os genótipos os compostos que apresentaram maiores médias nas proporções relativas foram o (*E*)-*trans*-Caryophyllene (M = 16% e L = 14,2%), *alpha*-Humulene (M = 11,4% e L = 7,1) e o *beta*-Bisabolol (M = 8,8 e L = 10,1%). Estes compostos apresentam atividades biológicas comprovadas para fins medicinais. O *Trans*-Caryophyllene possui atividade antileishmaniose, antiesquistossomótica e antifúngica [36-38], *alpha*-Humuleno é anti-inflamatório [39, 40] e o *alpha* e *beta*-Bisabolol possuem ação antimicrobiana e antitumoral [41, 42].

Os genótipos comerciais (PAL, PS, SEC, ROX e PET) apresentaram predominância de seis compostos: (*E*)-*trans*-Caryophyllene (M = 25,6% e L = 24,1%), *alpha*-Selinene (M = 7,6% e L = 6,1%), *beta*-Selinene (M = 8,0% e L = 6,8%), Caryophyllene oxide (M = 9,5% e L = 11,5%), Hinesol (M = 6,5% e L = 9,6%) e 14-hydroxy-9-*epi*-(*E*)-Caryophyllene (M = 11,7% e L = 10,5%). Nos genótipos de Cortibel (C1-C17) houve predominância de sete compostos: Limonene (M = 5,8% e L = 4,6%), (*E*)-*trans*-Caryophyllene (M = 14,2% e L = 11,9%), *alpha*-Humulene (M = 13,8% e L = 11,4%), *beta*-Bisabolene (M = 6,1% e L = 6,7%), *trans*-Nerolidol (M = 6,7% e L = 6,1%), *beta*-Bisabolol (M = 10,9% e L = 12,2%) e *alpha*-Bisabolol (M = 4,0% e L = 4,5%).

De acordo com o perfil cromatográfico dos óleos essenciais pode-se observar pouca influência exercida pelas condições ambientais (**Tabela 2**). Os valores com asterisco representam as médias com diferenças significativas entre os ambientes. Estas diferenças foram mais expressivas nos genótipos C17 (diferença significativa observada em 8 dos 16 compostos majoritários – 8/16), C7 (7/16) e C13 (6/16) e menos expressivas nos genótipos C16 (0/16), C1 (2/16), C5 (2/16) e PET (2/16). Os compostos que apresentaram maior variação foram: Eucalyptol, (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *epi-beta*-Cubanol e 14-hydroxy-9-*epi*-(*E*)-Caryophyllene.

As variações observadas entre os ambientes podem estar relacionadas ao mecanismo de produção do óleo essencial que se dá pelo metabolismo secundário das plantas e sofre variações de acordo com a constituição genética e em resposta a

fatores ambientais onde é cultivada [34, 43]. Este fato pode estar associado com o número de genes que controlam a característica e o número de passos enzimáticos relacionados às vias metabólicas para obtenção de cada composto. Quanto maior a via, maior o número de genes, maior a interação entre eles e mais o ambiente poderia influenciar a sua composição.

A existência de variabilidade quimiotípica pode ser evidenciada pelas variações observadas no perfil cromatográfico do óleo essencial de *P.guajava*, portanto não foi possível definir um quimiotipo padrão, indicando a necessidade de conhecer o perfil químico de cada genótipo ou grupo de genótipos com quimiotipos semelhantes para associá-los à sua potencial aplicação.

Nas condições experimentais em que estavam submetidos, os genótipos de *P.guajava* evidenciaram a viabilidade de exploração do óleo essencial, principalmente para os genótipos que apresentaram compostos majoritários de interesse farmacológico que sofreram pouca influência das condições ambientais: C10 (M = 32,2% e L = 32,3%), C13 (M = 25,6% e L = 28,3%) e SEC (M = 29,5% e L = 26,9%) para extração de (*E*)-*trans*-Caryophyllene; C3 (M = 23,5% e L = 21,4%) e C6 (M = 19,1% e L = 19,1%) para extração de *alpha*-Humulene e C2 (M = 13,2% e L = 15,3%), C8 (M = 16,4% e L = 16,3%), C12 (M = 20,1% e L = 19,4%), C15 (M = 17,2% e L = 16,1%) e C16 (M = 16,6% e L = 16,1%) para a extração de beta-Bisabolol.

4. Conclusão

O perfil cromatográfico de 22 genótipos de *Psidium guajava* apresentou grande variabilidade quimiotípica, portanto a espécie não apresenta um quimiotipo único.

A maioria dos genótipos estudados apresentou variações na composição do óleo essencial, o que reforça a necessidade de conhecer o perfil químico de cada

genótipo ou grupo de genótipos com quimiotipos semelhantes para associá-los à sua potencial aplicação.

As variações na composição do perfil cromatográfico do óleo essencial foram mais expressivas nos genótipos C7, C13 e C17, indicando que estes são mais afetados pelo ambiente e menos expressivas nos genótipos C1, C5, C16 e PET.

O (E)-trans-caryophyllene, alpha-humulene e o beta-bisabolol podem ter aplicações potenciais e, portanto, são de interesse a programas de melhoramento que visam agregar valor à cultura da *P. guajava*.

É viável a exploração do óleo essencial pelo bom rendimento de extração e pelos compostos majoritários de interesse sem a influência das condições ambientais, a exemplo do C10, C13 e SEC para a extração de (E)-trans-caryophyllene; C3 e C6 para extração de alpha-humulene e C2, C8, C12, C15 e C16 para a extração de beta-bisabolol.

5. Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

6. Referências

1. Roth, L.S. Mosby's Handbook of Herbs & Natural Supplements, 4th ed. Mosby, St Louis. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M.V., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R.. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origins functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. **2010**, 91, 621–632.

2. Gutiérrez, R.M.P.; Mitchell, S.; Solis, V.R. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, 117, 1–27.
3. BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria n. 971, de 3 de maio de **2006**. **Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC)** no Sistema Único de Saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 10 junho de 2014.
4. Ojewole, J.A.O.. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. **2006**, 28(7), 441-446.
5. Rajendran, S., Sriranjini, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*. **2008**, 44, 126-135.
6. Biswas, B.; Rogers, K.; Mclaughlin, F.; Daniels, D.; Yadav, A. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*. **2013**.
7. Mohamed, I.; Minhas, P.S.; Khanum, F.; Sahana, V.M.; Sahana, S.. Antibacterial Activity of Leaves Extract of Guava (*Psidium Guajava*). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. **2012**, 3(1).
8. Rozwalka, L.C.; Lima, M. L.R.Z.; Mio, L.L.M.; Nakashima, T. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits, *Ciência Rural*. **2008**, 38(2), 301-307.
9. Tangpu, T.V.; Yadav, A.K. Anticestodal efficacy of *Psidium guajava* against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. *Indian Journal Pharmacology*. **2006**, 38(1), 29-32.
10. Hui-Yin Chen; Gow-Chin Yen. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*. **2007**, 101(2), 686-694.
11. Chen, H.C.; Sheu, M.J.; Lin LY, WU CM. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *Journal Essential Oil Research*. **2007**, 19, 345-347.

12. Cole, R.A.; Setzer, W.N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* from Monteverde, Costa Rica. *Journal Essential Oil-Bear Plants*. **2007**, 10, 365-373.
13. Alves, S.F.; Borges, L.L.; Paula, J.A.M.; Vieira, R.F.; Ferri, P.H.; Couto, R.O.; Paula, J.R.; Bara, M.T.F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal. Pharmacognosy*. **2013**, 23(2), 225.
14. Botrel, P.P.; Pinto, J.E.B.P.; Araújo, A.C.C.; Bertolucci, S.K.V.; Figueiredo, F.C.; Ferri, P.H., Costa, D.P. Variações no teor e na composição de *Hyptis marrubioides* EPL. Cultivado no campo e em casa de vegetação. *Química Nova*, **2010**, 33, 33-37.
15. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Waomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 446-475.
16. Joseph, B.; Priya, M.R.; Helen, M.P.A.; Sujatha, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* L. leaf, *Journal of Advanced Biotech*. **2010**, 9(10), 10-14.
17. Khadhri, A.; Mokni, R.E.I; Almeida, C.; J.M.F; Nogueira, M; Araújo, E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. **2014**, 52, 29–31.
18. Lima, R.K.; Cardoso, M.G.; Santos, C.D.; Moraes, J.C.; Néri, D.K.P.; Nascimento, E.A. Essential oil chemical composition from leaves of guava (*Psidium guajava* L.) and its effects on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae) behavior. *Ciênc. Agrotec*. **2009**, 33, 1777-1781.
19. Chen, H.C.; Sheu, M.J.; Lin, L.Y.; Wu, C.M. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *J. Essent. Oil Res*. **2007**, 19, 345–347.
20. Cole, R.A.; Setzer, W.N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* from Monteverde, Costa Rica. *J. Essent. Oil-Bear Plants*. **2007**, 10, 365–373.
21. Silva, J.D.; Luz, A.I.R.; Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Zoghbi, M.G.B.; Maia, J.G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *J. Flavor Frag*. **2003**, 18, 240–243.

22. Solórzano-Santos, F; Miranda-Navales, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. **2011**, 23, 1-6.
23. Sandasi, M.; Kamatou, G.P.P.; Combrinck, S.; Viljoen, A.M. A chemotaxonomic assessment of four indigenous South African Lippia species using GC–MS and vibrational spectroscopy of the essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2013**, 51, 142-152.
24. Paula, J.A.M.; Ferri, P.H.; Bara, M.T.F., Tresvenzol, L.M.F., Sá, F.A.S., Paula, J.R. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **2011**, 39, 643-650.
25. 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). *Brazilian Journal. Pharmacognosy*. **2006**, 16, 246-251.
26. Stesevic, D.; Mihailo, R.; Vuko, N.; Marijana, N.; Cakovic, D.; Zlatko, S. Chemotype Diversity of Indigenous Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) Populations in Montenegro. *Chemistry & Biodiversity*. **2014**, 11, 101-114.
27. Radulovic, N.S.; Dekic, M.S. Volatiles of *Geranium purpureum* Vill. and *Geranium phaeum* L.: Chemotaxonomy of Balkan Geranium and Erodium Species (*Geraniaceae*). *Chemistry & Biodiversity*. **2013**, 10, 2042-2052.
28. BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, **2010**. 546p., 1v/il. P. 198, 199.
29. Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M.; Baliza, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L.. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **2006**, 8, 27-32.
30. Chen, H.C.; Sheu, M.J.; Lin, L.Y.; Wu, C.M. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *Journal Essential Oil Reserch*. **2007**, 19, 345-347.
31. National Institute of Standards and Technology (NIST). *Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook*. **2011**, U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. Acessado em março 2014 em <http://webbook.nist.gov/chemistry>.

32. Adams, R.P. *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy*. 4^a ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, **2007**.
33. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.0.2 (2013-09-25) - "Frisbee Sailing" Copyright (C) **2013**. The R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07. Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit).
34. Khadhri, A.; Mokni, R.E.I.; Almeida, C.; J.M.F.; Nogueira, M.; Araújo, E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 2014, 52, 29-31.
35. Correa, M.C.M.; Prado, R.M.; Natale, W.; Neto, D.; Silva, M.A.C. Aspectos morfológicos da goiabeira cultivar Paluma. *Acta Scientiarum agronomy*. **2004**, 26 (1), 67-71.
36. Soares, D.C.; Portella, N.A.; Ramos, M.F.S.; Siani, A.C.; Saraiva, E.M. *Trans-β-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (Copaifera spp.)*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**.
37. Marcos, P.N.; Silva, G.L.S.; Oliveira, R.B.F.; De Carvalho, D.P.; De Sousa, R.M.; Freitas, P.L.S. P.; Moraes, J. Antischistosomal Activity of the Terpene Nerolidol. *Molecules*. **2014**, 19, 3793-3803.
38. Lee, S.J.; Han, J.; Lee, G.S.; Park, M.J.; Choi, IG.; Na, K.J.; Jeung, E.B. Antifungal Effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea Pig Model. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30(1), 184-188.
39. Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. **2007**, 569, 228-236.
40. Rogerio, A.P.; Andrade, E.L., Leite, D.F.P., Figueiredo, C.P.; Calixto, J.B.. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. **2009**, 158, 1074-1087.
41. Forrer, M.; Kulik, E.M.; Filippi, A.; Waltimo, T. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis. *Archives of Oral Biology*. **2013**, 58, 10-16.

42. Costarelli, L.; Malavolta, M.; Giacconi, R.; Cipriano, C.; Gasparini, N.; Tesei, S.; Pierpaoli, S.; Orlando, F.; Suzuki, H.; Perbellini, L.; Piacenza, F.; Emanuelli, M.; Mocchegiani, E. *In vivo* effect of alpha-bisabolol, a nontoxic sesquiterpene alcohol, on the induction of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Oncology Research*. **2010**, 18(9), 409-418.
43. Solórzano-Santos, F.; Miranda-Novales, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. **2011**, 23, 1-6.

CAPÍTULO 2

Diversidade quimiotípica de *Psidium guajava* L.

by Tércio da Silva de Souza^{*a)}, Marcia Flores da Silva Ferreira^{b)}, Luciano Menini^{a)}, Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima Souza^{a)}, Adésio Ferreira^{c)}

^{a)}Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, *Campus* de Alegre, CEP: 29.500-000, Alegre – ES, (phone/fax +55-35-52-81-31, R.279; e-mail: tssouza@ifes.edu.br)

^{b)}Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Biologia, Alto Universitário s/n, Centro - CEP: 29500-000 - Caixa Postal 16, Alegre – ES.

^{c)}Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário s/n, Centro - CEP: 29500-000 - Caixa Postal 16, Alegre – ES.

Resumo. A composição química do óleo essencial obtido por hidrodestilação de folhas de 21 genótipos de *P. guajava* de plantios experimentais localizadas no Espírito Santo - Brasil foi estudada por análise de GC-FID e GC-MS. No total, 33 compostos foram identificados representando 87,5-99,0% da composição total, com predominância de sesquiterpenos em todas as samples. Os principais compostos identificados foram: (E) trans-cariofileno, α -humuleno, trans-nerolidol, β -bisabolene, β -bisabolol e Hinesol. Trans-cariofileno aparece como marcador químico potencial para a espécie. A partir da composição química do óleo *P. guajava* por análise multivariada de fatores, foram definidos três quimiotipos: quimiotipo 1 (Commercial - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 e C17MI) caracterizado por altos níveis de beta-selineno, alfa selineno, Hinesol, 14-hidroxi-epi (E) -cariofileno, com beta-selineno e alfa-selineno e seus marcadores químicos; Quimiotipo 2 (C10 e C13) apresentaram níveis elevados de elemol, trans-nerolidol, trans- β -eudesmol e (2Z, 6Z)-Farnesol, indicados como os seus marcadores químicos; Quimiotipo 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16, C17LI) caracteriza-se por níveis elevados de alfa-cedreno, cis-alfa-Bergamotene, alfa-humuleno, humuleno epóxido, epi-alfacadinol, beta-Bisabolol, alfa-bisabolol, com beta-bisabolol e alfa-bisabolol indicados como os seus marcadores químicos.

Palavras-chave: marcadores químicos, quimiotipos, análise de fatores.

Abstract. The chemical composition of essential oil obtained by leaves hydrodistillation of 21 *P.guajava* genotypes from experimental plantations located in the Espírito Santo - Brazil was studied by analysis of GC-FID and GC-MS. In total 33 compounds were identified representing 87.5 to 99.0% of the total composition, with a predominance of sesquiterpenes in all samples. The major compounds identified were: (*E*)-*trans*-Caryophyllene, α -Humulene, *trans*-nerolidol, β -bisabolene, β -bisabolol and Hinesol. *Trans*-Caryophyllene appears as potential chemical marker for the species. From the chemical composition of *P.guajava* oil by multivariate analysis of factors, were defined three chemotypes: Chemotype 1 (Commercial - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 and C17M) characterized by high levels of β -Selinene, α -Selinene, Hinesol, 14-Hydroxy-epi-(*E*)-Caryophyllene, with β -Selinene and α -Selinene and their chemical markers; Chemotype 2 (C10 and C13) showed elevated levels of Elemol, *trans*-Nerolidol, *trans*- β -Eudesmol and (2Z, 6Z)-Farnesol, indicated as their chemical markers; Chemotype 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16, C17L) characterized by elevated levels of α -Cedrene, *cis*- α -Bergamotene, α -Humulene, Humulene epoxide, epi- α -cadinol, β -Bisabolol, α -Bisabolol, with β -Bisabolol and α -Bisabolol indicated as their chemical markers.

Keywords: chemical markers, chemotypes, factors analysis.

1. Introdução

Psidium guajava L. pertencente à família *Myrtaceae* e apresenta mais de 160 cultivares no mundo, é apreciada pelo sabor, aroma e valor nutritivo característicos de seus frutos e por suas potencialidades como fontes de fitoquímicos [1-8]. Parte das propriedades biológicas atribuídas à espécie está relacionada ao óleo essencial [9-20], o qual possui matriz complexa e diversa com predominância de mono e sesquiterpenos [21-26].

A literatura apresenta relatos de diferentes perfis cromatográficos para o óleo essencial de *P. guajava*, o que pressupõe a existência de variabilidade quimiotípica

para a espécie [16,21-26]. Esta variabilidade pode estar relacionada a fatores genéticos que contribuem de forma determinante para a ocorrência de polimorfismo químico na espécie e também por fatores fisiológicos e ambientais que afetam de forma qualitativa e quantitativa a composição do óleo essencial de acordo com fatores climáticos, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade e ciclo circadiano [27-29].

Considerando a existência de variabilidade quimiotípica, faz-se necessário conhecer o perfil químico de cada genótipo ou grupo de genótipos com quimiotipos semelhantes e as condições fisiológicas e ambientais mais favoráveis para associá-los à sua potencial aplicação, seja na medicina popular, indústria química, farmacológicos e para estudos taxonômicos.

Análises químicas do óleo essencial permitem conhecer quantitativamente e qualitativamente os compostos presentes, mesmo quando estes se encontram em quantidades muito pequenas (ppm). Os óleos essenciais podem conter dezenas de compostos e a identificação destes pode ajudar a delimitar diferenças existentes entre os genótipos, definir agrupamentos de genótipos semelhantes (quimiotipos) e substâncias com potencial para marcadores químicos [30-32].

No estudo da diversidade quimiotípica dos óleos essenciais podem ser utilizadas várias análises multivariadas para avaliar a divergência entre genótipos e selecionar os descritores mais importantes para sua discriminação [33-35]. Para a escolha do tipo de análise a ser aplicada, deve-se levar em consideração o fato de que plantas superiores apresentam duas vias metabólicas capazes de sintetizar precursores dos óleos essenciais [36-38], e estas vias estão inter-relacionadas, podendo gerar compostos com alta correlação entre si (multicolineares) [34].

A análise de fatores pode ser aplicada neste contexto [39] e consiste em identificar um número menor de novas variáveis alternativas não correlacionadas e que, de algum modo, sumarizem as informações principais das variáveis originais

encontrando os fatores ou variáveis latentes através das relações de covariância [39-41]. Os novos grupos de variáveis representam um único constructo ou fator ou “supercaracterística”, que é responsável pelas correlações observadas [42-46] eliminando problemas de multicolinearidade e tornando os resultados mais confiáveis. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade quimiotípica do óleo essencial extraído de folhas de 22 genótipos de *P. guajava* cultivados em dois ambientes (Linhares/ES - L e Mimoso do Sul/ES - M) e identificar diferentes marcadores químicos.

2. Parte Experimental

2.1. Localização Geográfica dos experimentos e coleta do material vegetal

Folhas de 22 genótipos de *Psidium guajava* L. foram coletadas nos dias 15/06/2013 e 21/06/2013 das 7:00 às 9:00 horas em dois plantios experimentais localizados no Estado do Espírito Santo: Mimoso do Sul (21° 01' 12,99" S; 41° 17' 13,48" W e altitude 250 metros) e Linhares (19° 23' 27" S; 41° 04' 17" W e altitude 30 metros) (**Figura 1**). As folhas foram coletadas à altura do peito, em todo o entorno das plantas. Os pomares foram instalados em março de 2012 com o plantio 17 genótipos selecionados de pomar de polinização cruzada denominados de Cortibel (C1-C17) e as variedades Paluma (PAL), Pedro Sato (P.S), Século XXI (SEC) e Petri (PET). Todos em delineamento estatístico de blocos ao acaso, com quatro repetições e duas plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi de 6m X 4m entre plantas e a adubação de cobertura e os demais tratos culturais foram realizados conforme o recomendado para a cultura.

2.2. Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger de acordo com metodologia recomendada pela Farmacopeia brasileira [57], onde 100 g das folhas secas foram destilados com 500 mL de água destilada por 4 horas. O

hidrolato foi coletado e submetido à centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação o óleo essencial foi coletado e foram medidos o rendimento de extração (%m/m, base em biomassa seca), a densidade específica a 20 °C e o índice de refração. Os óleos essenciais foram armazenados em frasco protegidos da luz à temperatura de 0 °C para análise.

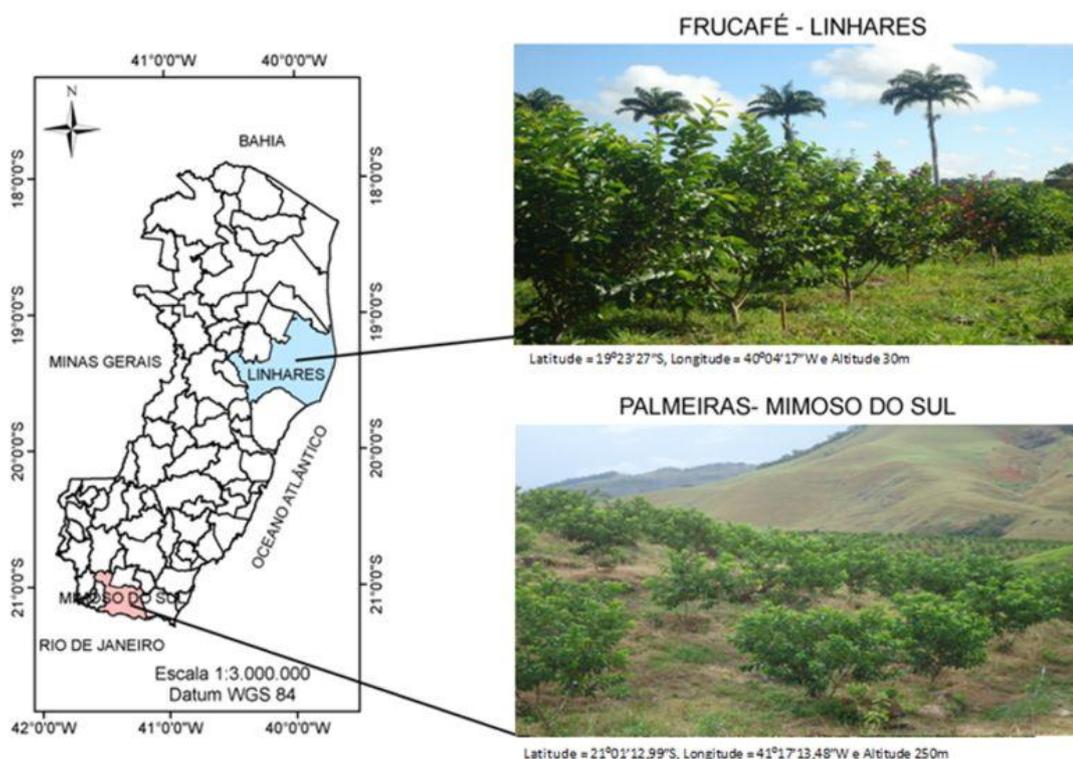


Figura 1. Localização das áreas experimentais em relação ao estado do Espírito Santo, Brasil.

2.3. Análise GC-FID-MS

As amostras do óleo essencial foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) (aparelho Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) (aparelho Shimadzu GCMS-2010). Foram empregadas em ambas as análises as seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase estacionária RTX-5MS (0,25µm de espessura do filme); N₂ (em análise de GC/FID) ou He (em análises de CG/MS) como gás de arraste com fluxo de 3,0mL.min⁻¹. A temperatura do forno seguiu a programação em que permanece por 1

minuto a uma temperatura inicial de 60°C e em seguida aumenta gradativamente 5°C.min⁻¹ até atingir 220°C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos; temperatura do injetor de 240°C; temperatura do detector de 240°C; razão de split de 1:30. Foi injetado um volume de 1,0µL de uma solução de 3% de óleo essencial dissolvido em hexano/DMA 0,1mol.L⁻¹ (em análise de GC/FID) ou diclorometano (em análises de CG/MS). As análises por GC/MS foram realizadas em um equipamento operando por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos.s⁻¹ e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z).

2.4. Composição do Óleo essencial

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Willey7 e NIST) e pelos índices de Retenção de Kováts (IK) associados a uma série de alcanos por interpolação linear (C7-C40) [58,59]. O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral de seus respectivos picos e a área total de todos os constituintes da amostra.

2.5. Análise Estatística Univariada e Multivariada

Os 33 compostos identificados no óleo essencial foram analisados em conjunto (M = Mimoso e L = Linhares). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas pela diferença entre médias testadas por Scott & Knott com $p < 0,05$ e a análise de correlação. Também foram submetidos aos testes de adequação à Análise Fatorial: teste de esfericidade de Bartlett ($p < 0,05$ indicam que a matriz é favorável), critério de Kaiser-Meyer-Olkin – KMO ($< 0,5$ são considerados inaceitáveis; 0,5 a 0,7 medíocres; 0,7 a 0,8 bons; e maiores que 0,8 e 0,9 são ótimos e excelentes, respectivamente) e o critério de MSA (excluir variáveis com peso $< 0,7$) [39,53].

A análise multivariada de Fatores foi efetuada com o Método de Componentes Principais via Rotação Ortogonal do Tipo Varimax para Extração das Matrizes e dos Fatores. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GENES e R programa [60,61].

3. Resultados e Discussão

3.1. Extração e Propriedades Físicas do Óleo Essencial

A hidrodestilação das folhas dos 22 genótipos de *P. guajava* provenientes de cultivos experimentais em dois ambientes Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES forneceu óleos essenciais levemente viscosos, de coloração amarelo-claro e odor característico. Não houve diferença significativa para o rendimento de extração, a densidade e o índice de refração entre os ambientes estudados (**Tabela 1**).

Os genótipos C6, C7, C11 e PAL apresentaram maiores rendimentos médios de extração, em torno de 0,5 %, resultados semelhantes aos descritos para genótipos de *P. guajava* da Tunísia [21], os genótipos C10 e C13 apresentaram menor rendimento. Os valores de densidade média a 20°C variaram de 0,9033 g/cm³ (C7) a 1,0167 g/cm³ (C17 e SEC). Os valores de índice de refração variaram de 1,4870 (C16) a 1,4995 (C5). As diferenças observadas nestas propriedades físicas apontam para uma influência predominantemente genotípica pela ausência de diferença significativa entre os ambientes. Os parâmetros densidade e índice de refração podem vir a serem utilizados na identificação e no controle de qualidade de óleos essenciais [29, 47].

Tabela 1. Média do rendimento de extração e propriedades físicas dos óleos essenciais de 22 genótipos de *P. guajava* cultivados em dois ambientes (Linhares/ES e Mimoso do Sul/ES)

GENÓTIPOS/ AMBIENTES	Rendimento* de extração (%m/m)		Densidade* 20 °C (g/cm ³)		Índice de Refração 20 °C (η)
	L	M	L	M	
C1	0,36 ^{Ab}	0,44 ^{Ab}	0,9130 ^{Bd}	0,9133 ^{Bd}	1,4925
C2	0,40 ^{Ab}	0,44 ^{Ab}	0,9512 ^{Bc}	0,9500 ^{Bc}	1,4965
C3	0,50 ^{Ab}	0,44 ^{Ab}	0,9589 ^{Bb}	0,9600 ^{Bb}	1,4936
C4	0,36 ^{Ac}	0,33 ^{Ac}	0,9603 ^{Bb}	0,9633 ^{Bb}	1,4910
C5	0,31 ^{Ac}	0,29 ^{Ac}	0,9647 ^{Bb}	0,9633 ^{Bb}	1,4995
C6	0,50 ^{Aa}	0,51 ^{Aa}	0,9300 ^{Bc}	0,9333 ^{Bc}	1,4940
C7	0,58 ^{Aa}	0,50 ^{Aa}	0,9058 ^{Bd}	0,9033 ^{Bd}	1,4930
C8	0,44 ^{Ab}	0,44 ^{Ab}	0,9737 ^{Bb}	0,9767 ^{Bb}	1,4950
C9	0,41 ^{Ab}	0,40 ^{Ab}	0,9841 ^{Bb}	0,9833 ^{Bb}	1,4950
C10	0,24 ^{Ad}	0,20 ^{Ad}	0,9622 ^{Bb}	0,9620 ^{Bb}	1,4920
C11	0,49 ^{Aa}	0,54 ^{Aa}	0,9873 ^{Ba}	0,9867 ^{Ba}	1,4950
C12	0,31 ^{Ac}	0,32 ^{Ac}	0,9904 ^{Ba}	0,9900 ^{Ba}	1,4910
C13	0,22 ^{Ad}	0,17 ^{Ad}	0,9324 ^{Bc}	0,9300 ^{Bc}	1,4920
C14	0,37 ^{Ac}	0,30 ^{Ac}	0,9800 ^{Bb}	0,9800 ^{Bb}	1,4970
C15	0,41 ^{Ab}	0,42 ^{Ab}	0,9952 ^{Ba}	0,9967 ^{Ba}	1,4960
C16	0,30 ^{Ac}	0,29 ^{Ac}	0,9505 ^{Bc}	0,9500 ^{Bc}	1,4870
C17	0,43 ^{Ab}	0,44 ^{Ab}	1,0099 ^{Ba}	1,0167 ^{Ba}	1,4930
PAL	0,56 ^{Aa}	0,52 ^{Aa}	0,9928 ^{Ba}	0,9933 ^{Ba}	1,4890
P.S	0,39 ^{Ab}	0,39 ^{Ab}	1,0012 ^{Ba}	1,0000 ^{Ba}	1,4925
SEC	0,30 ^{Ac}	0,33 ^{Ac}	1,0127 ^{Ba}	1,0167 ^{Ba}	1,4925
ROX	0,37 ^{Ac}	0,33 ^{Ac}	0,9700 ^{Bb}	0,9710 ^{Bb}	1,4925
PET	0,40 ^{Ab}	0,39 ^{Ab}	0,9705 ^{Bb}	0,9712 ^{Bb}	1,4880

Rendimento de extração % m/m (baseada em biomassa seca); *Dados submetidos à ANOVA. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Scott & Knott com $p < 0,05$. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Scott & Knott com $p < 0,05$.

3.2. Composição do Óleo Essencial

As análises de GC-FID e GC/MS do óleo essencial das folhas colhidas em junho de 2013 nos 21 genótipos de *P. guajava* nos dois ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso - M) permitiram a identificação de 33 compostos, que representaram 87,5-99,0% da composição total dos óleos (**Figura 2 e Tabela 2**).

Tabela 2. Teor percentual de 33 compostos químicos encontrados nos óleos essenciais extraídos das folhas de 22 genótipos de *P.guajava* em dois ambientes (A), Mimoso (M) e (Linhares (L), considerando os compostos com Área Relativa > 1%.

COMPOSTOS IK _{cal}	A	GENÓTIPOS																					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	PAL	P.S	SEC	ROX	PET
Limonene¹	M	-	-	5.3	11.6	-	8.9	-	1.9	8.8	2.3	0.2	11.7	7.6	0.3	-	-	5.5	0.7	-	0.3	-	-
1031	L	0.1	-	0.8	11.6	-	6.6	0.2	2.0	9.7	4.5	0.3	11.0	3.3	0.3	-	-	9.4	-	-	0.2	-	0.5
Eucalyptol²	M	1.1	0.9	1.7	2.0	1.0	2.3	1.7	1.8	2.0	1.0	2.3	3.1	2.7	2.8	0.7	1.1	2.6	5.3	2.3	3.6	0.3	1.9
1035	L	0.4	2.1	0.5	2.8	2.0	1.8	2.8	1.8	1.9	2.3	3.4	2.9	1.9	2.6	0.7	1.0	3.1	1.3	1.3	2.3	0.1	4.5
α-Terpineol²	M	-	-	-	0.3	0.2	0.3	0.4	0.8	0.3	0.4	0.4	0.6	0.5	0.4	0.2	0.3	0.4	1.2	0.3	1.2	-	0.5
1192	L	0.2	0.3	-	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.5	0.6	0.6	0.4	0.5	0.2	0.4	0.5	1.1	0.4	0.8	-	0.6
α-Copaene³	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	1.7	1.9	2.0	-	-
1381	L	0.3	-	-	-	-	-	-	0.3	0.4	-	-	-	0.7	-	0.3	0.4	-	1.5	1.6	1.7	-	0.3
α-Cedrene³	M	1.3	0.9	0.7	0.8	0.8	0.6	-	1.0	1.0	-	-	0.5	-	0.6	0.9	1.1	0.5	-	-	-	-	-
1402	L	1.2	0.9	0.7	0.9	1.0	0.7	-	1.1	1.0	-	-	0.7	-	0.7	1.2	1.2	0.6	-	-	-	-	-
<i>cis</i>-α-Bergamotene³	M	1.1	0.8	0.6	0.7	0.7	0.4	-	0.8	0.8	-	-	0.3	-	0.5	0.6	0.8	-	-	-	-	-	-
1413	L	1.1	0.8	0.6	0.9	0.9	0.6	0.4	1.0	0.9	-	-	0.6	-	0.6	0.9	1.0	0.6	-	-	-	-	-
<i>(E)</i>-<i>trans</i>-Caryophyllene³	M	9.9	15.7	13.4	12.1	15.8	10.5	19.7	8.0	13.2	32.2	16.1	5.1	25.6	12.6	8.2	7.2	15.3	27.4	22.4	29.5	30.0	18.6
1420	L	8.5	12.2	11.3	9.7	11.8	10.4	15.1	6.0	9.8	32.3	11.5	4.3	28.3	10.0	5.1	7.1	9.4	24.1	18.6	26.9	22.2	17.1
<i>(+)</i> Aromadendrene³	M	-	0.4	-	-	0.4	0.3	-	0.6	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	2.8	-	3.1	7.4	-
1440	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	-	3.5	5.6	-
α-Humulene³	M	17.3	17.1	23.5	2.0	17.5	19.1	18.6	14.8	1.9	4.7	16.1	9.0	4.5	24.4	15.5	13.9	15.2	3.3	2.9	3.5	3.5	2.6
1454	L	14.1	14.0	21.4	1.8	13.5	19.1	13.7	10.9	1.7	4.0	11.5	8.1	4.7	19.9	11.8	13.4	10.3	2.9	2.5	3.1	2.7	2.2
γ-Muurolene³	M	6.4	3.5	2.9	2.4	3.5	1.5	-	3.1	2.8	-	-	1.6	-	1.4	5.0	5.7	1.6	-	-	-	-	-
1479	L	4.4	3.1	2.5	3.3	3.9	1.7	-	3.8	4.4	-	-	3.3	-	1.9	5.4	4.9	2.1	-	-	-	-	-
β-Selinene³	M	0.5	-	0.8	4.0	-	0.6	10.9	-	1.3	0.5	9.1	-	0.5	0.8	-	-	5.4	7.5	13.3	8.3	0.5	13.2
1486	L	-	-	0.6	2.2	-	0.5	8.6	-	0.8	-	2.5	-	0.7	0.5	-	-	2.7	6.9	10.3	7.6	0.5	12.8
α-Selinene³	M	0.4	-	0.8	4.5	-	0.6	10.3	-	1.3	-	8.6	-	-	0.8	-	-	4.6	7.1	12.4	8.2	0.6	12.4
1495	L	-	-	0.6	2.3	-	0.5	7.7	-	0.7	-	6.5	-	0.6	0.5	-	-	2.1	6.6	9.2	7.2	0.3	11.2
α-Bisabolene³	M	1.2	1.0	0.6	-	0.9	0.5	-	0.9	1.0	0.5	-	0.4	-	0.6	0.8	1.0	-	-	-	-	2.3	-
1499	L	1.3	0.9	0.8	0.8	1.0	0.7	-	1.2	1.0	-	-	0.5	-	0.6	1.1	1.2	0.5	-	-	-	1.8	-

Tabela 2 (cont.)

COMPOSTOS IK _{cal}	A	GENÓTIPOS																					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	PAL	P.S	SEC	ROX	PET
<i>β</i> -Bisabolene ³ 1506	M	9.7	8.6	6.5	4.6	8.4	3.9	-	7.2	7.4	1.0	-	-	4.6	4.3	7.1	9.2	3.1	-	-	-	3.4	-
	L	9.7	9.0	5.9	6.0	7.5	5.4	-	8.7	8.8	-	-	4.3	1.2	4.9	9.5	8.7	4.1	-	-	-	2.3	-
<i>δ</i> -Amorphene ³ 1509	M	1.0	-	-	3.3	-	1.2	-	2.4	2.5	-	-	-	-	1.6	-	-	-	-	-	-	-	-
	L	3.7	-	1.9	2.0	2.0	1.7	-	3.4	-	-	-	1.0	-	1.7	-	2.0	-	-	-	-	-	-
<i>γ</i> -Candinene ³ 1514	M	0.9	0.9	0.6	1.2	0.8	0.5	-	1.0	1.0	-	0.3	0.5	2.1	0.7	0.6	0.8	-	-	-	-	0.4	0.9
	L	1.2	0.8	0.7	0.8	-	0.7	-	1.1	1.0	-	-	0.5	-	0.7	0.9	1.0	0.5	-	-	0.3	-	1.3
<i>δ</i> -Candinene ³ 1522	M	4.6	2.9	1.9	3.3	2.8	1.4	-	3.4	3.9	0.5	-	1.5	-	2.1	3.6	3.8	1.1	1.1	1.6	1.4	0.7	0.9
	L	5.1	2.2	2.0	2.7	2.3	1.8	-	3.4	3.4	-	-	1.2	0.5	1.7	3.8	3.7	0.7	1.0	1.4	1.1	0.6	1.0
<i>(E)</i> - <i>α</i> -Bisabolene ³ 1530	M	2.2	2.0	1.2	2.0	1.7	1.1	-	2.2	2.4	0.5	-	0.8	-	1.5	1.0	1.6	0.9	-	-	-	-	-
	L	2.9	2.0	1.7	2.0	1.8	1.5	-	2.4	2.2	-	-	1.1	-	1.4	-	2.0	0.8	-	-	-	-	-
Elemol ⁴ 1554	M	-	-	-	-	0.5	-	-	0.7	0.4	1.8	-	-	2.1	-	-	-	0.4	-	0.7	-	0.3	0.5
	L	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	3.5	0.5	-	2.7	-	-	-	-	0.5	1.0	0.4	0.6	1.0
<i>trans</i> -Nerolidol ⁴ 1560	M	3.2	7.8	0.5	4.9	8.4	6.3	3.3	5.2	7.5	16.8	3.7	5.8	19.9	6.6	5.0	5.1	4.1	3.7	1.9	3.6	12.0	-
	L	3.2	7.5	6.0	5.2	7.2	5.8	2.5	4.4	6.8	13.6	3.2	5.0	13.7	6.2	4.3	4.3	4.2	3.1	2.1	2.8	11.2	-
Caryophyllene oxide ⁴ 1585	M	2.8	2.6	2.7	2.5	2.9	2.8	3.3	2.4	2.7	3.8	4.4	3.7	3.1	2.4	4.6	3.4	3.6	11.6	4.7	9.5	18.1	3.8
	L	1.8	2.7	2.5	2.7	3.1	2.5	6.1	1.8	2.6	4.6	7.8	2.7	7.2	2.7	2.9	2.3	4.3	13.4	7.2	11.7	20.9	4.5
Ledol ⁴ 1606	M	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.9	-	1.0	1.0	-	-	1.3	-	0.7	0.6	0.8	0.4	0.5	1.1	0.5	1.5	-
	L	0.8	1.0	0.9	1.2	1.1	0.9	-	1.2	1.3	-	-	1.5	-	1.0	1.1	1.1	1.1	0.4	1.2	0.3	2.1	-
Humulene epoxide ⁴ 1613	M	3.4	2.3	3.6	0.8	2.4	3.9	3.4	2.9	0.8	-	4.1	3.5	0.9	3.4	4.2	3.6	3.3	0.5	-	-	0.7	-
	L	2.6	2.6	3.8	0.7	3.0	3.8	5.1	2.7	-	-	6.3	3.7	1.3	4.3	3.7	3.3	3.8	0.7	0.6	0.6	0.9	-
<i>γ</i> -Eudesmol ⁴ 1630	M	-	1.0	0.8	1.1	1.1	0.9	0.4	1.4	1.2	0.9	-	1.9	0.9	0.9	1.8	1.5	0.5	1.6	2.4	1.3	0.6	3.1
	L	0.9	-	-	0.9	0.8	-	-	1.0	1.0	1.0	0.5	1.2	0.9	-	1.3	1.2	-	1.9	3.2	1.7	0.9	3.7
<i>epi</i> - <i>β</i> -Cubenol ⁴ 1633	M	4.3	1.6	-	1.6	-	-	-	2.2	1.8	-	-	2.7	-	4.6	3.4	3.4	-	2.3	-	-	-	-
	L	2.4	-	-	2.2	-	-	-	-	2.3	-	-	7.1	-	6.9	3.1	3.1	-	-	-	-	-	-
<i>epi</i> - <i>α</i> -Cadinol ⁴ 1637	M	-	2.9	4.5	1.4	3.9	5.3	6.4	3.2	1.8	3.4	5.8	3.8	3.7	0.0	2.5	1.7	6.2	-	2.5	1.7	1.3	2.4
	L	3.0	5.3	7.1	2.2	5.6	6.4	10.9	5.6	2.2	4.6	12.0	-	4.3	1.1	3.0	3.1	7.6	3.1	3.8	2.7	2.5	2.8
Hinesol ⁴ 1642	M	-	-	0.9	-	-	1.1	3.6	-	-	8.1	-	-	8.6	1.0	-	-	3.9	6.4	7.0	5.0	4.0	10.0
	L	-	-	-	-	-	-	7.0	-	-	12.4	7.7	-	10.0	-	-	-	3.2	9.2	10.9	8.2	8.0	11.5

Tabela 2 (cont.)

COMPOSTOS IK _{cal}	A	GENÓTIPOS																					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	PAL	P.S	SEC	ROX	PET
β-Eudesmol⁴ 1649	M	1.2	1.2	1.0	1.1	-	1.2	0.6	1.3	1.7	3.2	0.8	1.7	2.7	1.1	1.4	1.5	1.0	1.7	1.1	1.4	0.9	1.2
	L	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.4	0.7	1.2	1.9	2.8	0.8	1.6	2.7	1.2	1.5	1.5	1.2	1.4	1.1	1.3	1.1	1.2
Selina-6-en-4-ol⁴ 1659	M	0.6	-	1.4	6.7	-	1.5	-	-	2.0	2.6	-	-	-	1.6	-	-	8.1	9.1	-	9.1	1.0	-
	L	-	-	-	3.3	-	3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.1	-	-	-	-	-
14-Hydroxy-epi-(E)-Caryophyllene⁴ 1661	M	2.0	2.1	1.5	-	2.1	2.1	12.5	2.8	1.9	-	14.0	4.0	2.3	1.6	2.3	2.5	-	-	14.4	-	1.3	19.3
	L	2.8	3.0	3.5	1.7	3.4	0.0	11.4	3.4	4.3	3.2	13.7	4.7	3.0	3.3	3.3	3.2	-	9.3	14.4	8.2	4.0	14.7
β-Bisabolol⁴ 1671	M	13.1	13.2	9.7	13.2	13.8	11.9	1.1	16.4	14.6	2.8	1.5	20.1	2.8	11.4	17.2	16.6	5.8	1.6	1.8	1.2	2.1	1.7
	L	14.5	15.3	13.1	16.8	14.7	12.2	2.2	16.3	16.9	4.0	2.3	19.4	4.1	13.5	16.1	16.1	10.3	2.6	3.1	2.2	3.1	2.4
α-Bisabolol⁴ 1685	M	4.3	4.6	3.7	4.6	4.6	4.6	0.8	5.9	4.9	1.4	1.0	7.9	1.7	4.4	5.7	5.5	2.9	-	0.9	-	1.2	1.0
	L	4.7	5.5	5.0	5.8	5.5	4.7	1.3	6.4	6.0	1.1	1.3	7.3	1.2	5.2	5.6	5.6	5.1	0.5	1.2	0.5	2.1	1.1
trans-(2Z-6Z)-Farnesol⁴ 1722	M	0.8	0.7	0.5	-	0.6	0.5	-	0.8	0.9	4.6	-	1.0	4.4	0.6	-	1.3	-	-	-	-	-	-
	L	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	-	0.6	-	1.8	-	0.7	2.6	0.7	0.9	1.2	-	-	-	-	-	-
Total identificado	M	94.0	95.3	92.0	93.5	95.5	96.6	96.9	95.7	94.8	93.3	88.4	92.4	99.0	95.6	92.8	93.3	96.4	97.2	95.8	94.6	94.3	94.1
	L	92.5	93.0	96.0	94.5	93.9	95.4	96.7	92.2	93.5	96.3	92.4	95.0	96.1	94.6	87.5	93.5	94.1	94.7	95.1	95.2	93.4	94.3
Monoterpenos hidrocarbonetos¹	M	-	-	5.3	11.6	-	8.9	-	1.9	8.8	2.3	0.2	11.7	7.6	0.3	-	-	5.5	0.7	-	0.3	-	-
	L	0.1	-	0.8	11.6	-	6.6	0.2	2.0	9.7	4.5	0.3	11.0	3.3	0.3	-	-	9.4	-	-	0.2	-	0.5
Monoterpenos Oxigenados²	M	1.1	0.9	1.7	2.3	1.2	2.6	2.1	2.6	2.3	1.4	2.7	3.7	3.2	3.1	0.8	1.4	3.0	6.5	2.6	4.8	0.3	2.4
	L	0.6	2.5	0.5	3.2	2.3	2.2	3.2	2.1	2.3	2.8	4.0	3.5	2.3	3.2	0.9	1.4	3.7	2.4	1.8	3.1	0.1	5.1
Sesquiterpenos hidrocarbonetos³	M	56.5	53.9	53.6	41.0	53.3	42.1	59.5	45.3	40.6	39.8	50.1	19.7	37.3	51.8	43.4	45.0	47.6	49.3	52.5	54.1	48.9	48.6
	L	53.1	45.9	50.8	35.3	45.5	45.0	45.5	43.1	35.9	36.3	31.8	25.6	36.0	45.1	39.7	45.9	34.2	44.6	41.9	49.8	36.0	45.6
Sesquiterpenos Oxigenados⁴	M	36.4	40.5	31.4	38.6	41.0	43.0	35.3	45.9	43.1	49.3	35.3	57.3	50.9	40.3	48.7	46.9	40.2	39.0	38.7	33.4	45.1	43.1
	L	38.5	44.6	43.8	44.3	46.1	41.6	47.8	44.7	45.3	52.6	56.2	54.9	53.7	46.0	46.6	45.8	46.9	46.1	49.8	40.4	57.4	42.8
Outros	M	6.0	4.7	8.0	6.5	4.5	3.4	3.1	4.3	5.2	6.7	11.7	7.6	1.0	4.4	7.2	6.7	3.6	2.8	4.2	5.4	5.7	5.9
	L	7.5	7.0	4.0	5.5	6.1	4.6	3.3	7.8	6.5	3.7	7.6	5.0	3.9	5.4	12.5	6.5	6.0	5.3	4.9	4.8	6.6	5.7

Dados expressos pela % média da área relativa obtida por normalização da área do pico, sem fator de correção; Matrizes de variâncias e covariâncias obtidas por ANOVA; Genótipos de *P. guajava*: Cortibel (C1 a C17), Paluma (PAL), Pedro Sato (P.S), Século XXI (SEC) e Petri (PET); Ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso do Sul- M). IK_{cal} = índice de retenção ou Kovats.

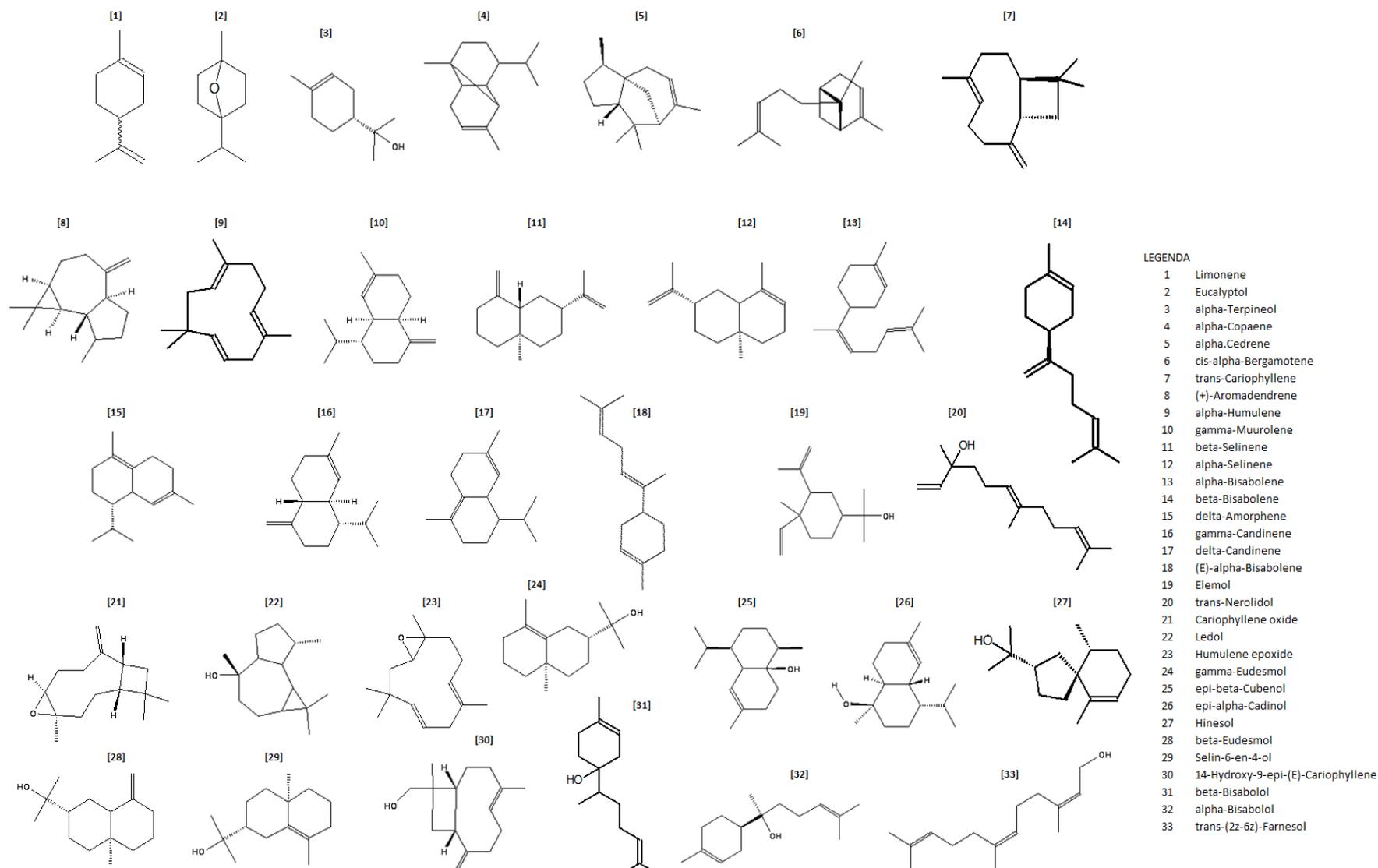


Figura 2. Fórmulas estruturais dos 33 compostos identificados no óleo essencial das folhas de *P. guajava*.

Dentre os 33 compostos identificados (**Tabela 2**), foram considerados majoritários os compostos voláteis com área percentual relativa acima de 10%, (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolene, Hinesol e *beta*-Bisabolol, suas estruturas estão em destaque na **Figura 2**. O óleo essencial apresentou predominância de sesquiterpenos (80-99%). Os teores de monoterpenos foram relativamente baixos, exceto para os genótipos que apresentaram elevados teores de limonene: C4 (Mimoso = 11,6%; Linhares = 11,6%), C6 (Mimoso = 8,9%; Linhares = 6,6%), C9 (Mimoso = 8,8%; Linhares = 9,7%), C12 (Mimoso = 11,7%; Linhares = 11,0%) e C17 (Mimoso = 5,5%; Linhares = 9,4%).

Uma análise geral apresenta o (*E*)-*trans*-Caryophyllene com elevado teor em todos os genótipos nos dois ambientes, potencial marcador químico para a espécie, evidencia a similaridade genética entre os genótipos. Alguns compostos apresentaram-se em maiores teores nos genótipos de Cortibel: β -Bisabolol, α -Bisabolol, α -Humulene, Humulene epoxide, *epi*- α -Cadinol. Enquanto que o β -Selinene, α -Selinene, Hinesol, 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Caryophyllene foram mais abundantes nos genótipos comerciais (**Tabela 2**).

A literatura apresenta relatos de diferentes perfis cromatográficos para o óleo essencial de *P. guajava* [21-26], o que pressupõe a existência de variabilidade quimiotípica. Os resultados deste estudo corroboram estas informações e aponta para a existência de mais de um perfil cromatográfico para o óleo essencial de *P. guajava*.

3.3. Análise Fatorial

A análise de diagnóstico dos 33 compostos identificados no óleo essencial dos 22 genótipos de *P. guajava* apresentou multicolinearidade severa, genotípica e fenotípica, de acordo com critérios estabelecidos por Montgomery e Peck [48], sugerindo alta correlação entre os compostos [43]. A multicolinearidade está associada ao fato de muitas funções de regressões diferentes proporcionarem bons ajustes para um

mesmo conjunto de dados, assim os coeficientes de regressão atendem a várias amostras em que as variáveis independentes são altamente correlacionadas. Estes coeficientes de regressão estimados variam de uma amostra para outra quando as variáveis independentes estão altamente correlacionadas (**Figura 3**). Isso leva à informação imprecisa a respeito dos coeficientes verdadeiros.

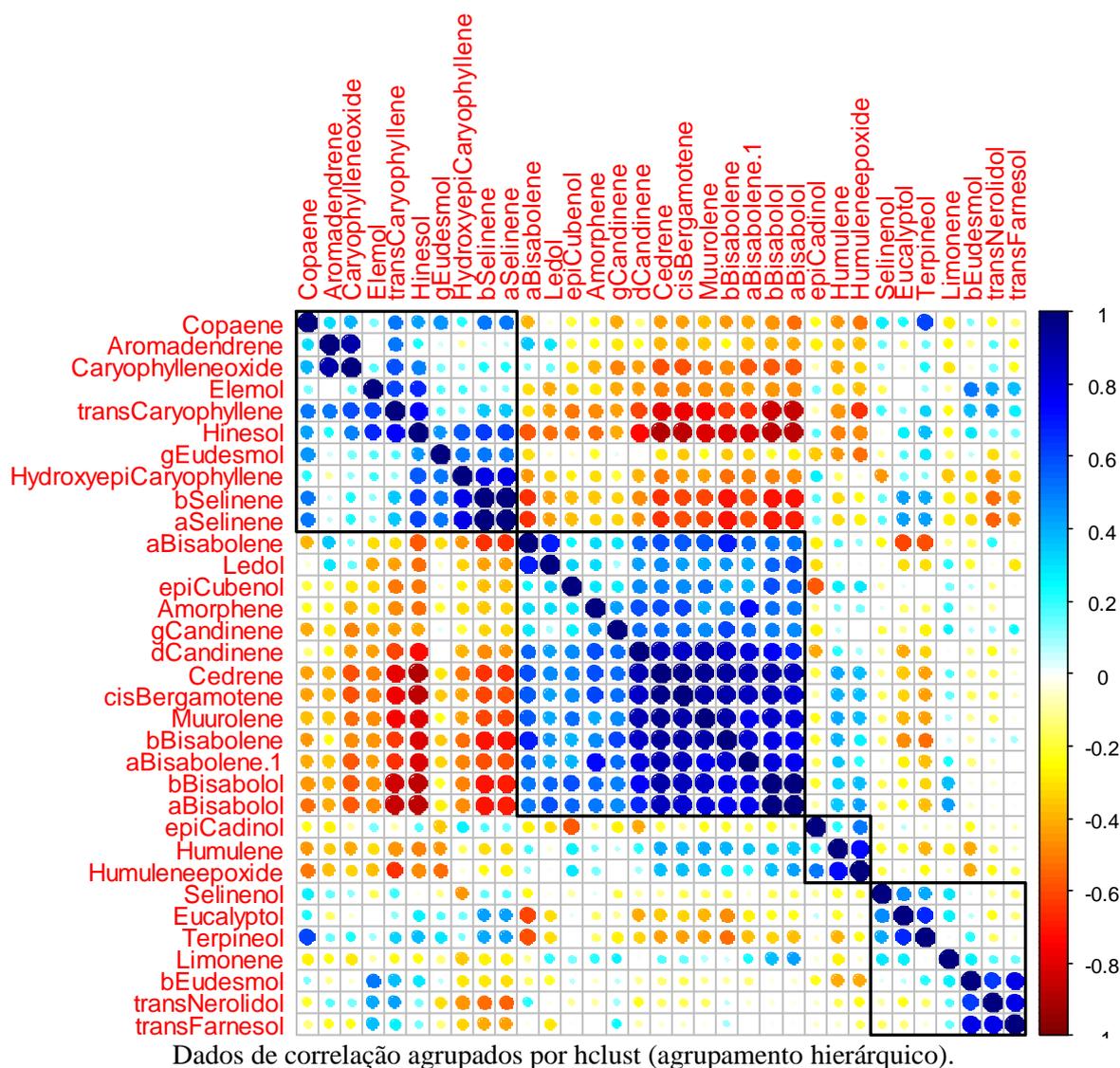


Figura 3. Análise de correlação para os 33 compostos presentes no óleo essencial de *P. guajava*.

Correlações positivas fortes foram observadas formando um grupo entre os compostos *alpha*-Copaene, (+)-Aromandrene, Caryophyllene oxide, Elemol, *trans*-Caryophyllene, Hinesol, *gamma*-Eudesmol, 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Caryophyllene, *alpha* e *beta*-Selinene, o que sugere que estes apresentam algumas similaridades no

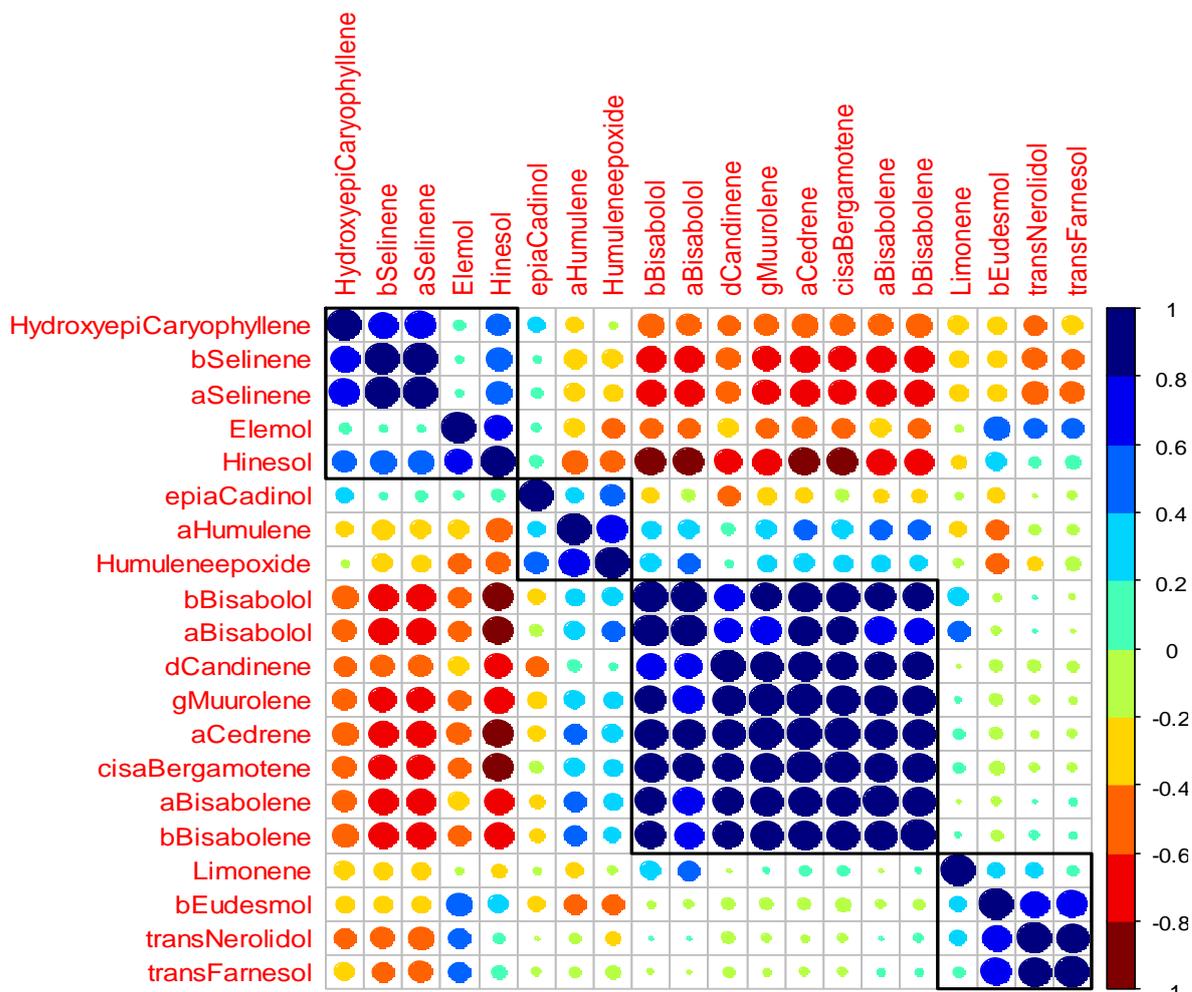
processo biossintético. O mesmo pode ser observado em um segundo grupo de compostos: *alpha*-Bisabolene, Ledol, *epi-beta*-Cubenol, *delta*-Amorphene, *gamma* e *delta*-Candinene, *alpha*-cedrene, *cis-alpha*-Bergamotene, *gamma*-Muuroolene, *beta* e *alpha*-Bisabolene, *alpha e beta*-Bisabolol. Formando um terceiro grupo de compostos altamente correlacionados tem-se: *epi-alpha*-Cadinol, *alpha*-Humulene e Humulene epoxide, já em um quarto grupo tem-se Selen-6-en-4-ol, Eucalyptol, *alpha*-Terpineol, Limonene, *beta*-Eudesmol, *trans*-Nerolidol, *trans*-(2Z-6Z)-Farnesol.

A análise de correlação entre os 33 compostos, este sugere que 70,23% das correlações calculadas são iguais ou superiores a $|0.5|$, valor indicativo de análise fatorial apropriada [40-43]. A partir desta informação propôs-se utilização da técnica estatística multivariada de Análise Fatorial, com Método de Componentes Principais via Rotação Ortogonal do Tipo Varimax para Extração das Matrizes e Fatores [39,43]. Para isso o conjunto de dados foi submetido a testes de adequação. O Teste de Esfericidade de Bartlett apresentou resultado favorável à Análise Fatorial ($p < 0,05$) e o critério Kaiser-Meyer-Olkin indicou valor de KMO regular (0,67).

As medidas de adequação da amostra para cada um dos compostos foram realizadas via MSA (Measure of Sampling Adequacy - Medida da Adequação da Amostra) e indicaram a necessidade da exclusão de variáveis, com peso $< 0,7$. Quando estes resultados foram comparados com a ordem das variáveis de maior peso nos últimos autovetores, conclui-se que os compostos Eucalyptol, α -Terpineol, α -Copaene, (*E*)-*trans*-Caryophyllene, (+)-Aromadendrene, δ -Amorphene, γ -Candinene, (*E*)- α -Bisabolene, Caryophyllene oxide, Ledol, γ -Eudesmol, *epi*- β -Cubenol e Selen-6-en-4-ol tinham peso pequeno na composição dos fatores e, portanto, não influenciavam de forma significativa.

Estes compostos foram excluídos e os cálculos das pressuposições para a realização da análise fatorial foram refeitos. Os resultados obtidos indicaram uma melhor adequação, principalmente no teste de KMO (0,77), que passou a classificar os dados como bons [49-53].

Outro critério utilizado para a verificação da análise fatorial foi a análise de correlação entre os 20 compostos restantes, este sugere que 85,53% das correlações calculadas são iguais ou superiores a $|0.3|$, valor indicativo de análise fatorial apropriada [40-43] (**Figura 4**).



Dados de correlação agrupados por hclust (agrupamento hierárquico).

Figura 4. Análise de correlação para os 20 compostos presentes no óleo essencial de *P. guajava* identificados como significativos para a composição dos fatores.

Correlações positivas fortes observadas no grupo de compostos 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Cariophyllene, *alpha* e *beta*-Selinene, Elemol e Hinesol apontam para a identificação de possíveis grupos de genótipos caracterizados pela presença de elevado teor destas substâncias. Um segundo grupo de compostos pode ser observado: Limonene, *beta*-Eudesmol, *trans*-Nerolidol, *trans*-(2*Z*-6*Z*)-Farnesol grupo este possivelmente associado a outro grupo de genótipos, em um terceiro grupo tem-se:

alpha e *beta*-Bisabolol, *delta*-Candinene, *gamma*-Muurolene, *alpha*-cedrene, *cis-alpha*-Bergamotene, *alpha* e *beta*-Bisabolene e um pequeno grupo formado por *epi-alpha*-Cadinol, *alpha*-Humulene e Humulene epoxide, indicando que estes estão relacionados à caracterização de outro grupo de genótipos.

Para determinação do número de fatores que deveriam ser retidos, foram levados em conta três critérios: autovalores (os vinte compostos avaliados revelaram que três fatores apresentaram autovalores - eigenvalue > 1); a variância total explicada por estes três fatores (76,9%) (**Tabela 3**) e a análise visual do gráfico *scree-plot* que mostra que primeira modificação mais brusca na tangente ocorre no terceiro fator (**Figura 5**), logo com três fatores é possível obter a explicação para as variações observadas.

Tabela 3. Estimativas de Autovalores relacionados a vinte compostos presentes no óleo essencial de *P.guajava*

Fatores	Autovalor (eigenvalue)	Percentual da Variância Explicada pelo Fator	Percentual Acumulado da Variância Explicado pelo Fator
1	9,5	47,3	47,3
2	3,9	19,6	66,8
3	2,0	10,1	76,9

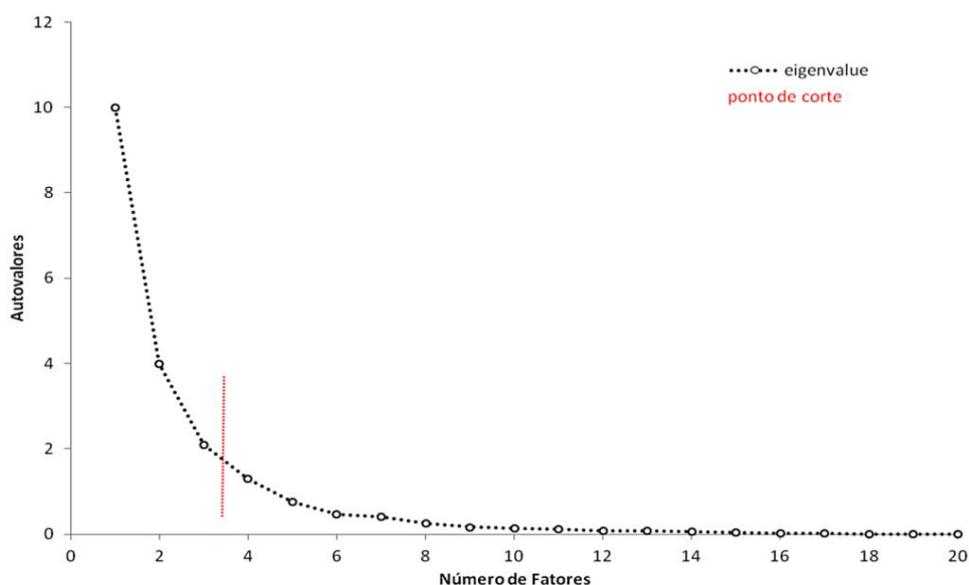


Figura 5. *Scree-plot* relacionado a vinte compostos presentes no óleo essencial de *P.guajava*

Obteve-se como resultado, três fatores, cada fator constituído com todos os compostos altamente correlacionados entre si, mas com baixas correlações com os compostos dos fatores diferentes (**Tabela 4**). Cada grupo de compostos representa uma única “supercaracterística” ou “quimiotipo”, responsável pelas correlações observadas e que sumariza informações principais das variáveis originais [39,43,44,46,52,53].

Tabela 4. Autovetores obtidos após a rotação Varimax nos vinte compostos presentes no óleo essencial de *P.guajava*

Compostos	Fator 1	Fator 2	Fator 3
Limonene	0.20	0.32	-0.09
α -Cedrene	-0.97	0.00	0.09
<i>cis</i> - α -Bergamotene	-0.94	-0.02	0.10
α -Humulene	-0.37	-0.11	0.78
γ -Muurolene	-0.94	-0.02	0.05
β -Selinene	0.65	-0.65	-0.27
α -Selinene	0.67	-0.67	-0.22
α -Bisabolene	-0.68	0.15	-0.02
β -Bisabolene	-0.92	0.12	0.07
δ -Candinene	-0.89	-0.12	-0.22
Elemol	0.53	0.48	-0.19
<i>trans</i> -Nerolidol	0.10	0.91	-0.04
Humulene epoxide	-0.29	-0.15	0.89
<i>epi</i> - α -Cadinol	0.34	-0.05	0.75
Hinesol	0.87	0.10	-0.29
β -Eudesmol	0.15	0.79	-0.35
14-Hydroxy- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Caryophyllene	0.55	-0.57	-0.02
β -Bisabolol	-0.92	0.11	0.11
α -Bisabolol	-0.88	0.12	0.20
<i>trans</i> -(2 <i>Z</i> -6 <i>Z</i>)-Farnesol	0.08	0.85	-0.03

Os valores em negrito indicam o peso associado de cada variável na composição do vetor.

Correlações positivas foram observadas entre os compostos que compõem o primeiro fator (Quimiotipo 1): β -Selinene, α -Selinene, Hinesol, 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Caryophyllene e correlações negativas foram registradas para α -Cedrene; *cis*- α -Bergamotene; γ -Muurolene; α -Bisabolene; β -Bisabolene; δ -Candinene, β -Bisabolol, α -Bisabolol. Indicando que a presença e a ausência destes compostos caracterizam o quimiotipo. O mesmo pode ser observado para o segundo fator (Quimiotipo 2) que apresentou correlação positiva entre o *trans*-Nerolidol, β -Eudesmol e *trans*-(2*Z*-6*Z*)-Farnesol e negativa entre β -Selinene; α -Selinene e 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Caryophyllene. O terceiro fator (Quimiotipo 3) apresentou correlações positivas entre:

α -Humulene, Humulene epoxide, *epi*- α -Cadinol, β -Bisabolol, α -Bisabolol e negativa com β -Eudesmol.

O biplot (**Figura 6**) e o triplot (**Figura 7**) foram construídos com base nas cargas fatoriais e mostram os 22 genótipos nos dois ambientes posicionados de acordo com os quimiotipos obtidos, determinados pela composição do óleo essencial da *P.guajava* de forma positiva e negativa.

A análise do biplot (Figura 6) baseada nas cargas fatoriais apenas dos dois primeiros fatores, 69,24% da variância total, mostra os compostos, representados pelos vetores, que foram determinantes na composição de cada quimiotipo, além do posicionamento dos genótipos nestes dois fatores.

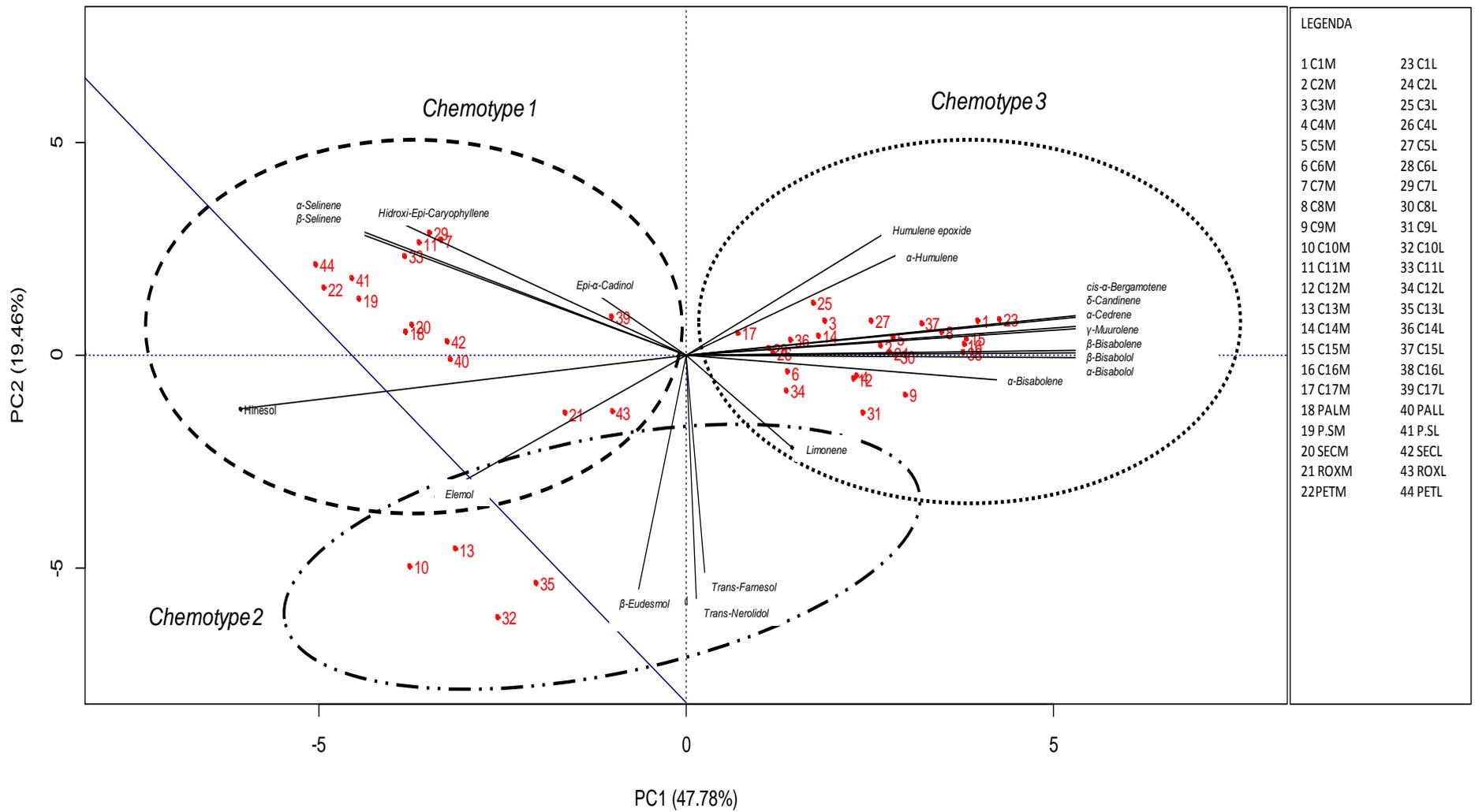


Figura 6. Biplot baseado nas cargas fatoriais mostrando os 22 genótipos nos dois ambientes (M = Mimoso e L = Linhares) para vinte compostos presentes no óleo essencial da *P.guajava*.

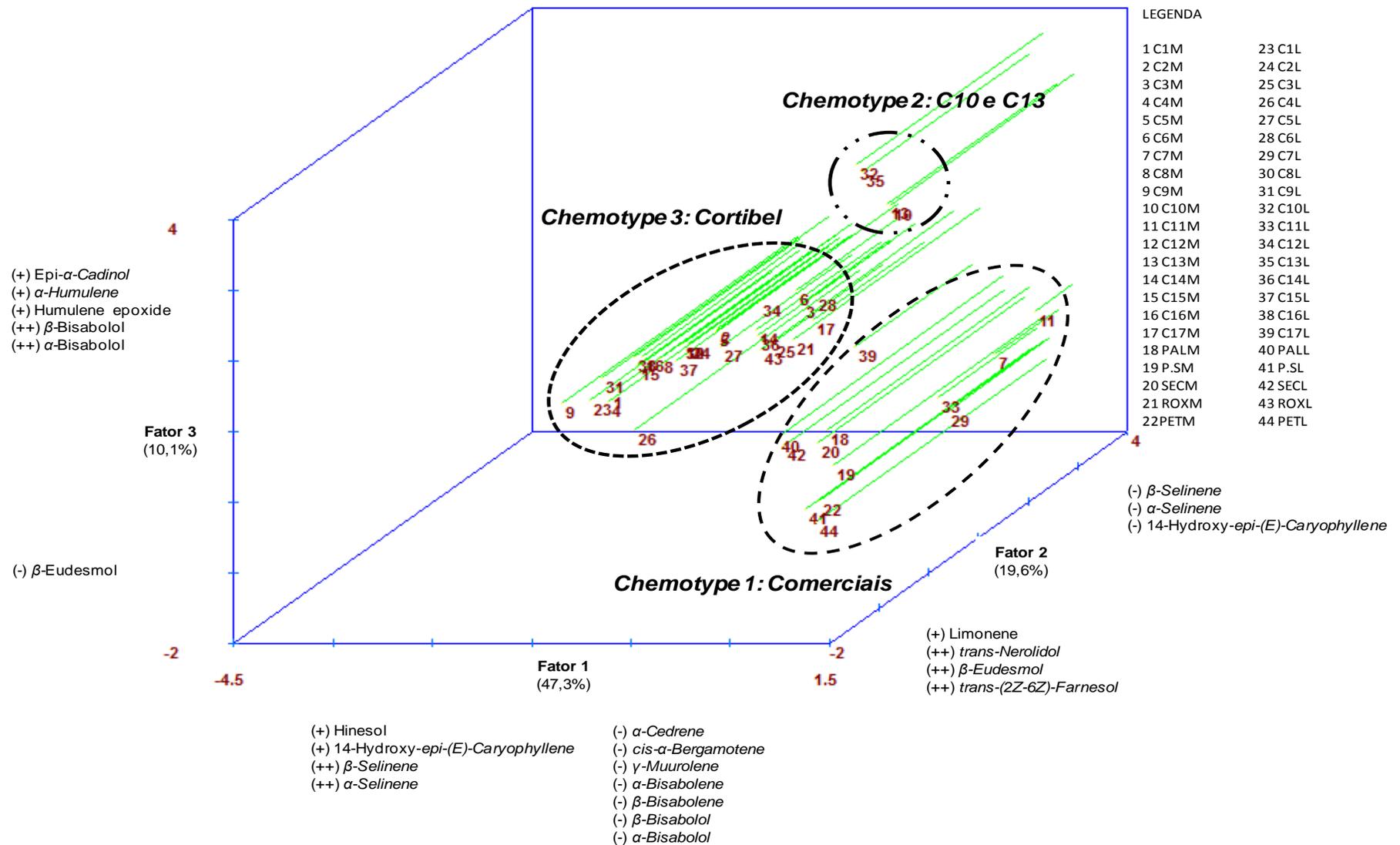


Figura 7. Triplot baseado nas cargas fatoriais mostrando os 22 genótipos nos dois ambientes (M = Mimoso e L = Linhares) para vinte compostos presentes no óleo essencial da *P.guajava*.

O Fator 1 explicou 47,3% da variação total, os genótipos comerciais PAL-M(18), PAL-L(37), SEC-M(20), SEC-L(41), PS-M(19), PS-L(40) PET-M(21) e PET-L(42) e os genótipos de Cortibel C7-M (7), C7-L (28), C11-M(11), C11-L(32) e C17-M(17) foram caracterizados por níveis elevados do β -Selinene, α -Selinene, Hinesol, 14-Hydroxy-*epi*-(*E*)-Caryophyllene. Com destaque para o β -Selinene, α -Selinene, que ao compará-los com os dados da **Tabela 2**, mostram-se como bons marcadores químicos para o Quimiotipo 1 (Comerciais).

O Fator 2 explicou 19,6% da variação total, os genótipos de Cortibel C10-M(10), C10-L(31), C13-M(13) e C13-L(34) apresentaram elevados níveis de *trans*-Nerolidol, β -Eudesmol e *trans*-(2*Z*-6*Z*)-Farnesol, compostos que analisados na **Tabela 2**, mostram-se como bons marcadores químicos para o Quimiotipo 2 (C10 e C13). O Fator 3, que explicou 10,1% da variação total, inclui os genótipos de Cortibel: C1-M(1), C1-L(22), C2-M(2), C2-L(23), C3-M(3), C3-L(24), C4-M(4), C4-L(25), C5-M(5), C5-L(26), C6-M(6), C5-L(27), C8-M(8), C8-L(29), C9-M(9), C9-L(30), C12-M(12), C12-L(33), C14-M (14), C14-L(35), C15-M(15), C15-L(36), C16-M(16), C16-L(37), C17-L(38), ROX-M(21) e ROX-L(43). Estes genótipos foram caracterizados por níveis elevados de α -Cedrene; *cis*- α -Bergamotene; α -Humulene, Humulene epoxide, *epi*- α -Cadinol, β -Bisabolol, α -Bisabolol. Os dois últimos mostraram-se bons marcadores químicos para o Quimiotipo 3 (que inclui os genótipos Cortibel).

Este resultado está em concordância com características moleculares obtidas por SSR (microssatélites) observadas nos mesmos genótipos, estes separam os genótipos de Cortibel dos comerciais, entretanto, a diferenciação dos genótipos C7, C10, C11, C13 e C17 não havia sido percebida [2].

Os resultados indicam que as diferenças existentes entre os ambientes na composição e no perfil cromatográfico dos óleos essenciais não foram suficientemente significativas para promover a separação de genótipos iguais em quimiotipos diferentes, exceto para o genótipo C17, que apresentou características semelhantes aos genótipos comerciais em Mimoso do Sul e aos de cortibel em

Linhares. A composição dos quimiotipos está sendo mantida independente do ambiente, mostrando que o fator genético neste caso é predominante.

Em estudos realizados com *L. Alba* e *Citrus* foram observados comportamentos similares, indicando que a variação na composição química do óleo essencial é preferencialmente de natureza genética, com influência de menor magnitude do ambiente [54-56].

4. Conclusões

Foram identificados 33 compostos presentes no óleo essencial das folhas de *P. guajava* nos dois ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso - M), representando 87,5-99,0% da composição total.

Os compostos majoritários foram: (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolene, Hinesol e *beta*-Bisabolol, com destaque para o (*E*)-*trans*-Caryophyllene que se apresentou como potencial marcador químico para a espécie de *P. guajava*.

A Análise Multivariada de Fatores mostrou que três fatores explicam 76,9% da variância total e possibilitou a definição de três quimiotipos para a *P. guajava*: Quimiotipo 1 (Comerciais - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 e C17M), sendo o β -Selinene, α -Selinene seus marcadores químicos. Quimiotipo 2 (C10 e C13) apresentaram elevados níveis Elemol, *trans*-Nerolidol, β -Eudesmol e *trans*-(2Z-6Z)-Farnesol, sendo estes seus marcadores químicos e Quimiotipo 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16, C17L, ROX21 e ROX43), onde os compostos β -Bisabolol, α -Bisabolol são indicados como marcadores químicos para o quimiotipo.

Os ambientes afetaram de forma pouco expressiva a composição dos óleos essenciais de *P. guajava*, indicando que a composição dos quimiotipos está predominantemente sendo influenciada por fatores genéticos, com exceção do genótipo C17.

5. Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

6. Referências

- [1] Roth, L.S. 'Mosby's Handbook of Herbs & Natural Supplements', 4th ed. Mosby, St Louis, 2010.
- [2] Coser, S.M.; Ferreira, M.F.S.; Ferreira, A.; Mitre, L.K.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. *Scientia Horticulturae*. **2012**, 148, 223–229.
- [3] Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B.K.; Landrum, L.L.; Matsumoto, K.; Mazine, F.F.; Lughadha, E.N.; Proenca, C.; Soares Silva L.H.; Wilson, P.G.; Lucas, E. 2008. World checklist of *Myrtaceae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/> (accessed: 06.02.15).
- [4] Gutiérrez, R.M.; Mitchell, S.; Solis, R.V.J. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal Ethnopharmacology*. 2008, 117, 1–27.
- [5] Kamath, J.V., Rahul, N., Ashok, C.K.K., Lakshmi, S.M. *Psidium guajava*: a review. *Int. J. Green Pharm.* **2008**, 2, 9–12.
- [6] Geidam, Y.A.; Ambali, A.G.; Onyeyili, P.A. Phytochemical screening and antibacterial properties of organic solvent fractions of *Psidium guajava* aqueous leaf extracts. *Int. Journal Pharmacology*, **2007**, 3(1), 1811-7775.
- [7] Rodríguez, N.N.; Valdés, J.J.; Rodríguez, J.A.; Velásquez, J.B.; Rivero, D.; Martínez, F.; González, G.; Sourd, D.G.; González, L.; Canizares, J. Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.). *Cuba. Biotecnol. Apl.* **2010**, 27, 238–241.
- [8] Varmudy, V. 'Guava: potential untapped. Facts For You'. 2013. Kew: <http://www.ffymag.com/admin/issuepdf/Guava FFY/> (accessed: 06.12.14).
- [9] Mailoa, M.N.; Mahendradatta, M.; Laga, A.; Djide, N. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. *International Journal of Scientific & Technology Research*. **2014**, 3.
- [10] Biswas, B.; Rogers, K.; Mclaughlin, F.; Daniels, D.; Yadav, A. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*. **2013**.

- [11] Sapkota, R.; Dasgupta, R.; Rawat, N.; Rawat, D.S. Antibacterial Effects Of Plants Extracts On Human Microbial Pathogens & Microbial Limit Tests, *International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry*. **2012**, 2(4).
- [12] Mohamed, I.; Minhas, P.S.; Khanum, F.; Sahana, V.M.; Sahana, S.. Antibacterial Activity of Leaves Extract of Guava (*Psidium Guajava*). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. **2012**, 3 (1).
- [13] Metwally, A. M.; Omar, A. A.; Ghazy, N. M.; Harraz, F. M., S. M. El Sohafy Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*. **2011**, 3(21).
- [14] Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.V.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origins functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 2010, 91, 621–632.
- [15] Metwalli, A.M.; Omar, A.A.; Harraz, F.M.; El Sohafy, S.M.. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Magazine*. **2010**, 6(23), 216-222.
- [16] Joseph, B.; Priya, M.R.; Helen, M.P.A.; Sujatha, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* L. leaf, *Journal of Advanced Biotech*. **2010**, 9(10), 10-14.
- [17] Deguchi, Y.; Miyazaki, K. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutr Metab (Lond)*. 2010, 7(9).
- [18] Ju-Wen Wu; Chiu-Lan Hsieh; Hsiao-Yun Wang; Hul-Yin Chen. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry*. **2009**, 113(1), 78-8.
- [19] Das, S.; Dutta, S.; Deka, S.. A study of the anti-ulcer activity of the ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* on experimental animal models. *The Internet Journal of Pharmacology*. **2009**, 7(1).
- [20] Nimishaa, S.; Kherwara, D.; Ajayb, K.M.; Singhc, B.; Ushaa, K. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective. *Scientia Horticulturae*. **2013**, 164, 578–588.
- [21] Khadhri, A.; Mokni, R.E.I; Almeida, C.; J.M.F; Nogueira, M; Araújo, E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 2014, 52, 29–31.
- [22] Lima, R.K.; Cardoso, M.G.; Santos, C.D.; Moraes, J.C.; Néri, D.K.P.; Nascimento, E.A. Essential oil chemical composition from leaves of guava (*Psidium guajava* L.) and its effects on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae) behavior. *Ciênc. Agrotec*. **2009**, 33, 1777-1781.

- [23] Chen, H.C.; Sheu, M.J.; Lin, L.Y.; Wu, C.M. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 345–347.
- [24] Cole, R.A.; Setzer, W.N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* from Monteverde, Costa Rica. *J. Essent. Oil-Bear Plants.* **2007**, *10*, 365–373.
- [25] Silva, J.D.; Luz, A.I.R.; Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Zoghbi, M.G.B.; Maia, J.G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *J. Flavor Frag.* **2003**, *18*, 240–243.
- [26] Solórzano-Santos, F; Miranda-Navales, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology.* **2011**, *23*, 1-6.
- [27] Alves, S.F.; Borges, L.L.; Paula, J.A.M.; Vieira, R.F.; Ferri, P.H.; Couto, R.O.; Paula, J.R.; Bara, M.T.F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal. Pharmacognosy.* **2013**, *23*(2), 225.
- [28] Botrel, P.P.; Pinto, J.E.B.P.; Araújo, A.C.C.; Bertolucci, S.K.V.; Figueiredo, F.C.; Ferri, P.H., Costa, D.P. Variações no teor e na composição de *Hyptis marrubioides* EPL. Cultivado no campo e em casa de vegetação. *Química Nova*, **2010**, *33*: 33-37.
- [29] Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Waomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemical Toxicology.* **2008**, *46*, 446-475.
- [30] Yapia, T.A; Botib, J.B; Tonzibob, Z.F; Ahibob, C.A; Bighellia, A; Casanova, J.; Tomi, F. Chemical Variability of *Xylopiya quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire. *Chemistry & Biodiversity.* **2014**, *11*, 332-339.
- [31] Stesevic, D.; Mihailo, R.; Vuko, N.; Marijana, N.; Cakovic, D.; Zlatko, S. Chemotype Diversity of Indigenous Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) Populations in Montenegro. *Chemistry & Biodiversity.* **2014**, *11*, 101-114.
- [32] Radulovic, N.S.; Dekic, M.S. Volatiles of *Geranium purpureum* Vill. and *Geranium phaeum* L.: Chemotaxonomy of *Balkan Geranium* and *Erodium* Species (*Geraniaceae*). *Chemistry & Biodiversity.* **2013**, *10*, 2042-2052.
- [33] Oliveira, E.C.; Filho, A.A.C.; Firetti, R. Identification and Elaboration of Statistical Variables Through Multivariate Techniques in the Study of the Production Grain and Fiber, Administrative Region of Presidente Prudente-SP. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas.* **2014**, *35*(2), 159-180.
- [34] Valente, M.D.R.; Queiroz, W.T.de; Pinheiro, J.G.; Monteiro, L.A.S. Modelo de Predição para o Volume Total de Quaruba (*Vochysia inundata* Ducke) via Análise de Fatores e Regressão. *Revista árvore.* **2011**, *35*(2), 307-317.
- [35] Torres, F. J. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, **2008**.

- [36] Biswas, D.K.; Xua, H.; Yang, J.C.; Li, Y.G.; Chen, S.B.; Jiang, C.D.; Li, W.D.; Maa, K.P.; Adhikary, S.K.; Wangd, X.Z.; Jiang, G.M. Impacts of methods and sites of plant breeding on ozone sensitivity in winter wheat cultivars. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **2009**, 134, 168–177.
- [37] Dewick, P. M. 'Medicinal Natural Product - A biosynthetic approach'. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, p. 546, 2009.
- [38] Phillips, M.A. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science*. **2008**, 13, 12, 619-623.
- [39] Oliveira, E.C.; Filho, A.A.C.; Firetti, R. Identification and Elaboration of Statistical Variables Through Multivariate Techniques in the Study of the Production Grain and Fiber, in Administrative Region of Presidente Prudente-SP. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. **2014**, 35(2), 159-180.
- [40] Bakke, H.A.; Leite, A.S.M.; Silva, L.B. Multivariate Statistics: Factorial Analysis Application in Production Engineering. *Revista Gestão Industrial*. **2008**, 4(4), 1-14.
- [41] Belfiore, P.P.; Fávero, L.P.L.; Angelo, C.F. Multivariate Analysis For Assessment Of The Main Latin-American Sectors. *FACES R. Adm.* **2006**, 5(1), 73-90.
- [42] Mingoti, S. A. 'Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada'. Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- [43] Hair Junior, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C. 'Análise multivariada de dados'. 5.ed. Editora Bookman, Porto Alegre, 2005.
- [44] Bomfim, P.R.C.M.; Almeida, R.S.; Gouveia, V.A.L.; Macedo, M.A.S.; Marques, J.A.V. Utilização de Análise Multivariada na Avaliação do Desempenho Econômico-Financeiro de Curto Prazo: uma Aplicação no Setor de Distribuição de Energia Elétrica. *Revista ADM.MADE*. **2011**, 15(1), 75-92.
- [45] Novaes, A.G.N. 'Logística e gerenciamento da cadeia de distribuição: estratégia, operação e avaliação'. Editora Elsevier/Campos, Rio de Janeiro, 2004, 321-344.
- [46] Damásio, B. F. Uso da análise fatorial exploratória em psicologia. *Avaliação Psicológica*, **2012**, 11(2), 213-228.
- [47] Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M., *Química Nova*. **2005**, 28, 519.
- [48] Montgomery, D.C.; Peck, E.A. 'Introduction to linear regression analysis'. J. Wiley, New York, 1981. 504p.
- [49] Hutcheson, G. D.; Sofroniou, N. (1999). *The multivariate social scientist: Introductory statistics using generalized linear models*. London: Sage Publications. In: Damásio, B.F. Uso da análise fatorial exploratória em psicologia. *Avaliação Psicológica*. **2012**, 11(2), 213-228.

- [50] Barroso, L. P.; Artes, R. (Universidade Feral de Lavras - *Minicurso: Análise Multivariada*), comunicação pessoal, 2003, 156 p.
- [51] Kaiser, H. F.; Rice, J. Little Jiffy, mark IV. *Education and Psychological Measurement*, **1974**, 34, 111–117.
- [52] Tabachnick, B. G. & Fidell, L. S. 'Using Multivariate Statistics'. 5th. Ed., Allyn and Bacon, Boston, 2007.
- [53] Fávero, L. P.; Belfiore, P.; Silva, F. L.; Chan, B. L. 'Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões'. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009.
- [54] Yamamoto, P.Y. Dissertação, Instituto Agronômico de Campinas – IAC, Campinas 2006.
- [55] Tavares, E.S.; Julião, L.S.; Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (*Verbenaceae*) cultivados em condições semelhantes. *Rev Bras Farmacogn.* **2005**, 15, 1-5.
- [56] Gomes, M.S.; Cardoso, M.G.; Souza, P.E.; Machado, S.M.F.; Silva, L.F.; Teixeira, M.L.; Andrade, J.; Miranda, C.A.S.F.; Andrade, M.A. Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity. *Científica, Jaboticabal.* **2013**, 41(2), 111–121.
- [57] BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il. P. 198, 199.
- [58] National Institute of Standards and Technology (NIST). 'Standard Reference Database 69: *NIST Chemistry WebBook*', 2011, U.S. Secretary of Commerce on behalf of the *United States of America*.
- [59] Adams, RP. 'Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy'. 4^a ed. Illinois, Allured Publishing Corporation, EUA, Carol Stream, 2007.
- [60] R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, **2010**.
- [61] Cruz, C.D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy (Online)*. **2013**, 35, 271-276.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO GERAL

Foram identificados 33 compostos nos dois ambientes estudados (Linhares - L e Mimoso - M), representando 87,5-99,0% da composição total do óleo essencial de *P. guajava*.

Os compostos majoritários, com área relativa > 10% foram: (*E*)-*trans*-Caryophyllene, *alpha*-Humulene, *trans*-Nerolidol, *beta*-Bisabolene, Hinesol e *beta*-Bisabolol, com destaque para o (*E*)-*trans*-Caryophyllene que se apresentou como potencial marcador químico para a espécie.

O perfil cromatográfico do óleo essencial apresentou grande variabilidade quimiotípica.

Nas condições experimentais foi possível evidenciar a viabilidade de exploração do óleo essencial, principalmente pelos elevados teores de (*E*)-*trans*-caryophyllene (C10, C13 e SEC), *alpha*-humulene (C3 e C6) e o *beta*-bisabolol (C2, C8, C12, C15 e C16) que alguns genótipos apresentaram. Estes compostos apresentam atividades biológicas testadas, e portanto, são de interesse a programas de melhoramento que visam agregar valor à cultura da *P. guajava*.

A Análise de Fatores definiu três quimiotipos para a *P. guajava*: Quimiotipo 1 (Comerciais - PAL, SEC, PS, PET, C7, C11 e C17M), sendo o β -Selinene, α -Selinene seus marcadores químicos. Quimiotipo 2 (C10 e C13) apresentaram elevados níveis Elemol, *trans*-Nerolidol, β -Eudesmol e *trans*-(2Z-6Z)-Farnesol, sendo estes seus marcadores químicos e Quimiotipo 3 (Cortibel - C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C12, C14, C15, C16, C17L), onde os compostos β -Bisabolol, α -Bisabolol são indicados como marcadores químicos para o quimiotipo.

As diferenças existentes entre os ambientes na composição dos óleos essenciais não foram suficientemente significativas para promover a separação de genótipos iguais em quimiotipos diferentes, exceto para o genótipo C17, que apresentou-se em diferentes quimiotipos em função do ambiente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIANUAL. São Paulo: **Agra FNP Consultoria e Comércio**. 2013, 334.
- ALVES, S.F.; BORGES, L.L.; PAULA, J.A.M.; VIEIRA, R.F.; FERRI, P.H.; COUTO, R.O.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal. Pharmacognosy**. 2013, 23(2), 225.
- ANDREW, K. N.; RUTAN, S. C.; WORSFOLD, P. J.; **Anal. Chim. Acta**. 1999, 388-315.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils - **A review. Food Chemical Toxicology**. 2008, 46, 446-475.
- BAKKE, H.A.; LEITE, A.S.M.; SILVA, L.B. Multivariate Statistics: Factorial Analysis Application in Production Engineering. **Revista Gestão Industrial**. 2008, 4(4), 1-14.
- BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R. **Anal. Chem**. 1987, 59, 1007A.
- BELFIORE; P.P.; FÁVERO, L.P.L.; ANGELO, C.F. Multivariate Analysis For Assessment Of The Main Latin-American Sectors. **FACES R. Adm**. 2006, 5(1), 73-90.
- BISWAS, B.; ROGERS, K.; MCLAUGHLIN, F.; DANIELS, D.; YADAV, A. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **International Journal of Microbiology**. 2013.
- BISWAS, D.K.; XUA, H.; YANG, J.C.; LI, Y.G.; CHEN, S.B.; JIANG, C.D.; LI, W.D.; MAA, K.P.; ADHIKARY, S.K.; WANGD, X.Z.; JIANG, G.M. Impacts of methods and sites of plant breeding on ozone sensitivity in winter wheat cultivars. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 2009, 134, 168–177.
- BISWAS, KK *et al*. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta Physiologiae Plantarum**. 2009, 31(1), 13-19.
- BOMFIM, P.R.C.M.; ALMEIDA, R.S.; GOUVEIA, V.A.L.; MACEDO, M.A.S.; MARQUES, J.A.V. Utilização de Análise Multivariada na Avaliação do Desempenho Econômico-Financeiro de Curto Prazo: uma Aplicação no Setor de Distribuição de Energia Elétrica. **Revista ADM.MADE**. 2011, 15(1), 75-92.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C.; FERRI, P.H., COSTA, D.P. Variações no teor e na composição de *Hyptis marruboides* EPL. Cultivado no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, 2010, 33: 33-37.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria n. 971, de 3 de maio de **2006**. **Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 10 junho de 2014.

CHEN, H.C.; SHEU, M.J.; LIN, L.Y.; WU, C.M. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. **J. Essent. Oil Res.** 2007, 19, 345–347.

CLARINDO, W.R. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. **Scientia Horticulturae**. 2012, 148, 223–229.

COLE, R.A.; SETZER, W.N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* from Monteverde, Costa Rica. **Journal Essential Oil-Bear Plants**. 2007, 10, 365-373.

COSER, S.M.; FERREIRA, M.F.S.; FERREIRA, A.; MITRE, L.K.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. **Scientia Horticulturae**. 2012, 148, 223–229.

COSTELLO, A. B. & OSBORNE, J. W. Best practices in exploratory factor analysis: Four recommendations for getting the most from your analysis. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, 2005, 10(7), 1-9.

COUTINHO, D. F.; AGRA, M. F.; BASÍLIO, I. J. L. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (*Lauraceae-Lauroidae*). **Revista Brasileira Farmacognosia**, Paraná. 2006, 16, 537-544.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. 620p.

DAMÁSIO, B. F. **Uso da análise fatorial exploratória em psicologia**. **Avaliação Psicológica**, 2012, 11(2), 213-228.

DAS, S.; DUTTA, S.; DEKA, S.. A study of the anti-ulcer activity of the ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* on experimental animal models. **The Internet Journal of Pharmacology**. 2009, 7(1).

DEGUCHI, Y.; MIYAZAKI, K. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. **Nutr Metab (Lond)**. 2010, 7(9).

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Product - A biosynthetic approach**. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, p. 546, 2009.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. 2007, 21(4), 308-323.

ENFISSI, E.M.A. et al. Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. **Plant Biotechnology Journal**. 2005, 3(1), 17-27.

FORZZAa, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.F.; CARVALHO Jr., A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D.P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.B.; SOUZA, V.C. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Andréa Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, 2010.

FORZZAb, R.C et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges, **BioScience**. 2012, 62(1), 39.

GEIDAM, Y.A.; AMBALI, A.G.; ONYAYILI, P.A. Phytochemical screening and antibacterial properties of organic solvent fractions of *Psidium guajava* aqueous leaf extracts. **Int. Journal Pharmacology**, 2007, 3(1), 1811-7775.

GEISSMAN, T.A.; CROUT, D.H.G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. Freeman, Cooper & Company, San Francisco, California. 1969, 233-289.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; LUGHADHA, E.N.; PROENCA, C.; SOARES SILVA L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E. 2008. **World checklist of *Myrtaceae***. In: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/> (accessed: 06.02.15).

GUJARATI, D. N. **Econometria básica**. São Paulo: Makron Book, 2000.

GUTIÉRREZ, R.M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V.J. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology**. 2008, 117, 1–27.

HAIR JUNIOR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Editora Bookman, Porto Alegre, 2005.

HUI-YIN CHEN; GOW-CHIN YEN. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemistry**. 2007, 101(2), 686-694.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. A. Review: Novel antiviral agents: a medicinal plant preservative. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n.3, p. 412-427, 2003.

JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. Em: B. S. Everitt & D. C. Howell (Orgs.), *Encyclopedia of statistics in behavioral science*. New York: John Wiley and Sons Ltd. 2005, 1580-1584.

JÖRESKOG, K. G.; KLOVAN, J. E.; REYMENT, R. A.; **Geological Factor Analysis**; Elsevier; Amsterdam, 1976.

JOSEPH, B.; PRIYA, M.R.; HELEN, M.P.A.; SUJATHA, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* L. leaf, **Journal of Advanced Biotech**. 2010, 9(10), 10-14.

JU-WEN WU; CHIU-LAN HSIEH; HSIAO-YUN WANG; HUI-YIN CHEN. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food Chemistry**. 2009, 113(1), 78-8.

KAMATH, J.V., RAHUL, N., ASHOK, C.K.K., LAKSHMI, S.M. *Psidium guajava*: a review. **Int. J. Green Pharm**. 2008, 2, 9–12.

- KHADHRI, A.; MOKNI, R.E.L; ALMEIDA, C.; J.M.F; NOGUEIRA, M; ARAÚJO, E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. ***Industrial Crops and Products***. 2014, 52, 29–31.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, C.D.; MORAES, J.C.; NÉRI, D.K.P.; NASCIMENTO, E.A. Essential oil chemical composition from leaves of guava (*Psidium guajava* L.) and its effects on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae) behavior. ***Ciênc. Agrotec.*** 2009, 33, 1777-1781.
- LOHNES, M. T.; GUY, R. D.; WENTZELL, P. D.; ***Anal. Chim. Acta.*** 1999, 389, 95.
- MAEDER, M.; ***Anal. Chem.*** 1987, 59, 527.
- MAILOA, M.N.; MAHENDRADATTA, M.; LAGA, A.; DJIDE, N. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. ***International Journal of Scientific & Technology Research.*** 2014, 3.
- MALHOTRA, N. K. **Marketing Research: an applied orientation.** New Jersey: Prentice Hall, 2001.
- MARINHO, S.C. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dióica* Lindl frente *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).** 2010. 125f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2010.
- MARTENS, H.; NAES, T.; **Multivariate Calibration;** John Wiley & Sons; New York, 1989.
- METWALLI, A.M.; OMAR, A.A.; HARRAZ, F.M.; EL SOHAFY, S.M.. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. ***Pharmacognosy Magazine.*** 2010, 6(23), 216-222.
- METWALLY, A. M.; OMAR, A. A.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M., S. M. El Sohafy Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. ***Pharmacognosy Journal.*** 2011, 3(21).
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada.** Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MOHAMED, I.; MINHAS, P.S.; KHANUM, F.; SAHANA, V.M.; SAHANA, S.. Antibacterial Activity of Leaves Extract of Guava (*Psidium guajava*). **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. Vol. 3 (1), 2012.

NIMISHAA, S.; KHERWARA, D.; AJAYB, K.M.; SINGHC, B.; USHAA, K. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective. **Scientia Horticulturae**. 2013, 164, 578–588.

NOVAES, A.G.N. **Logística e gerenciamento da cadeia de distribuição: estratégia, operação e avaliação**. Editora Elsevier / Campos, Rio de Janeiro, 2004, 321-344.

OJEWOLE, J.A.O.. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**. 2006, 28(7), 441-446.

OLIVEIRA, E.C.; FILHO. A.A.C.; FIRETTI, R. Identification and Elaboration of Statistical Variables Through Multivariates Techniques in the Study of the Production Grain and Fiber, Administrative Region of Presidente Prudente-SP. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. 2014, 35(2), 159-180.

PAULA, J.A.M.; FERRI, P.H.; BARA, M.T.F., TRESVENZOL, L.M.F., SÁ, F.A.S., PAULA, J.R. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 2011, 39, 643-650.

PEREIRA, F. M.; KAVATI, R. Contribution of Brazilian scientific research in developing some of subtropical fruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. 2011, 33(1), 92-108.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. **Melhoramento Genético da Goiaba**. In Anais III. Simpósio Brasileiro da Cultura da Goiaba. v. 2. Jaboticabal: Unesp. 2009, 371-398.

PHILLIPS, MA *et al.* The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**. 2008, 13(12), 619-23,

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). **Brazilian Journal. Pharmacognosy**. 2006, 16, 246-251.

RADULOVIC, N.S.; DEKIC, M.S. Volatiles of *Geranium purpureum* Vill. and *Geranium phaeum* L.: Chemotaxonomy of Balkan Geranium and Erodium Species (*Geraniaceae*). **Chemistry & Biodiversity**. 2013, 10, 2042-2052.

RAJENDRAN, S., SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**. 2008, 44, 126-135.

RODRÍGUEZ, N.N.; VALDÉS, J.J.; RODRÍGUEZ, J.A.; VELÁSQUEZ, J.B.; RIVERO, D.; MARTINEZ, F.; GONZALÉZ, G.; SOURD, D.G.; GONZALÉZ, L.; CANIZARES, J. Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.). **Cuba. Biotecnol. Apl.** 2010, 27, 238–241.

ROKBENI, N.; M'RABET, Y.; DZIRI, S.; CHAABANE, H.; JEMLI, M.; FERNANDEZ, X; BOULILA, A. Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Natural Populations of Tunisian *Daucus carota* L. (*Apiaceae*). **Chemistry & Biodiversity**. 2013, 10, 2278-2290.

ROTH, L.S. 'Mosby's Handbook of Herbs & Natural Supplements', 4th ed. Mosby, St Louis, 2010.

ROTH, L.S. **Mosby's Handbook of Herbs & Natural Supplements**, 4th ed. Mosby, St Louis. 2010.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M. L.R.Z.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits, **Ciência Rural**. 2008, 38(2), 301-307.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.V.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origins functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. 2010, 91, 621–632.

SANCHEZ, E.; KOWALSKI, B. R.; **J. Chemometr**. 1988, 2, 265.

SANDASI, M.; KAMATOU, G.P.P.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A.M. A chemotaxonomic assessment of four indigenous South African Lippia species using

GC–MS and vibrational spectroscopy of the essential oils. ***Biochemical Systematics and Ecology***. 2013, 51, 142-152.

SANTANA, A. C. **Elementos de economia, agronegócio e desenvolvimento local**. Belém: GTZ; TUD; UFRA, 2005. (Série Acadêmica, 1).

SAPKOTA, R.; DASGUPTA, R.; RAWAT, N.; RAWAT, D.S. Antibacterial Effects Of Plants Extracts On Human Microbial Pathogens & Microbial Limit Tests, ***International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry***. 2012, 2(4).

SCARMINIO, I. S.; ISHIKAWA, D. N.; BARRETO, W. J.; PACZKOWSKI, E. D.; ARRUDA, I.C.; ***Quim. Nova*** **1998**, 21, 590.

SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER JR., L.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; ***Anal. Chim. Acta***. 2000, 409, 159.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. ***J. Flavor Frag.*** 2003, 18, 240–243.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. ***Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **2012**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000171> > Acessado em 17/04/2015.

SOLÓRZANO-SANTOS, F; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. ***Current Opinion in Biotechnology***. 2011, 23, 1-6.

STESEVIC, D.; MIHAILO, R.; VUKO, N.; MARIJANA, N.; CAKOVIC, D.; ZLATKO, S. Chemotype Diversity of Indigenous Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) Populations in Montenegro. ***Chemistry & Biodiversity***. 2014, 11, 101-114.

TANGPU, T.V.; YADAV, A.K. Anticestodal efficacy of *Psidium guajava* against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. ***Indian Journal Pharmacology***. 2006, 38(1), 29-32.

TORRES F. J. **Caracterização morfo-Agronômica, seleção de descritores e associação entre a divergência genética e a heterose em meloeiro**. 2008. 150f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, 2008.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2005, 49(6), 2474-2478.

VALENTE, M.D.R.; QUEIROZ, W.T.DE; PINHEIRO, J.G.; MONTEIRO, L.A.S. Modelo de Predição para o Volume Total de Quaruba (*Vochysia inundata Ducke*) via Análise de Fatores e Regressão. **Revista árvore**. 2011, 35(2), 307-317.

WIDAMAN, K. F. (2007). **Common factor versus components: Principals and principles, errors and misconceptions** Em: R. Cudeck & R. C. Mac- Callum. **Factor Analysis at 100: Historical Developments and Future Directions**. London: Lawrence Erlbaum Associates. 2007, 177-204.

WINDIG, W.; HECKLER, C. E.; AGBLEVOR, F. A.; EVANS, R. J.; **Chemom. Intell. Lab. Syst.** 1992, 14, 195.

YAPIA, T.A; BOTIB, J.B; TONZIBOB, Z.F; AHIBOB, C.A; BIGHELLIA, A; CASANOVA, J.; TOMI, F. Chemical Variability of *Xylopiya quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**. 2014, 11, 332-339.