

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

MICHELI SOSSAI SPADETO

***Psidium cattleianum* Sabine: A INFLUÊNCIA DO CONTEÚDO DE DNA NA
FORMAÇÃO DE QUIMIOTIPOS E NA ATIVIDADE EM DIFERENTES
MODELOS BIOLÓGICOS**

ALEGRE – ES

2019

MICHELI SOSSAI SPADETO

***Psidium cattleyanum* Sabine: A INFLUÊNCIA DO CONTEÚDO DE DNA NA
FORMAÇÃO DE QUIMIOTIPOS E NA ATIVIDADE EM DIFERENTES MODELOS
BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento, na área de concentração em Citogenética e Evolução Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes

ALEGRE – ES

2019

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

- S715p Sossai Spadeto, Micheli, 1985-
Psidium cattleianum Sabine: a influência do conteúdo de
DNA na formação de quimiotipos e na atividade em diferentes
modelos biológicos. / Micheli Sossai Spadeto. - 2019.
82 f. : il.
- Orientadora: Milene Miranda Praça-Fontes.
Coorientadora: Márcia Flores da Silva Ferreira.
Tese (Doutorado em Genética e Melhoramentos) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.
1. Óleos essenciais. 2. Araçá. I. Miranda Praça-Fontes, Milene.
II. Flores da Silva Ferreira, Márcia. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
IV. Título.

CDU: 631.523|

MICHELI SOSSAI SPADETO

***Psidium cattleianum* Sabine: A INFLUÊNCIA DA POLIPLOIDIA NA
FORMAÇÃO DE QUIMIOTIPOS E NA ATIVIDADE EM DIFERENTES
MODELOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, na área de concentração em Citogenética e Evolução Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes.

Aprovada em 19 de Dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Luciano Menini
Instituto Federal do Espírito Santo
Membro Externo a UFES

Prof^a. Dra. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Stéfanie Cristina de Oliveira
Membro externo a UFES

Aos meus pais, Djame e Marlene, com
todo o meu amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Fiquei pensando se poderia escrever em algum lugar da minha tese algumas palavras aleatórias a pesquisa, pois queria que ficasse impresso junto do meu trabalho o que eu sinto hoje, para um dia eu poder ler e me recordar. Achei que aqui seria um bom lugar, mas pode ser que a banca me mande retirar. Sonhei muito com esse momento, o mestrado foi o primeiro sonho considerado impossível por mim mesma. Saí da faculdade particular sem um currículo que pudesse concorrer a uma vaga no mestrado em alguma Universidade Federal, não passei na primeira seleção, entrei como aluna especial na segunda, na terceira como aluna regular e concluí o mestrado já sonhando com o doutorado. O tempo tem passado rápido, mas foi implacável em deixar suas marcas... a vida dentro e fora da Universidade aconteceu nesses sete anos e hoje eu percebo o quanto ela me fez crescer. Nesse tempo percebi que a vida é muito mais ser do que ter e eu aprendi a ser melhor, viver melhor e ser grata por cada momento vivido. Muitas pessoas chegaram, algumas permaneceram e outras ficaram somente o tempo necessário para contribuir de alguma maneira e depois se foram. Ainda há aquelas que se foram pra sempre e deixaram muita saudade, mas essas foram as que mais me ensinaram a ser grata por cada suspiro de vida... o fato é que ninguém chega e ninguém sai da nossa vida sem deixar e sem levar alguma coisa, por isso minha gratidão a TODOS que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agora, vou seguir o protocolo o fazer os agradecimentos formais. Gratidão a Deus pela vida e por me dar saúde para conquistar esse sonho.

Aos meus pais, Djame e Marlene, meu porto seguro e maior exemplo de humildade e amor ao próximo. Aos meus irmãos Marcelo, Martha, Michel e Rosiane por estarem sempre por perto incentivando. As minhas cunhadas Andreia e Michely e ao Nilson. As minhas sobrinhas Gabriela e Laura, meus amores. A todos os familiares, tios e primos, que sempre apoiaram e me deram aquela moral, afinal agora eu sou a primeira Dra. da família.

Ao Programa de Genética e Melhoramento da UFES e a todos os professores que fizeram parte dessa caminhada, especialmente a minha orientadora Milene. Obrigada por toda a paciência e compreensão Mãelene e por me permitir crescer tanto nesse tempo, dentro e fora da Universidade.

A Professora Márcia Flores e ao Professor Luciano Menini por toda ajuda, orientação e idealização desde o projeto, passando pela fase experimental, até chegarmos ao fim. Vocês foram fundamentais para que tudo desse certo.

A Professora Tatiana Carrijo e a Stéfane Cristina de Oliveira pela participação na banca examinadora e por compartilharem seus conhecimentos para o enriquecimento do meu trabalho.

Ao professor Wellington Ronildo Clarindo pelas análises de Citometria de Fluxo e toda a contribuição na minha formação desde o mestrado. Ao Professor Gustavo Ferreira Martins pelas análises com as larvas de *Aedes aegypti*. A Universidade Federal de Viçosa.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, a todos que passaram por lá, os mais antigos... Anelise, Victor, Paulo Marcos, Renata, Ariane, Stephanie, Natália, Liliana, Katy e os mais recentes...João Paulo, Thamyres, Lara, Adeilson... Impossível citar o nome de todos, mas cada um sabe o quanto é especial.

A Marjorie F. Spadeto pela convivência todos esses anos, por me ouvir reclamar, por ir comer comigo e dividir as angústias e alegrias dessa fase... e que fase! Por compartilhar as alegrias e as tristezas de tudo que passamos dentro e fora de Alegre! Nossa república As Gambás ficará pra sempre na memória!

Ao meu amigo louco Caio M. Vinco por deixar os últimos dois meses mais leves!

Aos meus amigos, que acompanharam de longe, mas que sempre estiveram perto...Fernanda, Anelise, Glaucia e Gracci. Aos colegas de corrida, que fizeram os últimos três anos serem especialmente leves.

Ao Alextivane Venturim pelo apoio e companheirismo durante todos esses anos. Obrigada por toda paciência!

Ao meu eterno treinador Emílio Santana por me ensinar a ser disciplinada, dedicada e não me deixar desistir dos desafios nesse tempo todo.

A Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade, a Coordenação de Aperfeiçoamento pela bolsa, a FAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos, o meu muito obrigada!

“Vai... seja Forte, Livre e Corajosa!”

M.S.S.

BIOGRAFIA

Micheli Sossai Spadeto, filha de Djame Spadeto e Marlene Sossai Spadeto, nasceu em Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo, no dia 03 de novembro de 1985. Em fevereiro de 2005, ingressou no Centro Universitário São Camilo – ES, graduando-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas em Dezembro de 2009. Durante o período de graduação foi bolsista de iniciação científica da Embrapa Café, onde desenvolveu pesquisa em Biologia Molecular do cafeeiro. Em agosto de 2012 passou a cursar disciplinas como estudante especial no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Em fevereiro de 2013 ingressou no curso de Mestrado, atuando na área de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas, sob orientação do Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2015. Também em fevereiro de 2015 passou a cursar disciplinas como estudante especial no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Centro de Ciências Exatas e Engenharias da mesma Universidade. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Doutorado, atuando na área de Citogenética e Evolução Vegetal, sob orientação da Prof. Dra. Milene Miranda Praça-Fontes, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
--------------------------------	-----------

2. OBJETIVOS.....	19
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	19
Referências.....	20

CAPÍTULO 1. A influência do conteúdo de DNA nas características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de *Psidium cattleianum*

Resumo.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	25
2.1 <i>Citometria de Fluxo.....</i>	25
2.2 <i>Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas.....</i>	26
2.3 <i>Determinação do rendimento da extração dos óleos essenciais.....</i>	27
2.4 <i>Perfil cromatográfico dos óleos essenciais.....</i>	27
3. Resultados.....	28
4. Discussão.....	32
5. Conclusão.....	35
5. Agradecimentos.....	36
6. Referências.....	36

CAPÍTULO 2. Conteúdo de DNA, identificação de Quimiotipos em óleos essenciais de *Psidium cattleianum* e sua atividade biológica

Resumo.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos.....	42
2.1 <i>Citometria de Fluxo.....</i>	42
2.2 <i>Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas.....</i>	43
2.3 <i>Perfil cromatográfico dos óleos essenciais.....</i>	43
2.4 <i>Bioensaios vegetais.....</i>	45
2.5 <i>Análise estatística dos dados.....</i>	45

3. Resultados.....	46
3.1 Conteúdo de DNA e perfil cromatográfico.....	46
3.2 Fitotoxicidade.....	49
4. Discussão.....	55
4.1 Conteúdo de DNA e perfil cromatográfico.....	55
4.2 Fitotoxicidade.....	57
5. Conclusão.....	59
5. Agradecimentos.....	59
6. Referências.....	60

CAPÍTULO 3. Perfil cromatográfico de *Psidium cattleianum* e sua atividade larvívica em *Aedes aegypti*

Resumo.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	65
2.1 Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas.....	65
2.2 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais.....	66
2.3 Ação larvívica dos óleos essenciais em larvas de <i>A. aegypti</i>	67
2.5 Análise estatística dos dados.....	68
3. Resultados.....	68
4. Discussão.....	73
4.1 Conteúdo de DNA e perfil cromatográfico.....	55
4.2 Fitotoxicidade.....	57
5. Conclusão.....	75
5. Agradecimentos.....	75
6. Referências.....	75
CONCLUSÃO GERAL.....	79
ANEXOS.....	80

SPADETO, Micheli Sossai. ***Psidium cattleyanum* Sabine: A influência do conteúdo de DNA na formação de quimiotipos e na atividade em diferentes modelos biológicos.** 2019. XXp. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento/Citogenética e Evolução Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, ES.

RESUMO

A poliploidia é definida como a presença de dois ou mais conjuntos cromossômicos em um organismo e vem sendo relatada como um dos mecanismos mais importantes de especiação e diversificação de plantas, podendo ser resultante da fusão de dois genomas de espécies distintas (alopoliploidia) ou de genomas de indivíduos da mesma espécie (autopoliploidia). A duplicação de genes nas plantas poliploides gera alta variabilidade inter e intraespecífica, que pode influenciar na produção de metabólitos secundários e conseqüentemente, na composição química dos óleos essenciais e na formação de diferentes quimiotipos. Dentro do gênero *Psidium* (número cromossômico básico $x=11$), algumas espécies vem sendo descritas como poliploides, dentre estas, *Psidium cattleyanum* Sabine. Para essa espécie, estudos citogenéticos relataram nove citótipos, com números cromossômicos variando de $2n=22$ a $2n=132$ cromossomos. Tendo em vista a existência dessa variação na ploidia em *P. cattleyanum*, o presente trabalho teve por objetivo estudar a influência dessa variação na produção qualitativa e quantitativa de diferentes quimiotipos de óleos essenciais e ainda, relacionar os diferentes conteúdos de DNA com a atividade biológica desses óleos em *Lactuca sativa*, *Sorghum bicolor* e *Aedes aegypti*. Através da Citometria de Fluxo foi possível observar diferenças nos conteúdos de DNA das plantas analisadas e por meio da análise do perfil cromatográfico também foram identificados três quimiotipos distintos. As plantas com maiores conteúdos de DNA (6.03 e 5.81pg) apresentaram um rendimento mais alto e são compostas majoritariamente por sesquiterpenos hidrogenados, enquanto as plantas com menores conteúdos de DNA (3.95, 3.23, 3.80 e 3.20pg) produzem menos óleo e são compostas por monoterpenos hidrogenados. Além dessas, uma planta de conteúdo de DNA mediano (4.71pg) em relação as demais apresentou rendimento e composição intermediários entre os dois grupos anteriores. Dessa maneira observou-se uma relação direta entre o conteúdo de DNA e as características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de *Psidium cattleyanum*. Já nos bioensaios vegetais e larvicida os óleos apresentaram atividade e demonstraram potencial como bioherbicidas e biolarvicidas.

Palavras-chave: *Psidium cattleyanum* Sabine, Quimiotipos, Conteúdo de DNA, Biolarvicida, Atividade biológica.

SPADETO, Micheli Sossai. ***Psidium cattleianum* Sabine: The influence of DNA content on the formation of chemotypes and activity in different biological models.** 2019. XXp. Thesis (Doctorate in Genetics and Breeding/Cytogenetics and Plant Evolution) Federal University of Espírito Santo, ES.

ABSTRACT

Polyploidy is defined as the presence of two or more chromosomal assemblies in an organism and has been reported as one of the most important mechanisms of plant speciation and diversification, and may result from the fusion of two genomes of distinct species (allopolyploidy) or genomes of individuals of the same species (autopolyploidy). Gene duplication in polyploid plants generates high inter and intraspecific variability, which may influence the production of secondary metabolites and, consequently, the chemical composition of essential oils and the formation of different chemotypes. Within the genus *Psidium* (basic chromosome number $x = 11$), some species have been described as polyploids, among them, *Psidium cattleianum* Sabine. For this species, cytogenetic studies reported nine cytotypes, with chromosome numbers ranging from $2n = 22$ to $2n = 132$ chromosomes. In this context, considering the existence of this variation in ploidy in *P. cattleianum*, the present work aimed to study the influence of this variation on the qualitative and quantitative production of different essential oil chemotypes and also to relate the different DNA contents with the biological activity of these oils in *Lactuca sativa*, *Sorghum bicolor* and *Aedes aegypti*. Through flow cytometry it was possible to observe differences in the DNA content of the analyzed plants and by chromatographic profile analysis were also identified three distinct chemotypes. Plants with higher DNA content (6.03 and 5.81pg) showed higher yield and are mostly composed of hydrogenated sesquiterpenes, while plants with lower DNA content (3.95, 3.23, 3.80 and 3.20pg) produce less oil and are composed by hydrogenated monoterpenes. In addition, a plant with a median DNA content (4.71pg) compared to the others presented intermediate yield and composition between the two previous groups. Thus a direct relationship between the DNA content and the qualitative and quantitative characteristics of the essential oils of *Psidium cattleianum* was observed. In the vegetable and larvicide bioassays, the oils showed activity and demonstrated potential as bioherbicides and biolarvicides.

Keywords: *Psidium cattleianum* Sabine, Chemotypes, Polyploidy, Biolarvicide, Biological activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

CA – Crescimento Aéreo

CCAIE - Centro e Ciências Agrárias e das Engenharias

CAT - Cattleyanum

CL50 – Concentração Letal média pra matar 50%

CL90 – Concentração Letal média pra matar 90%

CG/FID ou CG-DIC - Cromatografia Gasosa com detector de Ionização por Chama

CG/MS ou CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR – Crescimento Radicular

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

GR - % Germinação

Ifes – Instituto Federal do Espírito Santo

IK - índices de retenção de Kovats

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

L4 – Larvas de quarto instar

MH – Monoterpenos Hidrogenados

MO – Monoterpenos Oxigenados

NIST – National Institute of Standards and Technology

PEG - polietilenoglicol

Pg – pictogramas

PPM – Parte Por Milhão

Q1 – Quimiotipo 1

Q2 - Quimiotipo 2

Q3 - Quimiotipo 3

RT - Tempo de Retenção em minutos

SH – Sesquiterpenos Hidrogenados

SO – Sesquiterpenos Oxigenados

TPS - Genes Terpenos Sintases

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UFV - Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. A influência da ploidia nas características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de *Psidium cattleianum*

Tabela 1. Relação entre o conteúdo de DNA (pg) e o rendimento (%) dos óleos dos sete acessos de *P. cattleianum*.....29

Tabela 2. Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum*.....30

CAPÍTULO 2. Conteúdo de DNA, identificação de Quimiotipos em óleos essenciais de *Psidium cattleianum* e sua atividade biológica

Tabela 1. Conteúdo de DNA (pg) dos óleos dos cinco acessos de *P. cattleianum*...46

Tabela 2 - Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum*.....47

Tabela 3. Resumo das concentrações significativas nos parâmetros analisados para os bioensaios alface e sorgo.....55

CAPÍTULO 3. Perfil cromatográfico de *Psidium cattleianum* e sua atividade larvicida em *Aedes aegypti*

Tabela 1 - Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum*.....69

Tabela 2. Toxicidade dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum* em larvas de *Aedes aegypti*.....72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. A influência da ploidia nas características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de *Psidium cattleianum*

Figura 1. Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleianum* (CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT5, CAT6 e CAT8).....31

Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários (compostos com área relativa maior que 10%).....32

CAPÍTULO 2. Conteúdo de DNA, identificação de Quimiotipos em óleos essenciais de *Psidium cattleianum* e sua atividade biológica

Figura 1. Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleianum* (CAT2, CAT3, CAT4, CAT5 e CAT8).....48

Figura 2 – Porcentagem de sementes germinadas de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....49

Figura 3 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....50

Figura 4 – Crescimento aéreo das plântulas de alface submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....51

Figura 5 – Crescimento aéreo das plântulas de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....52

Figura 6 – Crescimento radicular de sementes de alface submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....53

Figura 7 – Crescimento radicular de sementes de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleianum*.....54

CAPÍTULO 3 - Perfil cromatográfico de *Psidium cattleianum* e sua atividade larvicida em *Aedes aegypti*

- Figura 1.** Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleianum* (CAT2, CAT3, CAT4, CAT5 e CAT8).....70
- Figura 2.** Estrutura química dos compostos majoritários (compostos com área relativa maior que 10%).....71
- Figura 3.** Curvas de mortalidade das larvas após 24h de exposição aos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum*: T1 (CAT1), T2 (CAT2), T3 (CAT3), T4 (CAT4) e T5 (CAT8).....73

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Psidium* apresenta aproximadamente 100 espécies (Govaerts *et al.* 2016) e sua distribuição nativa é Neotropical, ocorrendo do sul do México até a Argentina, incluindo as Ilhas do Caribe e dois arquipélagos no Pacífico (Frazon *et al.* 2009). Algumas espécies do gênero ocorrem em outros lugares do mundo, resultado de sucesso adaptativo (Soares-Silva & Proença 2008).

Dentre as espécies do gênero, *Psidium cattleianum* Sabine é conhecido popularmente como araçazeiro. A espécie é caracterizada pelo porte arbustivo a arbóreo, de 1 a 10 m (Sanchothene 1985), com córtex liso, amarelado ou castanho avermelhado, com manchas claras. As folhas são glabras, brilhantes, pecioladas, com lâminas obovadas ou elíptico obovadas, discolores sendo a face abaxial mais clara; apresentam 8 a 15 pares de nervuras secundárias fracamente impressas na face ventral da lâmina (Sanchothene 1985), e borda das folhas às vezes revoluta (Sobral & Sousa 2007). As flores são solitárias, axilares ou às vezes abaixo das folhas; os botões florais são piriformes ou obovados; cálice com 4 a 5 lobos, soldados quase até o ápice nos botões, abrindo-se irregularmente; as pétalas são brancas (Pio Correa 1984).

Os frutos são elíptico-globosos ou obovados (“piriformes”), com cálice persistente, amarelos ou vermelhos quando maduros (Sobral & Sousa 2007), caracterizando dois morfotipos, denominados araçá-amarelo e araçá-vermelho (Lorenzi 2000). Na natureza, os frutos são muito apreciados, quando maduros, pela avifauna (Silva *et al.* 2011). Ainda, os frutos apresentam interesse econômico por serem ricos em vitamina C, minerais, ácidos graxos e outros agentes fitoquímicos com diferentes funções biológicas (Pereira *et al.*, 2018).

Além disso a espécie vem despertando o interesse na indústria farmacêutica já que estudos vem demonstrando a abundância de compostos fenólicos com atividade antioxidante (Medina *et al.*, 2011) e efeitos antimicrobianos (Scur *et al.*, 2016). Ainda, segundo Faleiro *et al.* (2016) a espécie é promissora na busca e desenvolvimento de novos fármacos pois a sua composição de metabólitos secundários apresenta baixa toxicidade e atividade antimicrobiana.

Psidium cattleianum tem o número básico definido em $x = 11$ (Atchison 1947, Costa et al., 2008). Estudos citogenéticos relataram organismos diploides ($2n=22$), tetraploides ($2n=44$), hexaploides ($2n=66$) e octoplóides ($2n=88$) (Atchison 1947; Costa & Forni-Martins 2006a, 2006b). Dentre as espécies poliploides do gênero, está *Psidium cattleianum* Sabine, que apresenta diferentes números cromossômicos, como $2n=44, 55, 66, 77, 88, 99, 100, 110$ e 132 (Atchison 1947; Costa & Forni-Martins 2006; Costa 2009; Hirano & Nakazone 1969; Medina 2014; Souza et al. 2014; Machado, 2016). Souza et al. (2014) relataram também citótipos que não são múltiplos do número básico para a família ($x=11$), como $2n=46, 48, 58, 82$.

Os vegetais poliploides possuem características específicas que são provenientes da duplicação cromossômica e conseqüentemente de seus genes. Sendo assim podem apresentar mais vigor na heterose e efeito tampão em mutações deletérias (Cornai, 2005), efeito gigas, resistência a doenças (Kulheim et al., 2015), variabilidade genética inter e intraespecífica que refletem na composição química dos seus óleos essenciais (Souza et al., 2017; Kulheim et al., 2015; Iannicelli et al., 2016), podendo formar assim, diferentes quimiotipos nos óleos essenciais dentro da mesma espécie.

A identificação dos compostos por sua vez, pode ajudar a definir as diferenças existentes entre os genótipos, possibilitando a definição de agrupamentos entre genótipos semelhantes (quimiotipos) (Yapia et al., 2014; Stesevic et al., 2014). Além disso, o estudo da diversidade quimiotípica nos óleos essenciais é importante para identificar e selecionar genótipos que sejam favoráveis para a produção e exploração do óleo essencial. Dessa forma os óleos podem ser aplicados na medicina popular, indústria bioquímica, na produção de fármacos, estudos quimiotaxonômicos e assim, agregar valor a cultura (Souza, 2017).

Para avaliar a atividade biológica desses óleos e compostos testes de fitotoxicidade são simples, confiáveis, rápidos e baratos (Valerio et al., 2007), além de serem efetivos na averiguação de toxicidade de substâncias inorgânicas e orgânicas. A variável mais integrativa analisada nesse teste é o crescimento radicular, pois a redução desse parâmetro pode resultar de vários mecanismos isolados ou em conjunto, como inibição da absorção de nutrientes, inibição do alongamento celular, morte celular e inibição da divisão celular (Freitas et al., 2016).

Para a realização dos testes de toxicidade é importante que o modelo vegetal teste apresente ciclo de vida curto. Dentre os organismos teste vegetal, a alface (*Lactuca sativa*), uma eudicotiledônea modelo muito sensível, é eficaz neste tipo de estudo (Pinheiro et al., 2015; Silveira et al., 2017). Outra espécie vegetal modelo em teste de toxicidade é a *Sorghum bicolor* (sorgo). Trata-se de uma monocotiledônea, autógama, que apresenta crescimento rápido, sendo utilizada em pastagens para alimentação animal (Araucária Sementes, 2010).

Além dos testes com modelos vegetais outros modelos vêm sendo utilizados, como o *Aedes aegypti*, um importante vetor de doenças que causam alta morbidade e mortalidade em vários países do mundo (Tattevin, 2012). Além disso, a avaliação da atividade larvicida de produtos naturais é essencial para a descoberta de compostos de efeito sinérgico com atividade biolarvicida, que são mais viáveis economicamente e causam menos danos ao meio ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Relacionar o conteúdo de DNA de *Psidium cattleianum* com as características qualitativas e quantitativas de seus óleos essenciais e sua atividade biológica em *Aedes aegypti*, *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o conteúdo de DNA de sete acessos de *Psidium cattleianum* Sabine cultivados na área experimental da UFES e do IFES via de citometria de fluxo.

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

Relacionar o conteúdo de DNA dos acessos testados com os quimiotipos formados e suas respectivas atividades biológicas;

Referências Bibliográficas

Araucária Sementes, 2010. Disponível em: http://www.sementesauracaria.com.br/sorgo_forrageiro.php. (Acesso em 20/10/2019).

Atchison, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany** 34: 159-164, 1947.

Comai, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature** 6:836–846. 2005. doi:10.1038/nrg1711.

Costa, I.R. **Estudos evolutivos em *Myrtaceae*: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em *Myrteae*, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2009.

Costa, I. R. & Forni-Martins, E. R. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. **Australian Journal of Botany** 54: 409-415, 2006 a.

Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia** 59: 7-13, 2006b.

Costa, I. R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2004.

Külheim, C.S.H.; Padovan, A.; Hefer, C.; Krause, S.T.; Kollner, T.G.; Myburg, A.A.; Degenhardt, J.; Foley, W.J. The Eucalyptus terpene synthase gene Family. **BMC Genomics**, 16, 450, 2015.

Machado, R.M. **Distribuição geográfica e análise cariorípica de citótipos de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2016.

Faleiro, F.H.; Gonçalves, R.C.; Santos, M.N.G.; Silva, D.P.; Naves, P.L.F., Malafaia, G. The Chemical Featuring, Toxicity, and Antimicrobial Activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) Leaves. **New Journal of Science**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7538613>.

Frazon, R. C., Campos, L. Z. de O., Proença, C. E. B. & Sousa-Silva, J. C. **Araçás do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Documentos/ Embrapa Cerrados. Planaltina, DF, 2009.

Freitas, A. S., Cunha, I. M. F., Andrade-Vieira, L. F., & Techio, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, 124, 426-434, 2016.

Ferreira, F. A.; Silva, Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B., Landrum, L., Lucas, E. J., Matsumoto, K., Mazine, F., Proença, C., Soares-Silva, L.,

Wilson, P. & Niclughdha, E. (2016). **World Check list of selected plant families – Myrtaceae.** (www.rbgekew.org.uk).

Hirano, R.T.; Nakazone, H. Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 94: 83-86, 1969.

Iannicelli, M.A., Elechosa, M.A., Juárez, A., Martinez, V., Bugallo, A.L., Bandoni, A.S., Escandón, C.M. Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. **Industrial Crops and Products.** v.81, p.20-29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.053>.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, vol. 1, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

Medina, A.L.; Haas, L.I.R.; Chaves, F.C.; Salvador, M.; Zambiazzi, R.C.; Silva, W.P.; Nora, L.; Rombaldi, C.V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry.** v.128(4), p.916-922, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>.

Medina, S. N. V. ***Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromossômica y cariotípica em poblaciones silvestre y genótipos seleccionados em programas nacionales de mejoramiento.** Monografía. Faculdade de Agronomia- Universidade da República, Uruguai, 2014.

Pereira, E.S.; Vinholes, J.; Franzon, R.C.; Delmazo, G.; Vizzotto, M.; Nora, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry.** v.258, p.95-103, 2018.

Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. D. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... & Fontes, M. M. P., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of agricultural and food chemistry**, 63(41), 8981-8990.

Pio Correa, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Ministério da Agricultura, IBDF, Brasília, p. 140, 1984.

Sanchotene, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis a fauna na Arborização Urbana.** Porto Alegre. FEPLAM. 309 p. 1985.

Scur, M.C.; Pinto, F.G.S.; Pandini, J.A.; Costa, W.F.; Leite, C.W.; Temponi, L.G. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of

Psidium cattleianum Sabine. **Braz. J. Biol.** vol.76 no.1, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13714>.

Silveira, G. L., Lima, M. G. F., dos Reis, G. B., Palmieri, M. J., & Andrade-Vieria, L. F. (2017). Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, 178, 359-367.

Soares-Silva, L. H. & Proença, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 158(1): 51-54, 2008.

Sobral, M. E. G. & Sousa, L. P. **Morfotipos do Araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) no Estado do Paraná**. IN: Pedrosa-Macedo, J.H., Dalmolin, A, Smith, C. W. (Orgs.). O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico. FUPEF, Curitiba, 2007.

Souza, T.S.; Ferreira, M.F.S.; Menini, L.; Souza, J.R.C.L.; Parreira, L.A.; Cecon, P.R.; Ferreira, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Sci. Hortic.** 216, 38–44, 2017.

Souza, A das G. de, Resende, L. V., Lima, I. P. de, Martins, L. S. S. & Techio, V. H. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. Resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution**. 2014.

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.

Tattevin, P. Dengue, chikungunya: two emerging arboviruses, **Journal des Anti-Infectieux**, vol. 14, no. 2, pp. 78–88, 2012.

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.

Valerio, M. E., Garcia, J. F., Peinado, F. M., 2007. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science Total Environment**, v.378, p.63–66.

Conteúdo de DNA, características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais de *Psidium cattleianum* Sabine

Micheli Sossai Spadeto¹, Gustavo Ferreira Martins², Luciano Menini³, Wellington Ronildo Clarindo⁴, José Henrinque Soler Guilhen⁵, Marcia Flores da Silva Ferreira⁶, Milene Miranda Praça-Fontes^{1*}.

^{1,5}Programa de Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, CCAE, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

^{2,4}Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

³Laboratório de Química Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). Rua Principal, s/n, Distrito de Rive, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

⁶Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

^{1*}Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

Resumo

A poliploidia é uma alteração numérica do cariótipo relatada como um dos mecanismos mais importantes na especiação e diversificação de plantas. *Psidium cattleianum* é uma espécie que possui nove citótipos já registrados na literatura, com números cromossômicos variando de $2n=22$ a $2n=132$ cromossomos. Nesse contexto, tendo em vista a existência dessa variação da ploidia, o presente trabalho teve por objetivo estudar a influência dessa variação na produção de diferentes quimiotipos de óleos essenciais. Através da Citometria de Fluxo foi possível observar diferenças nos conteúdos de DNA das plantas analisadas e por meio da análise do perfil cromatográfico também foram identificados três quimiotipos distintos entre as amostras. As plantas com maiores conteúdos de DNA apresentaram um rendimento mais alto e são compostas majoritariamente por sesquiterpenos hidrogenados, enquanto as plantas com menores conteúdos de DNA produzem menos óleo e são compostas por monoterpenos hidrogenados. Além dessas, uma planta de conteúdo de DNA mediano apresentou rendimento intermediário entre os dois grupos anteriores. Dessa maneira observou-se uma relação direta entre as características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais e o conteúdo de DNA das plantas de *Psidium cattleianum*.

Palavras-chave: Autopoliploides, Conteúdo de DNA, Valor 2C, Compostos voláteis, *Psidium*.

1. INTRODUÇÃO

A poliploidia é definida como a presença de dois ou mais conjuntos cromossômicos em um organismo, e pode ser resultante da fusão de dois genomas de espécies distintas (alopoliploidia) ou de genomas de indivíduos da mesma espécie (autopoliploidia) (Comai, 2005; Parisod et al., 2010; Beest et al., 2012). É um fenômeno frequente em plantas, especialmente em angiospermas (Dodswortj et al. 2016) que são, em sua maioria, poliploides ou paleopoliplóides. São organismos os quais seus ancestrais passaram por pelo menos um evento de poliploidização (Arrigo e Barker, 2012; Hegarty e Hiscock, 2008).

Um dos gêneros que apresentam espécies poliploides é o gênero *Psidium*, que teve o número básico de cromossomos definido em $x = 11$ (Atchison 1947, Costa et al., 2008). Estudos citogenéticos relataram organismos diploides ($2n=22$), tetraploides ($2n=44$), hexaploides ($2n=66$) e octoplóides ($2n=88$) (Atchison 1947; Costa & Forni-Martins 2006a, 2006b, 2007). Dentre as espécies poliploides do gênero, está *Psidium cattleianum* Sabine, que apresenta diferentes números cromossômicos, como $2n=44, 55, 66, 77, 88, 99, 100, 110$ e 132 (Atchison 1947; Costa & Forni-Martins 2006; Costa 2009; Hirano & Nakazone 1969; Medina 2014; Souza et al. 2014; Machado, 2016). Souza et al. (2014) relataram também citótipos que não são múltiplos do número básico para a família ($x=11$), como $2n=46, 48, 58, 82$.

As plantas poliploides apresentam mais vigor na heterose e efeito tampão em mutações deletérias (Comai, 2005). Além disso, são plantas que geralmente apresentam efeito gigas e assim possuem estruturas vegetais maiores, produzindo frutos maiores e em maior quantidade. Podem também ser resistentes a doenças ou a condições ambientais estressantes. Ainda, espécies poliploides são interessantes pois a variabilidade genética inter e intraespecífica origina diferenças na produção de metabólitos secundários e conseqüentemente na composição química dos óleos essenciais (Souza et al., 2017; Kulheim et al., 2015; Iannicelli et al., 2016).

Os óleos essenciais que tem importância ambiental auxiliando na proteção das plantas e atração de insetos e dispersores de pólen (Moore et al., 2013) e também possuem importância econômica, devido a sua ação fitoterápica, sendo amplamente

comercializados na indústria farmacêutica (Almeida et al., 2016). As variações na composição química dos óleos essenciais podem ser inter e intraespecíficas e ocasionadas por diferentes fatores, dentre os quais os fatores genéticos (Souza et al., 2017; Kulheim et al., 2015).

Assim, diante da variação na ploidia de plantas dentro da espécie *P. cattleyanum* e tendo em vista que o conteúdo de DNA de um organismo é responsável por diferentes características, o presente estudo teve por objetivo analisar qual a relação do conteúdo de DNA de *P. cattleyanum* com a produção de óleo essencial e sua composição química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos utilizados fazem parte da coleção que se encontra em campo no Centro e Ciências Agrárias e das Engenharias da UFES (CCAUE/UFES). Assim as amostras vegetais (folhas) dos acessos de *P. cattleyanum* foram coletadas no município de Alegre, latitude sul (20° 45' 48"), longitude oeste (41° 32' 2") altitude de 254 metros, no estado do Espírito Santo, Brasil. A extração dos óleos essenciais foi conduzida no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do CCAUE/UFES e as análises de composição química dos óleos foram realizadas no laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES) e as análises de citometria de fluxo foram realizadas no laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG).

2.1 Citometria de fluxo

Para determinar o tamanho do genoma nuclear dos diferentes acessos de *P. cattleyanum* foi utilizado *Solanum lycopersicum* L 'Stupické' (2C = 2,0 pg) como padrão interno (Praça-Fontes et al. 2011). Fragmentos foliares de 2 cm² do padrão e da amostra foram dissociados em placa de Petri contendo 500 µL de tampão de extração nuclear OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico, 0,5% de Tween 20, 2 mM de ditiotreitól e 50 µg/mL de RNase) (Otto, 1990) suplementados com polietilenoglicol (PEG). Ao material dissociado obtido foram adicionados 500 µL do mesmo tampão,

o qual foi filtrado em malha de nylon (Partec®) de 30 µm, acondicionado em microtubo e centrifugado a 100 xg por 5 minutos.

O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão OTTO-I e mantido neste por 10 minutos (Praça-Fontes et al. 2011). Posteriormente, foram acrescentados 1,5 mL do tampão de coloração OTTO-I: OTTO-II (400 mM de Na₂HPO₄.H₂O, 2 mM de ditiotreitól, 50 µg/ml iodeto de propídeo e 50 µg/mL de RNase) (1:2) (Otto, 1990). As suspensões de núcleos foram mantidas no escuro por 30 minutos na solução de coloração e posteriormente filtradas em malha de nylon (Partec®) de 20 µm.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS II/III (Partec GmbH, Munster, Germany). O tamanho do genoma das amostras analisadas foi calculado pela multiplicação do tamanho do genoma de *Solanum lycopersicum* (padrão interno) pela relação de intensidade fluorescente correspondente aos picos de núcleos G₀/G₁.

2.2 Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas dos acessos de *P. cattleyanum*

Material vegetal – As folhas dos acessos de *P. cattleyanum* foram coletadas às 8h da manhã no mesmo dia. A coleta foi realizada na altura do peito (1,6m) e ao redor do diâmetro da copa. Cerca de 500g de folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para obtenção do óleo e caracterização química. O material foi acondicionado em sacos de papel, identificado e transportado para o laboratório de Preparo de Amostra Vegetal no CCAE-UFES. As folhas foram secas a temperatura ambiente e acondicionadas em sacos plásticos, sendo armazenadas em freezer a -20 °C até a extração do óleo essencial.

Extração dos óleos essenciais – Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, em aparelho Clevenger, durante quatro horas de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (BRASIL, 2010). Nas extrações foram utilizadas cerca de 300g de folhas em aproximadamente 1000 mL de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2000 mL. Os vapores de água e de óleo se misturaram e após o resfriamento ocorreu a condensação das moléculas, que foram separadas por diferença de solubilidade e densidade. A mistura de óleo e água foi colocada em tubo de 1,5ml e centrifugada.

Após, o óleo foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegido de luminosidade.

2.3 Determinação do rendimento da extração dos óleos essenciais

Foram determinados os rendimentos das extrações dos óleos essenciais a fim de observar se as diferentes conteúdos de DNA influenciam na produção de óleo. Para isso, foi utilizada, em duplicata, a razão massa seca da planta em relação à massa de óleo extraído (m.m^{-1}). A pesagem foi realizada utilizando uma balança analítica (Shimadzu AU220) com quatro casas decimais.

2.4 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

Identificação dos constituintes dos óleos essenciais - As amostras dos óleos essenciais extraídos das folhas foram analisadas por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE). Para essas análises, as seguintes condições foram empregadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de $2,80\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $50,8\text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (GC-FID) e $1,98\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $50,9\text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$); fase estacionária Rtx[®]-5MS ($0,25\text{ }\mu\text{m}$ de espessura do filme); a temperatura do forno seguiu a programação: temperatura inicial de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas utilizadas nos detectores FID e MS foram de 240 e $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (SOUZA et al., 2017).

As amostras utilizadas foram retiradas dos vials em um volume de $1\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de 3% de óleo essencial dissolvido em hexano com DMA $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (padrão externo para controle de reprodutibilidade).

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV ; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de $0,50\text{ fragmentos}\cdot\text{seg}^{-1}$ e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H_2 e ar

atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL.min⁻¹ e 400 mL.min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente.

A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção de LTPRI (IR). Para o cálculo dos IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇C₄₀ (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2011).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em GC-FID. Os compostos com área relativa acima de 1% foram identificados e acima de 10% foram considerados majoritários.

A extração e a análise da composição química dos óleos foram realizadas em duplicata, sendo a primeira extração realizada em fevereiro de 2018 e a segunda em junho de 2019.

3. RESULTADOS

Após as análises de citometria de fluxo observou-se que as sete plantas apresentam conteúdos de DNA variando de 3.2 à 6.03 pg e que houve aumento do rendimento dos óleos essenciais nas plantas com maiores conteúdos de DNA (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre o conteúdo de DNA (pg) e o rendimento (%) dos óleos dos sete acessos de *P. cattleyanum*.

Acesso	Conteúdo de DNA (pg)	Rendimento (%)
CAT1	3.95	0.75
CAT2	5.81	0.90
CAT3	6.03	0.95
CAT4	3.23	0.70
CAT5	3.80	0.73
CAT6	3.20	0.70
CAT8	4.71	0.80

Além das variações quantitativas, as plantas utilizadas apresentaram também variações qualitativas no que diz respeito a composição química de seus óleos essenciais (Tabela 2).

Tendo em vista que duas extrações foram realizadas em períodos diferentes, observa-se que não houve variações no padrão dos compostos produzidos (Tabela 2 e Anexo 1).

Tabela 2. Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleyanum*.

Compostos ^a	Tempo de retenção (min) ^b	Índice de retenção ^c	Área relativa ^d							Classes Terpênicas ^e
			CAT1	CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT6	CAT8	
alpha-Pinene	8.795	933	10,35	2,03	6,06	23,80	19,56	5,70	4,88	MH
beta-Pinene	10.725	976				3,62				MH
Myrcene	11.520	990	8,16					2,01		MH
Limonene	12.925	1025						2,05	9,17	MH
Eucalyptol	13.280	1033				27,70	24,34		3,80	MO
Beta-ocimene	13.735	1041				5,20	4,17			MH
alpha-Terpineol	20.805	1192				4,38	3,45			MO
Copaene	29.030	1374		9,88	9,90			10,20	3,68	SH
trans-Caryophyllene	30.820	1417	72,16	62,27	58,45	35,30	41,80	57,69	57,05	SH
alpha-Humulene	32.270	1453	6,68	13,93	13,38		3,11	13,06	11,68	SH
alpha-Amorphene	33.255	1476	2,65				3,57			SH
beta.-Selinene	34.279	1490						6,39	2,96	SH
alpha.-selinene	34.672	1498						2,90	2,72	SH
delta-Cadinene	35.175	1523		6,78	6,34				4,06	SH
NI ^f	37.455	-			3,44					
Viridiflorol	37.485	1580		2,61						SO
NI	39.220	-		2,50	2,43					
Conteúdo de DNA (pg)			3.95	5.81	6.03	3.23	3.80	3.20	4.71	
Rendimento (%)			0.75	0.90	0.95	0.70	0.73	0.70	0.80	

^a Os compostos foram identificados pelo Índice LTPRI (GC/FID) e Espectrometria de Massa (GC / MS) utilizando a coluna Rtx®-5MS. ^b Índice de Retenção Tabulado (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011). ^c Índice de retenção calculado a partir de dados obtidos por amostragem de n-alcenos saturados (C7-C40). ^d Foram identificados compostos com áreas relativas >2%. ^e Classes terpênicas (MH: monoterpenos hidrogenados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrogenados). ^f Compostos não identificados.

A partir das análises cromatográficas foram identificados 15 compostos nos óleos essenciais dos sete acessos de *P. cattleyanum*. Nos óleos de cada acesso foram identificados 100% dos compostos com área relativa acima de 2%, os quais foram classificados em monoterpenos hidrogenados e oxigenados e sesquiterpenos hidrogenados e oxigenados (Figura 2). Verificou-se predomínio de compostos hidrogenados em todos os óleos analisados, com maior representatividade da classe de sesquiterpenos. Entretanto, os acessos CAT4 e CAT5 apresentaram maior quantidade de monoterpenos tanto oxigenados quanto hidrogenados.

No total, sete monoterpenos (sendo cinco hidrogenados e dois oxigenados) e oito sesquiterpenos (sete hidrogenados e um oxigenado), foram identificados. O composto majoritário em todos os acessos foi o sesquiterpeno hidrogenado o *Trans-caryophyllene*, seguido pelos compostos *alpha-pinene* (MH), *copaene* (SH), *alpha-humulene* (SH) e o *eucalyptol* (MO).

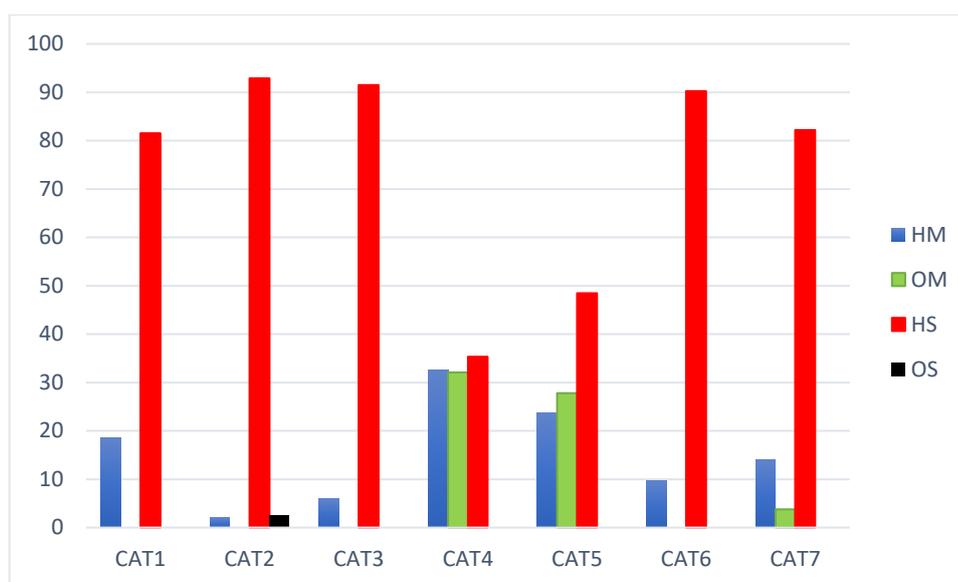


Figura 1. Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleyanum* (CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT5, CAT6 e CAT8). Monoterpenos hidrogenados (HM), monoterpenos oxigenados (OM), sesquiterpenos hidrogenados (HS) e sesquiterpenos oxigenados (OS).

Os cinco compostos majoritários (área relativa >10%), presentes nos óleos essenciais, foram identificados na Figura 2.

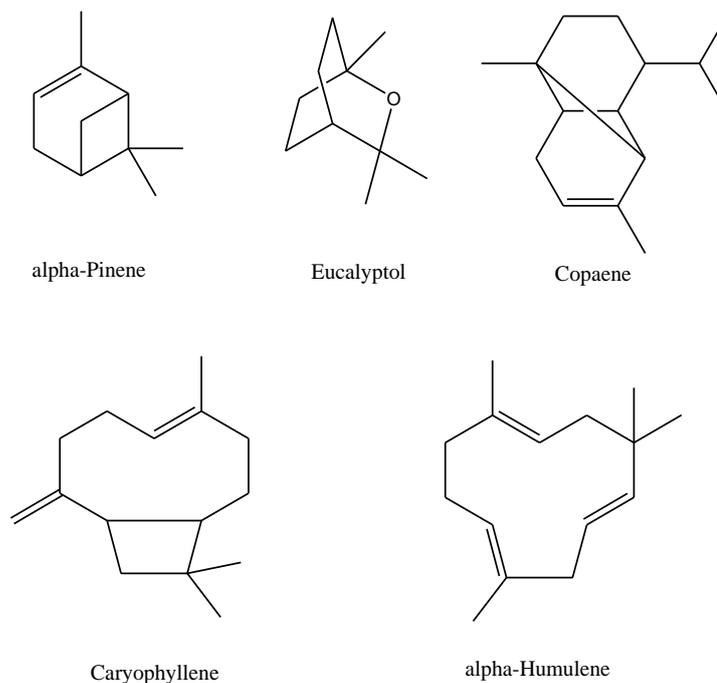


Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários (compostos com área relativa maior que 10%).

4 Discussão

A partir das análises de citometria de fluxo foi possível identificar uma variação intraespecífica nos acessos de *P. cattleyanum*, com conteúdo de DNA variando entre 3.20pg a 6.03pg. Tal técnica é considerada uma ferramenta segura na detecção indireta da poliploidia, como afirmou Medina (2014) ao relatar que o valor 2C teria uma relação direta com o nível de ploidia determinado para citótipos $2n=77$ e $2n=88$ de *P. cattleyanum* no Uruguai. Além disso, a citometria de fluxo é considerada um método rápido, confiável e simples para mensurar o nível de ploidia e confirmar a poliploidia (Roy et al., 2001). De acordo com Dolezel et al. (2007) o nível de ploidia é inferido indiretamente por sua correlação com o conteúdo relativo ou absoluto de DNA (nível de ploidia do DNA).

A poliploidia é um mecanismo reconhecido entre as espécies vegetais, sendo que 40% das espécies cultivadas são poliploides, dentre as quais estão as outras espécies do gênero *Psidium* como *P. acutangulum* Mart. ex DC (Atchison 1947), *P. friedrichstalianum* (O. Berg) Nied (Ellshof et al. 1995), *P. guajava* L. (Hirano & Nakazone 1969), *P. guinense* Sw. (Kumar & Ranade 1952), entre outras. Para *P. cattleyanum* diferentes níveis de ploidia foram relatados pela primeira vez no estudo

de Forni-Martins (2016), onde indivíduos com frutos amarelos e vermelhos apresentaram números cromossômicos variados. Entretanto a correlação do conteúdo de DNA com as características qualitativas e quantitativas da produção de óleo nessa espécie é descrita pela primeira vez neste estudo.

Segundo Soltis et al. (2010) a formação de um poliploide pela duplicação instantânea de um genoma cria uma nova espécie caso as populações diferenciadas pelo número cromossômico consigam se estabelecer no ambiente e se tornem reprodutivamente isoladas de seus progenitores diploides, o que segundo o autor, seria um mecanismo de especiação imediata. Acredita-se que *P. cattleyanum* seja um caso de autopoliploidia, pois segundo Stebbins (1950) quando um indivíduo poliploide surge dentro de uma ou entre populações de uma única espécie é tido como um autopoliploide. Nesse caso, a presença de mais de dois cromossomos homólogos pode contribuir para a formação de multivalentes na meiose. Assim, ocorre o emparelhamento não preferencial onde os descendentes apresentarão um padrão de herança polissômica.

Acredita-se ainda que as plantas poliploides de *P. cattleyanum* são autopoliploides provenientes da formação de células reprodutivas não reduzidas, esta que vem sendo apontada como a via de ocorrência mais comum na poliploidia em plantas (Sattler et al., 2015). Segundo Ramsey e Schemske (1998) a capacidade de produzir gametas não reduzidos é uma característica hereditária evidente em muitas espécies. Além disso fatores epigenéticos influenciam na produção de gametas não reduzidos, como os fatores ambientais, clima, herbivoria, déficit hídrico e falta de nutrientes.

Além da redução da fertilidade, outra consequência da poliploidia em plantas é o aumento do tamanho da célula, causado pelo maior número de cópias gênicas, consequentemente tais indivíduos exibirão órgãos maiores em comparação com os diploides (Stebbins, 1950). Tal fato explica os resultados do rendimento na produção de óleo relacionada com o conteúdo de DNA, já que observou-se que as plantas com maior conteúdo de DNA (CAT2 e CAT3, 5.81pg e 6.03pg de DNA, respectivamente) apresentaram maior rendimento de óleo. Enquanto CAT1, CAT4, CAT5 e CAT6 que possuem os menores conteúdos de DNA (3.95, 3.23, 3.80 e 3.20pg, respectivamente) e baixo rendimento de óleo. O acesso CAT8 tem um conteúdo de DNA mediano em

relação aos dois grupos (4.71pg) e o rendimento de 0.80% também está entre o rendimento dos dois grupos com conteúdo de DNA diferente.

A produção de óleo da espécie *P. cattleyanum* é significativa quando comparada a produção de outras espécies de *Psidium*. Como observado na Tabela 1 a produção de óleo no presente estudo variou de 0,70 a 0.95% enquanto Souza et al. (2017) trabalhando com 22 genótipos de *P. guajava* obteve um rendimento variando entre 0,17 a 0,56%. Além do efeito gigas que leva ao aumento do tamanho das células e consequentemente do número de cópias gênicas, o alto rendimento em *P. cattleyanum* pode ser explicado pelo tipo de via biossintética presente na espécie. Alguns trabalhos apontam que a via biossintética dos terpenos é a principal fonte de produção de óleo essencial (Külheim et al., 2011; Webb et al., 2013; Padovan et al., 2014; Webb et al., 2014). Como observado, os óleos essenciais das plantas analisadas são compostos majoritariamente por terpenos, sendo assim, as plantas com genoma maior, apresentam mais genes terpenos e consequentemente produzem mais óleo.

Além da observação desses três grupos de plantas com os conteúdos de DNA e rendimentos similares, pode-se inferir também que o perfil dos compostos produzidos por elas se assemelha (Figura 2), dessa maneira observa-se a presença de três quimiotipos diferentes nas amostras analisadas. É interessante ressaltar que o número de moléculas de sesquiterpenos e monoterpenos produzidos pelas plantas são próximos, entretanto os monoterpenos são produzidos quase que exclusivamente pelos indivíduos de menor conteúdo de DNA (CAT 1, 4, 5, 6 e 8), enquanto os sesquiterpenos em maior quantidade e maior variabilidade nos indivíduos de maior conteúdo de DNA (CAT2 e CAT3).

A proporção relativa de metabólitos secundários ocorre em diferentes níveis (sazonais e circadianos-diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e são resultado da especialização celular em que suas manifestações ocorrem de acordo com a expressão diferencial dos genes (Souza, 2017). O padrão encontrado em *P. cattleyanum* pode ocorrer devido à família de genes terpenos sintases (TPS) que são uma classe de enzimas especializada pela biossíntese de terpenos. Essa família constitui-se por 3 classes e 7 subfamílias. A classe I consiste em TPS-c (copalil difosfato e ent-caureno), TPS-e/f (ent-caureno e outros diterpenos, assim como alguns

mono e sesquiterpenos) e TPS-h (específico à *Selaginella*). Já a classe II consiste de TPS-d (específico a gimnospermas) e a classe III apresenta TPS-a (sesquiterpenos), TPS-b (monoterpenos cíclicos e hemiterpenos) e TPS-g (monoterpenos acíclicos) (Külheim et al., 2015). Nesse caso, acredita-se que nas plantas de *P. cattleianum* analisadas neste estudo apresentem um padrão de TPS classe III (TPS-a e TPS-b).

P. cattleianum apresenta uma variação pequena dos tipos de terpenos encontrados, o que aponta novamente para a presença de genes TPS iguais, que possivelmente foram duplicados nesses autopoliploides. Na Tabela 2 observa-se que em todos os indivíduos os compostos que apresentaram maiores médias nas proporções relativas foram o *Trans-caryophyllene*, o *alpha-pinene*, *copaene*, *alpha-humulene* e o *eucalyptol*. Tais compostos apresentam atividades biológicas comprovadas para fins medicinais. O *Trans-caryophyllene* possui atividade antileishmaniose, antiesquistossomótica e antifúngica. O *alpha-Humuleno* é anti-inflamatório. Já o *alpha-pinene* apresenta efeitos anti bactericida e antigo fúngico (Hong et al., 2004), O *eucalyptol* vem sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica por apresentar propriedades antibacterianas, antifúngica, sedativa, anticonvulsivante (Monforte et al., 2010) e analgésica (Takaishi et al., 2012).

Analisando o perfil cromatográfico dos óleos essenciais nas duas extrações realizadas em épocas diferentes (Tabela 2 e Anexo 1), pode-se afirmar que as condições ambientais exercem pouca influência na composição química das plantas analisadas, nos permitindo evidenciar a viabilidade de exploração do óleo essencial para fins farmacológicos, já que a produção dos compostos majoritários de interesse sofreu variação mínima das condições ambientais.

5 Conclusão

Conclui-se que o conteúdo de DNA em *P. cattleyanum* influencia diretamente nas características quantitativas e qualitativas de seus óleos essenciais, sendo que as plantas poliploides de maior conteúdo de DNA (CAT2 e CAT3) são recomendadas como possíveis matrizes para a propagação de novas plantas com potencial para a produção de compostos majoritários de interesse farmacológico como o *Trans-caryophyllene* e o *alpha-Humuleno*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 311950/2016-7), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES/UNIVERSAL, 80707114/18 e FAPES/VALE, 75516586/16). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Código de financiamento 001.

Referências bibliográficas

Adams, R.P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.

Arrigo N, Barker MS. 2012. Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. **Current Opinion in Plant Biology** 15: 140– 146.

Atchison, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany** 34: 159-164, 1947.

Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubesová M, Pysek P. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, 109: 19– 45.

Brasil. **Farmacopeia Brasileira**, 5th ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p. 2899, 2010.

Comai, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature** 6:836–846. 2005. doi:10.1038/nrg1711.

Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia** 59: 7-13, 2006.

Dodsworth, S., M. W. Chase, and A. R. Leitch. 2016. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? **Botanical Journal of the Linnean Society**, 180: 1– 5.

Doležal J, Greilhuber J, Suda J. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Wiley- VCH, Weinheim, 2007.

El-Sayed, A.M. The Pherobase Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. 2016.

Hegarty, M.J., Hiscock, S.J., 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. **Curr. Biol.** 18, R435–R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.043>.

Hirano, R. T.; Nakazone, H. Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 94: 83-86, 1969.

Hong, E.J., Na, K.J., Choi I.G., Choi K.C., Jeung, E.B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Biol. Pharm. Bull.** 27: 863–866, 2004.

Iannicelli, M.A., Elechosa, M.A., Juárez, A., Martínez, V., Bugallo, A.L., Bandoni, A.S., Escandón, C.M. Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. **Industrial Crops and Products.** v.81, p.20-29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.053>.

Külheim, C.S.H.; Padovan, A.; Hefer, C.; Krause, S.T.; Kollner, T.G.; Myburg, A.A.; Degenhardt, J.; Foley, W.J. The Eucalyptus terpene synthase gene Family. **BMC Genomics**, 16, 450, 2015.

Kumar, L. S. S. & Ranade, S. G. (1952). Autotriploidy in guava (*Psidium guajava* Linn.). *Current Science* 21: 75-76.

Machado, R.M. **Distribuição geográfica e análise cariorípica de citótipos de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2016.

Medina, S. N. V. ***Psidium cattleyanum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromossómica y cariotípica em poblaciones silvestre y genótipos seleccionados em programas nacionales de mejoramiento**. Monografía. Faculdade de Agronomia- Universidade da República, Uruguai, 2014.

Monforte, M. T. et al. Chemical Composition and Biological Activities of Calamintha officinalis Moench Essential Oil. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.3, 2011. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0191>.

NIST (National Institute of Standards and Technology), 2011. Standard Reference Database 69. NIST Chemistry WebBook.

Padovan, A.; Keszei, A.; Külheim, C.; Foley, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochem. Rev.** 13: 695–716, 2014.

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New Phytologist** 186: 5– 17.

Praça-fontes, M.M.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R.; Cruz, C.D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards. **Plant Cell Reports**, v.30, 7, p. 1183-1191, 2011.

Ramsey J, Schemske DW. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annu Rev Ecol Evol Syst** 29:467–501. 1998. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467.

Roy AT, Leggett G, Koutoulis A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Rep** 20:489–495. 2001. doi:10.1007/s002990100364.

Sattler, M.C.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**. 2015.

Souza, T.S.; Ferreira, M.F.S.; Menini, L.; Souza, J.R.C.L.; Parreira, L.A.; Cecon, P.R.; Ferreira, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Sci. Hortic**. 216, 38–44, 2017.

Souza, A das G. de, Resende, L. V., Lima, I. P. de, Martins, L. S. S. & Techio, V. H. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. Resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution**. 2014.

Stebbins GL. **Variation and evolution in plants**. Columbia University Press, New York, 1950.

Takaishi, M. et al. 1, 8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. **Molecular pain**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 1744-8069.

Webb, H.; Lanfear, R.; Hamill, J.; Foley, W. J.; Külheim, C. The yield of essential oils in *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) is regulated through transcript abundance of genes in the MEP pathway. **PLoS One** 8: 600-631, 2013 .

Webb, H.; Foley, W. J.; Külheim, C. The genetic basis of foliar terpene yield: Implications for breeding and profitability of Australian essential oil crops. **Plant Biotechnol**. 31: 363–376, 2014.

Conteúdo de DNA, identificação de Quimiotipos em óleos essenciais de *Psidium cattleianum* e sua atividade biológica

Micheli Sossai Spadeto¹, Luciano Menini², Wellington Ronildo Clarindo³, Guilherme Bravim⁴, Marcia Flores da Silva Ferreira⁵, Milene Miranda Praça-Fontes^{1*}.

^{1,4}Programa de Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, CCAE, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

²Laboratório de Química Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). Rua Principal, s/n, Distrito de Rive, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

⁵Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

^{1*}Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

Resumo

Diferentes estudos vem demonstrando diferenças cromossômicas para *Psidium cattleianum*, relatando desde organismos diplóides ($2n=22$ cromossomos) até citótipos que não são múltiplos do número básico da família ($x=11$), como $2n=46, 48, 58, 82$. Tal variação indica que a espécie seja um autopoliploide e dessa forma desperta o interesse já que os poliploides tendem a aumentar a produção de metabólitos secundários quando comparados as plantas-mãe diplóides. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo analisar a relação entre o conteúdo de DNA, as variações na composição química dos óleos essenciais e a sua atividade biológica em bioensaios vegetais. A partir das análises químicas e de citometria de fluxo, observou-se a formação de três quimiotipos distintos que variaram de acordo com o conteúdo de DNA das plantas. Assim, foi realizada a extração dos óleos essenciais que foram testados em sementes de *Lactuca sativa* e *Sorgum bicolor*. Como resultado, observou-se que os óleos de *P. cattleianum* apresentam atividade fitotóxica inibindo principalmente o crescimento radicular e aéreo em alface e influenciando em todas as variáveis em sorgo, demonstrando assim seu potencial como bioherbicida.

Palavras-chave: *Psidium*, Bioherbicida, Quimiotipos.

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae vem sendo descrita como fonte de diferentes eventos de poliploidia e hibridização (Costa e Forni-Martins, 2006b) e, por isso, se tornou foco de estudos evolutivos que descreveram o número cromossômico para cerca de 50 espécies em nove gêneros (Costa, 2004; Costa e Forni-Martins, 2006a) e Costa (2009). Para o gênero *Psidium*, os valores de conteúdo 2C de DNA nuclear se relacionam diretamente com o número básico $x=11$ e aumentam de acordo com o nível de ploidia (Costa et al., 2008).

Para *Psidium cattleianum* Sabine diferentes números cromossômicos foram relatados, como $2n = 44, 66, 77$ e 88 (Atchison 1947; Costa e Forni-Martins, 2006b; Costa 2009; Hirano e Nakazone 1969; Medina 2014; Raseira e Raseira 1996; Singhal et al., 1980; Souza et al., 2014). Além desses, Souza et al. (2014) relataram citótipos com $2n = 46, 48, 55, 58$ e 82 que não são múltiplos do número básico para a família ($x = 11$), sendo que suas contagens foram complementadas pela quantificação de DNA. Medina (2014) relatou que o valor 2C teria uma relação direta com o nível de ploidia determinado para citótipos $2n=77$ e $2n=88$ no Uruguai, confirmando que a quantificação de DNA por citometria de fluxo é uma ferramenta segura na detecção indireta da poliploidia.

A poliploidia se refere a presença de dois ou mais conjuntos cromossômicos completos em um núcleo celular (Soltis, 2009) e em plantas é um fenômeno frequente, sendo relatado principalmente nas angiospermas (Dodsworth et al., 2016). Além de diversas características fenotípicas, os vegetais poliploides apresentam modificações genotípicas, já que o aumento do número de cromossomos da planta pode aumentar a produção de metabolitos secundários quando comparadas as plantas-mãe diploides (Dhawan e Lavania, 1996; De Jesus-Gonzales e Weathers, 2003) podendo formar assim, diferentes quimiotipos nos óleos essenciais dentro da mesma espécie.

A identificação dos compostos por sua vez, pode ajudar a definir as diferenças existentes entre os genótipos, possibilitando a definição de agrupamentos entre genótipos semelhantes (quimiotipos) (Yapia et al., 2014; Stesevic et al., 2014). Além disso, o estudo da diversidade quimiotípica nos óleos essenciais é importante para identificar e selecionar genótipos dentro de condições ambientais que sejam

favoráveis para a produção e exploração do óleo essencial. Dessa forma os óleos podem ser aplicados na medicina popular, indústria bioquímica, na produção de fármacos, estudos quimiotaxonômicos e assim, agregar valor a cultura (Souza, 2017).

Dessa forma, diante da variação no número cromossômico descrita para *P. cattleyanum*, o presente estudo teve por objetivo analisar a relação entre o conteúdo de DNA, a composição química do óleo essencial de cinco diferentes plantas de *P. cattleyanum* bem como sua atividade biológica em bioensaios vegetais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras vegetais foram coletadas no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, situado na latitude sul (20° 45' 48''), longitude oeste (41° 32'2'') e altitude de 254 metros. A extração dos óleos foi conduzida no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal e os experimentos com os bioensaios vegetais no laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alegre, ES. Já as análises de composição química dos óleos foram realizadas no laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES).

2.1 Citometria de fluxo

Para determinar o conteúdo de DNA nuclear dos diferentes acessos de *P. cattleyanum* foi utilizado *Solanum lycopersicum* L 'Stupické' (2C = 2,0 pg) como padrão interno (Praça-Fontes et al. 2011). Fragmentos foliares de 2 cm² do padrão e da amostra foram dissociados em placa de Petri contendo 500 µL de tampão de extração nuclear OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico, 0,5% de Tween 20, 2 mM de ditiotreitol e 50 µg/mL de RNase) (Otto, 1990) suplementados com polietilenoglicol (PEG). Ao material dissociado obtido foram adicionados 500 µL do mesmo tampão, o qual foi filtrado em malha de nylon (Partec®) de 30 µm, acondicionado em microtubo e centrifugado a 100 xg por 5 minutos.

O precipitado obtido foi ressuspensionado em tampão OTTO-I e mantido neste por 10 minutos (Praça-Fontes et al. 2011). Posteriormente, foram acrescentados 1,5 mL do tampão de coloração OTTO-I: OTTO-II (400 mM de Na₂HPO₄.H₂O, 2 mM de

ditiotreitól, 50 µg/ml iodeto de propídeo e 50 µg/mL de RNase) (1:2) (Otto, 1990). As suspensões de núcleos foram mantidas no escuro por 30 minutos na solução de coloração e posteriormente filtradas em malha de nylon (Partec®) de 20 µm.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS II/III (Partec GmbH, Munster, Germany). O conteúdo de DNA nuclear das amostras analisadas foi calculado pela multiplicação do conteúdo de DNA nuclear de *Solanum lycopersicum* (padrão interno) pela relação de intensidade fluorescente correspondente aos picos de núcleos G₀/G₁.

2.2 Coleta das folhas de *P. cattleianum* e extração dos óleos essenciais

Material vegetal – Foram coletadas folhas de 5 acessos de *P. cattleyanum*, sendo as coletas realizadas utilizando a mesma planta de cada acesso as 8h da manhã no dia. A coleta foi realizada na altura do peito (1,6m) e ao redor do diâmetro da copa. Cerca de 500g de folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para obtenção do óleo e caracterização química. O material foi acondicionado em sacos de papel, identificado e transportado para o laboratório de Preparo de Amostra Vegetal no CCAE-UFES. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -9°C até a extração do óleo essencial.

Extração dos óleos essenciais – Os óleos essenciais foram obtidos no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do CCAE-UFES por hidrodestilação, em aparelho Clevenger, durante quatro horas de extração de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (BRASIL, 2010). Nas extrações foram utilizadas cerca de 300g de folhas em aproximadamente 1000 mL de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2000 mL. Os vapores de água e de óleo se misturaram e após o resfriamento ocorreu a condensação das moléculas, que foram separadas por diferença de solubilidade e densidade. A mistura de óleo e água foi colocada em eppendorf, centrifugada, o óleo foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a -20 °C, protegido de luminosidade.

2.3 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

Identificação dos constituintes dos óleos essenciais - As amostras dos óleos essenciais extraídos das folhas foram analisadas por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e Cromatografia

Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE). Para essas análises, as seguintes condições foram empregadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de 2,80 mL.min⁻¹ e 50,8 cm.sec⁻¹ (GC-FID) e 1,98 mL.min⁻¹ e 50,9 cm.sec⁻¹ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx®-5MS (0,25 µm de espessura do filme); a temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C.min⁻¹ até atingir 180 °C, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas utilizadas nos detectores FID e MS foram de 240 e 200 °C, respectivamente (SOUZA et al., 2017).

As amostras utilizadas foram retiradas dos vials em um volume de 1 µL de uma solução de 3% de óleo essencial dissolvido em hexano com DMA 0,1 mol.L⁻¹ (padrão externo para controle de reprodutibilidade).

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos.sec⁻¹ e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H₂ e ar atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL.min⁻¹ e 400 mL.min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente.

A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção LTPRI (IR). Para o cálculo dos IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C7C40 (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2011).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em GC-FID. Os compostos com

área relativa acima de 1% foram identificados e acima de 10% foram considerados majoritários.

2.4 Bioensaios vegetais

Teste de Fitotoxicidade - Sementes de *Lactuca sativa* e *Sorgum bicolor* foram utilizadas como modelos vegetais de eudicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. Sementes das duas espécies foram colocadas em placa de Petri forradas com papel filtro umedecido com diferentes concentrações do óleo essencial (187.5, 375, 750, 1500 e 3000 ppm) dos cinco acessos de *P. cattleianum*. Como controle positivo foi utilizado água e como controle negativo o herbicida comercial glifosato. A germinação se deu em BOD à 24°C durante todo o experimento. O número de sementes germinadas foi contado após 16, 24, 32 e 48h de tratamento. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido de acordo com a fórmula: $(N1*1) + (N2-N1)*1/2 + (N3-N2)*1/3 + \dots (Ny-(Ny-1))*1/y$, onde N_y representa o número de sementes germinadas em um determinado período e Y representa o número total de intervalos de tempo. A porcentagem de sementes germinadas (GR) e o comprimento de raiz (CR) foram avaliados após 48h. As partes aéreas das plântulas foram medidas após 120h para determinar o crescimento aéreo (CA).

2.5 Análise estatística dos dados

Utilizando os dados dos testes de fitotoxicidade foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Dunnett para comparar os acessos nas diferentes concentrações testadas com os controles. Além disso, o teste de Tukey foi realizado para comparar os efeitos entre os controles. a 5% de probabilidade utilizando o Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Conteúdo de DNA e perfil cromatográfico

Os acessos utilizados apresentaram variação nos valores de conteúdo de DNA (Tabela 1) e também na composição química de seus óleos essenciais (Tabela 2).

Tabela 1. Conteúdo de DNA (pg) dos óleos dos cinco acessos de *P. cattleyanum*.

Acesso	Conteúdo de DNA (pg)
CAT2	5.81
CAT3	6.03
CAT4	3.23
CAT5	3.80
CAT8	4.71

Tabela 2 - Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleyanum*.

Compostos ^a	Tempo de retenção (min) ^b	Índice de retenção ^c	Área relativa ^d					Classes Terpênicas
			CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT8	
alpha-Pinene	8.795	933	2,03	6,06	23,80	19,56	4,88	MH
beta-Pinene	10.725	976			3,62			MH
Myrcene	11.520	990						MH
Limonene	12.925	1025					9,17	MH
Eucalyptol	13.280	1033			27,70	24,34	3,80	MO
Beta-ocimene	13.735	1041			5,20	4,17		MH
alpha-Terpineol	20.805	1192			4,38	3,45		MO
Copaene	29.030	1374	9,88	9,90			3,68	SH
trans-Caryophyllene	30.820	1417	62,27	58,45	35,30	41,80	57,05	SH
alpha-Humulene	32.270	1453	13,93	13,38		3,11	11,68	SH
alpha-Amorphen	33.255	1476				3,57		SH
beta.-Selinene	34.279	1490					2,96	SH
alpha.-selinene	34.672	1498					2,72	SH
delta-Cadinene	35.175	1523	6,78	6,34			4,06	SH
NI ^f	37.455	-		3,44				
Viridiflorol	37.485	1580	2,61					SO
NI	39.220	-	2,50	2,43				
Conteúdo de (pg)			5,81	6,03	3,23	3,80	4,71	

^a Os compostos foram identificados pelo Índice LTPRI (GC/FID) e Espectrometria de Massa (GC / MS) utilizando a coluna Rtx®-5MS. ^b Índice de Retenção Tabulado (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011). ^c Índice de retenção calculado a partir de dados obtidos por amostragem de n-alcenos saturados (C7-C40). ^d Foram identificados compostos com áreas relativas >2%. ^e Classes terpênicas (MH: monoterpenos hidrogenados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrogenados). ^f Compostos não identificados.

A partir das análises cromatográficas foram identificados 14 compostos nos óleos essenciais dos 5 acessos de *P. cattleyanum*. Nos óleos de cada acesso foram identificados 100% dos compostos com área relativa acima de 2%, os quais foram classificados em monoterpenos hidrogenados e oxigenados e sesquiterpenos hidrogenados (Figura 1).

Utilizando a classificação terpênica dos compostos encontrados nos acessos em estudo, a Figura 2 foi gerada e nela é possível observar a formação de 3 quimiotipos diferentes que foram assim classificados: Quimiotipo 1 (Q1) composto pelos acessos de maior conteúdo de DNA (CAT2 – 5.81pg e CAT3 – 6.03pg); Quimiotipo 2 (Q2) composto pelos acessos de menor conteúdo de DNA (CAT4 – 3.23pg e CAT5 – 3.80pg) e o Quimiotipo 3 (Q3) composto pelo acesso de conteúdo de DNA intermediário em relação aos demais (CAT8 – 4.71pg).

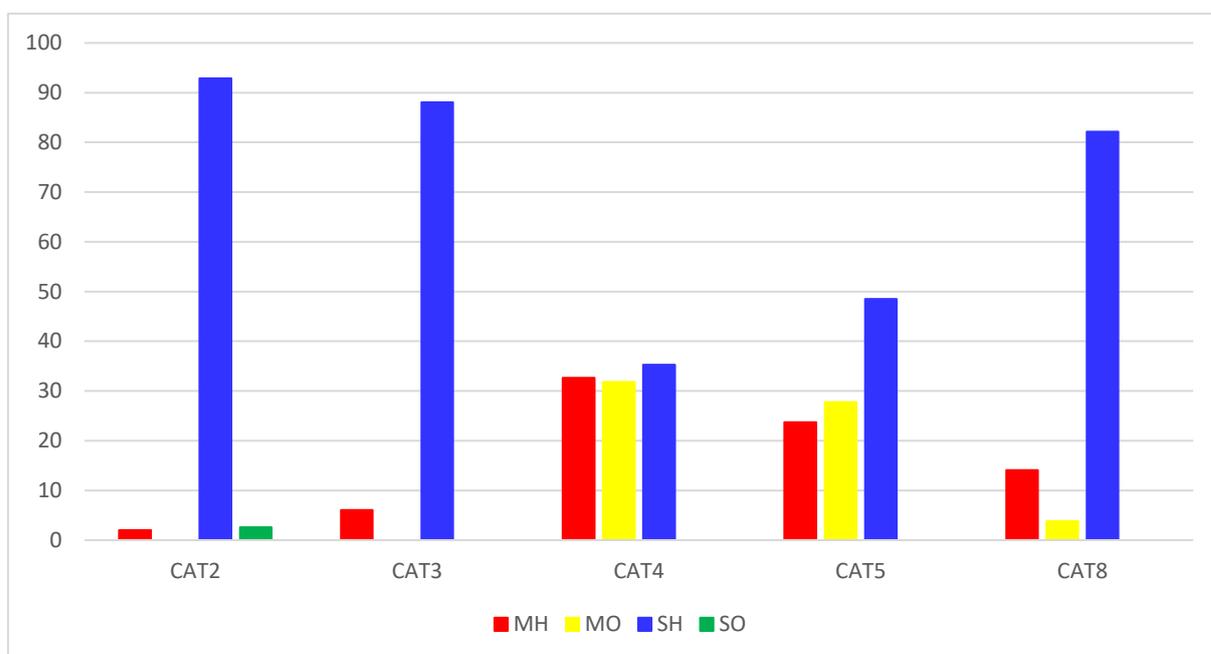


Figura 1 – Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleyanum*. *Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleyanum* (CAT2, CAT3, CAT4, CAT5 e CAT8). Monoterpenos hidrogenados (HM), monoterpenos oxigenados (OM), sesquiterpenos hidrogenados (HS) e sesquiterpenos oxigenados (SO).

3.2 Fitotoxicidade

No teste de fitotoxicidade foram avaliados a porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA). Os dados obtidos após o teste de Dunnett, a 5% de probabilidade, foram utilizados para gerar o boxplot, e apenas onde houve interação entre os tratamentos e as três testemunhas é que os gráficos foram gerados.

Dessa forma, nas variáveis porcentagem de germinação e IVG observadas em sementes de alface não houve efeito significativo, por isso as mesmas não se encontram representadas. Já a germinação das sementes de sorgo foi inibida em 77% com o óleo essencial da planta CAT3 na concentração de 750ppm, sendo essa inibição próxima a do controle positivo glifosato. Além disso, as concentrações de 1500 e 3000ppm inibiram 63% e 70% da germinação. O óleo essencial de CAT4 inibiu em 50% a germinação na concentração de 187,5ppm e 45% na concentração de 750ppm (Figura 2).

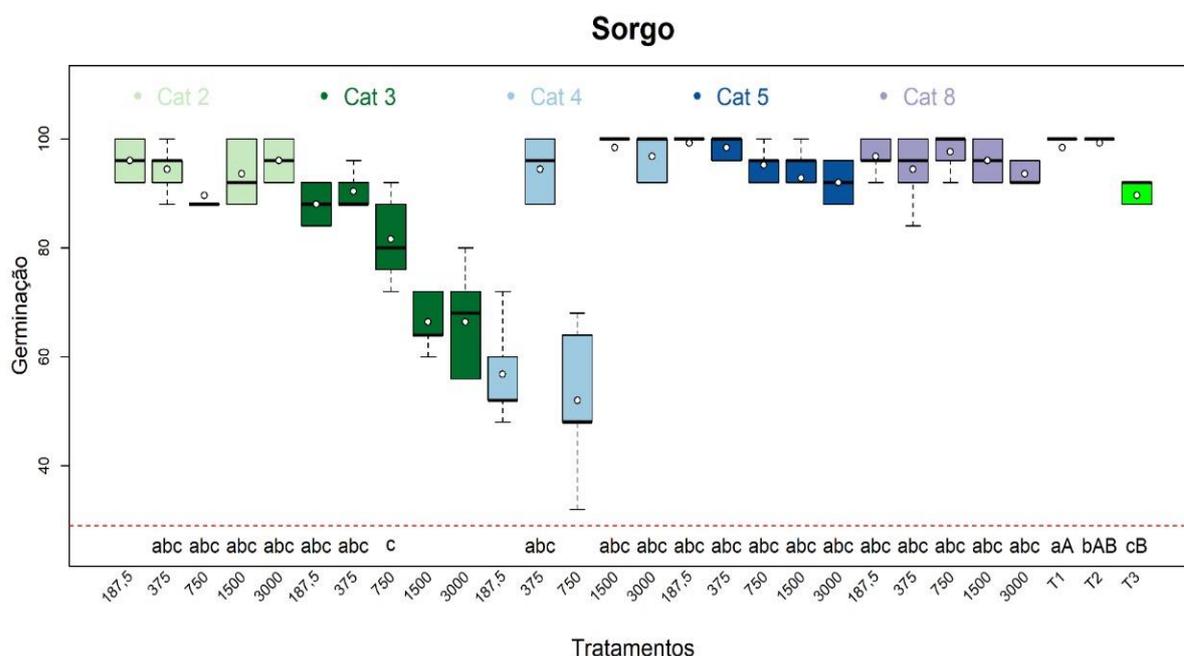


Figura 2 – Porcentagem de sementes germinadas de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*. * As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde a germinação é representada em porcentagem.

Na Figura 3, na análise da variável IVG, observou-se que o óleo essencial de CAT3, nas concentrações de 1500 e 3000ppm, provocou diferenças significativas, enquanto o óleo essencial de CAT4 influenciou no IVG nas concentrações de 187,5; 375 e 750ppm. As concentrações de 1500 e 3000ppm do óleo essencial de CAT5 também foram significativas bem como as concentrações de 187.5 e 3000ppm do óleo de CAT8.

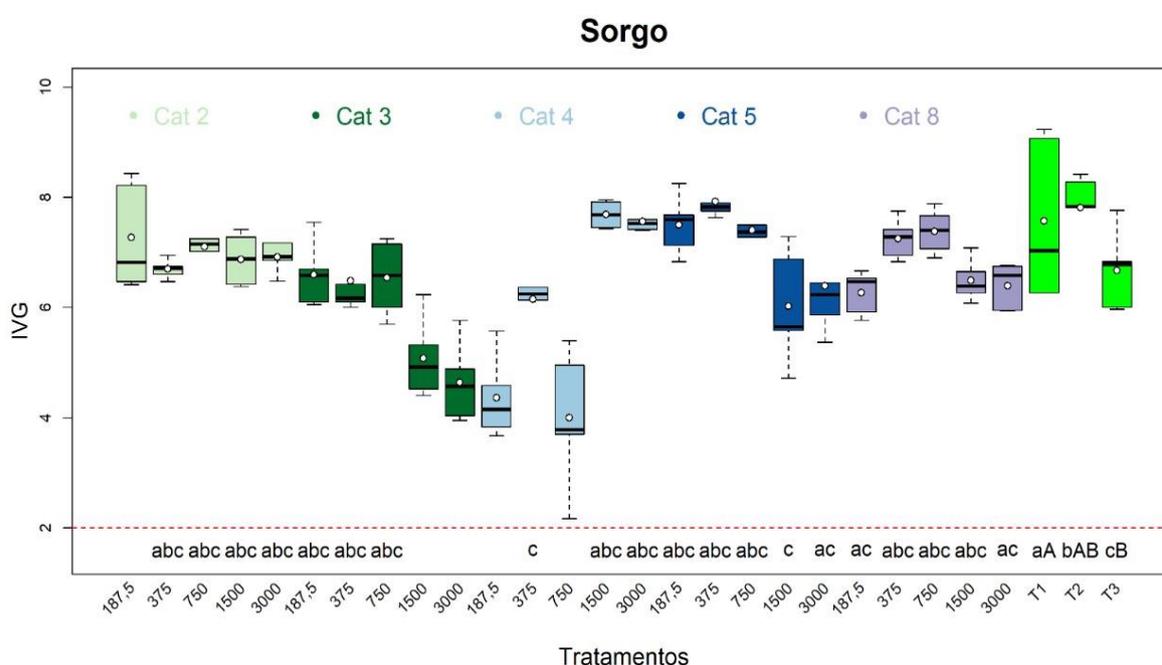


Figura 3 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*.* As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste.

A variável crescimento aéreo (CA) das plântulas de alface submetidas aos tratamentos com óleo essencial de CAT2 nas concentrações de 187.5, 375 e 1500ppm diferiram significativamente do controle positivo glifosato, apresentando um CA de 6.6, 4.2 e 6.3mm, respectivamente. Para CAT3 todas as concentrações do óleo foram significativas, sendo suas médias iguais a 8, 6.2, 8.3, 7.1, 6.2mm. Para CAT4

as concentrações de 187.5, 375 e 750ppm do óleo essencial apresentaram um CA de 4.2, 7 e 4.3mm, respectivamente (Figura 4).

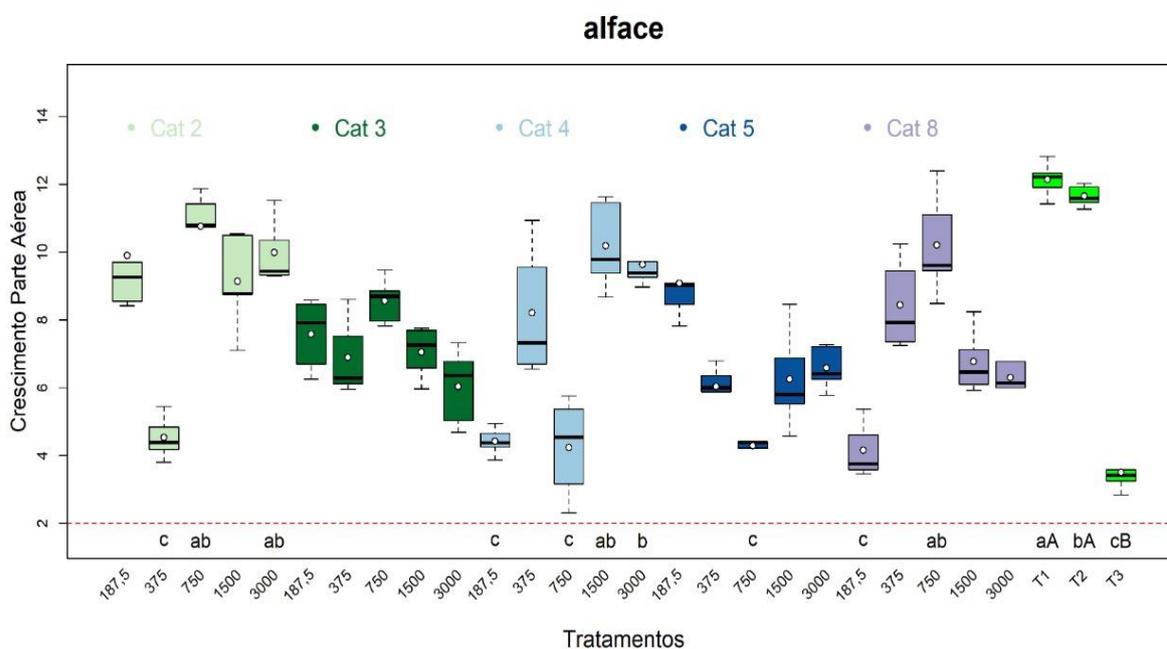


Figura 4 – Crescimento aéreo das plântulas de alface submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*. * As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde o Crescimento da Parte Aérea é representada em mm.

Já no experimento com sorgo o CA apresentou diferenças significativas para as concentrações de 187.5, 375 e 3000ppm do óleo essencial de CAT2 (13.5, 7.5, 9.5mm, respectivamente); 187.5, 375, 1500 e 3000ppm do óleo de CAT3 (8, 7.6, 7.9 e 6mm, respectivamente). Para CAT4 as concentrações de 187.5 e 750 ppm (4 e 3mm, respectivamente) do óleo essencial apresentaram diferenças significativas, enquanto que para o óleo de CAT5 as concentrações de 187.5, 375 e 750ppm (9, 4 e 3ppm, respectivamente) foram significativas quando comparadas ao controle positivo glifosato. Por fim, o óleo essencial de CAT8, nas concentrações de 187.5 e 3000ppm, apresentou resultados significativos (6.5 e 8mm, respectivamente) (Figura 5).

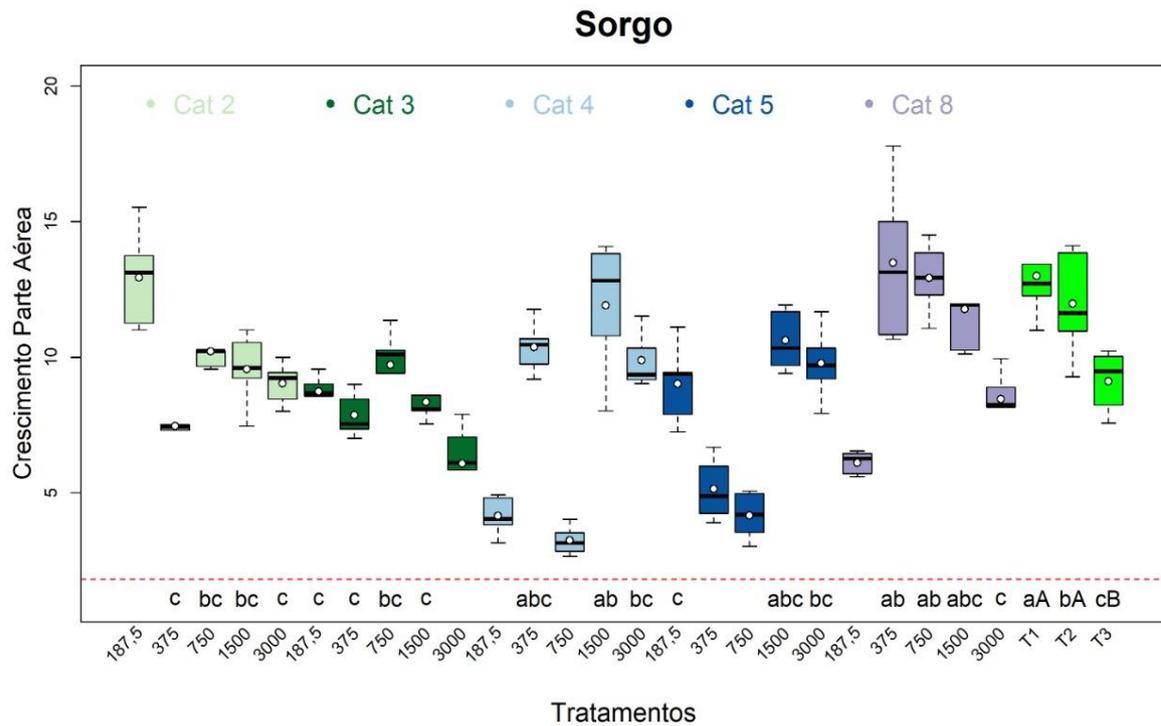


Figura 5 – Crescimento aéreo das plântulas de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*. *As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde o Crescimento da Parte Aérea é representada em mm.

Em relação ao CR, em alface o óleo essencial de CAT3, na concentração de 1500ppm, permitiu um CR significativo de 10.3mm quando comparado ao controle glifosato, enquanto o óleo de CAT4, na concentração de 750ppm, permitiu um CR significativo de 9mm. O óleo essencial de CAT5, nas concentrações de 375 e 750ppm permitiu um CR de 8.7 e 8mm (Figura 6).

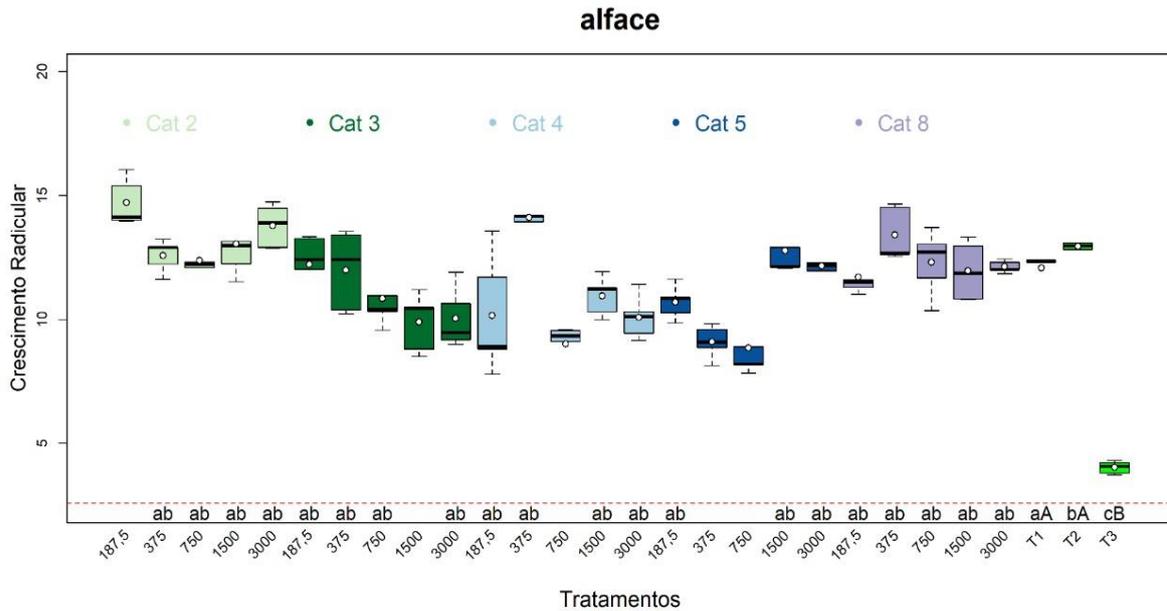


Figura 6 – Crescimento radicular de sementes de alface submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*. *As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde o Crescimento Radicular é representado em mm.

Já nos testes com as sementes de sorgo observou-se que os valores significativos foram encontrados em sementes submetidas aos tratamentos com óleo essencial de CAT3, nas concentrações de 750ppm (3.5mm), 1500ppm (2.5mm) e 3000ppm (2mm); CAT4, nas concentrações de 187.5ppm (1.9mm), 750ppm (1.7mm), 1500ppm (2.5mm) e 3000ppm (2.3mm) e CAT5, nas concentrações de 187.5 (2.4mm), 375ppm (2.3mm), 750ppm (2.4mm) (Figura 7).

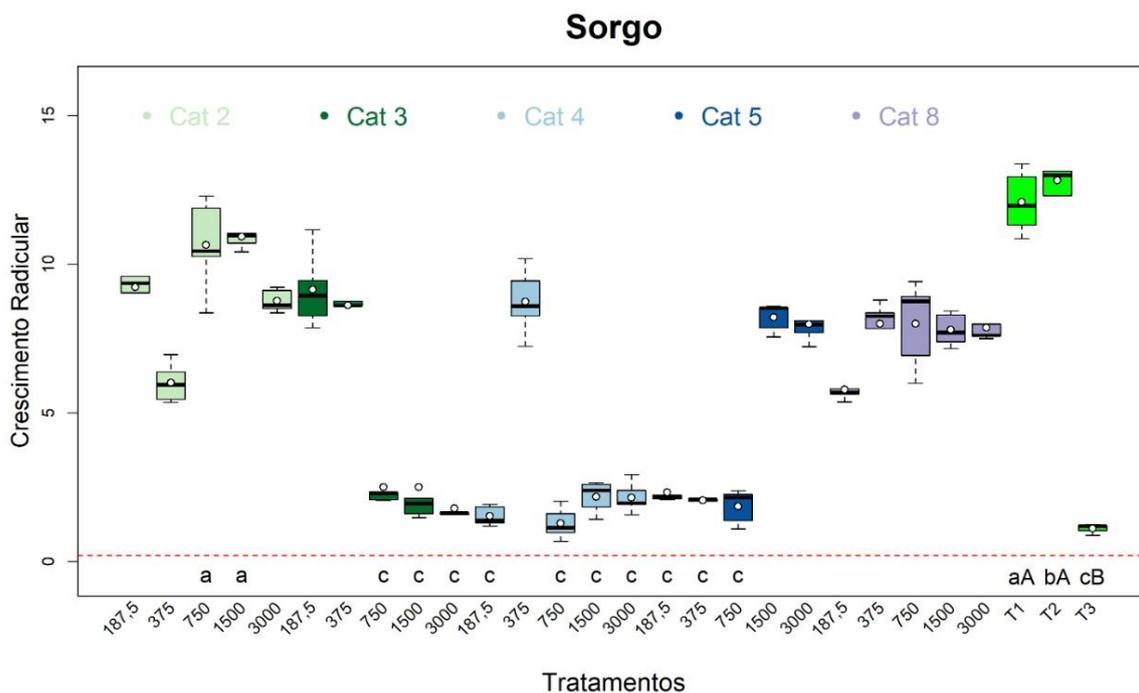


Figura 7 – Crescimento radicular de sementes de sorgo submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (ppm) dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *P. cattleyanum*. *As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde o Crescimento Radicular é representado em mm.

A tabela abaixo resume os resultados dispostos nos gráficos, ressaltando as concentrações significativas em cada acesso de *P. cattleyanum*, em alface e sorgo.

Tabela 3. Resumo das concentrações significativas nos parâmetros analisados para os bioensaios alface e sorgo.

		CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT8
ALFACE	Germinação					
	IVG					
	CPA			187.5ppm C 750ppm C	750ppm C	187.5ppm C
	CR	187.5ppm*	1500ppm*	750ppm*	375ppm* 750ppm*	
SORGO	Germinação		750ppm C 1500ppm* 3000ppm*	187.5ppm* 750ppm*		
	IVG		1500ppm* 3000ppm*	187.5ppm* 750ppm*	1500ppm C	
	CPA	187.5ppm* 375ppm C 3000ppm C	187.5ppm C 375ppm C 1500ppm C 3000ppm*	187.5ppm* 750ppm*	187.5ppm C 375ppm* 750ppm*	187.5ppm* 3000ppmC
	CR		750ppm C 1500ppm C 3000ppm C	187.5ppm C 750ppm C 1500ppm C 3000ppm C	375ppm C 750ppm C	

IVG: Índice de Velocidade de Germinação; CPA: Crescimento Parte Aérea; CR: Crescimento Radicular.

4 Discussão

4.1 Conteúdo de DNA e perfil cromatográfico

A partir dos resultados da citometria de fluxo observou-se que CAT2 e CAT3 são os acessos com maior conteúdo de DNA, enquanto CAT4 e CAT5 são os que apresentam menor conteúdo de DNA. CAT8 teve o conteúdo de DNA estimado em 4.71pg, um valor considerado intermediário em relação aos demais acessos. Diferentes estudos demonstraram a existência de variações no número cromossômico para *P. cattleyanum*, sendo que já foram relatados valores de $2n = 44, 46, 48, 55, 58, 66, 77, 82$ e 88 (Atchison 1947; Costa e Forni-Martins, 2006; Costa 2009; Hirano e Nakazone 1969; Medina 2014; Raseira e Raseira 1996; Singhal et al., 1984; Souza et al., 2014).

Nesse sentido, essas variações, do número cromossômico e conseqüentemente do conteúdo de DNA, influenciam na produção de diferentes quimiotipos nas plantas dessa espécie. Tal afirmação é comprovada pela análise cromatográfica e

evidenciada na Tabela 1, onde observou-se uma variação na produção de compostos das plantas testadas, sendo que as de conteúdo de DNA próximo apresentam semelhanças na composição química. Os acessos com maior conteúdo de DNA (CAT2 e CAT3) são compostos principalmente por sesquiterpenos (5 compostos), enquanto os acessos com menor conteúdo de DNA (CAT4 e CAT5) são compostos principalmente por monoterpenos (5 compostos). Já o acesso CAT8 apresenta conteúdo de DNA intermediário quando comparado com os demais acessos e sua composição química, apesar de conter mono (3 compostos) e sesquiterpenos (6 compostos), apresenta quantidades diferentes dos mesmos ao se comparar com CAT4 e CAT5.

Na figura 2 é possível visualizar a formação dos quimiotipos relacionados ao conteúdo de DNA. Assim o Q1 é formado por CAT2 e CAT3 (maiores conteúdos de DNA), o Q2 por CAT4 e CAT5 (menores conteúdos de DNA) e o Q3 pelo acesso CAT8.

De acordo com Souza et al. (2017), a quimiotipia é um fenômeno químico onde os óleos essenciais de uma mesma planta apresentam diferença significativa na produção de seus compostos majoritários. Por muito tempo considerou-se que a quimiotipia era decorrente de eventos ligados a fatores ambientais como altitude, variações do clima e solo. Entretanto, com os avanços tecnológicos e os estudos aplicados verificou-se que fatores genéticos também influenciam na quimiotipia. Para *P. cattleyanum* não existem relatos da formação de diferentes perfis cromatográficos, entretanto, para *P. guajava* essa variação quimiotípica é existente (Khadhri et al., 2014; Solórzano-Santos e Miranda-Novales, 2011; Joseph et al., 2010).

Observando os resultados deste estudo é possível inferir que para a síntese dos metabólitos primários e secundários, os genes controlam a produção de catalisadores (enzimas) dentro da unidade informativa da maquinaria celular. Dessa maneira, a constituição genética de cada indivíduo influenciará nas rotas metabólicas requeridas para a produção de tais metabólitos secundários (Roberts, 2007).

Sendo assim, tendo em vista as variações de conteúdo de DNA verificadas pelas análises de citometria de fluxo, entende-se que nos acessos de maior conteúdo de DNA (CAT2 e CAT3) possivelmente há a ocorrência de duplicação cromossômica e conseqüentemente, duplicação de genes que controlam a produção dos compostos majoritários do primeiro quimiotipo identificado, formado em sua maioria por

sesquiterpenos. O contrário acontece no segundo quimiotipo identificado, onde as plantas de menor conteúdo de DNA (CAT4 e CAT5), possivelmente não sofreram duplicação cromossômica equivalente as plantas CAT2 e CAT3, portanto, são formadas majoritariamente por monoterpenos.

4.2 Fitotoxicidade

Em relação a atividade dos óleos dos diferentes acessos de *P. cattleyanum* nos bioensaios vegetais com alface e sorgo é possível perceber que de maneira geral todos os óleos apresentaram atividade em alguma das variáveis analisadas, porém, alguns apresentam maior potencial, sendo assim, a discussão a seguir terá como foco a relação entre a quimiotipia identificada nos acessos estudados e sua relação com a variação no conteúdo de DNA dos mesmos, como evidenciado na tabela 3.

Nas variáveis porcentagem de germinação e IVG, no que diz respeito aos testes com alface é possível observar que nenhum óleo teve efeito significativo quando comparado com o controle positivo glifosato, por isso, esses parâmetros não se encontram representados graficamente.

Observa-se que para alface o Q2 apresentou maior atividade, já que afetou significativamente as variáveis CA e CR, enquanto o Q1 só afetou a variável CR e o Q3 somente o CA. Amri et al. (2013), afirmaram que geralmente as eudicotiledôneas são mais sensíveis à monoterpenos e isso pode justificar o fato de que o Q2 teve maior atividade nas variáveis avaliadas nas sementes de alface.

Entretanto, vale destacar que o óleo essencial de CAT2 exerceu ação na menor concentração aplicada. Este acesso se difere dos demais por apresentar a maior concentração de trans-Cayophyllene (TC). Outros trabalhos relataram a atividade do TC, como por exemplo em *Brassica campestris*, *Raphanus sativus* e *Achyranthes japonica* (Miq.), onde o TC inibiu o crescimento das plântulas (Kil et al., 2000; Wang et al., 2009). Já em *Arabidopsis thaliana*, Araniti et al. (2013) observaram um efeito dose dependente do TC no crescimento da parte aérea e das raízes. Valera-Burgos et al. (2012) relataram que para moléculas e/ou extratos de plantas com atividade alelopática, as respostas do TC foram específicas da espécie e dependentes da dose. Além disso, as características de permeabilidade e absorção da semente utilizada também influenciam na atividade e na resposta ao TC (Pellissier, 2013).

Observando os gráficos de sorgo e a Tabela 3 é possível perceber que tanto o Q1 quanto o Q2 apresentaram elevada atividade nesse bioensaio. No Q1 o óleo de CAT3 se destacou com maior efeito, porém em todos os parâmetros as maiores concentrações foram as mais efetivas. Já no Q2 CAT4 se destaca com atividade em todos os parâmetros e diferentemente de CAT3, neste acesso a menor concentração (187.5ppm) foi a que apresentou maior efeito.

A efetividade de CAT4 pode estar relacionada com a quimiotipia encontrada, onde os monoterpenos são majoritários, principalmente o *Alpha-pinene* e o *Eucalyptol*. Os monoterpenos apresentam alta capacidade de atuar na integridade da membrana celular, alterando seu estado de fluidez. Isso acontece, pois segundo Zunino e Zygadlo (2004), os monoterpenos aumentam a razão entre ácidos graxos insaturados e saturados nos fosfolípidos da membrana. Ainda, segundo Amri et al. (2013) as ligações insaturadas mantêm a fase cristalina líquida da membrana, o que impede a peroxidação lipídica, sendo esta uma resposta das plantas ao estresse hídrico e oxidativo que pode causar distúrbios nos processos fisiológicos e bioquímicos das mesmas. Dessa maneira, os monoterpenos se relacionam com o estresse oxidativo nos vegetais. Além disso, os monoterpenos também inibem a polimerização de microtúbulos em células vegetais (Chaimovitsh et al. 2010), interrompendo a divisão celular, causando malformações radiculares mediadas por uma alteração no conteúdo de auxina e etileno em *Arabidopsis thaliana* (Grana et al. 2013).

Como já mencionado anteriormente, a presença do TC como composto majoritário em todas os acessos também reforça a ideia de que juntamente a atividade dos monoterpenos presentes no Q2, o TC tenha um efeito sinérgico junto aos demais compostos. Tal composto foi eficiente na inibição do crescimento radicular de plantas daninhas como o *Lolium perenne* L., *Amaranthus retroflexus* L. e *Digitaria sanguinalis* L. Scop (Araniti, 2016). Sendo assim, os óleos essenciais de *P. cattleyanum* que apresentam os quimiotipos 1 e 2 apresentam potencial alelopático e podem ser utilizados como bioherbicida.

Ainda é importante ressaltar que a identificação de quimiotipos nos óleos essenciais de *P. cattleyanum* permite que estes se tornem marcadores químicos para a espécie, já que é possível relacionar o quimiotipo com o conteúdo de DNA da espécie. Além disso, os quimiotipos podem servir também para a identificação taxonômica da

espécie. Na prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos genéticos, quimiosistemáticos, em programas de melhoramento genético na seleção de genótipos de interesse e identificação de condições ambientais favoráveis para o cultivo e exploração dos frutos e do próprio óleo essencial.

5 CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico dos cinco acessos de *Psidium cattleianum* apresentou grande variabilidade quimiotípica, demonstrando que a espécie não apresenta um quimiotipo único. As variações na composição química se relacionaram com a variação do conteúdo de DNA nuclear, dessa maneira foi possível a identificação de três quimiotipos: o Quimiotipo 1, das plantas com maiores conteúdos de DNA (CAT2 – 5.81pg e CAT3 – 6.03pg); o Quimiotipo 2, das plantas com os menores conteúdos de DNA (CAT4 – 3.23pg e CAT5 – 3.80pg) e o Quimiotipo 3 da planta com conteúdo de DNA intermediário (CAT8 – 4.71pg). A identificação de quimiotipos nas espécies vegetais, é importante pois estes podem ser utilizados como marcadores químicos e utilizados em estudos citogenéticos, quimiosistemáticos e em programas de melhoramento genético.

No que diz respeito a atividade biológica dos óleos essenciais de *Psidium cattleianum* observou-se que os mesmos apresentaram atividade fitotóxica, inibindo o crescimento radicular e aéreo em alface e influenciando em todas as variáveis estudadas (%G, IVG, CPA e CR) em sorgo. Sendo assim, recomenda-se os acessos CAT3 e CAT4 como plantas matrizes para programas de melhoramento genético, com potencial para exploração de seu óleo essencial com efeito bioherbicida.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 311950/2016-7), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES/UNIVERSAL, 80707114/18 e FAPES/VALE, 75516586/16). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Código de financiamento 001.

Referências Bibliográficas

Adams, R.P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.

Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., & Jamoussi, B. **Reviews on phytotoxic effects of essential oils and their individual components: News approach for weeds management**. 4, 96-114, 2013.

Araniti, F.; Sánchez-Moreiras, A.M.; Graña, E.; Reigosa, M.J.; Abenavoli, M.R. Terpenoid *trans-caryophyllene* inhibits weed germination and induces plant water status alteration and oxidative damage in adult *Arabidopsis*. **Plant Biology**. 19(1), 79-89, 2016. Doi:10.1111/plb.12471.

Atchison, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany** 34: 159-164, 1947.

Brasil. **Farmacopeia Brasileira**, 5th ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p. 2899, 2010.

Chaimovitch D., Abu-Abied M., Belausov E., Rubin B., Dudai N., Sadot E. Microtubules are an intracellular target of the plant terpene citral. **The Plant Journal**, 61, 399–408, 2010.

Costa, I.R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando Psidium e gêneros relacionados**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2009.

Costa, I. R. & Forni-Martins, E. R. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. **Australian Journal of Botany** 54: 409-415, 2006 a.

Costa, I. R.; Forni-Martins, E. R. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). **Caryologia** 59: 7-13, 2006b.

Costa, I. R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2004.

De Jesus-Gonzales L, Weather PJ. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Rep**. 21:809–813, 2003.

- Dhawan OP, Lavania UC. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica** 87:81–89, 1996. doi:10.1007/BF00021879.
- Dodsworth, S., M. W. Chase, and A. R. Leitch. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? **Botanical Journal of the Linnean Society**, 180: 1–5, 2016.
- El-Sayed, A.M. The Pherobase Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. 2016.
- Grana E., Sotelo T., Diaz-Tielas C., Reigosa M.J., Sanchez-Moreiras A.M. The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants. **Weed Science**, 61, 469–481, 2013.
- Hirano, R.T.; Nakazone, H. Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 94: 83–86, 1969.
- 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.** 9(10), 10-14, 2010.
- 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**. 52, 29–31, 2014.
- Kil B.S., Han D.M., Lee C.H., Kim Y.S., Yun K.Y., Yoo H.G. Allelopathic effects of *Artemisia lavandulaefolia*. **The Korean Journal of Ecology**, 23, 149–155, 2000.
- Medina, S. N. V. ***Psidium cattleyanum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromossómica y cariotípica em poblaciones silvestre y genótipos seleccionados em programas nacionales de mejoramiento.** Monografía. Faculdade de Agronomia- Universidade da República, Uruguai, 2014.
- NIST (National Institute of Standards and Technology), 2011. Standard Reference Database 69. NIST Chemistry WebBook.
- Pellissier F. Improved germination bioassays for allelopathy research. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 23–30, 2013.
- Praça-fontes, M.M.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R.; Cruz, C.D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards. **Plant Cell Reports**, v.30, 7, p. 1183-1191, 2011.

Raseira, M.C. B.; Raseira, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro**. Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado- Pelotas RS, 1996.

Roberts, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 387-395, 2007.

Singhal, V.K.; Gill, B.S.; Bir, S.S. Cytology of cultivated woody species (Polypetalae). **Proceedings of the Indian Science Congress Association** 71(3- VI), 143-144, 1984.

Solórzano-Santos, F.; Miranda-Novales, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. 2011, 23, 1- 6.

Soltis, D. E.; Albert, V. A.; Leebens-Mack, J.; Bell, C. D.; Paterson, A. H.; Zheng, C.; Soltis, P. S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American journal of botany**, 96(1): 336-348, 2009.

Souza, T.S.; Ferreira, M.F.S.; Menini, L.; Souza, J.R.C.L.; Parreira, L.A.; Cecon, P.R.; Ferreira, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Sci. Hortic.** 216, 38–44, 2017.

Souza, A das G. de, Resende, L. V., Lima, I. P. de, Martins, L. S. S. & Techio, V. H. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. Resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution**. 2014.

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.

Wang R.L., Peng S.L., Zeng R.S., Ding L.W., Xu Z.F. Cloning, expression and wounding induction of b-caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* HBK and allelopathic potential of b-caryophyllene. **Allelopathy Journal**, 24, 35–44, 2009.

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.

Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. **Planta**, 219(2), 303-309, 2004.

Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Psidium cattleianum* Sabine e sua atividade larvicida em *Aedes aegypti*

Micheli Sossai Spadeto¹, Gustavo Ferreira Martins², Luciano Menini³, Wellington Ronildo Clarindo⁴, José Henrinque Soler Guilhen⁵, Márcia Flores da Silva Ferreira⁶, Milene Miranda Praça-Fontes^{1*}.

^{1,5}Programa de Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Exatas e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCENS-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

^{2,4}Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

³Laboratório de Química Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). Rua Principal, s/n, Distrito de Rive, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

⁶Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

^{1*}Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

Resumo

O controle do mosquito *Aedes aegypti* pelo uso de inseticidas sintéticos tem potencial efeito na poluição ambiental e aumenta a resistência dos vetores alvo. Surge assim a necessidade de pesquisas com plantas produtoras de substâncias naturais com ação inseticida, uma forma ambientalmente correta de controlar o *Aedes aegypti* e consequentemente diminuir a incidência das doenças transmitidas por ele. Tais substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas. Nesse contexto, estudos recentes demonstraram atividade larvicida promissora em espécies de *Psidium*. Além disso, para *Psidium cattleianum* foram identificados diferentes quimiotipos, o que despertou o interesse em analisar a ação larvicida da espécie em *A. aegypti* e se essa variação química influencia na mesma. O estudo foi um delineamento experimental, com cinco indivíduos de *P. cattleianum* e cinco doses de óleo essencial: 10, 30, 50, 70 e 100 µg.mL⁻¹. Os dados de mortalidade foram obtidos e demonstraram efeito larvicida em *A. aegypti* com CL50 que variam de 64.07 a 93.18 µg.mL⁻¹. O perfil cromatográfico dos óleos essenciais permitiu observar a formação de três quimiotipos, o primeiro constituído majoritariamente por sesquiterpenos hydrogenados (CAT2 e CAT3) o segundo em que os óleos possuem monoterpenos hydrogenados (CAT4, CAT5 e CAT8) em sua constituição, sendo que tais quimiotipos apresentaram diferenças na atividade. Sendo assim, conclui-se que os óleos essenciais de *P. cattleianum* apresentam alta atividade larvicida em *A. aegypti*.

Palavras-chave: Variação de ploidia, inseticida natural, mortalidade de larvas, *Psidium cattleianum*, *Aedes aegypti*.

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um importante vetor de doenças que causam alta morbidade e mortalidade em vários países do mundo (Tattevin, 2012). Diante disso os métodos de controle se tornaram parte essencial do gerenciamento de vetores pela saúde pública, envolvendo principalmente a intervenção por meio do controle de larvas pela aplicação rotineira de larvicidas químicos, como compostos organofosforados e reguladores de crescimento de insetos.

Entretanto, os impactos ambientais provenientes dos inseticidas sintéticos, bem como o custo dos mesmos se apresentam como um grande desafio (Ohimain et al., 2014; Soleimani-Ahmadi et al., 2014). Além disso, alguns destes, como a deltametrina e a permetrina que são os mais utilizados desde a década de 90, perderam a sua eficácia devido a resistência significativa do mosquito e a não conformidade de seu uso diante da preocupação com a saúde pública e os impactos ambientais de produtos químicos sintéticos (Chareonviriyaphap et al., 2013; Vontas et al., 2012).

O controle de mosquitos ainda no seu estágio aquático, na forma de larva, é uma estratégia preferível em comparação com o manejo de estágios adultos (Mdoe et al., 2014). Os produtos de origem vegetal são uma alternativa vantajosa aos compostos químicos convencionais e assim vem sendo amplamente explorados contra diferentes gêneros de mosquitos (Ghosh et al., 2012; George et al., 2014). Nesse cenário, surge a necessidade de pesquisas com plantas produtoras de substâncias naturais com ação inseticidas, que tem alta eficácia em virtude do efeito sinérgico das substâncias que as compõem.

Dentre essas plantas de interesse está *Psidium cattleianum* Sabine, que pertence a família *Myrtaceae*. Essa espécie, vem demonstrando grande potencial para a exploração econômica (Kinupp e Lorenzi, 2014). Além da utilização dos frutos in natura na alimentação, a espécie apresenta atividade antiproliferativa em células cancerígenas (Moon et al. 2011, Medina et al. 2011, Jun et al. 2011, Im et al. 2012), antimicrobiana (Brighenti et al. 2008, De Menezes et al. 2010, Jun et al. 2011, Medina et al. 2011), potencial alelopático, citotóxico e genotóxico (Hister et al. 2015).

Além disso, estudos com espécies do gênero *Psidium* vem demonstrando que existem variações químicas intraespecíficas, como é o caso das cultivares de *Psidium guajava*

que apresentaram quimiotipos distintos relatados (Souza et al., 2017). Tais quimiotipos representam a diversificação da composição química do óleo essencial, resultante da interação entre características genéticas e condições ambientais em que a planta se encontra (Januzzi et al., 2011).

Assim, diante da importância da espécie *P. cattleyanum* e tendo em vista que a presença de diferentes quimiotipos pode influenciar nas características qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade larvicida em *Aedes aegypti* dos óleos essenciais de cinco plantas de *P. cattleyanum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas utilizadas fazem parte da coleção que se encontra em campo no Centro de Ciências Agrárias e das Engenharias da UFES. Assim as amostras vegetais (folhas) dos acessos de *P. cattleyanum* foram coletadas no município de Alegre, latitude sul (20° 45' 48"), longitude oeste (41° 32'2") altitude de 254 metros, no estado do Espírito Santo, Brasil. A extração dos óleos essenciais foi conduzida no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do Centro e Ciências Agrárias e das Engenharias da UFES e os experimentos com as larvas no Insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG). Já as análises de composição química dos óleos foram realizadas no laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES).

2.1 Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas dos acessos de *P. cattleyanum*

Material vegetal – As folhas dos acessos de *P. cattleyanum* foram coletadas as 8h da manhã no mesmo dia. A coleta foi realizada na altura do peito (1,6m) e ao redor do diâmetro da copa. Cerca de 500g de folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para obtenção do óleo e caracterização química. O material foi acondicionado em sacos de papel, identificado e transportado para o laboratório de Preparo de Amostra Vegetal no CCAE-UFES. As folhas foram secas a temperatura ambiente e acondicionadas em sacos plásticos, sendo armazenadas em freezer a -20 °C até a extração do óleo essencial.

Extração dos óleos essenciais – Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, em aparelho Clevenger, durante quatro horas de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (BRASIL, 2010). Nas extrações foram utilizadas cerca de 300g de folhas em aproximadamente 1000 mL de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2000 mL. Os vapores de água e de óleo se misturaram e após o resfriamento ocorreu a condensação das moléculas, que foram separadas por diferença de solubilidade e densidade. A mistura de óleo e água foi colocada em eppendorf, centrifugada, o óleo foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegido de luminosidade.

2.2 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

Identificação dos constituintes dos óleos essenciais - As amostras dos óleos essenciais extraídos das folhas foram analisadas por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE). Para essas análises, as seguintes condições foram empregadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de $2,80\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $50,8\text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (GC-FID) e $1,98\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $50,9\text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx[®]-5MS (0,25 μm de espessura do filme); a temperatura do forno seguiu a programação: temperatura inicial de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas utilizadas nos detectores FID e MS foram de 240 e $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (SOUZA et al., 2017).

As amostras utilizadas foram retiradas dos vials em um volume de 1 μL de uma solução de 3% de óleo essencial dissolvido em hexano com DMA $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (padrão externo para controle de reprodutibilidade).

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos. seg^{-1} e fragmentos detectados de 29 a 400 (m/z). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H_2 e ar atmosférico

com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL.min⁻¹ e 400 mL.min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente. A detecção dos íons ocorre quando os compostos orgânicos presentes na amostra são misturados com o gás de arraste (He) e é produzida uma corrente proporcional à quantidade desses compostos na amostra. Se somente o He e o H₂ forem misturados, uma pequena corrente é produzida entre os eletrodos.

A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção de LTPRI (IR). Para o cálculo dos IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇C₄₀ (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (Adams, 2007; Nist, 2011).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em GC-FID. Os compostos com área relativa acima de 2% foram identificados e acima de 10% foram considerados majoritários.

2.3 Ação larvicida dos óleos essenciais em larvas de *A. aegypti*

Para verificar a bioatividade dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleyanum* frente às larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti* foram realizados ensaios larvas no Insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG). As larvas da linhagem PPCampos (Campos dos Goytacazes, RJ) foram obtidas a partir de uma colônia de sucessivas gerações mantida no insetário. As larvas foram eclodidas e mantidas em água dechlorada, sendo alimentadas diariamente com ração de tartaruga (Reptolife, Alcon Pet, Camburiú, SC, Brasil), sob temperatura controlada (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas até L4, sendo este o tamanho ideal para a realização dos ensaios de ação larvicida, seguindo a metodologia descrita por Consoli e Oliveira (1994), WHO (2005) e Mendes (2017).

Os ensaios biológicos foram realizados em quintuplicata com 25 larvas por tratamento. Foram utilizados cinco óleos essenciais de acessos de *P. cattleyanum* previamente

selecionados a partir dos resultados de conteúdo de DNA e composição química. Para os ensaios larvicidas, foram preparadas soluções dos cinco óleos essenciais com DMSO 1% (v.v⁻¹) nas concentrações: 10, 30, 50, 70 e 100 µg.mL⁻¹. As larvas foram separadas com auxílio da pipeta de Pasteur e posteriormente distribuídas em recipientes de vidro contendo 100 mL das diluições. Foram utilizadas 25 larvas (L4) por tratamento, sob temperatura controlada (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas. Além disso, uma solução controle foi preparada utilizando DMSO 1% como controle negativo e solução de Deltametrina 0,06 µg.mL⁻¹ (Decis 25 EC, 25 g.L⁻¹, concentrado emulsionável, Bayer S. A., São Paulo, SP) como controle positivo (CL₉₀).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), seguindo o esquema fatorial 5 x 5 (óleos essenciais x concentrações), totalizando 25 tratamentos com cinco repetições em cada, de modo que foram realizados 125 ensaios. Além desses, foi utilizado controle positivo, com cinco repetições. O ensaio com o controle negativo foi realizado antes de iniciar os experimentos, utilizando cinco repetições. Dessa forma, foram totalizados 150 ensaios, utilizando 3750 larvas (25 larvas/ensaio), além das utilizadas no controle negativo. A verificação da mortalidade foi realizada 24 horas após o início de cada ensaio. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos com a pipeta de Pasteur.

2.6 Análise Estatística dos Dados

Para encontrar os valores da concentração letal média para matar 50% da população (CL₅₀) e concentração letal média para matar 90% da população (CL₉₀), foi utilizada regressão logística a partir do modelo Probit a 5% de probabilidade utilizando o Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016).

3. RESULTADOS

As plantas utilizadas apresentaram variações qualitativas no que diz respeito a composição química de seus óleos essenciais (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição química em percentual de área relativa dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleyanum*.

Compostos ^a	Tempo de retenção (min) ^b	Índice de retenção ^c	Área relativa ^d					Classes Terpênicas
			CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT8	
alpha-Pinene	8.795	933	2,03	6,06	23,80	19,56	4,88	MH
beta-Pinene	10.725	976			3,62			MH
Myrcene	11.520	990						MH
Limonene	12.925	1025					9,17	MH
Eucalyptol	13.280	1033			27,70	24,34	3,80	MO
Beta-ocimene	13.735	1041			5,20	4,17		MH
alpha-Terpineol	20.805	1192			4,38	3,45		MO
Copaene	29.030	1374	9,88	9,90			3,68	SH
trans-	30.820	1417	62,27	58,45	35,30	41,80	57,05	SH
Caryophyllene								
alpha-Humulene	32.270	1453	13,93	13,38		3,11	11,68	SH
alpha-Amorphen	33.255	1476				3,57		SH
beta.-Selinene	34.279	1490					2,96	SH
alpha.-selinene	34.672	1498					2,72	SH
delta-Cadinene	35.175	1523	6,78	6,34			4,06	SH
NI ^f	37.455	-		3,44				
Viridiflorol	37.485	1580	2,61					SO
NI	39.220	-	2,50	2,43				

^a Os compostos foram identificados pelo Índice LTPRI (GC/FID) e Espectrometria de Massa (GC / MS) utilizando a coluna Rtx®-5MS. ^b Índice de Retenção Tabulado (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011). ^c Índice de retenção calculado a partir de dados obtidos por amostragem de n-alcenos saturados (C7-C40). ^d Foram identificados compostos com áreas relativas >2%. ^e Classes terpênicas (MH: monoterpenos hidrogenados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrogenados). ^f Compostos não identificados.

A partir das análises cromatográficas foram identificados 15 compostos nos óleos essenciais dos 5 acessos de *P. cattleyanum*. Nos óleos de cada acesso foram identificados 100% dos compostos com área relativa acima de 2%, os quais foram classificados em monoterpenos hidrogenados e oxigenados e sesquiterpenos hidrogenados e oxigenados (Figura 2).

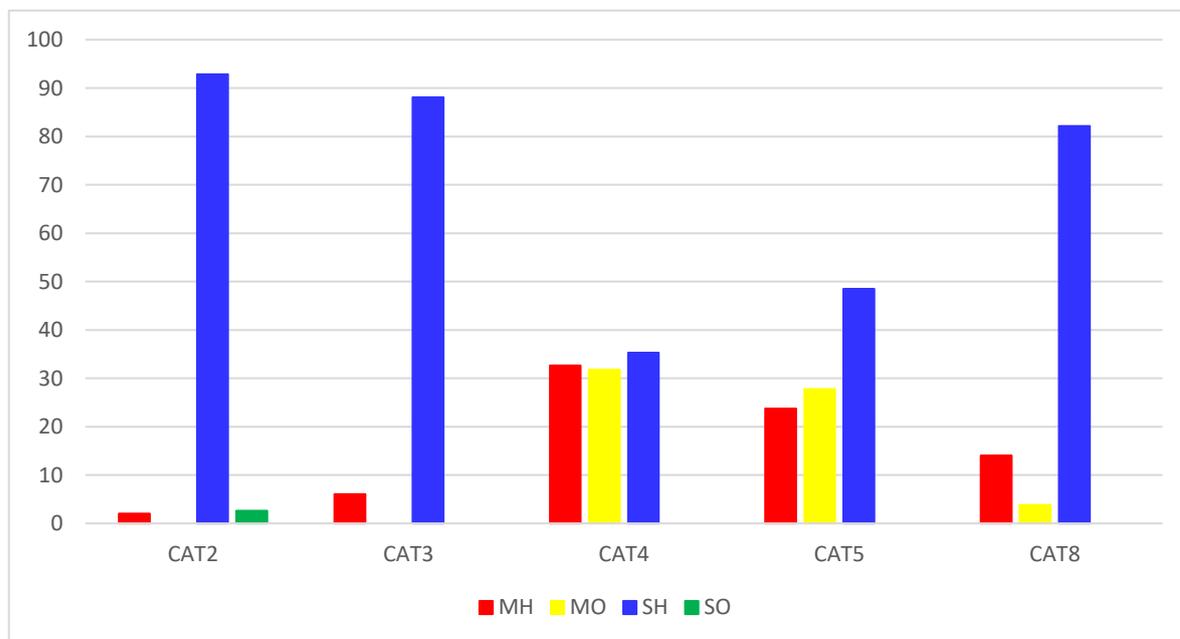


Figura 1. Área relativa das classes terpênicas em relação aos acessos de *P. cattleyanum* (CAT2, CAT3, CAT4, CAT5, CAT8). Monoterpenos hidrogenados (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrogenados (SH) e sesquiterpenos oxigenados (SO).

Os 5 compostos majoritários (área relativa >10%), presentes nos óleos essenciais, foram identificados na Figura 3.

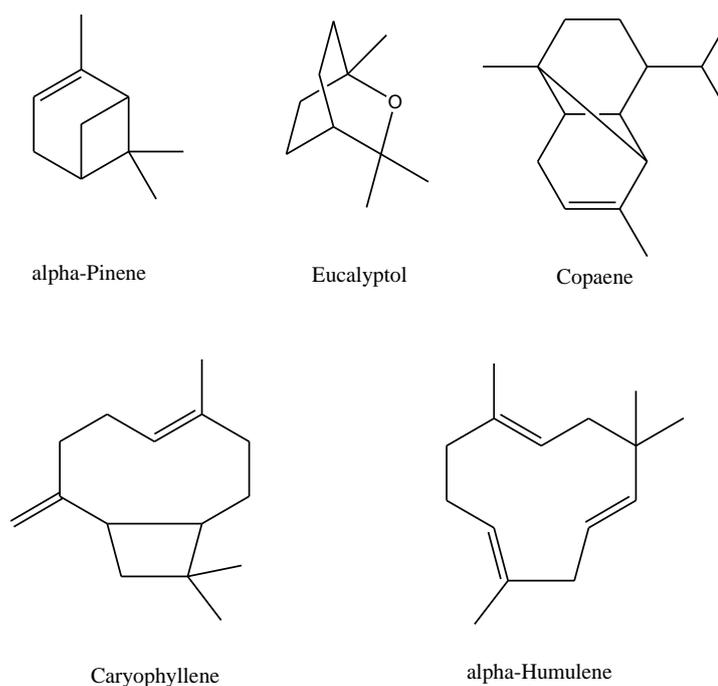


Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários (compostos com área relativa maior que 10%).

Em relação a atividade larvica, no controle negativo, composto por uma solução de DMSO 1%, não foram observadas larvas mortas. Para obtenção da porcentagem de mortalidade das L4 submetidas ao controle positivo, foi utilizado o piretroide Deltametrina na concentração de $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para matar 90% da população. A taxa de mortalidade obtida foi de $90,7 \pm 2,4\%$, demonstrando a eficiência desse composto. Os óleos essenciais obtidos nos cinco indivíduos de *P. cattleyanum* diferiram quanto a atividade larvica, em concentrações variando entre 64.07 (CAT5) a 93.18 (CAT2) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para obtenção das CL_{50} e de 95.96 (CAT5) a 124.22 (CAT8) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CL_{90} (Tabela 2).

Tabela 2. Toxicidade dos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleyanum* em larvas de *Aedes aegypti*.

Acesso	n^a	Inclination ± SD^b	LC₅₀ (IC de 95%)^c	LC₉₀ (IC de 95%)^d	χ^{2e}	p^f
CAT2	625	0.07 ± 0.007	93.18	110.81	0.05	1.00
CAT3	625	0.05 ± 0.003	85.98	113.39	0.05	1.00
CAT4	625	0.04 ± 0.003	64.38	95.98	0.04	1.00
CAT5	625	0.04 ± 0.003	64.07	95.96	0.04	1.00
CAT8	625	0.035 ± 0.003	87.80	124.22	0.04	1.00

^aNúmero de larvas utilizadas. ^bInclinação da reta com erro padrão. ^cConcentração Letal média para matar 50% da população (em µg.mL⁻¹) com intervalo de confiança à 95%. ^dConcentração Letal média para matar 90% da população (em µg.mL⁻¹) com intervalo de confiança à 95%. ^eQui-quadrado. ^fProbabilidade. > dose.p (T1,p=c (0.5,0.9)) Dose Letal de 50% e 90%.

Os acessos CAT4 e CAT5 apresentaram destaque com os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀, ou seja, os óleos desses acessos apresentaram maiores taxas de mortalidade tanto para CL₅₀ quanto para CL₉₀. Os acessos CAT2, CAT3 e CAT8 tiveram um comportamento similar quanto a eficiência do seu óleo no que diz respeito aos seus valores de CL₅₀. Já na CL₉₀, CAT2 e CAT3 tiveram um comportamento similar, enquanto CAT8 se diferenciou dos demais, apresentando o maior valor de CL₉₀ (Figura 4).

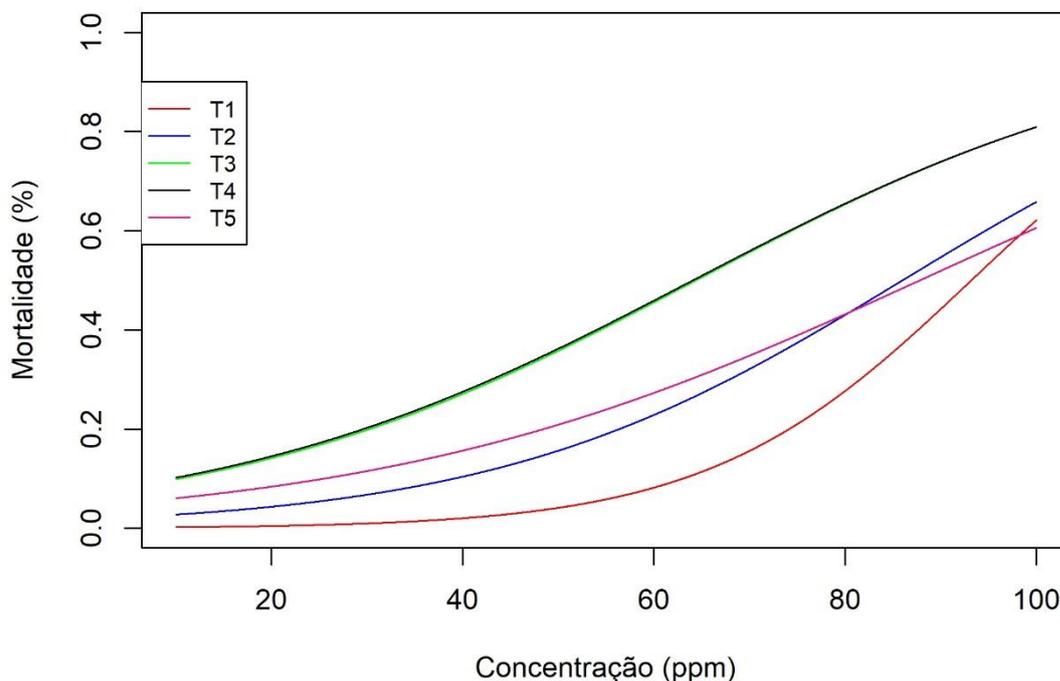


Figura 3. Curvas de mortalidade das larvas após 24h de exposição aos óleos essenciais dos acessos de *P. cattleianum*: T1 (CAT1), T2 (CAT2), T3 (CAT3), T4 (CAT4) e T5 (CAT8). Os pontos foram marcados em preto demonstram os valores de CL₅₀ – Concentração Letal média para matar 50% da população ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4 Discussão

Após a análise dos óleos essenciais foi possível observar entre as amostras a presença de três quimiotipos distintos (Figura 2), o primeiro é composto pelas plantas CAT2 e CAT3, que apresentam em sua composição majoritariamente sesquiterpenos hidrogenados e o segundo grupo formado por CAT4 e CAT5 que são compostos majoritariamente por monoterpenos hidrogenados e oxigenados. Já CAT8 se diferencia dos outros dois quimiotipos, pois apesar de apresentar monoterpenos, estes estão em menor quantidade em relação a CAT4 e CAT5 e é composto majoritariamente por sesquiterpenos, assim como CAT2 e CAT3. Assim, percebe-se que CAT8 apresenta um padrão de composição intermediário em relação aos outros dois grupos.

No que diz respeito a atividade larvicida de produtos naturais, não existe um padrão de determinação. Entretanto alguns autores estabeleceram critérios individuais que se relacionam principalmente com o tempo de exposição e a origem das larvas, variáveis que podem alterar os valores de CL50 (Massebo et al., Komalamisra et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os cinco acessos de *P. cattleyanum* apresentaram efeito larvicida significativo de acordo com os critérios estabelecidos por Kiran et al. (2006), onde são considerados óleos com efeito larvicida significativo, aqueles com CL50 menor do que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sob avaliação de 24 horas.

Os valores de CL50 observados para os cinco óleos essenciais avaliados foram menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, podendo ser considerados ativos em L4 de *A. aegypti*, de acordo com os critérios adotados. Levando em consideração o padrão de quimiotipos encontrados, percebe-se que esse mesmo padrão se repete na atividade larvicida, onde os óleos de CAT2, CAT3 e CAT8 apresentaram menor atividade com CL50 e CL95 mais altos (Tabela 3). Enquanto CAT4 e CAT5 apresentaram maior atividade com menores valores de CL50 e CL95 (Tabela 2).

Pode-se considerar que os indivíduos apresentaram como padrão, sesquiterpenos, já que houve a presença de β -cariofileno em todos os indivíduos, com quantidades variando entre 35,30% e 62,27%, entretanto os acessos CAT2, CAT3 e CAT8 apresentaram os maiores teores do composto. Por outro lado, o padrão monoterpênico ocorreu nas plantas CAT 4, CAT5 e CAT8, sendo que as duas primeiras apresentaram maiores teores do monoterpreno hidrogenado α -pineno (Tabela 1).

Alguns estudos apontaram que óleos com padrão sesquiterpênico que apresentaram o β -cariofileno como composto majoritário foram mais ativos para o controle de larvas de *A. aegypti* (Santos et al. 2006; Gois et al., 2011; Mendes et al., 2017). Entretanto outros autores demonstraram que o padrão monoterpênico pode também apresentar atividade larvicida, pois seus óleos apresentaram CL50 próximo aqueles com padrão sesquiterpênicos (Costa et al., 2008; Simas et al., 2004).

Os resultados deste estudo demonstraram que as duas plantas com padrão monoterpênico foram mais ativas (CAT4 e CAT5), porém não se pode atribuir a ação larvicida a um composto isolado, pois as demais plantas que tiveram níveis de monoterpenos mais baixos (CAT2, CAT3 e CAT8) também apresentaram atividade.

Assim, acredita-se que a ação sinérgica das diferentes classes de terpenos leva a uma atividade larvívica efetiva de *P. cattleianum* em larvas de *Aedes aegypti*

5 Conclusão

De maneira geral, todas os acessos testados apresentaram efeito larvívica significativo, entretanto CAT4 e CAT5, apresentaram semelhanças no perfil de quimiotipos, com maior área relativa composta de monoterpenos hidrogenados e maior atividade larvívica, sendo estas recomendadas como possíveis matrizes para a propagação de novas plantas com potencial para a produção de biolarvívica para *Aedes aegypti*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 311950/2016-7), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES/UNIVERSAL, 80707114/18 e FAPES/VALE, 75516586/16). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Código de financiamento 001.

Referências bibliográficas

- Adams, R.P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.
- Brasil. **Farmacopeia Brasileira**, 5th ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p. 2899, 2010.
- Brighenti, F.L. et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. **Caries Research**, v.42, n.2, p.148-154, 2008.
- Chareonviriyaphap, T.; Bangs, M.J.; Suwonkerd, W.; Kongmee, M.; Corbel, A.V.; Ngoen-klan, R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasit Vectors**.;6:280, 2013.
- Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L., 1994. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro 228 p.

Costa, E.V. et al., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteeriops* species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1895- 9, 2008.

De Menezes, T.E.C. et al. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.3, p.300-305, 2010.

El-Sayed, A.M. The Pherobase Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. 2016.

George, D.R.; Finn, R.D.; Graham, K.M.; Sparagano, O.A. Present and future potential of plantderived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasit Vectors**, 7: 28, 2014.

Ghosh, A.; Chowdhury, N.; Chandra, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian J Med Res**, 135: 581-98, 2012.

Hister, C.A.L. **Genotoxicidade citotoxicidade, compostos fenólicos e viabilidade polínica de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 2015.

Im, I. et al. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK 1/2 MAPK signalling pathway. **Nutrition and Cancer**, v.64, n.2, p.255-266, 2012.

Jannuzzi, H.; Mattos, J.K.A.; Silva, D.B.; Gracindo, L.A.M.; Vieira, R.F. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de ervacidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p.258-264, 2011.

Jun, N.J.; Mosaddik, A.; Moon, J.Y.; Jang, K.C.; Lee, D.S.; Ahn, K.S., Cho, S.K. Cytotoxic activity o f β -Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. **Rec. Nat. Prod.** 5:3, 242-246, 2011.

Kinupp, V.F.; Lorenze, H. **Plantas Alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil.Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2014.

Kiran, S.R.; Bhavani, K.; Devi, P.S.; Rao, B.R.R.; Reddy, K.J. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of Chloroxylon swietenia DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresour. Technol.** 97, 2481–2484, 2006.

Komalamisra, N.; Trongtokit, Y.; Rongsriyam Y.; Apiwathnasorn, C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants again st four mosquito vector species. **Southeast**

Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, vol. 36, no. 6, pp. 1412–1422, 2005.

Massebo, F.; Tadesse, M.; Bekele, T.; Balkew, M.; Gebremichael, T. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, no. 17, pp. 4183–4188, 2009.

Mdoe, F.P.; Cheng, S.S.; Lyaruu, L.; Nkwengulila, G.; Chang, S.T.; Kweka E.J. Larvicidal efficacy of *Cryptomeria japonica* leaf essential oils against *Anopheles gambiae*. **Parasit Vectors**, 7: 426, 2014.

Medina, A.L. et al. Araça (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.916-922, 2011.

Mendes, L.A.; Martins, G.F.; Valbon, W.R.; Souza, T.S.; Menini, L.; Ferreira, A.; Ferreira, M.F.S. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops & Products**. 108: 684-689, 2017.

Moon, J.Y. et al. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry**, v.125, n.2, p.369-375, 2011.

NIST (National Institute of Standards and Technology), 2011. Standard Reference Database 69. NIST Chemistry WebBook. <http://webbook.nist.gov/chemistry>.

Ohimain, E.I.; Angaye, T.C.N.; Basse, S.E. Comparative tial Oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 297-303, 2011/03/01, 2010. ISSN 1096-620X.

Simas, N.K.; Lima, E.D.C.; Conceição, S. D. R.; Kuster, R.M.; Oliveira Filho A.M.C.; LAGE L. S. Natural products for dengue transmission control—Larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. **Quimica Nova**, vol. 27, no. 1, pp. 46–49, 2004.

Soleimani-Ahmadi, M.; Vatandoost, H.; Zare, M. Characterization of larval habitats for *Anopheline* mosquitoes in a malarious area under elimination program in the southeast of Iran. **Asian Pac J Trop Biomed**. 4(Suppl. 1): S73–80, 2014.

Souza, T.S.; Ferreira, M.F.S.; Menini, L.; Souza, J.R.C.L.; Parreira, L.A.; Cecon, P.R.; Ferreira, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Sci. Hortic**. 216, 38–44, 2017.

Tattevin, P. Dengue, chikungunya: two emerging arboviruses, **Journal des Anti-Infectieux**, vol. 14, no. 2, pp. 78–88, 2012.

Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; Della Torre, A.; Ranson, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pest Biochem Physiol.**104:126–31, 2012.

WHO (World Health Organization), 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf. (Accessed 10 Oct. 2019).

CONCLUSÃO GERAL

De maneira geral foram avaliadas sete plantas de *Psidium cattleyanum* e nas análises de citometria de fluxo foram identificados conteúdos de DNA diferentes para as mesmas, variando de 3.20pg a 6.03pg. O perfil cromatográfico dos óleos essenciais também variou, sendo que 14 compostos foram identificados. O composto majoritário em todos os acessos foi o sesquiterpeno hidrogenado o *Trans-caryophyllene*, seguido pelos compostos *alpha-pinene* (MH), *copaene* (SH), *alpha-humulene* (SH) e o *eucalyptol* (MO).

Três quimiotipos foram identificados e foi possível relacioná-los com o conteúdo de DNA dos acessos: o Quimiotipo 1, das plantas com maiores conteúdos de DNA (CAT2 – 5.81pg e CAT3 – 6.03pg); o Quimiotipo 2, das plantas com os menores conteúdos de DNA (CAT1 – 3.95pg, CAT4 – 3.23pg, CAT5 – 3.80pg e CAT6 – 3.20pg) e o Quimiotipo 3 da planta com conteúdo de DNA intermediário (CAT8 – 4.71pg). A identificação de quimiotipos nas espécies vegetais, é importante pois estes podem ser utilizados como marcadores químicos e utilizados em estudos citogenéticos, quimiosistemáticos e em programas de melhoramento genético.

No que diz respeito a atividade biológica dos óleos essenciais de *Psidium cattleyanum* observou-se que os mesmos apresentaram atividade fitotóxica, inibindo o crescimento radicular e aéreo em alface e influenciando em todas as variáveis estudadas (%G, IVG, CPA e CR) em sorgo. Sendo assim, recomenda-se os acessos CAT3 e CAT4 como plantas matrizes para programas de melhoramento genético, com potencial para exploração de seu óleo essencial com efeito bioherbicida. Já no bioensaio com *Aedes aegypti* todas os acessos testados apresentaram efeito larvicida significativo, entretando CAT4 e CAT5, apresentaram maior atividade larvicida, sendo estas recomendadas como possíveis matrizes para a propagação de novas plantas com potencial para a produção de biolarvicida para *Aedes aegypti*.

A poliploidia de *P. cattleyanum* exerce influência sobre a quantidade e a qualidade dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas e dessa maneira, a espécie se destaca e é recomendada para futuros estudos farmacológicos e em programas de melhoramento genético de plantas.

ANEXO 1 – Identificação dos compostos dos óleos essenciais de seis acessos de *Psidium cattleianum* extraídos a partir de folhas coletadas em fevereiro de 2018.

Compound ^b	Retention time (min)	Retention Index ^c	Relative areas (%) ^d					
			CAT1	CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT6
alpha-Pinene	8.795	933	10,35	2,03	6,06	30,12	22,91	5,70
beta-Pinene	10.725	976				2,62		
Myrcene	11.520	990	8,16					2,01
Limonene	12.925	1025						2,05
Eucalyptol	13.280	1033				31,37	26,60	
Beta-ocimene	13.735	1041				5,12	4,17	
alpha-Terpineol	20.805	1192				3,88	3,24	
Copaene	29.030	1374		9,88	9,90			10,20
Caryophyllene	30.820	1417	72,16	62,27	58,45	26,89	37,08	57,69
alpha-Humulene	32.270	1453	6,68	13,93	13,38		2,83	13,06
alpha-Amorphene	33.255	1476	2,65				3,17	
delta-Cadinene	35.175	1523		6,78	6,34			6,39
Caryophyllene oxide	36.514	1580						2,90
NI ^e	37.455	-			3,44			
Viridiflorol	37.485	1580		2,61				
NI	39.220	-		2,50	2,43			

^a The compounds were indentified by LTPRI Index (GC/FID) and Mass Spectrometry (GC/MS) using Rtx ®-5MS column.

^b Tabulated Retention index (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011).

^c Retention index calculated from data obtained by sampling of saturated n-alkanes (C7-C40).

^d Compounds with relative areas >2% were identified.

^e Unidentified compound.

ANEXO 2 – Identificação dos compostos dos óleos essenciais de sete acessos de *Psidium cattleianum* extraídos a partir de folhas coletadas em junho de 2019.

Compound ^b	Retention time (min)	Retention Index ^c	Relative areas (%) ^d						
			CAT1	CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	CAT6	CAT8
alpha-Pinene	8.795	933	10,35	2,03	6,06	23,80	19,56	24,46	4,88
beta-Pinene	10.725	976				3,62			
Myrcene	11.520	990	8,16					2,26	
Limonene	12.925	1025						3,11	9,17
Eucalyptol	13.280	1033				27,70	24,34	25,48	3,80
Beta-ocimene	13.735	1041				5,20	4,17		
alpha-Terpineol	20.805	1192				4,38	3,45		
Copaene	29.030	1374		9,88	9,90			6,25	3,68
trans-Caryophyllene	30.820	1417	72,16	62,27	58,45	35,30	41,80	21,86	57,05
alpha-Humulene	32.270	1453	6,68	13,93	13,38		3,11	10,50	11,68
alpha-Amorphene	33.255	1476	2,65				3,57		
beta.-Selinene	34.279	1490							2,96
alpha.-selinene	34.672	1498							2,72
delta-Cadinene	35.175	1523		6,78	6,34			6,08	4,06
NI ^e	37.455	-				3,44			
Viridiflorol	37.485	1580		2,61					
NI	39.220	-		2,50	2,43				

^a The compounds were indentified by LTPRI Index (GC/FID) and Mass Spectrometry (GC/MS) using Rtx ®-5MS column.

^b Tabulated Retention index (Adams, 2007; El-Sayed, 2016; NIST, 2011).

^c Retention index calculated from data obtained by sampling of saturated n-alkanes (C7-C40).

^d Compounds with relative areas >2% were identified. ^e Unidentified compound.

