

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

LUIZA ALVES MENDES

PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium guajava* L. EM ANÁLISE SAZONAL E EFEITO LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

ALEGRE - ES

2017

LUIZA ALVES MENDES

PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium guajava* L. EM ANÁLISE SAZONAL E EFEITO LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

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

Orientador: Prof.^a Dr^a. Marcia Flores da Silva Ferreira.

ALEGRE - ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M538p Mendes, Luiza Alves, 1992-
Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Psidium guajava* L. em análise sazonal e efeito larvicida em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) / Luiza Alves Mendes. – 2017.
105f. : il.

Orientador: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadores: Adésio Ferreira ; Luciano Menini ; Tércio da Silva de Souza.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Goiaba. 2. Óleos essenciais. 3. Pragas – Controle biológico. 4. Genótipo. 5. Sesquiterpenos. 6. Atividade larvicida. I. Ferreira, Marcia Flores da Silva. II. Ferreira, Adésio. III. Menini, Luciano. IV. Souza, Tércio da Silva de. V. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. VI. Título.

CDU: 63

LUIZA ALVES MENDES

PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium guajava* L. EM ANÁLISE SAZONAL E EFEITO LARVICIDA EM *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

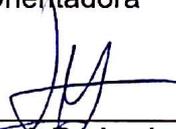
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas. Orientador: Prof.^a Dr.^a Marcia Flores da Silva Ferreira.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



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



Prof. Dr. Tércio da Silva de Souza
Instituto Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof.^a Dr.^a Patrícia Fontes Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro externo ao PPGPV



Dr.^a Débora Ferreira Melo Fragoso
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno ao PPGPV

A Simone, Romulo, Tawan e Felipe, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por poder confiar e descansar Nele, sabendo que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus (Rm 8:28);

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal;

A Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto Federal do Espírito Santo;

A CAPES pela bolsa;

A FAPES pelo apoio financeiro deste trabalho;

À prof.^a Dr.^a. Marcia Flores da Silva Ferreira, pela orientação, dedicação, disponibilidade, incentivo, paciência, oportunidade e amizade;

Ao prof. Dr. Adésio Ferreira, pela oportunidade de realizar este mestrado, pelos auxílios e incentivo;

Ao prof. Dr. Tércio da Silva de Souza, por ter realizado um trabalho tão grande com óleos essenciais e ter me permitido dar continuidade, por me encorajar sendo um químico no Programa de Produção Vegetal e pelos auxílios;

Ao prof. Dr. Luciano Menini, pelos muitos auxílios prestados, pela disponibilidade e dedicação;

À prof.^a Dr.^a. Patrícia Fontes Pinheiro, pelos muitos auxílios prestados, pelo incentivo, disponibilidade, paciência e amizade;

À Dr.^a. Débora Ferreira Melo Fragoso, por ter aceitado o convite de compor a banca e pela disponibilidade em ajudar;

À vigilância sanitária e ambiental de Alegre e Jerônimo Monteiro. Aos moradores dessas cidades que abriram suas casas para a coleta dos ovos de *Aedes* durante todo o ano de 2015. A João Carlos e Monica pelos auxílios;

Aos amigos José Henrique, Lidiane e José Romário, pelos auxílios estatísticos;

Aos colegas Wilson, Hudson e Wagner; e aos professores Dr. Gustavo Ferreira Martins e Dr. Eugênio Eduardo de Oliveira, que muito me auxiliaram no experimento na UFV;

Aos amigos do laboratório, Ana Beatriz, Carol, Ramon, Amélia, Cintia, Iana, Clemilton, Marina, Liana, Drielli e Paula, pelo incentivo e auxílios, que possibilitaram a realização deste trabalho. Em especial, à amiga Luina, que muito me auxiliou

durante todo o mestrado, pela companhia em quase todas as disciplinas, pelas conversas e amizade;

A Letícia, pelos auxílios no laboratório e amizade;

À minha família, em especial à minha mãe Simone (em memória), por me ensinar a ter Deus acima de todas as coisas, pelo amor incondicional, pelo incentivo a estudar e outros tantos ensinamentos. Ao meu pai Romulo, pelo amor, cuidado, apoio, incentivo e ensinamentos. Ao meu noivo e amigo Nicholas Tawan, pelo amor, paciência, apoio e por muito me ajudar na realização deste trabalho. A meu irmão Felipe e cunhada Marianna, pelo amor e incentivo. Às minhas avós Evanilde e Idalina (em memória), pelo amor e orações. Aos meus sogros Paulo e Miriam, pelo incentivo. A Gerusa pelo incentivo;

Às amigas, em especial a Mariana, Thalita, Thays, Larissa, Marcele, Luiza, Alessandra, Paloma e Patrícia, por fazerem parte da minha vida, pelo amor e incentivo;

Aos membros e amigos da Igreja Presbiteriana Central de Cachoeiro, pelas orações e incentivos;

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Goiabeiras e óleos essenciais.....	19
3.2. Variabilidade da composição química dos óleos essenciais.....	21
3.3. Efeito larvicida dos óleos essenciais de Myrtaceae.....	24
CAPÍTULO 1. Alterações no perfil cromatográfico de óleos essenciais de <i>Psidium guajava</i> L. em análise sazonal.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas de 21 genótipos de <i>P. guajava</i>	30
2.2. Caracterização física dos óleos essenciais e obtenção de dados climáticos do experimento.....	31
2.3. Perfil cromatográfico de óleos essenciais.....	32
2.4. Análise estatística dos dados.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1. Propriedades físicas dos óleos essenciais.....	34
3.2. Composição química dos óleos essenciais.....	35
3.3. Sazonalidade.....	39
4. CONCLUSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS.....	49
6. APÊNDICE.....	54
CAPÍTULO 2. Efeito larvicida de óleos essenciais de cultivares de goiabeiras frente ao <i>Aedes aegypti</i>	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74

2.1.	Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas de cinco cultivares de <i>P. guajava</i>	74
2.2.	Determinação do rendimento da extração dos óleos essenciais.....	75
2.3.	Perfil cromatográfico de óleos essenciais.....	75
2.4.	Ação larvicida dos óleos essenciais em larvas de <i>A. aegypti</i>	77
2.5.	Análise estatística dos dados.....	78
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1.	Rendimento dos óleos essenciais.....	78
3.2.	Atividade larvicida.....	79
3.3.	Composição química dos óleos essenciais.....	83
4.	CONCLUSÃO.....	87
5.	REFERÊNCIAS.....	88
6.	APÊNDICE.....	94
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	95
5.	REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

A goiabeira (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) apresenta, dentre seus usos relevantes, atividades biológicas relacionadas a compostos ativos na planta, com destaque ao óleo essencial presente na folha, alvo deste estudo tanto por alterações sazonais no perfil cromatográfico, quanto por efeito larvicida. Os óleos essenciais extraídos das folhas de 21 genótipos de *P. guajava*, obtidos sazonalmente nos anos de 2015 e 2016, foram analisados utilizando GC-FID e GC-MS. No total foram identificados 35 compostos. Variações quali e semiquantitativas nos óleos essenciais foram observadas ao comparar os diferentes genótipos, bem como os mesmos genótipos nas estações do ano. De forma geral, os genótipos apresentaram predominância de sesquiterpenos, com área relativa acima de 70%. A primavera foi a estação que mais diferiu das demais, com redução de sesquiterpenos hidrogenados e aumento de oxigenados. Quando se observa os fatores fenológicos, como a floração, a redução de compostos como o (E)-Caryophyllene e α -Humulene nos óleos essenciais das folhas de todos os genótipos estudados, se apresenta como uma possível influência dessa época. Por outro lado, recentemente os óleos essenciais de *P. guajava* demonstraram atividade larvicida promissora em larvas de *Aedes aegypti*. Os óleos essenciais das cultivares SEC, C4, C6, PAL e PET foram avaliados quanto ao efeito larvicida sendo eficientes, com CL_{50} que variam de 39,48 a 64,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. SEC apresentou-se como a cultivar mais promissora, pois além de ter menor valor de CL_{50} , teve maior rendimento de extração, que variou de 0,15 a 0,37% para as cinco cultivares. Assim, a utilização dos óleos essenciais, além de ser mais uma alternativa ao controle de um inseto vetor de doenças, pode gerar novas fontes de recursos aos produtores de goiaba, uma vez que na condução da cultura grande quantidade de matéria vegetal é gerada em decorrência das sucessivas podas para a produção.

Palavras-chave: Goiabeiras; metabólitos secundários; genótipos; sesquiterpenos; atividade larvicida.

ABSTRACT

The guava tree (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) presents, among its relevant uses, biological activities related to active compounds in the plant, with emphasis on the essential oil present in the leaf, target of this study by both seasonal changes in the chromatographic profile and larvicidal effect. The essential oils extracted from leaves of 21 *P. guajava* genotypes, obtained seasonally in the years 2015 and 2016, were analyzed using GC-FID and GC-MS. In total, 35 compounds were identified. Qualitative and semi-quantitative variations in essential oils were observed when comparing the different genotypes, as well as the same genotypes in the seasons. In general, genotypes showed a predominance of sesquiterpenes, with a relative area above 70%. Spring was the season that most differed from the others, with reduction of hydrogenated sesquiterpenes and increase of oxygenates. When phenological factors are observed, such as flowering, the reduction of compounds such as (E)-Caryophyllene and α -Humulene in leaf essential oils of all genotypes studied is a possible influence of this time. On the other hand, *P. guajava* essential oils have recently shown promising larvicidal activity in *Aedes aegypti* larvae. The essential oils of the cultivars SEC, C4, C6, PAL and PET were evaluated for the larvicidal effect being efficient, with LC_{50} ranging from 39.48 to 64.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. SEC presented the most promising cultivar, because in addition to having a lower value of LC_{50} , it had a higher extraction yield, which varied from 0.15 to 0.37% for the five cultivars. Thus, the use of essential oils, in addition to being an alternative to the control of an insect vectors of diseases, can generate new sources of resources to guava producers, since in the conduction of the crop a large amount of vegetal matter is generated as a result of successive prunings for production.

Keywords: Guava trees; secondary metabolites; genotypes; sesquiterpenes; larvicidal activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A. aegypti – *Aedes aegypti*
 Abr – Abril
 Ago – Agosto
 ANOVA – Análise de variância
 A_{rel} – Área relativa dos compostos
 CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 CCAE – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias
 CCENS – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde
 CL_{50} – Concentração Letal média para matar 50% da população
 CL_{90} – Concentração Letal média para matar 90% da população
 $cm.seg^{-1}$ – Velocidade linear em centímetro por segundo
 C1 – Cortibel LG
 C2 – Cortibel LM
 C3, C5, C7, C9, C10, C11, C12, C13, C16, C17 – Cortibel 3, 5, 7, 9-13, 16, 17
 C4 – Cortibel Branca LG
 C6 – Cortibel RM
 C8 – Cortibel Branca RM
 C14 – Cortibel RG
 C15 – Cortibel SLG
 DBC – Delineamento em Blocos Casualizados
 Dez – Dezembro
 DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
 DMA – Dimetilacetamida
 DMAPP – Dimetilalil difosfato
 DMSO – Dimetilsulfóxido
 EP – Erro padrão
 eV – Elétron-volt
 FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
 FPP – Farnesil difosfato
 Fev – Fevereiro
 $g.cm^{-3}$ – Densidade em grama por centímetro cúbico
 GC-FID – Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama
 GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
 GGPP – Geranilgeranil difosfato
 GPP – Geranil difosfato
 H_2 – Hidrogênio
 He – Hélio
 I – Inverno
 IC – Intervalo de Confiança
 IFES – Instituto Federal do Espírito Santo
 IK_{cal} – Índice de Kovats calculado
 IK_{tab} – Índice de Kovats tabelado
 INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
 IPP – Isopentenil difosfato
 Jan – Janeiro
 Jun – Junho
 Jul – Julho

L4 – Larvas de 4^o instar
Mai – Maio
Mar – Março
MH – Monoterpeno Hidrogenado
mL.min⁻¹ – Fluxo do gás em mililitro por minuto
MO – Monoterpeno Oxigenado
mol – Quantidade de substância que corresponde a aproximadamente $6,022 \times 10^{23}$ moléculas
mol.L⁻¹ – Concentração em mol por litro
m/z – Relação massa/carga
n – Numeração dos compostos ou número de larvas utilizadas
NIST – National Institute of Standards and Technology
Nov – Novembro
O – Outono
OPP – Oxigênio ligado a pirofosfato
Out – Outubro
p – Probabilidade
P – Primavera
P (mm) – Precipitação em milímetro
P. guajava – *Psidium guajava*
PAL – Paluma
PET – Petri
PS – Pedro Sato
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
SEC – Século XXI
Set – Setembro
SH – Sesquiterpeno Hidrogenado
SO – Sesquiterpeno Oxigenado
T_{máx} – Temperatura máxima
T_{méd} – Temperatura média
T_{mín} – Temperatura mínima
TR – Tempo de Retenção
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
UFV – Universidade Federal de Viçosa
UPGMA – Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages
V – Verão
°C.min⁻¹ – Programação de temperatura em grau Celsius por minuto
η – Índice de refração
μV – Intensidade dos picos em microvolt
% m.m⁻¹ – Percentual massa/massa
% v.v⁻¹ – Percentual volume/volume
χ² – Qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. Alterações no perfil cromatográfico de óleos essenciais de *Psidium guajava* L. em análise sazonal.

Tabela 1. Densidade e índice de refração dos óleos essenciais de 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i>	35
Tabela 2. Identificação dos compostos majoritários (>10%) dos óleos essenciais de folhas de <i>Psidium guajava</i>	38
Tabela 3. Índices de coincidência (%) dos grupos de genótipos formados pelos dendrogramas.....	47
APÊNDICE A - Composição química em percentual de área relativa de 35 compostos identificados nos óleos essenciais das folhas de 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i> obtidos sazonalmente, considerando teores maiores que 1%.....	54

CAPÍTULO 2. Efeito larvicida de óleos essenciais de cultivares brasileiras de goiabeiras em *Aedes aegypti* L.

Tabela 1. Toxicidade dos óleos essenciais de cultivares de <i>Psidium guajava</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	80
Tabela 2. Identificação química e área relativa (%) dos compostos presentes nos óleos essenciais de cinco cultivares de <i>Psidium guajava</i>	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de síntese de terpenos em plantas.....	20
CAPÍTULO 1. Alterações no perfil cromatográfico de óleos essenciais de <i>Psidium guajava</i> L. em análise sazonal.	
Figura 1. Estruturas químicas dos 35 compostos identificados nos óleos essenciais de 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i>	36
Figura 2a. Média das áreas relativas das classes terpênicas [Monoterpeno hidrogenado (MH), Monoterpeno oxigenado (MO), Sesquiterpeno hidrogenado (SH) e Sesquiterpeno oxigenado (SO)] em relação às estações do ano. Letras iguais em barras de mesma classe terpênica não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$	40
Figura 2b. Heatmap e dendrograma considerando as estações do ano e os 35 compostos identificados nos óleos essenciais de <i>Psidium guajava</i> . A escala representa a somatória das áreas relativas (%) dos compostos em cada estação.....	40
Figura 2c. Dados de temperatura e precipitação acumulada do município de Alegre-ES nos meses de março de 2015 a março de 2016. *Mês de coleta das folhas.....	40
Figura 3. Variações dos compostos (a) (E)-Caryophyllene e (b) α -Humulene nos óleos essenciais de 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i> . Estações do ano: Outono (O), Inverno (I), Primavera (P) e Verão (V).....	43
Figura 4. Rotas biossintéticas propostas para os principais sesquiterpenos identificados em espécies de Myrtaceae.....	43
Figura 5. Heatmap com as áreas relativas dos 35 compostos em relação aos 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i> nas estações (a) Outono, (b) Inverno, (c) Primavera e (d) Verão, com seus respectivos agrupamentos. Diferentes cores nas barras representam os grupos formados para cada estação do ano e as escalas representam a área relativa (%) dos compostos.....	45
Figura 6. Média das áreas relativas dos compostos majoritários (>10%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Psidium guajava</i> , considerando as quatro estações do ano. Letras iguais em gráficos do mesmo composto não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$	48
APÊNDICE B - Cromatogramas (GC-FID) dos óleos essenciais de 21 genótipos de <i>Psidium guajava</i> nas quatro estações do ano.....	63

CAPÍTULO 2. Efeito larvicida de óleos essenciais de cultivares brasileiras de goiabeiras em *Aedes aegypti* L.

Figura 1. Curvas de mortalidade das larvas após 24h de exposição aos óleos essenciais das cultivares: Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4) e

Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET). Os pontos marcados em preto demonstram os valores de CL_{50} = Concentração Letal média para matar 50% da população (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....	82
Figura 2. Área relativa das classes terpênicas em relação às cultivares Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET). Monoterpeno hidrogenado (MH), Monoterpeno oxigenado (MO), Sesquiterpeno hidrogenado (SH) e Sesquiterpeno oxigenado (SO).....	84
Figura 3. Estruturas químicas dos 29 compostos identificados em cinco cultivares de <i>Psidium guajava</i>	85
APÊNDICE - Curvas de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> e respectivos intervalos de confiança à 95%. Cultivares: Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET).....	94

1. INTRODUÇÃO GERAL

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) pertence à família Myrtaceae e se destaca pela riqueza de espécies em grande parte das formações vegetais do Brasil (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014). A família compreende cerca de 132 gêneros e 5671 espécies (GOVAERTS et al., 2008) que se distribuem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (THORNHILL et al., 2015). Atualmente o Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de goiaba (BATISTA et al., 2015).

Além do grande valor nutritivo da fruta, *P. guajava* pode ser considerada um eficiente agente terapêutico obtido da natureza. Desde 1986, essa espécie está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que confirma a potencialidade da espécie como planta medicinal devido à sua comprovação fitoterápica (AMARAL et al., 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O efeito medicinal da *P. guajava* vem sendo atribuído aos compostos biologicamente ativos presentes na planta. A folha possui óleo essencial, constituído predominantemente por mono e sesquiterpenos, além de flavonoides, álcoois sesquiterpenoides, ácidos triterpenoides e taninos (IHA et al., 2008). Destaque é dado ao óleo essencial, por ser alvo deste estudo, possuir importância ambiental, auxiliando na proteção das plantas (MOORE et al., 2013) e despertar interesse em estudar os seus compostos químicos, responsáveis pelas ações biológicas e fitoterápicas (BARDAWEEL et al., 2015; NAPOLI et al., 2015, TEIXEIRA, 2009).

A variabilidade quimiotípica dos óleos essenciais em genótipos distintos de *P. guajava* foi demonstrada recentemente pelo nosso grupo de pesquisa, bem como foi verificada a alta quantidade de sesquiterpenos nos óleos extraídos de folhas de plantas, sob condição de cultivo (SOUZA et al., 2017). Entretanto, ainda não há informações sobre a existência de variabilidade quali e semiquantitativa do óleo essencial em decorrência da época do ano. Nesse sentido, a avaliação dos óleos essenciais obtidos das folhas de 21 genótipos de goiabeiras, nas estações do ano, pode auxiliar na definição da melhor época em realizar a coleta, a fim de obter os óleos em momentos de maior concentração do princípio ativo.

Visando estudar os perfis químicos dos óleos e de aplicá-los de forma eficiente, os óleos essenciais das folhas da goiabeira demonstraram atividade larvicida promissora em larvas do vetor *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (LIMA et al., 2011), porém, sem a indicação do genótipo utilizado. Dado que as diferentes variedades de *P. guajava* apresentam óleos essenciais com variações significativas na composição (SOUZA et al., 2017), é importante o estudo do efeito larvicida considerando a cultivar utilizada para observar variações nesses efeitos e verificar a existência de cultivares mais promissoras para esse fim.

Um dos grandes e desafiadores problemas para a saúde pública tem sido combater doenças transmitidas por vetores, incluindo malária, dengue, chikungunya, leishmaniose, febre amarela, entre outras doenças. Essas podem ser transmitidas aos seres humanos por mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, que representam uma ameaça por sua capacidade de atingir milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2014).

Sendo assim, é notável a importância de se tentar controlar a propagação do *A. aegypti*. Nos últimos anos, o uso convencional de produtos químicos tem dado espaço a materiais de origem botânica. Muitos fitoquímicos de várias espécies de plantas são avaliados quanto à sua larvicida e repelente ação contra mosquitos (PEREIRA et al., 2014).

Nesse trabalho comparou-se o efeito larvicida de óleos essenciais de cinco cultivares comercialmente cultivadas, para a identificação da melhor constituição química com bioatividade em larvas da espécie *A. aegypti*. Aliado a essa aplicação, será obtido um perfil cromatográfico dos óleos de 21 genótipos a fim de estudar as influências das variações sazonais na composição química, uma vez que diferentes quimiotipos, com variações quali e semiquantitativas entre diferentes genótipos foram identificados (SOUZA et al., 2017). Este trabalho integra a caracterização de cultivares e materiais genéticos superiores de goiabeiras brasileiras, sendo um dos poucos trabalhos de estudo de óleos essenciais que consideram genótipos distintos em uma espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas de 21 genótipos de *Psidium guajava* L., sendo 11 cultivares e 10 genótipos superiores, obtidos nas quatro estações do ano.

Comparar a atividade larvicida de óleos de cinco cultivares de goiabeiras previamente selecionadas na espécie *Aedes aegypti*.

2.1. Objetivos Específicos

Identificar e quantificar os compostos químicos dos óleos essenciais através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) e Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID), em quatro estações do ano.

Estudar a variabilidade quali e semiquantitativa da composição química dos óleos essenciais.

Analisar alterações do perfil cromatográfico em relação a temperatura e pluviosidade do experimento, características de cada estação do ano.

Verificar o comportamento dos genótipos, em análise de agrupamentos, quanto a alterações quali e semiquantitativas nos perfis cromatográficos obtidos sazonalmente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Goiabeiras e óleos essenciais

A goiabeira é um arbusto ou árvore esgalhada, que pode atingir 8 m de altura. Suas folhas podem alcançar cerca de 20 cm de comprimento e possuem nervuras salientes na parte inferior (RAVI; DIVYASHREE, 2014). Suas flores são hermafroditas e geralmente brancas (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). Seu fruto é uma baga que consiste em um pericarpo, uma polpa com pequenas e numerosas sementes e uma casca fina e verde, que pode se tornar amarela quando bem madura. Popularmente, os tipos mais comuns de goiaba são a vermelha e a branca (ESCRIG et al., 2001; IHA et al., 2008).

A goiaba pode ser consumida ao natural ou ser utilizada na produção de geleias, sucos, doces e vinhos (IHA et al., 2008). Sua polpa possui atividades biológicas e farmacológicas, dentre as quais: antioxidante (MELO et al., 2008) e antimicrobiana (IHA et al., 2008). Por outro lado, as folhas podem ser utilizadas de maneira mais comum na forma de extratos, infusões ou ainda o óleo essencial extraído. As ações de componentes da folha têm revelado ação bactericida, antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002; VUUREN; NKWANYANA; WET, 2015), antifúngica (ALVES et al., 2006), anti-inflamatória (SIANI et al., 2013), antimutagênica e anticarcinogênica (TEIXEIRA et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que as folhas também podem ser indicadas para combater cólicas associadas à diarreia e disenteria (BIRDI; BRIJESH; DASWANI, 2014).

Destaque é dado ao óleo essencial, por ser alvo deste estudo, possuir importância ambiental, auxiliando na proteção das plantas (MOORE et al., 2013) e despertar interesse em estudar os seus compostos químicos, responsáveis pelas ações biológicas e fitoterápicas (BARDAWEEL et al., 2015; NAPOLI et al., 2015, TEIXEIRA, 2009).

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes por moléculas de natureza terpênica. Além disso, constituem um tipo de metabólito secundário de plantas e possuem grande importância econômica, com inúmeras aplicações

principalmente nos setores alimentícios, farmacêuticos e de perfumaria (SALGADO, 2001).

Os principais compostos presentes nos óleos essenciais de folhas de goiabeira, os mono e sesquiterpenos, possuem origem biossintética a partir de unidades de isopreno (C5) (BANDEIRA et al., 2011). Os esqueletos dos terpenoides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas, como o isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) (Figura 1) (ARRAIS, 2012).

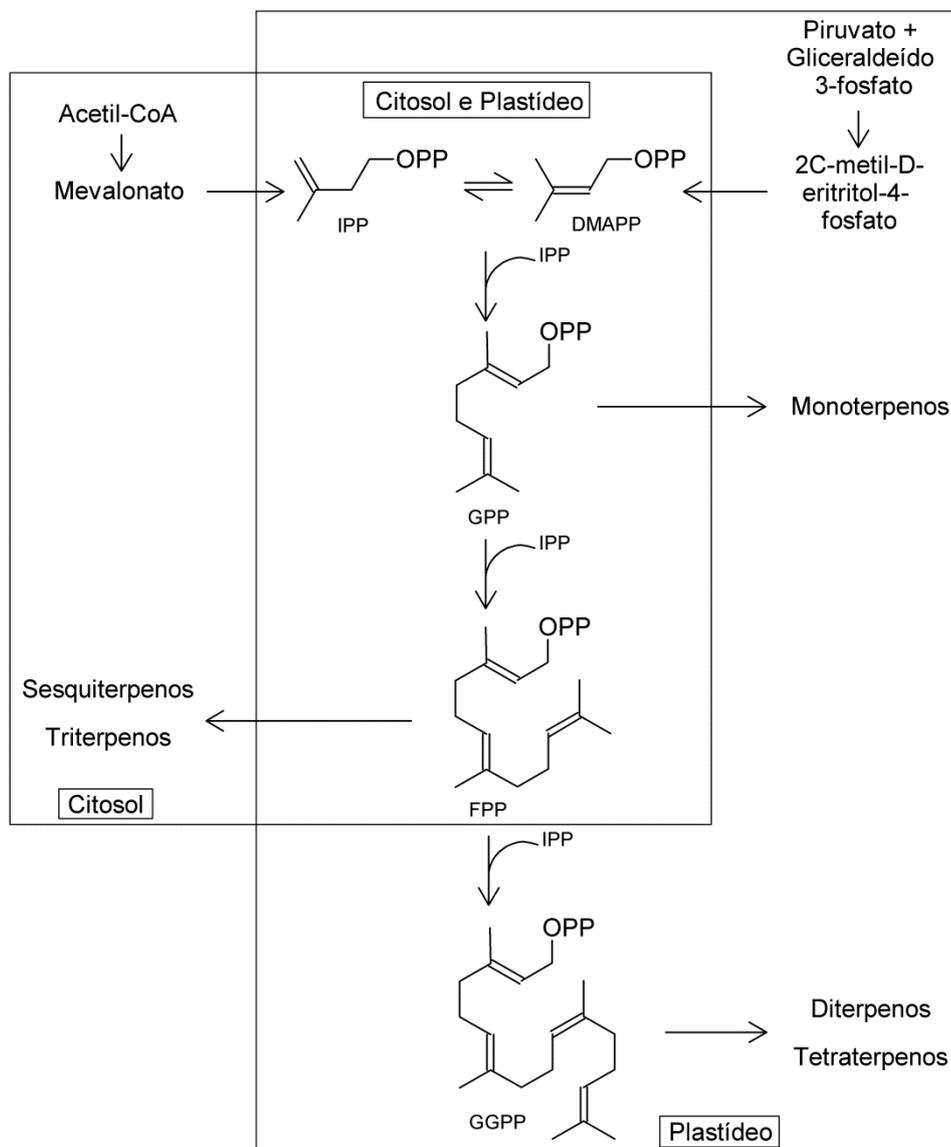


Figura 1. Via de síntese de terpenos em plantas.

Fonte: CANAL, 2016 (Adaptado de TRAPP; CROTEAU, 2001).

A partir de uma série de reações subsequentes são obtidos como produtos finais o IPP e o DMAPP. Esses podem se condensar dando origem ao geranyl difosfato (GPP), que possui 10 carbonos e é precursor da síntese dos monoterpenos (C10). Através do GPP, novas condensações com essas unidades isoprênicas podem ocorrer dando origem ao farnesil difosfato (FPP), que possui 15 carbonos e será um precursor dos sesquiterpenos (C15) (HARADA, MISAWA, 2009). A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), que contém 20 carbonos e é precursor dos diterpenos (C20). Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (Figura 1) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

3.2. Variabilidade da composição química dos óleos essenciais

Nos óleos essenciais das folhas de *Psidium guajava* e de outras espécies da família Myrtaceae, o (E)-Caryophyllene é muito encontrado (MENDES et al., 2017; PADOVAN et al., 2014). Esse composto apresenta atividade farmacológica como anti-inflamatório (GALDINO et al., 2012), anticarcinogênico, antioxidante (DAHAM et al., 2015; KUBO et al., 1996) e anestésico local (GHELARDINI et al., 2001). Ainda possui atividade biológica, sendo relatado como inseticida (SILVA et al., 2015), bactericida, fungicida (PICHETTE et al., 2006; SELESTINO NETA et al., 2016) e atrator de polinizadores (KNUDSEN et al., 2006). A importância do (E)-Caryophyllene desperta interesse comercial, porém as variações intraespecíficas e sazonais nos teores encontrados dificultam a obtenção desse composto em concentração constante através dos óleos essenciais de plantas (ALMEIDA et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

O teor e a composição química dos óleos essenciais são determinados por caracteres genéticos, mas diferentes fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários (MORAIS; CASTANHA, 2012). Dentre os quais, destacam-se: idade e estágio de desenvolvimento da cultivar, disponibilidade de nutrientes no solo, fatores abióticos, bem como técnicas de colheita considerando época e horário de coleta (MORAIS, 2009).

Considerando todas essas causas de variações nos óleos essenciais de *P. guajava*, é possível encontrar diferentes perfis cromatográficos para essa espécie. Há

estudos que mostram a presença predominante de sesquiterpenos (KAMRAN et al., 2012; KHADHRI et al., 2014; SATYAL et al., 2015), como o trabalho de Souza et al. (2017), em que esse perfil ocorreu nos 22 genótipos de goiaba estudados em pomar de cultivo para a produção, sendo que a cultivar Paluma apresentou mais de 80% de sesquiterpenos em sua composição química. Por outro lado, segundo Lima et al. (2010), o óleo essencial da mesma cultivar apresentou mais de 80% de monoterpenos. A presença majoritária de monoterpenos em óleos essenciais de goiabeiras também foi demonstrada em outros trabalhos (LIMA et al., 2011; SACCHETTI et al., 2005; SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1998; SILVA et al., 2003; SOLIMAN et al., 2016).

Assim, para a obtenção de óleos essenciais de composição constante, eles devem ser extraídos de plantas sob as mesmas condições, do mesmo órgão, que cresceram sob mesmo solo, clima e que tenham sido coletados na mesma época do ano (BAKKALI et al., 2007; CERIMELE; RINGUELET, 2008). Isso pode ser explicado pelas influências ambientais, que podem redirecionar a via metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009).

Em estudos de campo de plantas perenes, que passam por ciclos anuais de produção de frutos, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas do processo de desenvolvimento das plantas, como a floração e frutificação, devendo assim ser considerados em conjunto (LOPES; GOBBO-NETO, 2007; STEFANELLO et al., 2010). Dessa forma, nos períodos em que ocorre elevada atividade metabólica, como a floração e frutificação, a composição dos óleos pode variar significativamente em relação às outras fases (GONÇALVES, 2015; YAPI et al., 2014). Essas modificações metabólicas podem refletir tanto no rendimento das essências como na sua composição química (LOPES; GOBBO-NETO, 2007). Considerando que os metabólitos secundários atuam como compostos de defesa, dispersando insetos indesejáveis, além de serem atratores de polinizadores, devem ser produzidos em diferentes concentrações de acordo com a necessidade exigida pela planta (KNUDSEN et al., 2006; ZITO; DÖTTERL; SAJEVA, 2015).

Os fatores abióticos como temperatura, luminosidade e pluviosidade também podem gerar variabilidade na composição dos óleos essenciais. Assim, os níveis de

incidência de luz podem ter efeito nos compostos químicos presentes no óleo essencial (MEIRA; MARTINS; MANGANOTTI, 2012). A maior produção de metabólitos secundários sob altos níveis de radiação solar é explicada devido às reações biossintéticas serem dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações (TAIZ; ZEIGER, 2009). Há estudo que mostra a baixa luminosidade associada à diminuição da produção de monoterpenos (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003).

O índice pluviométrico ideal para o desenvolvimento da planta e maior produção de metabólitos secundários varia entre espécies (CARVALHO, 2013). O fator hídrico afeta significativamente o crescimento e desenvolvimento da planta como um todo. Tanto o estresse hídrico, gerado pela falta de água, quanto o excesso influenciam na fisiologia da planta, como abertura e fechamento de estômatos, a fotossíntese, o crescimento e a expansão foliar podem sofrer alterações, podendo gerar mudanças no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

A influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais foi demonstrada em algumas espécies, como *Hyptis marrubioides* (BOTREL et al., 2010), que apresentou no verão maior rendimento de óleo e no inverno maior concentração relativa (%) dos componentes majoritários. Por outro lado, o óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* coletadas no verão, apresentou rendimento menor que no outono (ANDRADE; GOMES, 2000). Outros trabalhos avaliando a influência da sazonalidade nas espécies *Myrcia salzmannii* (CERQUEIRA et al., 2009), *Hyptis marrubioides* (BOTREL et al., 2010) e *Cinnamodendron dinisii* (LOURA, 2015) mostraram variações semiquantitativas nas composições dos óleos. Nos estudos com óleos essenciais de *Mentha suaveolens* (EL-KASHOURY et al., 2012) e *Citrus aurantium* (ELLOUZE et al., 2012) verificou-se diferenças quali e semiquantitativas nas composições químicas, de acordo com a variação sazonal. Assim, a época de coleta de amostras é um fator importante, visto que a qualidade e quantidade dos constituintes dos óleos essenciais podem não ser constantes durante o ano (LOPES; GOBBO-NETO, 2007). Entretanto, esses resultados não podem ser atribuídos a um fator, mas a uma rede complexa de fatores e/ou condições ambientais (CERQUEIRA et al., 2009).

3.3. Efeito larvicida dos óleos essenciais de Myrtaceae

Com o objetivo de encontrar métodos alternativos para controlar vetores de doenças, como os mosquitos do gênero *Aedes*, diferentes estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos (WHO, 2014; WILLIAMS et al., 2014). Visando esse fim, o ideal é a prevenção à proliferação do vetor através do uso de produtos larvicidas, por ser mais fácil controlar a população do mosquito na fase larval. Como consequência, pode-se reduzir a utilização de inseticidas em geral. Produtos de origem botânica têm sido utilizados em muitas partes do mundo contra espécies de pragas de insetos, por serem menos nocivos para os organismos não alvos e devido à sua biodegradabilidade (DHARMAGADDA et al., 2005; GOVINDARAJAN et al., 2011).

A busca de larvicidas naturais eficientes ou de substâncias pesticidas com baixa toxicidade ao ambiente têm aumentado (PEREIRA et al., 2014). Nesse sentido, plantas que possuem óleos essenciais se mostram promissoras, uma vez que são, em alguns casos, letais às larvas de mosquito e economicamente viáveis (SILVA et al., 2007).

Espécies da família Myrtaceae são reconhecidas pela produção de metabólitos secundários, como os óleos essenciais (PADOVAN et al., 2014). Na literatura são relatados trabalhos mostrando a variabilidade quimiotípica dos óleos essenciais na família (MENDES et al., 2017; PADOVAN et al., 2014). Esses estudos são importantes para conhecimento das composições químicas dos óleos e entendimento dos seus efeitos biológicos. Um desses efeitos é a atividade larvicida em larvas de *Aedes aegypti*, que foi comprovada em trabalhos que estudaram espécies da família Myrtaceae, representadas com seus respectivos valores de CL₅₀ em µg.mL⁻¹, como *Psidium guajava* (24,7), *Myrcia ovata* (192,1) (LIMA et al., 2011), *Eugenia piauhiensis* (230), *Psidium myrsinites* (292) (DIAS et al., 2015), *Eugenia melanadenia* (220) e *Psidium rotundatum* (164) (AGUILERA et al., 2003). Sendo essas relatadas como produtos naturais eficientes.

Alguns trabalhos associam a atividade larvicida à maior quantidade de sesquiterpenos, sugerindo que compostos com essa classificação são os principais responsáveis pelo princípio ativo (GOIS et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010;

SANTOS et al., 2006). A atividade inseticida com outros insetos também sugere que os óleos essenciais ricos em sesquiterpenos podem ser usados como um potencial agente de combate a insetos praga (ANDRADE et al., 2004; KHANI; HEYDARIAN, 2014).

No entanto, essa teoria pode ser questionada, visto que estudos com espécies da família Myrtaceae como *Myrcia sylvatica* (ROSA et al., 2016), que apresentou óleo essencial com padrão sesquiterpênico, não exibiu potencial larvicida. Assim, a presença de um padrão sesquiterpênico não é garantia de atividade larvicida, bem como substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais nem sempre são os componentes responsáveis pelas propriedades que esses demonstram (CERIMELE; RINGUELET, 2008). Em alguns casos, a bioatividade da mistura é mais elevada do que dos compostos purificados (ROSA et al., 2016). Isto pode ser explicado pelas interações entre os constituintes presentes nos óleos e a presença de compostos minoritários, que podem ser biologicamente ativos.

CAPÍTULO 1

Alterações no perfil cromatográfico de óleos essenciais de *Psidium guajava* L. em análise sazonal

Luiza Alves Mendes¹; Luciano Menini²; Tércio da Silva de Souza²; José Henrique Soler Guilhen³; Adésio Ferreira³; Marcia Flores da Silva Ferreira^{1*}.

¹Departamento de Biologia, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCENS-UFES, 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 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.

Resumo: Os óleos essenciais das folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) apresentam variação intraespecífica na composição química. Para verificar variabilidade na composição em decorrência da variação sazonal, foram extraídos os óleos essenciais de 21 genótipos de *Psidium guajava*, obtidos sazonalmente nos anos de 2015 e 2016, e analisados utilizando GC-FID e GC-MS. No total foram identificados 35 compostos. Variações quali e semiquantitativas nos óleos essenciais foram observadas ao comparar os diferentes genótipos, bem como os mesmos genótipos nas estações do ano. De forma geral, os genótipos apresentaram predominância de sesquiterpenos, com área relativa acima de 70%. A primavera foi a estação que mais diferiu das demais, com redução de sesquiterpenos hidrogenados e aumento dos oxigenados. Para verificar se esse resultado teria sido causado por uma condição sazonal, foram obtidos dados de pluviosidade e temperaturas diárias do experimento durante as épocas de coleta das folhas de *P. guajava* e constatou-se que as variações climáticas não foram as principais influenciadoras desse resultado. Quando se observa os fatores fenológicos, como a floração, a diminuição de compostos como o (E)-Caryophyllene e α -Humulene, nos óleos essenciais das folhas de todos os genótipos estudados, se

apresenta como influência dessa época. Assim, sugere-se a hipótese que ocorre um redirecionamento da via metabólica em que compostos importantes na floração apresentam redução nas folhas em detrimento das flores.

Palavras-chave: Genótipos; goiabeiras; metabólitos secundários; sesquiterpenos; primavera.

Abstract: The essential oils of guava leaves (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) show intraspecific variation in chemical composition. The essential oils of 21 genotypes of *Psidium guajava*, obtained seasonally in the years 2015 and 2016, were analyzed using GC-FID and GC-MS to verify variability in composition due to seasonal variation. In total, 35 compounds were identified. Qualitative and semi-quantitative variations in essential oils were observed when comparing the different genotypes, as well as the same genotypes in the seasons. In general, genotypes showed a predominance of sesquiterpenes, with a relative area above 70%. Spring was the season that differed from the others, with a decrease of hydrogenated sesquiterpenes and increase of oxygenates. In order to verify if this result was caused by a seasonal condition, rainfall data and daily temperatures of the experiment were collected during *P. guajava* leaves, and it was verified that climatic variations were not the main influencers of this result. When phenological factors are observed, such as flowering, the decrease of compounds such as (E)-Caryophyllene and α -Humulene, in the essential oils of the leaves of all the genotypes studied, are presented as an influence of that time. Thus, the hypothesis is suggested that a redirection of the metabolic pathway occurs in which important compounds in the flowering present a reduction in the leaves in detriment of the flowers.

Keywords: Genotypes; guava trees; secondary metabolites; sesquiterpenes; spring.

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae destaca-se pela grande diversidade de gêneros e espécies, além da característica de produção de óleos essenciais, esses presentes nas glândulas oleíferas das plantas e produtos do metabolismo secundário (GOODGER et al., 2016; MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014; PADOVAN et al., 2014). Os óleos essenciais possuem importância ambiental, auxiliando na proteção das plantas, com funções de repelência de insetos indesejáveis e atração de insetos dispersores de pólen e sementes (MOORE et al., 2013). Também apresentam ação fitoterápica que é de interesse comercial, sendo utilizados em indústrias farmacêuticas (ALMEIDA et al., 2016).

Devido à variabilidade da composição química dos óleos essenciais dentro das espécies, a produção em escala industrial é um desafio (KESZEI et al., 2010). Essas variações, inter e intraespecíficas, são comumente relatadas na literatura e atribuídas a diferentes fatores (PADOVAN et al., 2014; SOUZA et al., 2017), entre os quais os genéticos são determinantes da composição química destes óleos nas espécies (KÜLHEIM et al., 2015). Adicionalmente, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta, a disponibilidade de nutrientes no solo, os fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, bem como as técnicas de colheita considerando época e horário de coleta, podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários (MORAIS, 2009).

Recentemente foi demonstrado que os perfis químicos dos óleos essenciais de genótipos comerciais e melhorados de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) do Brasil, são formados majoritariamente por sesquiterpenos e apresentam variação na composição (SOUZA et al., 2017). No referido trabalho verificou-se que o ambiente, em condições de cultivo de *P. guajava*, apresentou pouca influência na composição dos óleos essenciais extraídos de folhas, à exceção de um genótipo em 22 avaliados. Todavia, ainda não há informações sobre a existência de variabilidade quali e semiquantitativa dos óleos essenciais em decorrência da variação sazonal na espécie. Como a cultura da goiabeira é perene e passa por ciclos de produção de frutos anuais, os efeitos da sazonalidade devem ser considerados em conjunto com

as alterações metabólicas relacionadas aos processos de floração e frutificação (LOPES; GOBBO-NETO, 2007; STEFANELLO et al., 2010).

Fatores como a temperatura e pluviosidade, característicos de cada estação do ano, podem causar alterações na composição dos óleos essenciais, e se conhecidos podem trazer benefícios à exploração comercial desse produto (MEIRA; MARTINS; MANGANOTTI, 2012). Neste sentido, a avaliação sazonal da composição química dos óleos essenciais de genótipos comerciais de goiabeiras foi o objetivo deste estudo, constituindo um dos poucos trabalhos que consideram genótipos distintos em uma espécie. Esses resultados podem contribuir na definição de época estratégica de realização de coletas de folhas para extração de óleos essenciais, bem como auxiliam no direcionamento de seus usos pela composição química na indústria, potencializando os efeitos para o fim indicado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras vegetais foram coletadas no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, situado na latitude sul (20° 45'), longitude oeste (41° 31') e altitude de 254 metros. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal e laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES) e no laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Alegre, ES). O pomar experimental utilizado nesse estudo está localizado no município de Alegre desde julho de 2013, foi mantido sob condições naturais, sem irrigação, sombreamento e podas.

2.1. Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas de 21 genótipos de *P. guajava*

Material vegetal - Foram coletadas folhas, nas quatro estações do ano, de 21 genótipos de *P. guajava* sendo 11 cultivares: Paluma (PAL), Século XXI (SEC), Pedro Sato (PS), Petri (PET), Cortibel LG (C1), Cortibel LM (C2), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Cortibel Branca RM (C8), Cortibel RG (C14) e Cortibel SLG (C15); e 10 genótipos superiores: Cortibel 3 (C3), Cortibel 5 (C5), Cortibel 7 (C7),

Cortibel 9 (C9), Cortibel 10 (C10), Cortibel 11 (C11), Cortibel 12 (C12), Cortibel 13 (C13), Cortibel 16 (C16) e Cortibel 17 (C17). As coletas foram realizadas utilizando a mesma planta de cada genótipo às 9h da manhã em dias característicos dos meados das estações: 24/04/15 (outono), 11/08/15 (inverno), 11/11/15 (primavera) e 20/02/16 (verão). A coleta foi realizada na altura do peito (1,3 m) e ao redor do diâmetro da copa. Cerca de 100 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 Genética e Melhoramento Vegetal do CCAE-UFES. As folhas foram secas à sombra e em temperatura ambiente por uma semana. Esse processo tem, entre outros objetivos, o de reduzir tempo e custo de destilação, aumentar a estabilidade do produto, inibir atividade enzimática, que pode decompor ou modificar os princípios aromáticos originais e estabilizar cor, odor, sabor e textura (CERIMELE; RINGUELET, 2008). Posteriormente, as folhas secas 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 100 g de folhas secas 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.

2.2. Caracterização física dos óleos essenciais e obtenção de dados climáticos do experimento

Determinação da densidade e índice de refração dos óleos essenciais - Os óleos essenciais refratam a luz polarizada, propriedade que é usada para seu controle de

pureza, pois tem um índice de refração característico (CERIMELE; RINGUELET, 2008). Para medir o índice de refração (η) dos óleos, foi utilizado um refratômetro (Quimis Q767B) com quatro casas decimais. Essa medida foi realizada no laboratório de Química Aplicada do IFES a 20 °C.

A densidade dos óleos foi obtida no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do CCAE-UFES a 20 °C, através da pesagem em triplicata de um volume preciso do óleo utilizando uma micropipeta. Foi utilizada balança analítica (Shimadzu AUY220) com quatro casas decimais.

Dados climáticos - Os dados de variações climáticas durante as estações do ano foram obtidos através do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), constituindo-se de índices de pluviosidade e temperatura do município de Alegre durante os períodos de coleta das folhas.

2.3. Perfil cromatográfico de 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 $\text{fragmentos.seg}^{-1}$ 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 $^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados fluxos de 40 mL.min^{-1} e 400 mL.min^{-1} para H_2 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 H_2 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 Kovats (IK). Para o cálculo dos IK, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C_7 - C_{40} (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; EL-SAYED, 2016; 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. Análise estatística dos dados

Utilizando as densidades médias dos óleos essenciais foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparar o mesmo genótipo nas quatro estações do ano. O teste de Scott-Knott foi utilizado para comparar as

densidades dos 21 genótipos dentro de cada estação. Ambos os testes a 5% de probabilidade utilizando o Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016).

Para observar as diferenças entre as estações do ano em relação às classes terpênicas e nos compostos majoritários, foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey, a 5% de probabilidade no Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016).

Os agrupamentos foram gerados pelo método de UPGMA, utilizando dados de distância Euclidiana média padronizada. A padronização foi baseada no desvio padrão e os resultados foram apresentados em heatmap. Foi utilizado o Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016). Posteriormente foi realizado o cálculo dos índices de coincidência dos grupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Propriedades físicas dos óleos essenciais

Parâmetros físicos dos óleos como densidade e índice de refração, podem ser usados como indicadores no controle de qualidade, quando comparados a valores teóricos (CERIMELE; RINGUELET, 2008). Todos os óleos essenciais apresentaram densidade menor que a da água (aproximadamente $1,0 \text{ g.cm}^{-3}$), variando entre $0,8267$ a $0,8933 \text{ g.cm}^{-3}$. Diferenças significativas foram observadas tanto ao comparar as densidades dos óleos dos 21 genótipos em cada estação do ano, sendo essa variação maior na primavera, quanto ao considerar os genótipos individuais entre as estações. As médias das densidades nas quatro estações do ano foram cerca de $0,86 \text{ g.cm}^{-3}$. Os índices de refração variaram de $1,4900$ a $1,5005$, com média de $1,4949$ (Tabela 1), e os óleos essenciais extraídos apresentaram coloração amarelo-claro.

As densidades e os índices de refração obtidos demonstraram a boa qualidade dos óleos essenciais, corroborando com valores encontrados em trabalhos que realizaram as mesmas análises em óleos extraídos das folhas de goiabeiras (KAMRAN et al., 2012; SOUZA, 2015).

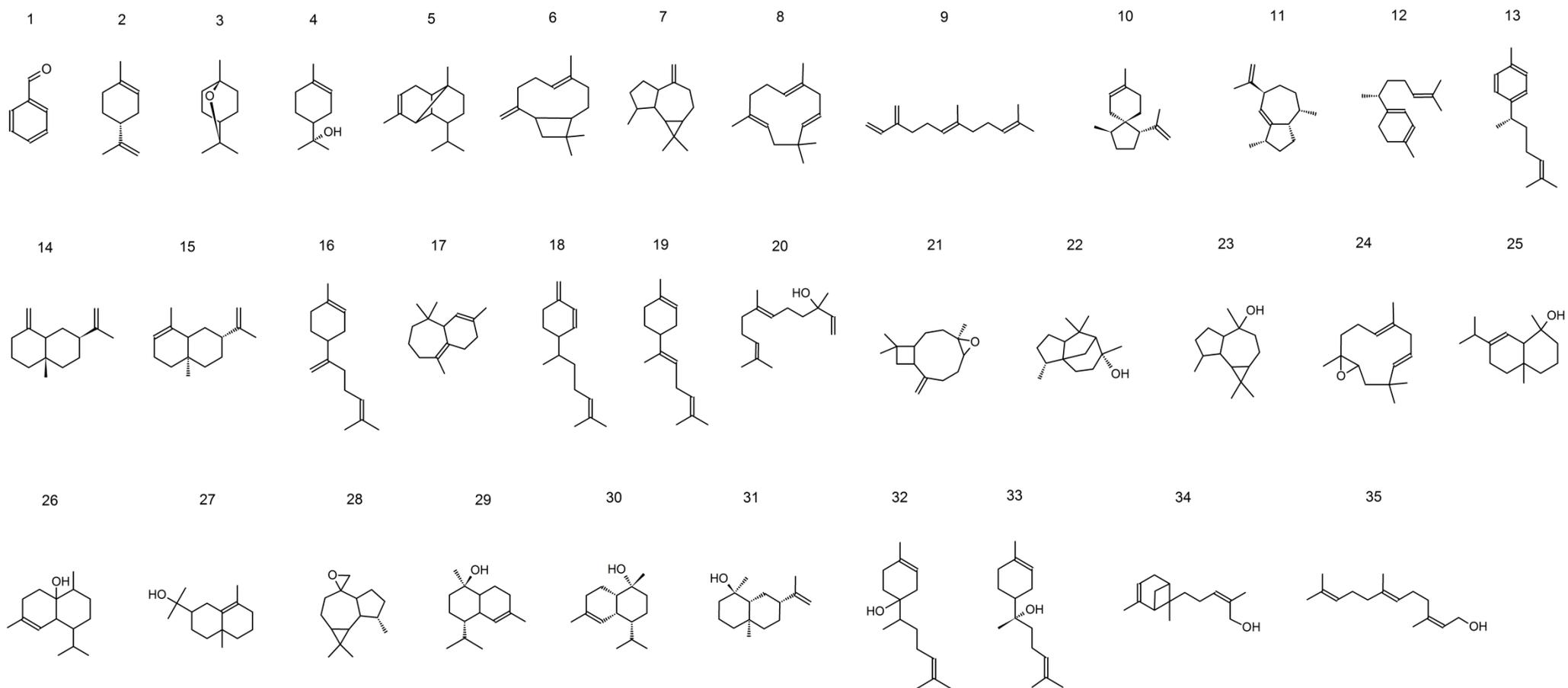
Tabela 1. Densidade e índice de refração dos óleos essenciais de 21 genótipos de *Psidium guajava*.

Genótipo*	Densidade** a 20 °C (g.cm ⁻³)				Índice de Refração 20 °C (η)
	Outono	Inverno	Primavera	Verão	
SEC	0,8767 ^{Aa}	0,8767 ^{Aa}	0,8667 ^{Ac}	0,8833 ^{Aa}	1,5005
PAL	0,8867 ^{Aa}	0,8667 ^{Ba}	0,8500 ^{BCd}	0,8400 ^{Cc}	1,4965
PS	0,8567 ^{ABb}	0,8700 ^{Aa}	0,8500 ^{Bd}	0,8533 ^{ABc}	1,4980
PET	0,8533 ^{Ab}	0,8333 ^{Bb}	0,8600 ^{Ac}	0,8667 ^{Ab}	1,5000
C1	0,8467 ^{Ac}	0,8533 ^{Ab}	0,8633 ^{Ac}	0,8467 ^{Ac}	1,4940
C2	0,8567 ^{Ab}	0,8633 ^{Aa}	0,8533 ^{Ad}	0,8700 ^{Ab}	1,4940
C3	0,8533 ^{Bb}	0,8667 ^{ABa}	0,8267 ^{Ce}	0,8767 ^{Aa}	1,4930
C4	0,8467 ^{Cc}	0,8667 ^{Ba}	0,8933 ^{Aa}	0,8900 ^{Aa}	1,4900
C5	0,8600 ^{Ab}	0,8600 ^{Aa}	0,8267 ^{Be}	0,8467 ^{Ac}	1,4935
C6	0,8567 ^{Ab}	0,8567 ^{Ab}	0,8600 ^{Ac}	0,8333 ^{Bc}	1,4940
C7	0,8600 ^{ABb}	0,8533 ^{ABb}	0,8633 ^{Ac}	0,8433 ^{Bc}	1,4980
C8	0,8667 ^{Ab}	0,8667 ^{Aa}	0,8667 ^{Ac}	0,8600 ^{Ab}	1,4930
C9	0,8633 ^{Ab}	0,8600 ^{Aa}	0,8767 ^{Ab}	0,8333 ^{Bc}	1,4910
C10	0,8433 ^{Ac}	0,8433 ^{Ab}	0,8467 ^{Ad}	0,8433 ^{Ac}	1,4930
C11	0,8567 ^{Ab}	0,8633 ^{Aa}	0,8667 ^{Ac}	0,8667 ^{Ab}	1,4975
C12	0,8433 ^{Bc}	0,8700 ^{Aa}	0,8567 ^{ABc}	0,8600 ^{ABb}	1,4910
C13	0,8567 ^{ABb}	0,8733 ^{Aa}	0,8667 ^{Ac}	0,8433 ^{Bc}	1,4930
C14	0,8533 ^{Bb}	0,8500 ^{Bb}	0,8667 ^{ABc}	0,8800 ^{Aa}	1,4950
C15	0,8500 ^{Ac}	0,8500 ^{Ab}	0,8533 ^{Ad}	0,8467 ^{Ac}	1,4945
C16	0,8833 ^{Aa}	0,8467 ^{Bb}	0,8567 ^{Bc}	0,8533 ^{Bc}	1,4945
C17	0,8467 ^{Bc}	0,8667 ^{Aa}	0,8633 ^{ABc}	0,8633 ^{ABb}	1,4990
Média	0,8579	0,8598	0,8587	0,8571	1,4949

*Genótipos de *Psidium guajava*: Século XXI (SEC), Paluma (PAL), Pedro Sato (PS), Petri (PET), Cortibel LG (C1), Cortibel LM (C2), Cortibel 3 (C3), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel 5 (C5), Cortibel RM (C6), Cortibel 7 (C7), Cortibel Branca RM (C8), Cortibel 9 (C9), Cortibel 10 (C10), Cortibel 11 (C11), Cortibel 12 (C12), Cortibel 13 (C13), Cortibel RG (C14), Cortibel SLG (C15), Cortibel 16 (C16) e Cortibel 17 (C17). **Letras maiúsculas iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ e letras minúsculas iguais entre linhas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, à $p < 0,05$.

3.2. Composição química dos óleos essenciais

A partir das análises cromatográficas, foram identificados 35 compostos nos óleos essenciais de 21 genótipos de *P. guajava*. Foram considerados os compostos com área relativa, obtida por normalização, acima de 1% (APÊNDICE A e Figura 1).



1 – Benzaldehide; 2 – Limonene; 3 – 1,8-Cineole; 4 – α -Terpineol; 5 – α -Copaene; 6 – (E)-Caryophyllene; 7 – Aromadendrene; 8 – α -Humulene; 9 – (E)-Farnesene; 10 – α -Acoradiene; 11 – γ -Gurjunene; 12 – γ -Curcumene; 13 – α -Curcumene; 14 – β -Selinene; 15 – α -Selinene; 16 – β -Bisabolene; 17 – β -Himachalene; 18 – β -Sesquiphellandrene; 19 – α -Bisabolene; 20 – (E)-Nerolidol; 21 – Caryophyllene oxide; 22 – α -Cedrol; 23 – Ledol; 24 – Humulene epoxide; 25 – Selina-6-en-4-ol; 26 – epi-Cubenol; 27 – γ -Eudesmol; 28 – Aromadendrene epoxide; 29 – τ -Cadinol; 30 – α -Muurolol; 31 – Selin-11-en-4 α -ol; 32 – β -Bisabolol; 33 – α -Bisabolol; 34 – (Z,E)- α -Bergamotol; 35 – (2Z,6E)-Farnesol. Monoterpeno hidrogenado: 2; Monoterpeno oxigenado: 3-4; Sesquiterpeno hidrogenado: 5-19; Sesquiterpeno oxigenado: 20-35.

Figura 1. Estruturas químicas dos 35 compostos identificados nos óleos essenciais de 21 genótipos de *Psidium guajava*.

Nos óleos essenciais de cada genótipo foram identificados, entre 84,9 e 100% dos compostos com área relativa acima de 1%, os quais foram classificados em mono e sesquiterpenos hidrogenados e oxigenados. Também foi identificado o Benzaldehyde, o único de natureza não terpênica. Verificou-se predominância de sesquiterpenos na composição de óleos essenciais de todos os genótipos, com área relativa acima de 70%. Perfis de óleos essenciais de *P. guajava* com mesma natureza terpênica são relatados na literatura (KAMRAN et al., 2012; KHADHRI et al., 2014, SATYAL et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Os compostos (E)-Caryophyllene e o Caryophyllene oxide foram os únicos compostos identificados em todos os genótipos e estações do ano, com quantidade variando entre 1,1 e 48,9% para o primeiro e entre 1,8 e 21,4% para o segundo, com destaque para os genótipos C10, C13, SEC, PAL e PS, que apresentaram os maiores teores de (E)-Caryophyllene (APÊNDICE A). O composto (E)-Caryophyllene, um dos mais representativos, está presente em muitos óleos essenciais de diferentes espécies, incluindo *P. guajava* (LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011; MENDES et al., 2017; PADOVAN et al., 2014; SACCHETTI et al., 2005; SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1998; SILVA et al., 2003). Esse composto apresenta atividade farmacológica como anti-inflamatório (GALDINO et al., 2012), anticarcinogênico, antioxidante (DAHAM et al., 2015; KUBO et al., 1996) e anestésico local (GHELARDINI et al., 2001). Ainda possui atividade biológica, sendo relatado como inseticida (SILVA et al., 2015), bactericida, fungicida (PICHETTE et al., 2006; SELESTINO NETA et al., 2016) e atrator de polinizadores (KNUDSEN et al., 2006).

A importância do (E)-Caryophyllene desperta interesse comercial, porém as variações nos teores encontrados dificultam a obtenção desse composto em concentração constante nos óleos essenciais de plantas (ALMEIDA et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Os compostos Aromadendrene, β -Selinene, β -Bisabolene e Humulene epoxide foram detectados em todas as estações, entretanto não em todos os genótipos.

Os 16 compostos majoritários (área relativa > 10%), presentes nos óleos essenciais, foram identificados na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação dos compostos majoritários (>10%) dos óleos essenciais de folhas de *Psidium guajava*.

Composto ^a	Variação das A _{rel} (%) ^b	TR	IK _{cal} ^c	IK _{tab} ^d	m/z (Intensidade Relativa) ^e
Limonene	<1-20,6	12,761	1028	1024	136 (21); 121 (20); 107 (21); 93 (70); 79 (30); 68 (100); 67 (71); 44 (26)
(E)-Caryophyllene	1,1-48,9	30,384	1417	1417	204 (9); 189 (14); 161 (31); 133 (75); 107 (49); 93 (100); 69 (88); 41 (95)
α-Humulene	<1-23,0	31,767	1452	1452	204 (6); 147 (22); 121 (26); 93 (100); 91 (17); 80 (34); 67 (13); 41 (22)
α-Curcumene	<1-11,9	33,099	1484	1487	202 (25); 145 (29); 132 (100); 119 (98); 105 (56); 91 (27); 55 (22); 41 (36)
β-Selinene	<1-10,9	33,197	1486	1489	204 (44); 189 (34); 161 (51); 133 (51); 105 (100); 93 (90); 79 (75); 41 (69)
α-Selinene	<1-13,8	33,571	1495	1498	204 (58); 189 (98); 161 (53); 133 (86); 107 (96); 93 (100); 81 (72); 41 (67)
β-Bisabolene	<1-13,7	34,130	1509	1505	204 (18); 161 (20); 133 (10); 119 (32); 109 (29); 93 (81); 69 (100); 41 (82)
β-Himachalene	<1-10,7	34,208	1511	1500	204 (11); 121 (22); 119 (100); 105 (37); 93(48); 91 (30); 69 (23); 41 (37)
(E)-Nerolidol	<1-18,9	36,322	1566	1561	161 (16); 136 (21); 107 (38); 93 (61); 81 (28); 71 (38); 69 (100); 41 (74)
Caryophyllene oxide	1,8-21,4	36,940	1582	1582	161 (20); 135 (18); 109 (51); 93 (72); 79 (76); 69 (66); 55 (43); 43 (100)
Humulene epoxide	<1-11,5	37,987	1608	1608	138 (70); 123 (31); 109 (99); 96 (88); 96 (88); 81 (46); 67 (91); 43 (100)
γ-Eudesmol	<1-17,1	38,833	1632	1630	204 (53); 189 (29); 161 (100); 149 (29); 119 (49); 93 (66); 81 (96); 41 (67)
Aromadendrene epoxide	<1-20,2	39,068	1639	1639	161 (23); 136 (100); 109 (27); 91 (45); 79 (41); 69 (51); 55 (30); 41 (76)
τ-Cadinol	<1-12,8	39,230	1643	1640	204 (41); 189 (12); 161 (100); 134 (18); 121 (32); 95 (45); 81 (33); 43 (55)
Selin-11-en-4α-ol	<1-24,5	39,768	1658	1658	204 (43); 189 (30); 161 (36); 135 (58); 109 (45); 95 (53); 81 (78); 43 (100)
β-Bisabolol	<1-28,1	40,325	1673	1674	204 (17); 161 (10); 119 (44); 111 (46); 93 (68); 82 (100); 69 (52); 41 (67)

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bA_{rel} (Áreas relativas dos compostos). ^cÍndice de Kovats calculado através de dados obtidos por amostra de n-alcanos saturados (C₇-C₄₀). ^dÍndice de Kovats tabelado (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2016; NIST, 2011). ^eDados utilizados das espectrotecas Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s. TR (Tempo de Retenção – minutos); m/z (Relação massa/carga).

A maioria dos compostos majoritários detectados nos óleos dos 21 genótipos, como o Limonene, (E)-Caryophyllene, α -Humulene, α -Curcumene, β -Selinene, α -Selinene, β -Bisabolene, (E)-Nerolidol, Caryophyllene oxide, Humulene epoxide, Selin-11-en-4 α -ol e β -Bisabolol, também são relatados em diferentes trabalhos com óleos essenciais de *P. guajava* (KAMRAN et al., 2012; KHADHRI et al., 2014; LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011; SACCHETTI et al., 2005; SANTOS; RAO; SATYAL et al., 2015; SILVEIRA, 1998; SILVA et al., 2003; SOLIMAN et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Dentre esses, o composto β -Bisabolol destacou-se como um majoritário representativo na composição dos óleos essenciais da maioria dos genótipos Cortibel, à exceção de C7, C10, C11, C13 e C17. As mesmas variações do β -Bisabolol ocorreram em outro trabalho que avaliou os mesmos genótipos nos óleos essenciais de *P. guajava* em ambientes diferentes (SOUZA et al., 2017).

Diferentes perfis cromatográficos entre os óleos essenciais dos 21 genótipos (APÊNDICE B) foram identificados, com variações quali e semiquantitativas entre os genótipos, corroborando com o trabalho de Souza et al. (2017). Quanto à comparação dos óleos dos mesmos genótipos em função da sazonalidade, observou-se variações quali e semiquantitativas nas composições durante as estações do ano, sendo as diferenças qualitativas entre as estações menos relevantes, haja vista que ocorreram em genótipos que apresentaram compostos com menor área relativa, como o 1,8-Cineole, α -Humulene, α -Bisabolene, Aromadendrene epoxide, α -Bisabolol, entre outros.

3.3. Sazonalidade

De forma geral, o perfil químico dos óleos variou consideravelmente em decorrência da época de coleta das folhas (Figura 2a). Por meio da média das áreas relativas das classes terpênicas em cada estação, na primavera e verão foram observados maiores teores monoterpênicos oxigenados, enquanto os hidrogenados não apresentaram variação significativa entre as estações. Para a classe dos sesquiterpênicos, os mais representativos nos óleos essenciais de *P. guajava*, houve uma grande variação detectada na primavera, com redução dos hidrogenados e aumento dos oxigenados.

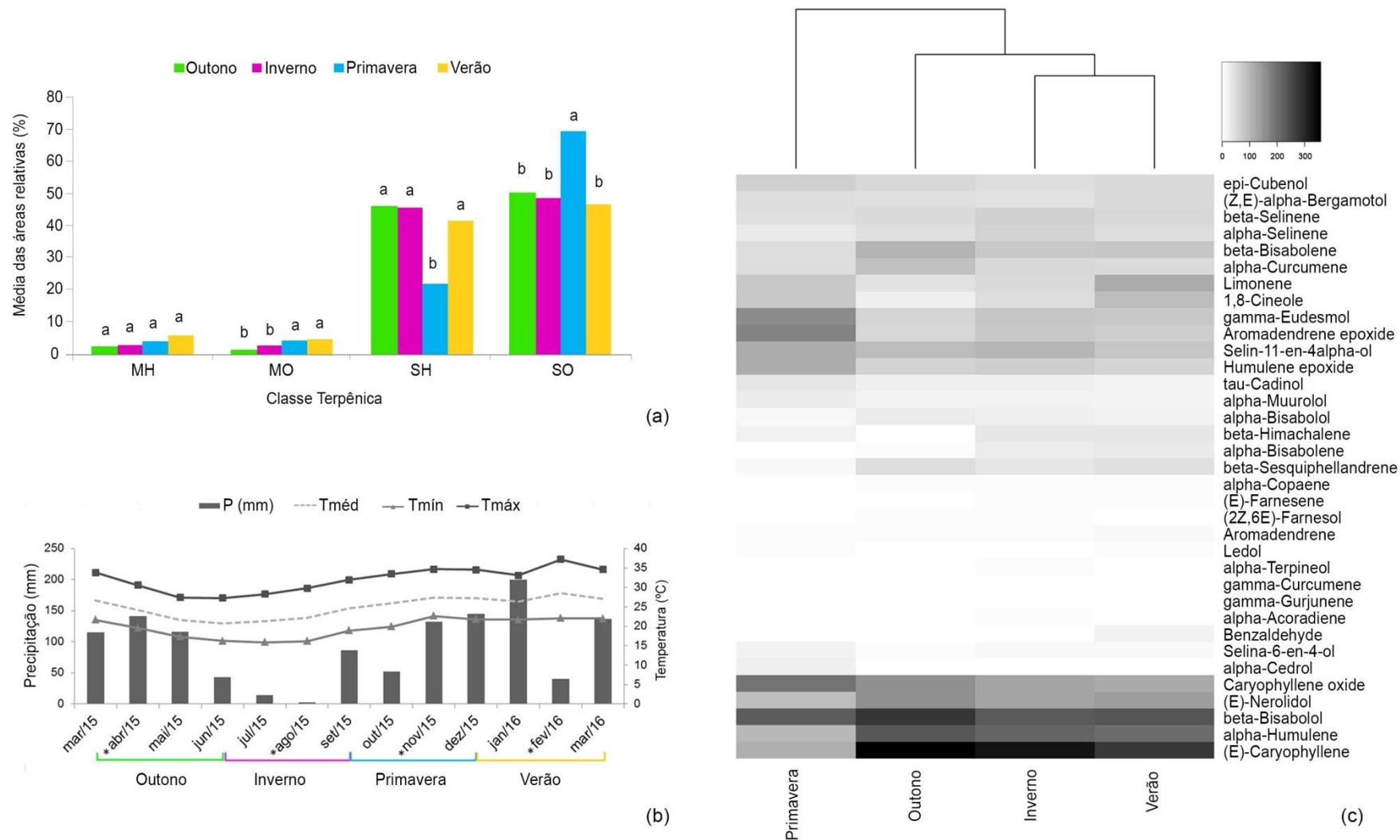


Figura 2. (a) Média das áreas relativas das classes terpênicas [Monoterpeno hidrogenado (MH), Monoterpeno oxigenado (MO), Sesquiterpeno hidrogenado (SH) e Sesquiterpeno oxigenado (SO)] em relação às estações do ano. Letras iguais em barras de mesma classe terpênic não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$. (b) Dados de temperatura e precipitação acumulada do município de Alegre-ES nos meses de março de 2015 a março de 2016. *Mês de coleta das folhas. (c) Heatmap e dendrograma considerando as estações do ano e os 35 compostos identificados nos óleos essenciais de *Psidium guajava*. A escala representa a somatória das áreas relativas (%) dos compostos em cada estação.

Ao analisar as concentrações de cada um dos 35 compostos em função das estações do ano, comportamentos similares foram observados no outono, inverno e verão, que foram agrupados, diferente da primavera (Figura 2c). Isso pode ser explicado principalmente pela redução do (E)-Caryophyllene, α -Humulene e aumento de Caryophyllene oxide, γ -Eudesmol, Aromadendrene epoxide. A fim de caracterizar as variações sazonais ocorridas nos períodos de coleta, foram obtidos dados de pluviosidade e temperaturas diárias do experimento durante 12 meses (Figura 2b). Esses valores foram tabelados de forma a totalizar a precipitação mensal acumulada e as temperaturas mínima, máxima e média do mês foram apresentadas.

As temperaturas locais variaram de 15,9 a 37,8 °C e as precipitações variaram de 2,0 a 199,6 mm, nos meses do trabalho. Por meio dos dados climáticos diários, verificou-se que os dados mensais representaram as condições nos dias próximos e nos dias das coletas das folhas. Na estação do inverno, com a coleta das folhas em agosto, foi registrado um dos menores índices de pluviosidade e temperaturas. Contudo, as diferenças relevantes na composição química dos óleos essenciais foram detectadas na primavera, porém em novembro (em plena primavera) as temperaturas foram semelhantes a fevereiro (verão) e a precipitação acumulada se assemelhou mais a abril (outono). Assim, apesar de semelhanças na precipitação e temperatura na primavera com o outono e verão, as composições químicas dos óleos essenciais diferiram. Dessa forma, não foi possível relacionar diretamente os dados climáticos durante o ano com a variação da composição química dos óleos essenciais.

Ao estudar a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais, diferentes trabalhos relatam que devem ser considerados os fatores fenológicos da planta, passando por períodos de floração e frutificação (FIGUEIREDO et al., 2008; STEFANELLO et al., 2010). Nesses trabalhos, foi possível observar que para os óleos essenciais das folhas de *Lavandula pinnata* e *Myrcia oblecta*, no período de floração, os teores dos compostos químicos se diferenciaram das demais épocas. Durante o desenvolvimento da planta, alterações metabólicas ocorrem podendo variar significativamente a composição dos óleos essenciais, em relação às outras fases (YAPI et al., 2014).

Os óleos essenciais, dentre muitas utilidades, têm função de atrair insetos polinizadores especialmente na floração, emitindo compostos voláteis para esse fim (THOLL et al., 2005). Em um trabalho realizado por Chen et al. (2003), esses compostos foram estudados em várias partes da planta *Arabidopsis thaliana*, incluindo folhas e flores, e foi observado maior quantidade de compostos como o (E)-Caryophyllene e α -Humulene nas flores do que em outras partes da planta. O mesmo ocorreu com o composto (E)-Caryophyllene nos óleos essenciais de *Myrcia myrtifolia*, com maior concentração nas flores do que em folhas e frutos (CERQUEIRA et al., 2007).

Durante este trabalho, nas plantas de *P. guajava*, mantidas em condições naturais, sem podas e irrigação, foram observados frutos durante todas as coletas com número bem maior no verão. Assim, o período da primavera coincidiu com o período de florescimento das plantas. Nessa estação, o perfil químico dos óleos essenciais das folhas de *P. guajava* de todos os genótipos apresentou redução de (E)-Caryophyllene e α -Humulene (Figura 3). Esses compostos possuem estruturas similares, apresentam proximidade de volatilidade e polaridade, sendo os primeiros sesquiterpenos a chegarem ao detector (GC-MS e GC-FID) e fazem parte da mesma rota de biossíntese (KESZEI et al., 2010) (Figura 4).

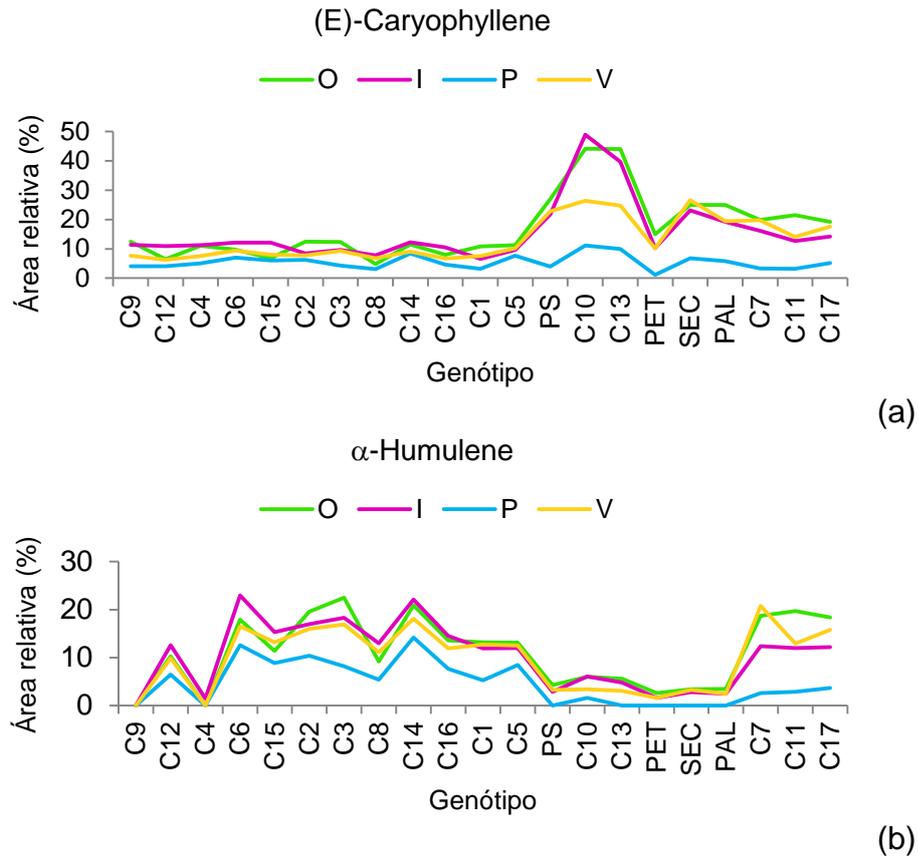


Figura 3. Variações dos compostos (a) (E)-Caryophyllene e (b) α -Humulene nos óleos essenciais de 21 genótipos de *Psidium guajava*. Estações do ano: Outono (O), Inverno (I), Primavera (P) e Verão (V). Genótipos de *Psidium guajava*: Século XXI (SEC), Paluma (PAL), Pedro Sato (PS), Petri (PET), Cortibel LG (C1), Cortibel LM (C2), Cortibel 3 (C3), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel 5 (C5), Cortibel RM (C6), Cortibel 7 (C7), Cortibel Branca RM (C8), Cortibel 9 (C9), Cortibel 10 (C10), Cortibel 11 (C11), Cortibel 12 (C12), Cortibel 13 (C13), Cortibel RG (C14), Cortibel SLG (C15), Cortibel 16 (C16) e Cortibel 17 (C17).

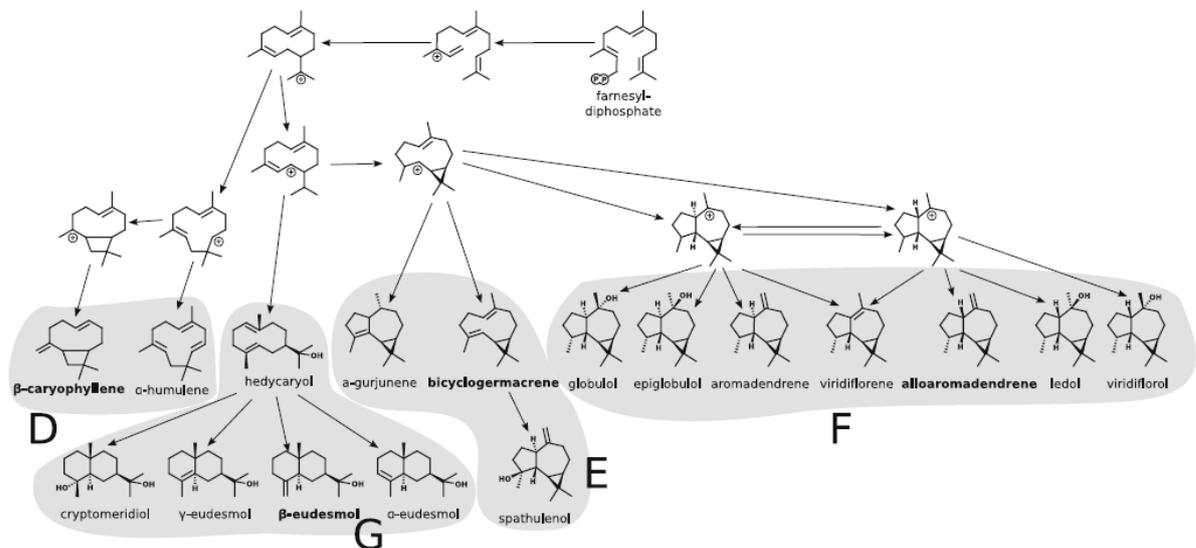


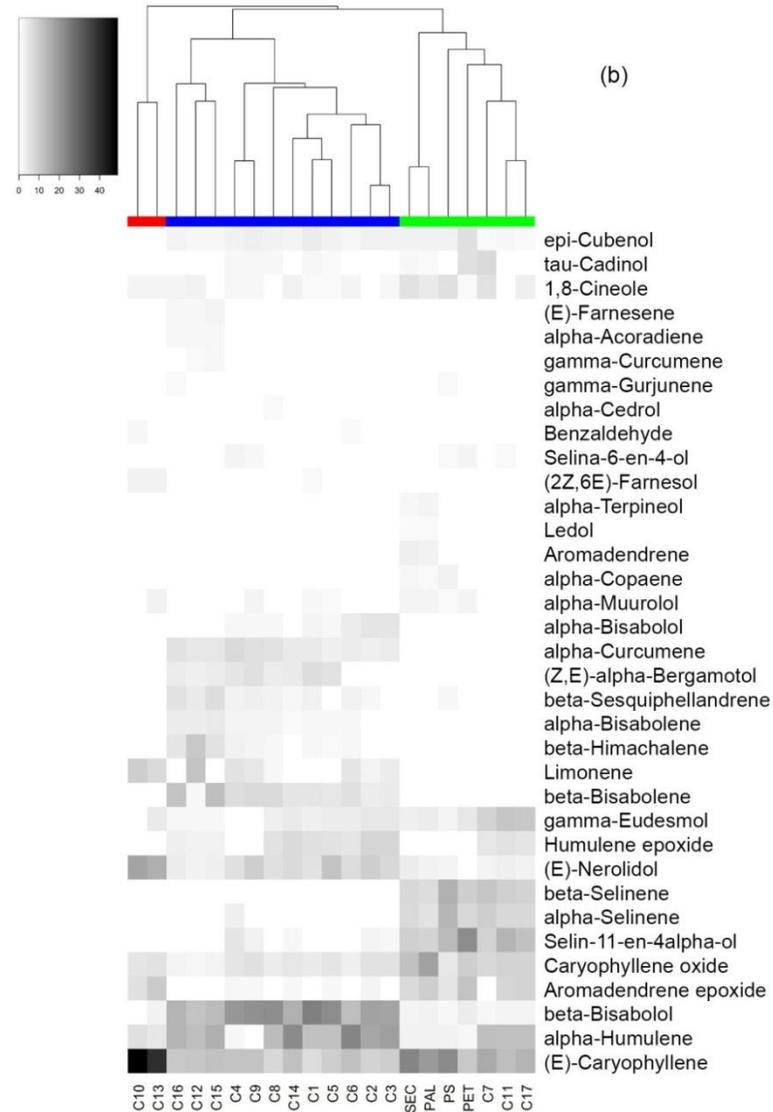
Figura 4. Rotas biossintéticas propostas para os principais sesquiterpenos identificados em espécies de Myrtaceae.

Fonte: KESZEL et al., 2010.

Ainda não se tem estudos com os compostos voláteis de diferentes partes da *P. guajava* em momento de floração. Considerando que essa espécie se comporte de forma similar ao organismo modelo, a *Arabidopsis thaliana*, sugere-se a hipótese de redução dos sesquiterpenos hidrogenados nos óleos essenciais das folhas como redirecionamento da via metabólica, de forma que alguns compostos tiveram redução na produção e aumento de outros na primavera (CHEN et al., 2003). Como os terpenos voláteis são muito importantes nas flores para atrair polinizadores, o (E)-Caryophyllene e α -Humulene devem ser produzidos principalmente nas flores em detrimento das folhas (HONG et al., 2012; KNUDSEN et al., 2006). Em óleos essenciais das flores de *Myrcia salzmannii* (CERQUEIRA et al., 2009) e *Salvia officinalis* (MIRJALILI et al., 2006), foram obtidos α -Humulene e (E)-Caryophyllene, sendo que em *Myrcia salzmannii* eles foram majoritários.

O perfil completo com as variações nas composições dos 35 compostos identificados em relação aos 21 genótipos nas quatro estações do ano está representado na Figura 4.

Com base nas variações do perfil químico em cada estação do ano, os genótipos foram agrupados. Assim, os genótipos: SEC e PAL; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C12, C14, C15 e C16; C10 e C13; C7, C11 e C17 mantiveram-se unidos em todas as estações. Os demais: PS, PET, mantiveram-se unidos apenas no inverno e na primavera; e C9 manteve-se em mesmo grupo no inverno, primavera e verão. As variações significativas nas composições químicas entre estações e genótipos, foram evidenciadas nos casos onde os agrupamentos dos genótipos, baseados nas similaridades, não se mantiveram. Os genótipos PAL, SEC, PS e PET também se mostraram divergentes dos genótipos Cortibel em análises moleculares (COSER et al., 2014).



(continua...)

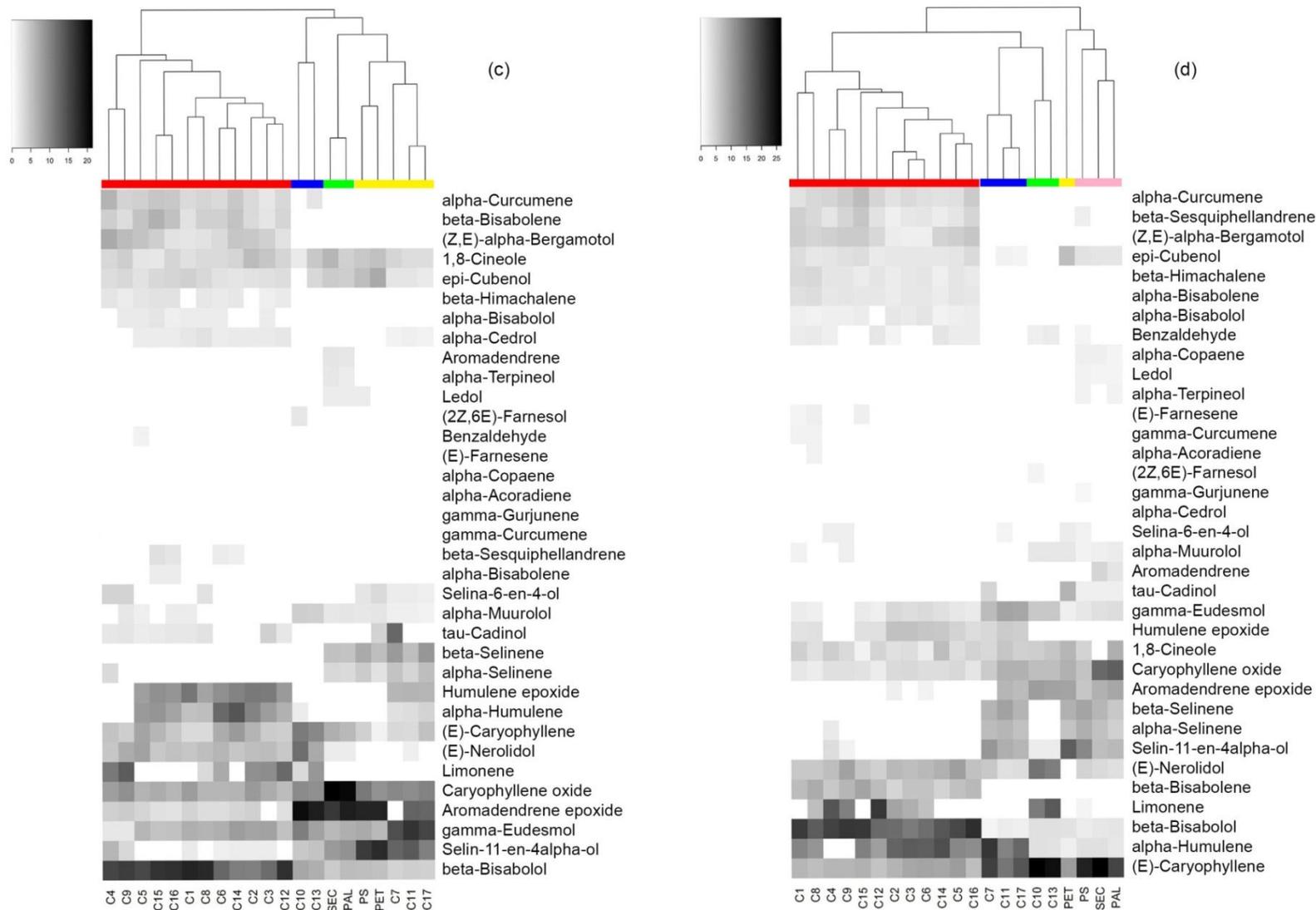


Figura 5. Heatmap com as áreas relativas dos 35 compostos em relação aos 21 genótipos de *Psidium guajava* nas estações (a) Outono, (b) Inverno, (c) Primavera e (d) Verão, com seus respectivos agrupamentos. Diferentes cores nas barras representam os grupos formados para cada estação do ano e as escalas representam a área relativa (%) dos compostos.

Ao comparar os grupos formados em cada estação do ano, foram verificados altos valores de coincidência que variam de 80,95 a 90,48%(Tabela 3), demonstrando similaridade de comportamentos dos óleos essenciais dos genótipos entre estações.

Tabela 3. Índices de coincidência (%) dos grupos de genótipos formados pelos dendrogramas.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Outono	100	90,48	80,95	80,95
Inverno		100	90,48	80,95
Primavera			100	90,48
Verão				100

Considerando os 16 compostos majoritários (área relativa > 10%), presentes nos óleos essenciais, as variabilidades nos teores encontrados foram demonstradas de acordo com a sazonalidade. Os compostos majoritários encontrados, geralmente, são os maiores responsáveis pelos princípios ativos que os óleos essenciais apresentam e foram organizados de acordo com as semelhanças estatísticas (Figura 5).

É possível observar que o (E)-Caryophyllene, α -Humulene, Caryophyllene oxide, Humulene epoxide, γ -Eudesmol, Aromadendrene epoxide e β -Himachalene diferiram significativamente nas estações do ano, considerando as coletas nos anos de 2015 e 2016 para este pomar. Sendo assim, para obter óleos essenciais ricos em alguns desses compostos, as folhas preferencialmente devem ser coletadas em diferentes momentos. Para obtenção de maiores concentrações do (E)-Caryophyllene, as folhas não devem ser coletadas na primavera. Para α -Humulene, elas devem ser coletadas preferencialmente no outono ou inverno. Para o Caryophyllene oxide, Humulene epoxide, γ -Eudesmol e Aromadendrene epoxide as folhas devem ser preferencialmente coletadas na primavera. Para o β -Himachalene deve-se coletar de preferência no inverno ou verão.

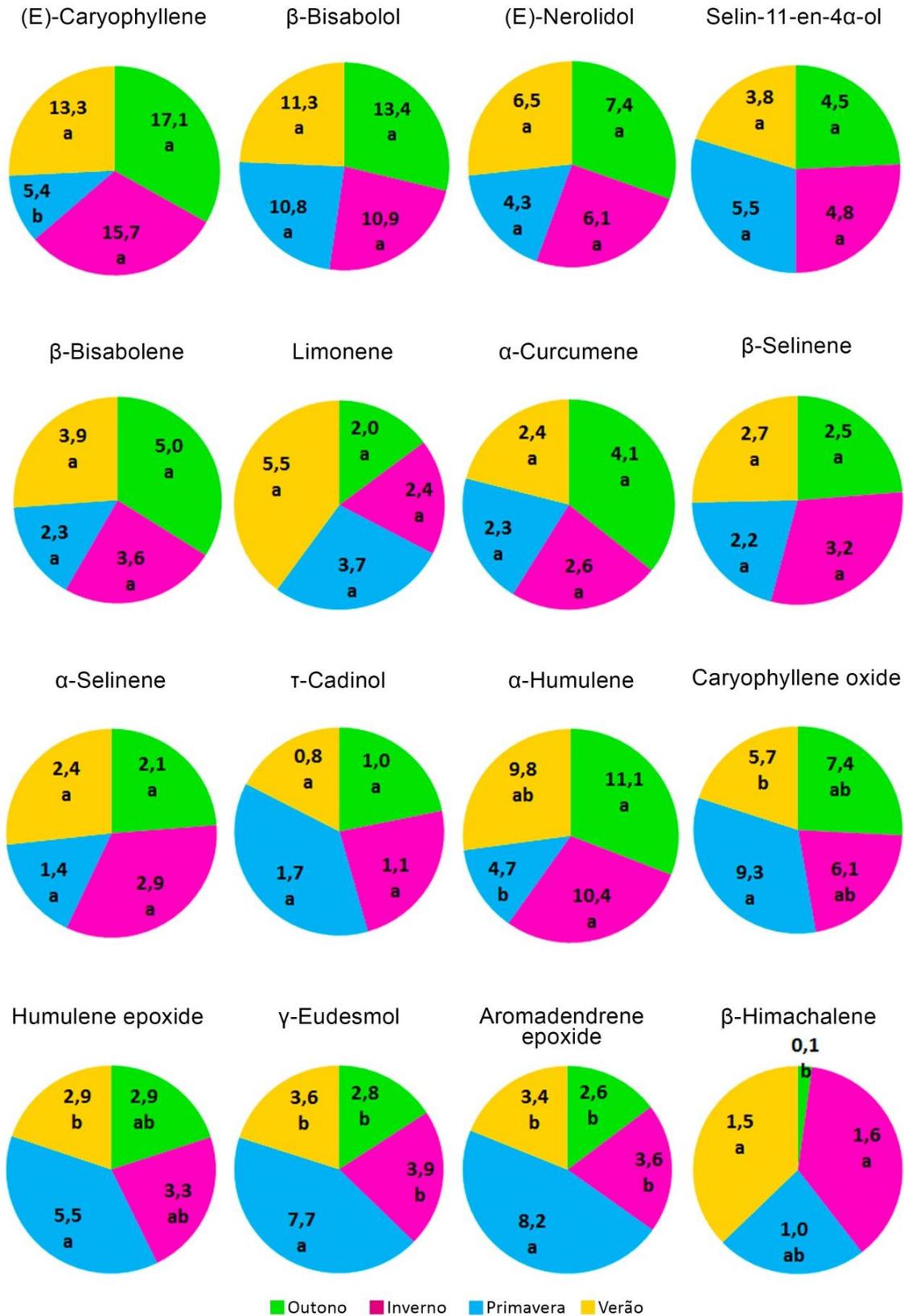


Figura 6. Média das áreas relativas dos compostos majoritários (>10%) dos óleos essenciais das folhas de *Psidium guajava*, considerando as quatro estações do ano. Letras iguais em gráficos do mesmo composto não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

A partir desses resultados, fica evidente que as diferenças nas composições dos óleos essenciais ocorrem tanto entre os genótipos quanto entre os mesmos genótipos nas estações do ano. Assim, buscando gerar o melhoramento das cultivares, este trabalho apresenta a importância de conhecer individualmente os genótipos, com objetivo de obter uma potencial aplicação.

4. CONCLUSÃO

Óleos essenciais de folhas de goiabeiras melhoradas do Brasil apresentam predominância de sesquiterpenos, com variabilidade quali e semiquantitativa na composição química entre genótipos e durante o ano.

Os compostos variam de forma significativa principalmente na primavera. As variações quali e semiquantitativas detectadas nas composições químicas não foram associadas diretamente às variações climáticas decorrentes da sazonalidade. Quando se observa os fatores fenológicos, como a floração, a redução de compostos como o (E)-Caryophyllene e α -Humulene nos óleos essenciais dos genótipos estudados, se apresenta como uma possível influência desse estágio. Assim, levanta-se a hipótese que a redução na produção desses compostos nas folhas pode ser resultado de maior produção dos mesmos nas flores, como relatado em outras espécies, podendo ser decorrentes de demanda de eventos de polinização.

Sendo assim, ocorrem variações nos compostos químicos e deve-se direcionar o uso dos óleos de acordo com as maiores concentrações dos princípios ativos.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. EUA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ALMEIDA, L. F. R. de. et al. Non-Oxygenated Sesquiterpenes in the Essential Oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the Day in the Dry Season. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010, v. 2, 899 p.

CERIMELE, E.; RINGUELET, J. A. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas. In: **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória, ES: EDUFES, 2008.

CERQUEIRA, M. D. de. et al. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CERQUEIRA, M. D. de. et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, Salvador, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHEN, F. et al. Biosynthesis and Emission of Terpenoid Volatiles from *Arabidopsis* Flowers. **Plant Cell**, Michigan, v. 15, n. 2, p. 481-494, 2003.

COSER, S. M. et al. Diversidade genética de seleções de goiabeiras Cortibel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 391-399, 2014.

HONG, G. et al. Arabidopsis MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. **Plant Cell**, Shanghai, v. 24, n. 6, 2012.

EL-SAYED, A. M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 10 outubro 2016.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

GOODGER, J. Q. D. et al. Foliar Essential Oil Glands of *Eucalyptus* Subgenus *Eucalyptus* (Myrtaceae) Are a Rich Source of Flavonoids and Related Non-Volatile Constituents. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

KAMRAN, A. et al. Therapeutic Effects of Essential Oil from Waste Leaves of *Psidium guajava* L. against Cosmetic Embarrassment Using Phylogenetic Approach. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 745-752, 2012.

KESZEI, A. et al. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844-852, 2010.

KHADHRI, A. et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KNUDSEN, J. T. et al. Diversity and Distribution of Floral Scent. **The Botanical Review**, v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.

KÜLHEIM, C. et al. The *Eucalyptus* terpene synthase gene family. **BMC Genomics**, Canberra, v. 16, n. 450, p. 1-18, 2015.

LIMA, R. K. de. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, 2010.

LIMA, M. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, 2011.

LOPES, N. P.; GOBBO-NETO, L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, 2012.

MENDES, L. A. et al. **Óleos essenciais em Myrtaceae**. Tópicos Especiais em Produção Vegetal VI. Alegre, ES: CAUFES, 2017. Disponível em: <<https://mega.nz/#!z4Q2Slol!UM16kpQ4vJZka2nTvJWo-n8ZiA8poQWirpLaUJ3EwFI>>.

MIRJALILI, M. H. et al. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 1, 2006.

MOORE, B. D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750, 2013.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Jaguariúna, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M. da.; NASCIMENTO, J. de M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição geográfica de uma Coleção Botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 317, 2014.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Database 69. **NIST Chemistry WebBook**, 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 21 janeiro 2016.

PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 695-716, 2014.

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the Antinociceptive Effect of *Psidium guajava* Leaf Essential Oil and its Major Constituents. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 24-27, 1998.

SATYAL, P. et al. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 11-14, 2015.

SILVA, J. D. da. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 240-243, 2003.

SOLIMAN, F. M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin Facult Pharmacy**, Cairo Univ, p. 1-7, 2016.

SOUZA, T. da S. de. **Perfil cromatográfico do óleo essencial e diversidade quimiotípica de *Psidium guajava* L.** 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2015.

SOUZA, T. da S. de. et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

THOLL, D. et al. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. **The Plant Journal**, Blacksburg, v. 42, n. 5, p. 757-771, 2005.

YAPI, A. T. et al. Chemical variability of *Xylopiya quintasii* Engl. & Diels leaf oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, p. 332-339, 2014.

6. APÊNDICE

APÊNDICE A - Composição química em percentual de área relativa de 35 compostos identificados nos óleos essenciais das folhas de 21 genótipos de *Psidium guajava* obtidos sazonalmente, considerando teores maiores que 1%.

Composto (IK_{cal}^*)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Benzaldehyde (960)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	1,2	-	2,0	1,2	-	1,7	2,0	-	-	2,3	-	1,6	-	2,6	1,9	2,9	-	2,0	-
Limonene (1028)	O	-	-	-	-	-	4,6	5,4	10,7	-	4,9	-	4,0	3,2	2,1	-	5,4	2,1	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	2,4	3,9	5,6	-	5,3	-	1,5	4,5	9,5	-	11,5	7,2	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	9,4	9,5	11,3	-	7,1	-	3,2	13,6	3,2	-	12,5	8,6	-	-	-	-
	V	-	-	1,2	-	-	9,5	8,3	17,8	-	6,5	-	6,7	13,3	13,7	-	20,6	17,1	-	-	-	-
1,8-Cineole (1031)	O	2,3	3,4	1,8	-	1,4	-	1,5	3,4	1,1	1,3	1,4	2,5	1,2	-	-	-	-	1,8	-	-	-
	I	5,5	4,4	5,9	1,3	1,2	-	1,7	1,8	1,1	2,0	5,8	-	1,9	2,2	-	2,9	2,2	2,5	-	2,4	3,2
	P	6,1	3,9	4,7	5,3	2,6	5,7	4,9	3,3	2,3	3,2	3,6	3,0	4,1	1,9	2,9	3,6	4,5	3,6	2,1	3,6	2,8
	V	-	8,4	4,7	7,6	4,9	3,2	3,6	5,1	3,6	2,0	4,1	3,3	3,9	5,2	5,9	4,3	6,0	6,8	1,4	4,7	5,0
α -Terpineol (1190)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	1,6	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	2,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	1,4	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Copaene (1375)	O	1,1	1,2	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	1,8	1,3	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	1,8	1,2	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
(E)-Caryophyllene (1417)	O	25,0	25,0	26,9	15,0	10,8	12,5	12,3	11,0	11,3	9,7	19,9	4,8	12,5	44,1	21,5	6,5	44,0	11,5	6,8	8,0	19,2
	I	23,1	19,2	22,1	10,3	6,6	8,4	9,6	11,3	9,6	12,1	16,2	7,8	11,4	48,9	12,7	10,9	39,7	12,2	12,1	10,5	14,2
	P	6,8	5,8	4,0	1,1	3,2	6,3	4,3	5,1	7,7	7,0	3,3	3,1	4,1	11,1	3,2	4,1	10,0	8,4	6,0	4,6	5,2
	V	26,6	19,4	23,1	10,2	7,6	7,8	9,3	7,6	10,2	9,4	19,8	6,8	7,7	26,4	14,1	6,2	24,8	9,1	8,0	6,7	17,6
Aromadendrene (1438)	O	2,4	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	3,3	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	2,3	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	4,3	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Humulene (1452)	O	3,4	3,5	4,3	2,6	13,2	19,6	22,5	-	13,1	17,9	18,7	9,2	-	6,0	19,7	10,3	5,6	20,9	11,4	13,6	18,4
	I	2,8	2,5	2,9	1,6	11,9	17,0	18,3	1,5	12,0	23,0	12,4	13,0	-	6,1	12,0	12,6	4,8	22,1	15,3	14,5	12,2
	P	-	-	-	-	5,3	10,4	8,2	-	8,5	12,6	2,6	5,4	-	1,6	2,9	6,5	-	14,2	8,9	7,7	3,7
	V	3,3	2,5	3,3	1,6	12,7	16,0	16,9	-	12,5	16,5	20,8	11,1	-	3,4	12,9	9,9	3,1	18,1	13,2	11,9	15,8
(E)-Farnesene (1459)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	2,0	1,8	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-
α -Acoradiene (1463)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	1,8	1,8	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
γ-Gurjunene (1475)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Curcumene (1480)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	1,6	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Curcumene (1484)	O	-	-	-	-	7,6	8,8	7,4	10,0	6,1	3,3	-	7,7	11,9	-	-	3,9	-	4,4	7,7	7,2	-
	I	-	-	-	-	4,0	3,0	3,5	7,3	3,2	3,9	-	5,7	5,9	-	-	4,6	-	4,3	4,7	5,5	-
	P	-	-	-	-	3,1	3,1	2,1	6,3	3,9	3,1	-	3,6	3,7	-	-	3,4	2,2	4,5	4,9	4,6	-
	V	-	-	-	-	3,1	3,0	3,9	4,5	3,3	3,4	-	4,0	5,5	-	-	4,3	-	3,0	7,0	5,5	-
β-Selinene (1486)	O	4,4	5,0	8,9	5,4	-	-	-	-	-	-	10,4	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	10,2
	I	7,6	6,4	15,1	9,5	-	-	-	-	-	-	10,9	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	8,8
	P	5,3	5,0	7,2	5,4	-	-	-	-	-	-	8,5	-	-	-	5,5	-	-	-	-	-	8,7
	V	7,6	5,6	9,5	8,2	-	-	-	-	-	-	7,8	-	-	-	9,7	-	-	-	-	-	7,8
α-Selinene (1495)	O	4,0	4,5	8,4	5,4	-	-	-	-	-	-	7,7	-	-	-	7,4	-	-	-	-	-	6,7
	I	7,0	5,4	13,8	7,7	-	-	-	3,4	-	-	9,3	-	-	-	7,7	-	-	-	-	-	7,5
	P	3,3	3,0	4,3	2,4	-	-	-	3,0	-	-	5,0	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-	5,5
	V	6,5	4,9	8,4	6,3	-	-	-	2,2	-	-	7,1	-	-	-	7,7	-	-	-	-	-	6,6

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
β-Bisabolene (1509)	O	-	-	-	-	9,7	11,1	8,8	9,3	8,4	5,4	-	7,9	13,7	-	-	6,2	-	6,0	8,9	9,6	-
	I	-	-	-	-	5,0	3,8	4,3	6,7	4,5	6,0	-	7,3	6,9	-	-	1,5	-	5,1	12,5	11,7	-
	P	-	-	-	-	2,5	3,0	2,3	4,1	5,0	4,0	-	3,9	2,8	-	-	3,5	-	5,1	6,5	5,3	-
	V	-	-	-	-	7,0	4,5	6,2	5,6	6,5	6,3	-	8,6	7,7	-	-	7,1	-	4,6	9,5	7,3	-
β-Himachalene (1511)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	1,7	-	-	2,5	1,3	1,5	-	1,9	2,2	-	-	10,7	-	-	5,8	5,0	-
	P	-	-	-	-	-	-	1,4	2,3	2,2	1,8	-	2,0	1,6	-	-	1,9	-	2,0	2,5	2,5	-
	V	-	-	-	-	3,9	2,1	2,5	2,9	2,9	2,8	-	4,0	2,7	-	-	2,7	-	1,7	2,0	2,3	-
β- Sesquiphellandrene (1523)	O	-	-	1,7	-	2,9	4,8	3,2	4,5	3,4	3,2	-	-	7,2	-	-	3,1	-	3,0	4,0	5,6	-
	I	-	-	1,6	-	2,6	1,5	-	2,9	-	2,5	-	2,6	3,2	-	-	4,1	-	1,7	6,7	5,8	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	1,4	2,7	2,2	-
	V	-	-	1,6	-	5,0	1,6	2,5	2,8	2,7	2,9	-	4,1	4,5	-	-	3,1	-	2,1	6,1	4,4	-
α-Bisabolene (1533)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	2,4	-	1,6	-	-	-
	I	-	-	-	-	1,9	-	-	2,4	1,6	1,8	-	2,2	2,4	-	-	3,8	-	1,4	4,3	3,8	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	1,5	-
	V	-	-	-	-	3,2	2,0	2,4	2,6	2,7	2,5	-	3,5	2,8	-	-	2,6	-	1,9	2,5	2,6	-
(E)-Nerolidol (1566)	O	4,7	3,9	5,6	-	10,6	5,8	7,5	8,2	10,7	7,8	3,7	7,9	8,8	18,9	4,4	6,5	16,9	8,5	6,3	6,0	3,4
	I	3,5	2,6	2,0	-	5,8	9,3	7,8	6,0	11,3	6,4	2,4	6,3	9,5	17,6	3,3	2,9	15,3	7,1	3,0	3,9	2,6
	P	1,7	1,6	-	-	4,8	5,4	5,7	4,9	7,8	6,0	-	5,5	7,0	12,1	1,3	4,7	7,2	4,9	4,5	5,3	-
	V	3,8	3,4	4,6	-	5,6	7,3	6,7	6,9	10,0	7,4	5,7	5,7	9,8	14,6	3,2	4,8	13,4	8,2	5,9	6,4	3,7

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Caryophyllene oxide (1582)	O	20,1	18,2	4,5	9,3	5,2	4,5	3,9	4,6	3,7	4,1	11,9	4,3	3,8	11,5	7,2	2,6	10,7	3,8	3,9	2,5	14,1
	I	11,9	18,0	4,8	9,4	4,3	5,5	5,4	5,1	5,0	3,0	7,8	3,6	5,9	5,1	8,7	1,8	5,7	4,7	2,1	2,3	8,4
	P	21,4	20,6	11,2	9,1	8,2	8,4	7,0	8,0	6,4	6,0	9,9	6,0	9,3	9,7	9,6	5,6	9,4	6,4	6,9	6,1	10,4
	V	15,5	16,6	6,2	8,0	2,5	3,9	4,2	3,2	4,0	3,7	5,4	1,9	3,2	6,9	8,1	2,0	6,9	3,5	3,0	2,8	8,1
α-Cedrol (1600)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	2,0	1,9	1,8	-	1,6	1,6	1,2	2,4	-	-	1,3	2,0	-	1,8	1,5	1,6	1,1
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ledol (1600)	O	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	1,4	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	1,5	1,5	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	1,3	1,3	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Humulene epoxide (1608)	O	-	-	-	-	4,2	6,0	4,6	-	3,0	5,9	6,7	4,9	-	-	4,7	2,7	-	4,9	3,7	2,4	7,5
	I	-	-	-	-	6,3	8,0	8,0	-	5,6	5,2	4,7	5,5	-	-	5,5	2,8	-	7,0	2,9	3,4	5,1
	P	-	-	-	-	11,5	11,3	11,0	-	8,1	9,4	6,2	7,6	-	-	6,4	8,5	-	10,3	9,3	8,9	6,2
	V	-	-	-	-	3,0	6,6	6,6	-	4,7	6,0	4,0	3,3	-	-	5,4	3,4	-	5,7	3,4	3,5	5,2
Selina-6-en-4-ol (1612)	O	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-
	I	-	-	1,4	2,1	-	-	-	2,1	-	-	-	-	1,9	-	1,4	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	2,2	3,0	-	-	-	3,7	-	-	1,7	2,5	3,7	-	1,6	-	-	-	-	-	1,3
	V	-	-	1,5	1,9	-	-	-	1,6	-	-	-	-	1,7	-	1,1	-	-	-	-	-	-

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
epi-Cubenol (1629)	O	3,1	3,0	2,8	6,5	3,2	2,3	2,5	3,7	3,0	3,2	-	4,0	3,3	-	-	3,8	-	2,7	4,2	3,5	1,3
	I	2,6	2,8	2,6	5,9	3,8	2,9	2,7	2,7	2,7	1,8	1,2	2,8	3,4	-	1,5	1,5	-	2,2	1,8	2,2	1,3
	P	4,3	4,1	5,5	7,1	3,9	2,4	2,6	2,9	2,4	2,5	2,2	3,3	3,3	-	2,2	2,9	3,4	2,2	3,3	3,5	1,9
	V	2,7	2,8	3,1	6,7	3,5	2,4	2,5	2,8	2,8	2,5	-	2,4	3,3	-	1,4	2,3	-	2,6	3,7	3,8	1,3
γ-Eudesmol (1632)	O	4,0	3,4	1,9	4,2	-	2,3	-	-	2,2	3,3	5,8	2,5	-	3,0	7,7	2,3	4,1	2,9	2,3	2,2	5,5
	I	3,0	3,9	2,4	4,6	3,4	4,8	4,8	-	3,5	3,7	8,8	3,1	-	-	11,1	1,5	4,3	4,1	1,7	1,9	10,6
	P	5,9	6,7	7,1	5,8	6,8	7,5	7,9	2,0	6,1	6,7	14,7	6,3	2,1	10,9	17,1	5,3	7,9	8,2	5,0	5,2	15,6
	V	3,2	3,7	2,6	1,8	2,1	4,1	3,6	-	2,6	3,8	7,0	1,7	-	5,6	9,4	1,8	5,6	3,4	2,2	2,3	9,2
Aromadendrene epoxide (1639)	O	9,1	7,6	3,9	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	5,3	-	9,3	-	-	-	3,4
	I	7,2	9,3	5,3	11,7	-	2,0	-	1,6	1,8	-	-	-	1,8	6,3	8,2	-	10,2	1,6	-	-	8,5
	P	16,6	18,7	18,2	18,3	3,8	4,0	-	3,9	3,6	2,9	-	2,8	4,3	20,2	12,9	2,6	18,8	3,6	2,7	2,4	12,7
	V	8,1	9,2	6,1	9,5	-	1,6	-	-	-	1,5	-	-	-	10,2	7,5	-	9,8	-	-	-	7,0
τ-Cadinol (1643)	O	2,4	2,3	2,5	10,8	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	1,5	1,4	-	5,9	1,6	-	-	1,5	1,4	-	7,2	1,5	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	3,7	2,1	-	3,9	2,0	1,6	-	12,8	2,4	2,2	-	-	2,0	-	-	1,9	2,0	-
	V	1,6	1,6	1,7	7,9	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Muurolol (1648)	O	2,6	2,8	2,1	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	3,0	-	-	-	-
	I	2,0	2,0	1,3	2,1	1,7	-	-	-	1,4	-	-	-	2,0	-	-	-	2,9	-	-	-	-
	P	2,1	2,3	2,0	2,3	1,7	-	-	-	1,3	-	1,3	-	2,1	4,2	1,3	-	4,0	-	-	1,5	1,2
	V	1,8	1,9	1,5	2,5	1,4	-	-	-	-	-	-	-	1,7	2,6	-	-	2,6	-	-	-	-

(continua...)

Composto (IK _{cal} *)	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Selin-11-en-4 α -ol (1658)	O	8,5	9,8	18,5	24,5	-	-	-	3,8	-	-	10,2	-	-	-	10,3	-	-	-	-	-	9,1
	I	9,0	8,6	13,3	21,8	-	2,0	1,8	4,9	-	-	8,4	-	2,6	-	14,4	-	-	1,6	-	-	12,0
	P	8,4	9,2	16,3	17,6	1,8	1,6	1,7	6,2	-	1,3	12,9	-	3,3	4,5	13,8	-	5,0	1,6	-	-	10,7
	V	6,7	7,4	12,3	16,7	-	-	-	3,5	-	-	10,9	-	1,5	2,1	8,4	-	2,1	-	-	-	7,6
β -Bisabolol (1673)	O	2,9	2,4	1,0	3,3	24,3	12,9	17,3	24,1	23,1	19,2	-	27,1	21,9	2,1	1,7	28,1	2,8	17,7	24,9	22,7	1,2
	I	2,2	2,9	1,6	3,5	24,4	17,8	17,4	19,7	21,9	12,6	1,8	21,7	21,3	-	2,3	11,4	2,7	14,8	12,9	14,2	2,4
	P	4,4	5,6	5,5	5,3	18,4	10,5	12,4	15,6	15,3	12,7	3,7	17,9	16,2	7,3	4,1	17,2	6,7	10,9	17,0	17,2	3,9
	V	2,4	2,7	1,9	3,0	20,3	15,4	13,6	19,5	19,1	15,1	1,3	16,8	20,8	3,3	2,0	15,6	3,2	17,3	20,7	21,6	1,8
α -Bisabolol (1685)	O	-	-	-	-	-	2,5	3,1	-	2,2	5,6	-	2,6	2,0	-	-	2,4	-	1,7	2,3	2,2	-
	I	-	-	-	-	2,1	5,1	5,1	1,6	1,8	3,7	-	1,8	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	1,5	-	1,6	-	1,9	1,6	-	1,5	1,9	-	-	-	-	-	2,3	1,4	-
	V	-	-	-	-	1,8	2,6	2,2	1,6	1,7	2,8	-	1,4	1,8	-	-	-	-	1,5	1,9	1,9	-
(Z,E)- α -Bergamotol (1688)	O	-	-	-	-	4,4	-	-	4,2	5,8	-	-	7,2	3,8	-	-	7,0	-	4,6	4,6	4,0	-
	I	-	-	-	-	6,5	-	-	5,2	5,8	-	-	3,7	5,9	-	-	3,4	-	4,1	3,7	3,9	-
	P	-	-	-	-	2,3	4,6	3,9	7,1	5,1	3,2	-	2,5	5,6	-	-	2,4	-	4,8	4,2	2,5	-
	V	-	-	-	-	5,1	2,0	1,8	4,9	5,1	1,8	-	4,3	5,4	-	-	4,1	-	4,7	5,4	5,9	-
(2Z,6E)-Farnesol (1721)	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-	1,5	-	-	1,2	-
	I	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	-	-	2,9	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-

(continua...)

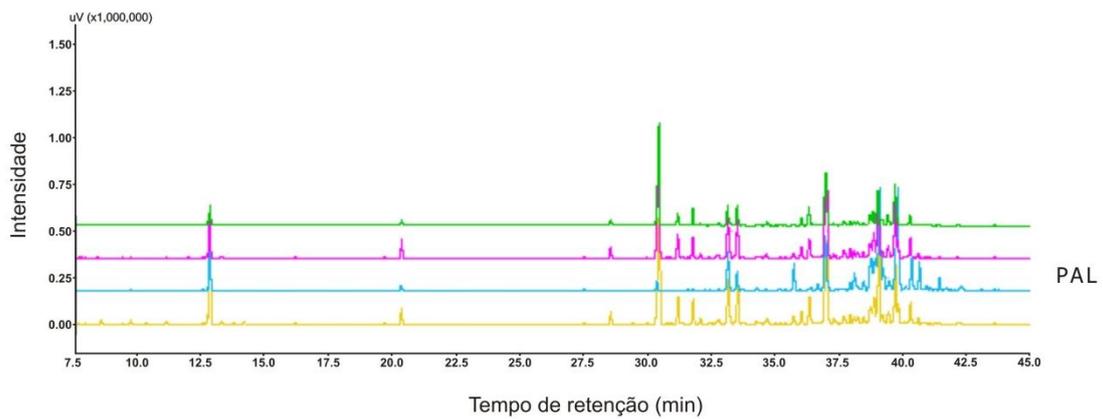
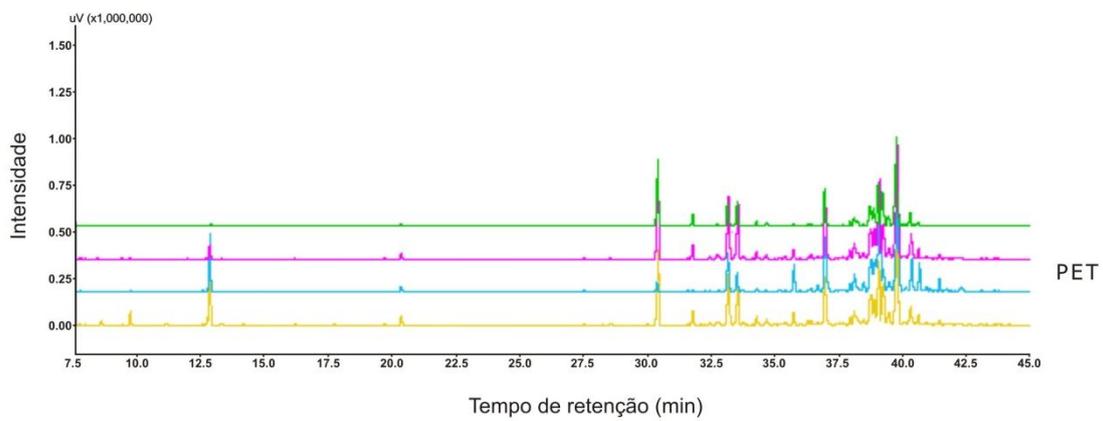
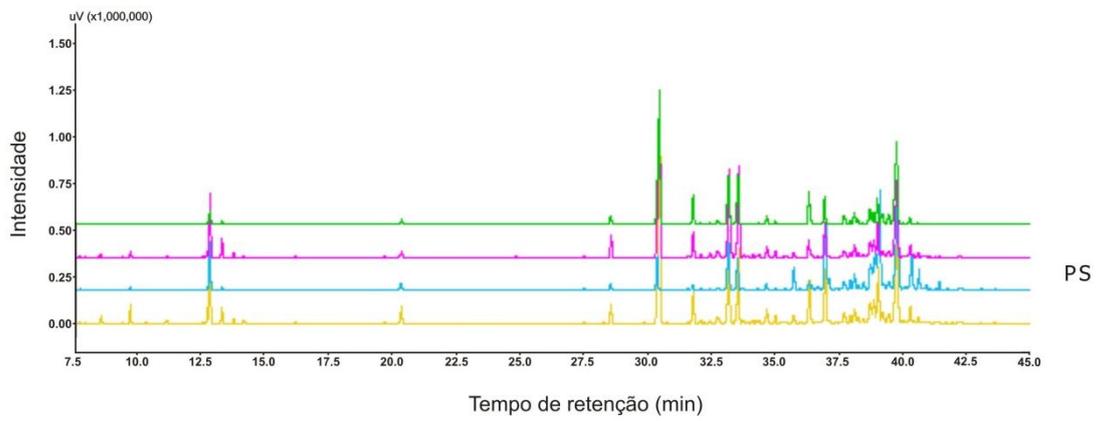
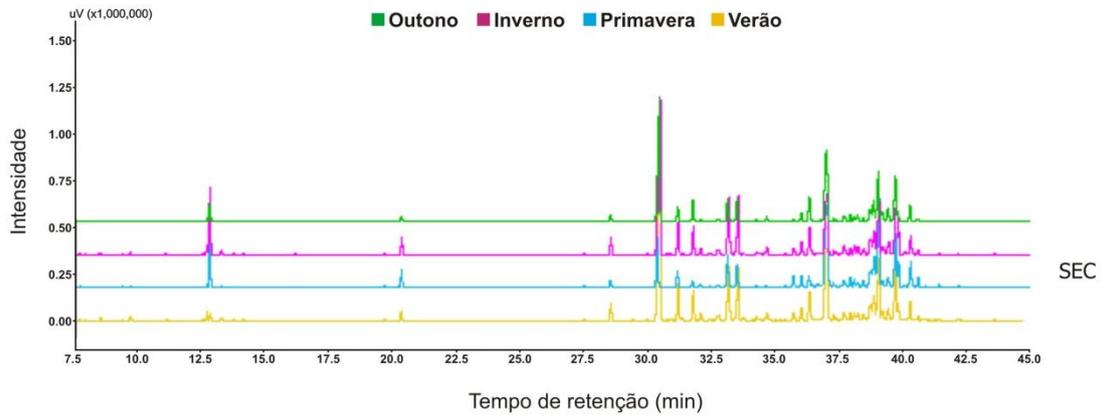
	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Total	O	100	98,4	100	100	97,5	97,7	100	97,5	97,1	96,9	100	96,6	97,8	100	98,2	95,1	100	96	93	90,7	100
Identificado	I	97	96,9	100	97,4	96	93,5	94,3	95,8	95,5	95,8	96,9	93,4	96,1	100	97,9	92,6	97,9	96,5	94,9	96	96,8
	P	92,1	91,5	89,8	86,4	85,5	95,5	92,2	91,7	91,9	94,3	89,6	84,9	90,9	88,7	89,7	88,7	87,7	93,9	93,8	89,6	90,9
	V	97,2	96,9	100	91,9	97,5	96,8	96,8	96,8	96,4	96,9	98,4	96,4	97,3	96,9	96,8	97,4	96,5	97,1	97,6	95,6	96,7

(continua...)

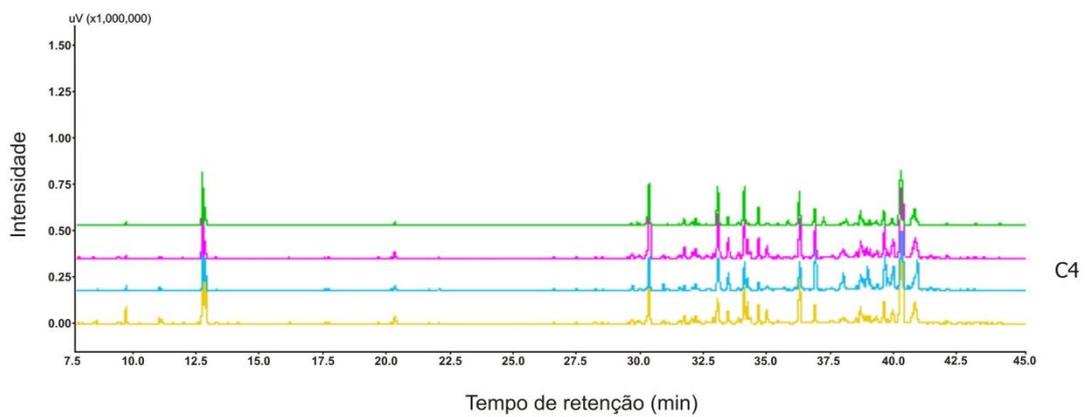
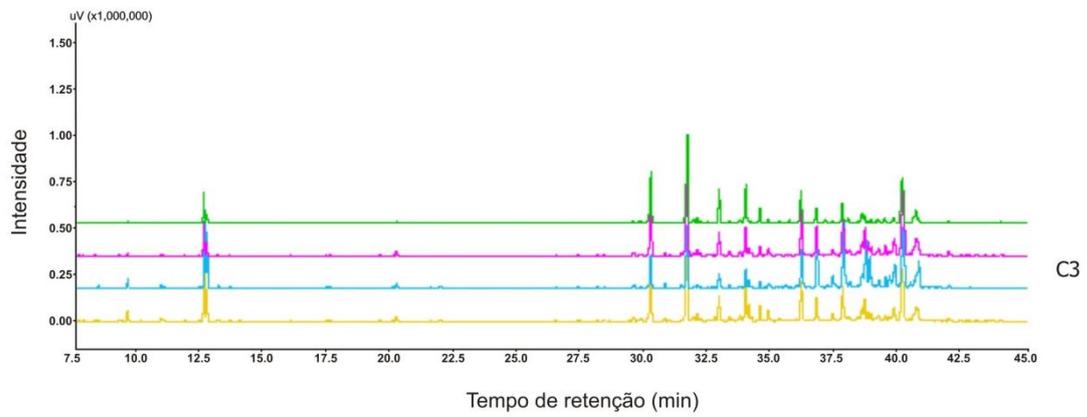
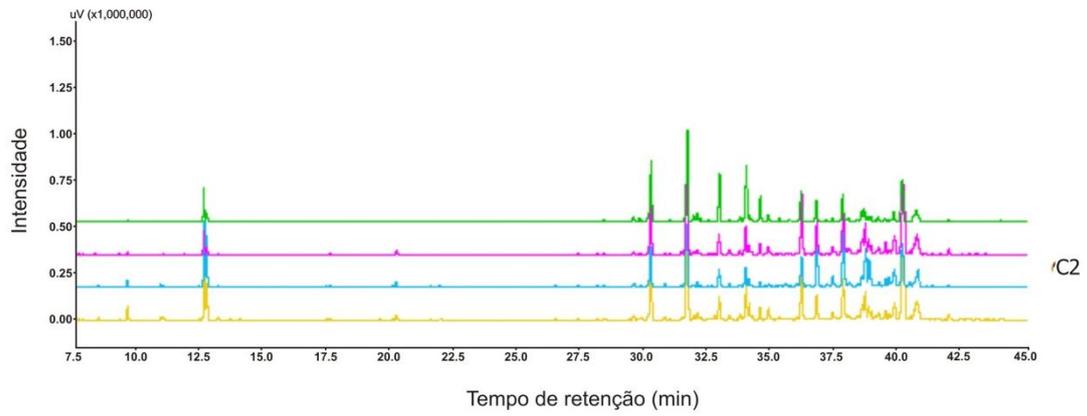
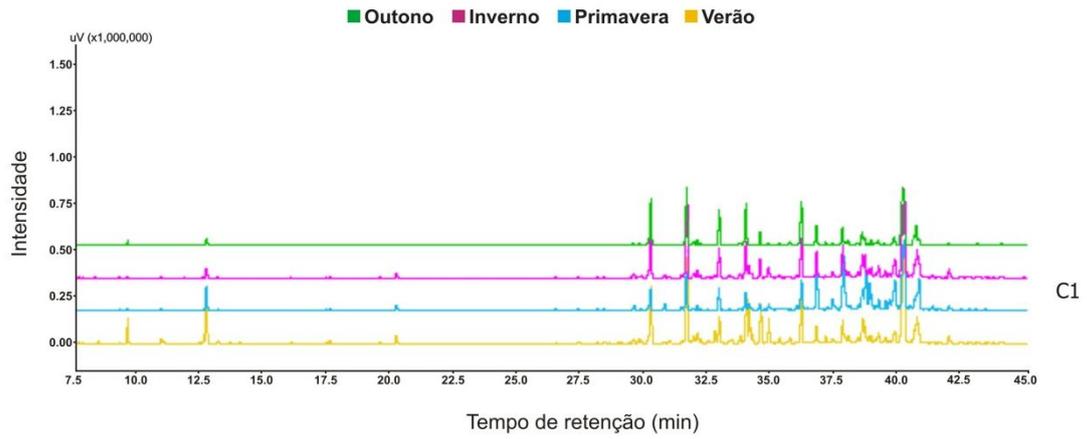
Composto	Estação do ano	Genótipo																				
		SEC	PAL	PS	PET	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Monoterpeno Hidrogenado	O	-	-	-	-	-	4,7	5,4	11,0	-	5,1	-	4,1	3,3	2,1	-	5,7	2,1	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	2,6	4,1	5,8	-	5,5	-	1,6	4,7	9,5	-	12,4	7,4	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	9,8	10,3	12,3	-	7,5	-	3,8	15,0	3,6	-	14,1	9,8	-	-	-	-
	V	-	-	1,2	-	-	9,8	8,6	18,4	-	6,7	-	7,0	13,7	14,1	-	21,1	17,7	-	-	-	-
Monoterpeno Oxigenado	O	2,3	3,5	1,8	-	1,4	-	1,5	3,5	1,1	1,3	1,4	2,6	1,2	-	-	-	-	1,9	-	-	-
	I	7,3	6,6	5,9	1,3	1,3	-	1,8	1,9	1,2	2,1	6,0	-	2,0	2,2	-	3,1	2,2	2,6	-	2,5	3,3
	P	8,8	5,9	5,2	6,1	3,0	6,0	5,3	3,6	2,5	3,4	4,0	3,5	4,5	2,1	3,2	4,1	5,1	3,8	2,2	4,0	3,1
	V	-	10,1	6,1	8,3	5,0	3,3	3,7	5,3	3,7	2,1	4,2	3,4	4,0	5,4	6,1	4,4	6,2	7,0	1,4	4,9	5,2
Sesquiterpeno Hidrogenado	O	40,3	42,2	51,5	28,4	45,4	58,1	54,2	35,7	43,6	42,9	56,7	30,7	50,9	50,1	57,9	36,0	49,6	49,3	41,7	48,5	54,5
	I	47,0	38,8	59,4	29,9	35,1	36,0	37,9	39,7	33,7	53,0	50,3	43,4	33,3	55,0	42,4	57,2	45,5	48,5	70,4	64,4	44,1
	P	19,2	17,3	17,3	10,3	16,5	23,9	19,9	22,7	29,7	31,9	21,7	21,2	13,4	14,4	17,0	21,8	13,9	37,9	35,3	31,7	25,4
	V	51,5	37,7	48,6	28,6	46,4	38,3	45,1	29,0	42,3	45,2	56,4	48,3	31,7	30,7	45,9	36,9	28,9	41,7	51,3	42,6	49,4
Sesquiterpeno Oxigenado	O	57,4	54,3	46,7	71,6	53,2	37,2	38,9	49,8	55,3	50,7	41,9	62,6	44,6	47,8	42,1	58,3	48,3	48,8	58,3	51,5	45,5
	I	45,7	54,6	34,7	68,8	63,6	61,4	56,2	52,6	65,1	38,0	43,7	55,0	60,0	31,7	57,6	27,3	44,9	48,9	29,6	33,1	52,6
	P	72,0	76,8	77,5	83,6	80,5	60,3	64,5	61,4	66,6	57,2	74,3	71,5	67,1	79,9	79,8	60,0	71,2	58,3	62,5	64,3	71,5
	V	48,5	52,2	42,9	63,1	46,5	47,4	42,6	45,5	51,9	46,0	39,4	38,9	50,6	48,1	48,0	34,9	45,2	48,3	47,3	50,4	45,4
Benzaldehyde	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	1,2	-	2,1	1,2	-	1,8	2,1	-	-	2,4	-	1,7	-	2,7	2,0	3,0	-	2,1	-

*Índice de Kovats calculado (IK_{cal}). Estações do ano: Outono (O), Inverno (I), Primavera (P) e Verão (V). Genótipos de *Psidium guajava*: Século XXI (SEC), Paluma (PAL), Pedro Sato (PS), Petri (PET), Cortibel LG (C1), Cortibel LM (C2), Cortibel 3 (C3), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel 5 (C5), Cortibel RM (C6), Cortibel 7 (C7), Cortibel Branca RM (C8), Cortibel 9 (C9), Cortibel 10 (C10), Cortibel 11 (C11), Cortibel 12 (C12), Cortibel 13 (C13), Cortibel RG (C14), Cortibel SLG (C15), Cortibel 16 (C16) e Cortibel 17 (C17).

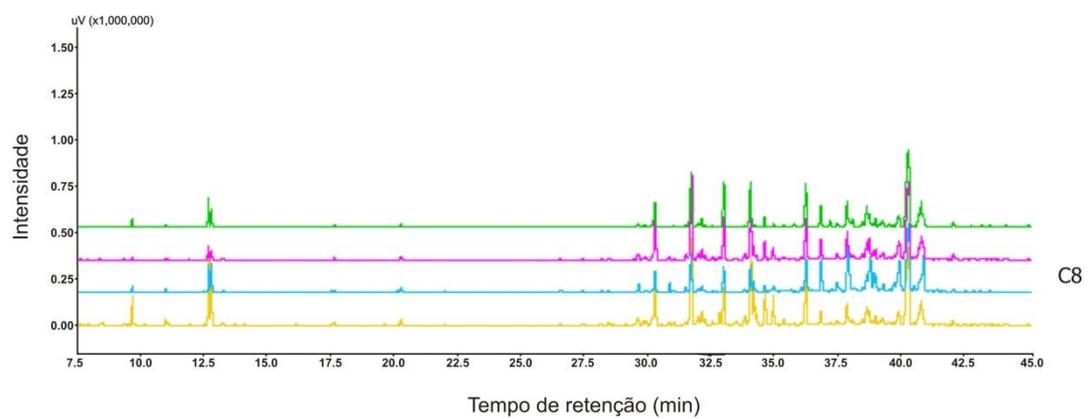
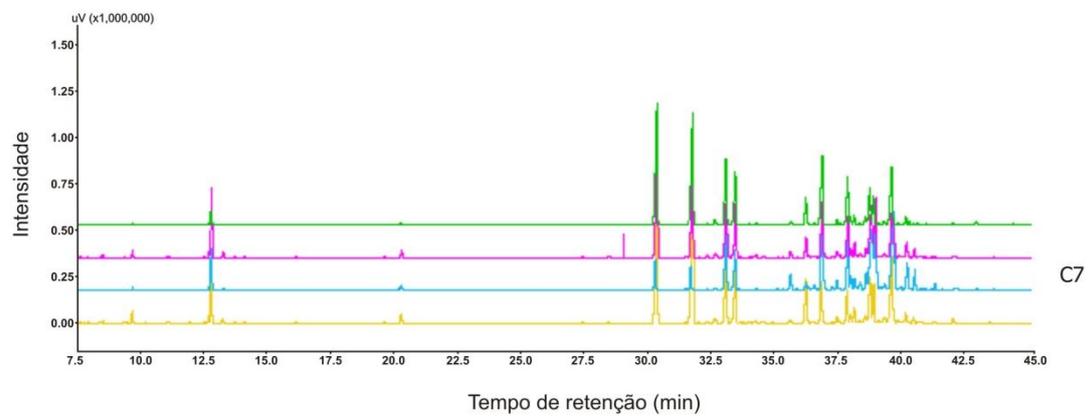
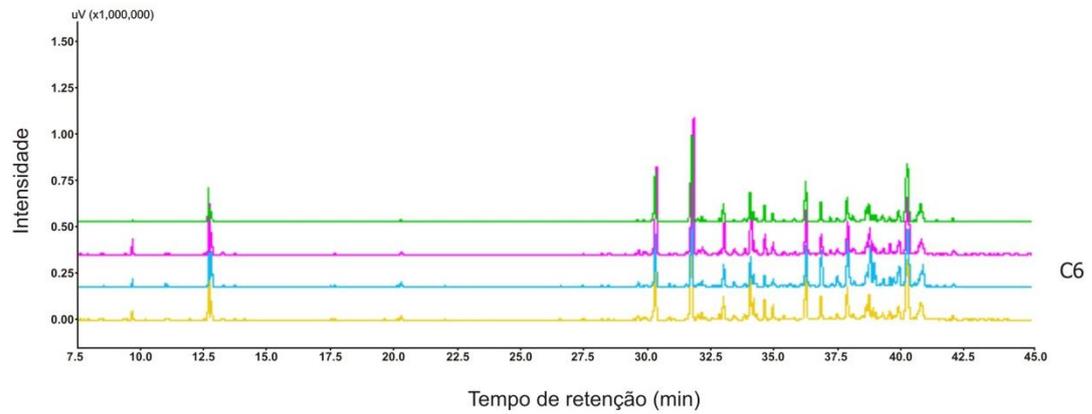
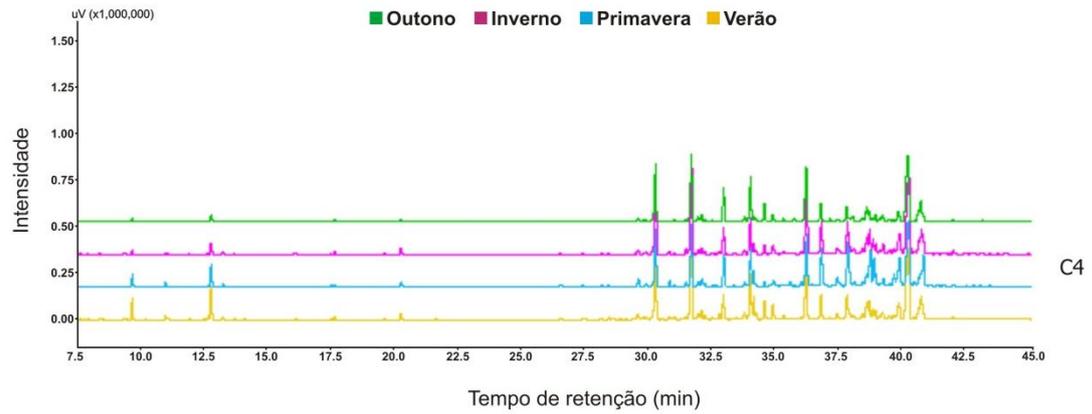
APÊNDICE B



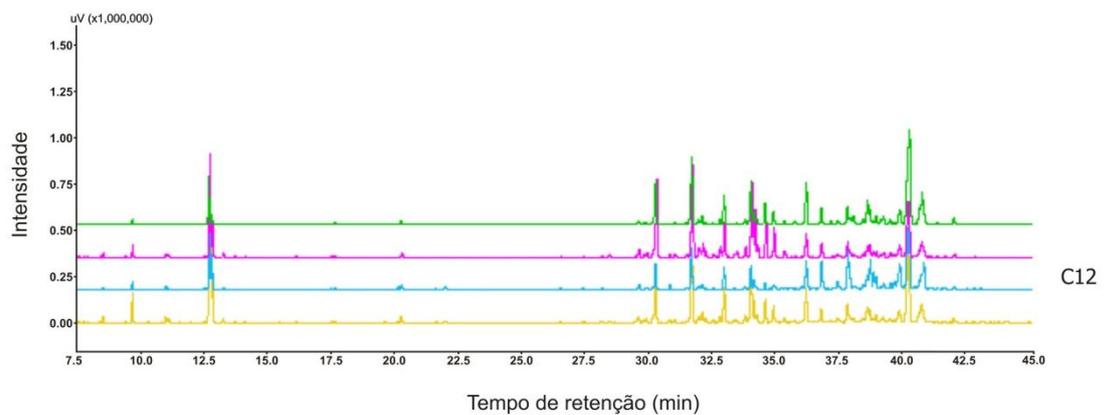
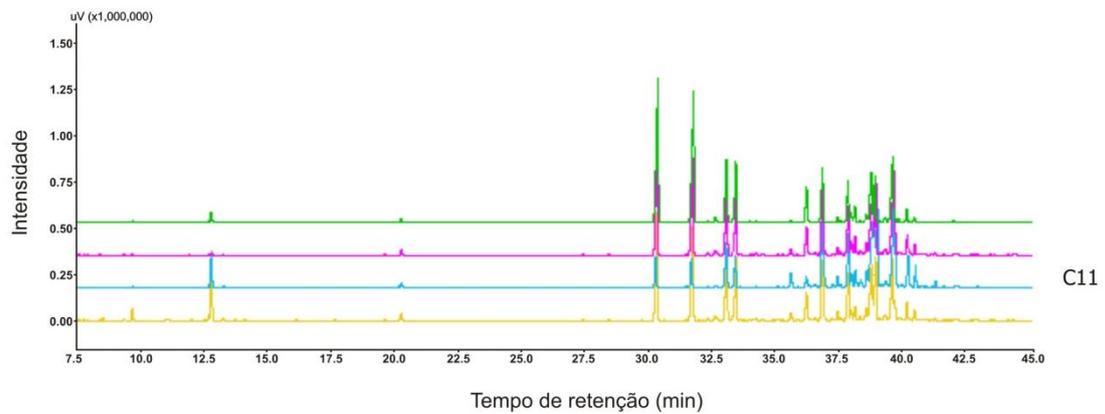
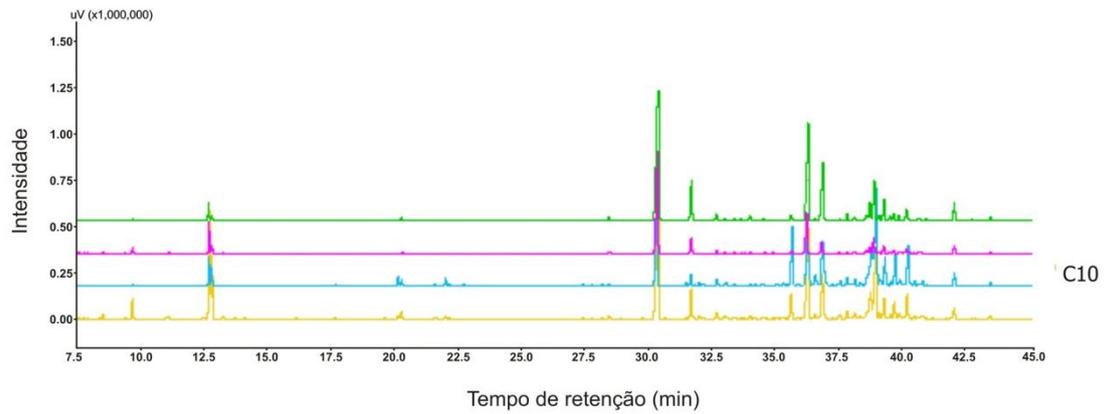
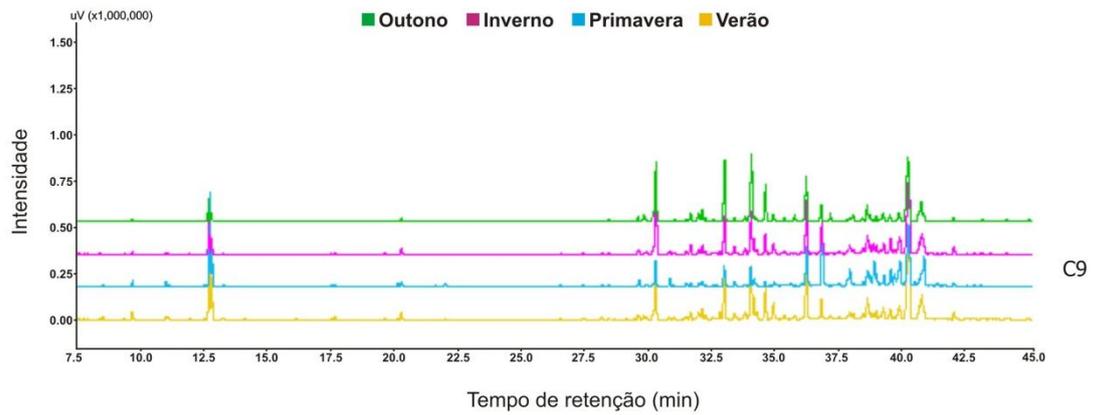
(continua...)



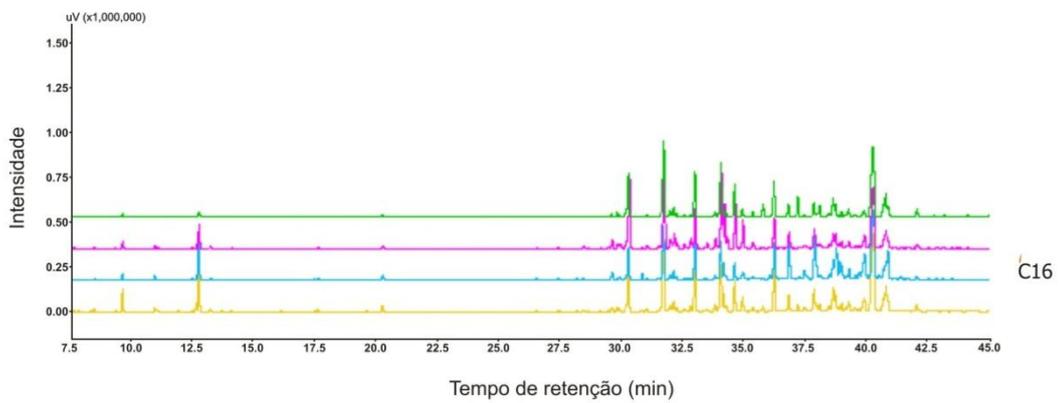
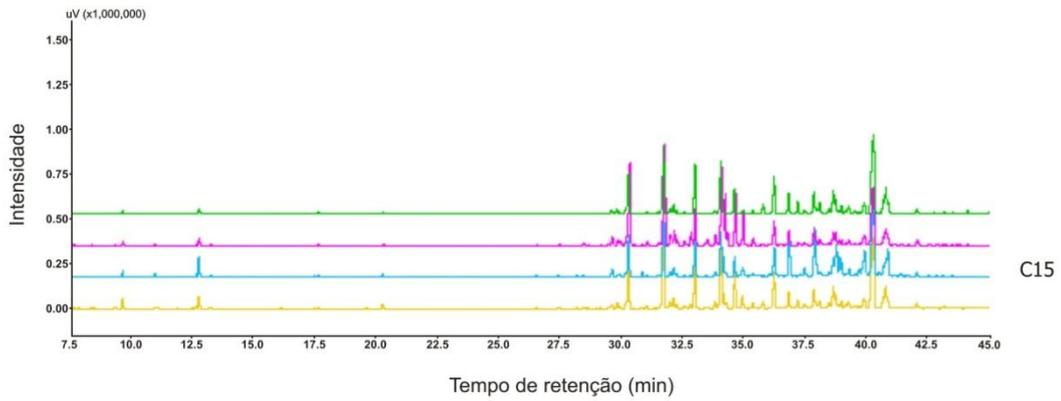
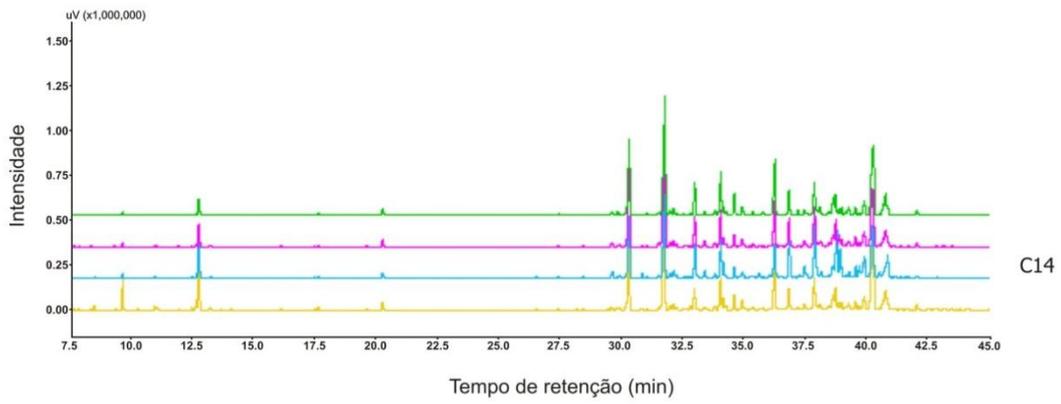
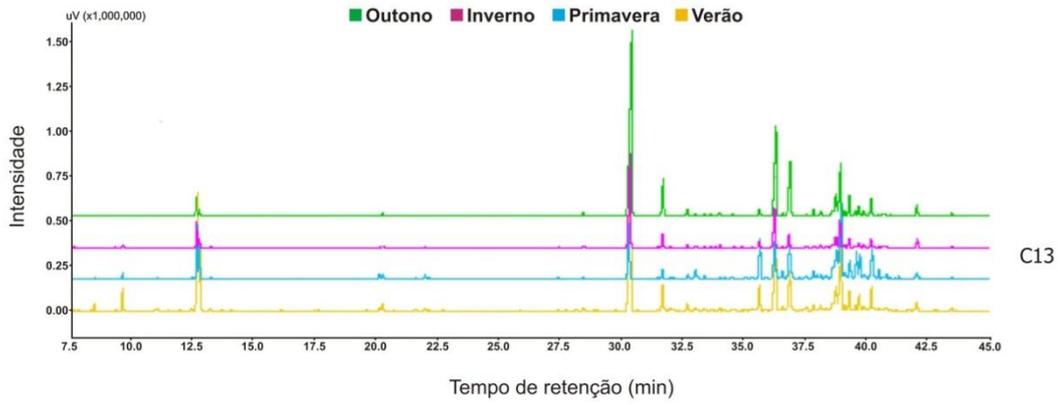
(continua...)



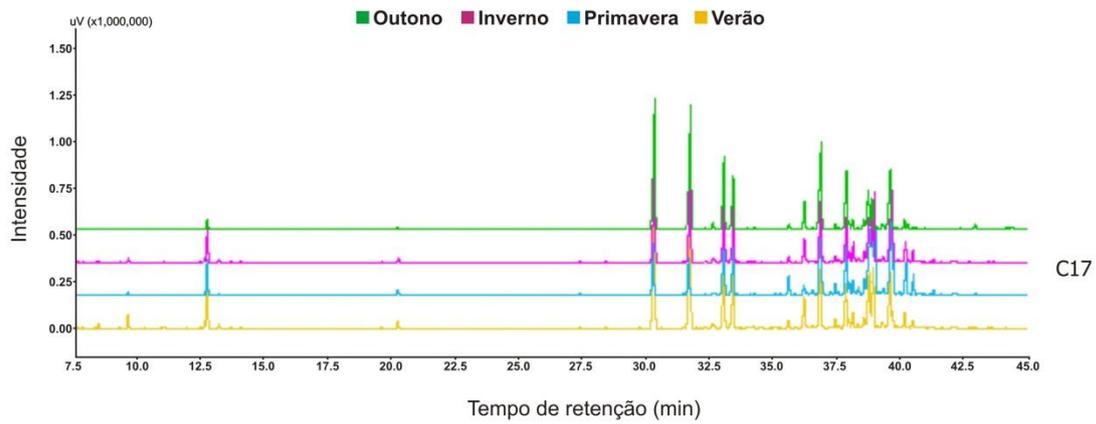
(continua...)



(continua...)



(continua...)



Cromatogramas (GC-FID) dos óleos essenciais de 21 genótipos de *Psidium guajava* nas quatro estações do ano. Genótipos de *Psidium guajava*: Século XXI (SEC), Paluma (PAL), Pedro Sato (PS), Petri (PET), Cortibel LG (C1), Cortibel LM (C2), Cortibel 3 (C3), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel 5 (C5), Cortibel RM (C6), Cortibel 7 (C7), Cortibel Branca RM (C8), Cortibel 9 (C9), Cortibel 10 (C10), Cortibel 11 (C11), Cortibel 12 (C12), Cortibel 13 (C13), Cortibel RG (C14), Cortibel SLG (C15), Cortibel 16 (C16) e Cortibel 17 (C17).

CAPÍTULO 2

Efeito larvicida de óleos essenciais de cultivares brasileiras de goiabeiras em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

**Luiza Alves Mendes¹; Gustavo Ferreira Martins²; Wilson Rodrigues Valbon³;
Tércio da Silva de Souza⁴; Luciano Menini⁴; Adésio Ferreira⁵; Marcia Flores da
Silva Ferreira^{1*}.**

¹Departamento de Biologia, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCENS-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

²Departamento 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 Fisiologia e Neurobiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

⁴Laboratório 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.

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

Resumo: O mosquito *Aedes aegypti* L. é um dos principais vetores de diferentes vírus, incluindo dengue e chikungunya e o controle desse vetor tem sido um grande e desafiador problema de saúde pública. Atualmente são utilizados principalmente inseticidas sintéticos no controle populacional desse vetor, que são eficientes, porém criam uma série de problemas ambientais. Os produtos naturais constituem um método alternativo por serem eficazes, facilmente biodegradáveis e de baixo custo. Nesse contexto, recentemente os óleos essenciais das folhas das goiabeiras (*Psidium guajava* L.) demonstraram atividade larvicida promissora em larvas de *A. aegypti*. No entanto, a existência de quimiotipos distintos de óleos essenciais nessa espécie torna necessário o conhecimento se essa variação influencia na atividade larvicida. Os óleos essenciais das cultivares SEC, C4, C6, PAL e PET foram avaliados quanto ao efeito larvicida em *A. aegypti* e se mostraram muito eficientes,

com CL_{50} que variam de 39,48 a 64,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. SEC apresentou-se como a cultivar mais promissora, pois além de ter menor valor de CL_{50} , teve maior rendimento de extração, que variou de 0,15 a 0,37% para as cinco cultivares. O perfil cromatográfico dos óleos essenciais apresentou majoritariamente sesquiterpenos, permitindo inferir que esse grupo de compostos contribui para o efeito larvicida, corroborando com trabalhos que utilizaram esses padrões e em maioria apresentaram toxicidade às larvas de *A. aegypti*. Entretanto, não se pode excluir a presença, mesmo que minoritária, dos outros compostos, que podem estar auxiliando na atividade biológica avaliada. Ainda, a utilização dos óleos essenciais, além de ser mais uma alternativa ao controle de um inseto vetor de doenças, pode gerar novas fontes de recursos aos produtores de goiaba, uma vez que na condução da cultura grande quantidade de matéria vegetal é gerada em decorrência das sucessivas podas para a produção.

Palavras-chave: *Psidium guajava*; atividade larvicida; sesquiterpenos.

Abstract:

The mosquito *Aedes aegypti* L. is one of the largest vectors of pathogens, including dengue and chikungunya viruses and the control of this vector is a challenge. Currently, mainly synthetic insecticides are used to control the vector, which are efficient, but they rise a series of environmental problems. Natural products are an alternative method because they are effective, easily biodegradable and inexpensive. In this context, recently the essential oils of guava leaves (*Psidium guajava* L.) have shown promising larvicidal activity against *A. aegypti* larvae. However, the existence of different chemotypes of essential oils in this species makes it necessary to know if this variation influences larvicidal activity. The essential oils of the cultivars SEC, C4, C6, PAL and PET were evaluated for the larvicidal effect in *A. aegypti* and were very efficient, with LC_{50} ranging from 39.48 to 64.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. SEC presented the most promising cultivar, because in addition to having a lower value of LC_{50} , it had a higher extraction yield, which varied from 0.15 to 0.37% for the five cultivars. The chromatographic profile of the essential oils presented mainly sesquiterpenes, allowing to infer that this group of compounds contributes to the larvicidal effect, corroborating with works that used these standards and in the majority presented toxicity to the larvae of *A. aegypti*. However, the presence, even if minority, of the

other compounds, which may be assisting in the evaluated biological activity can not be excluded. Moreover, the use of essential oils, besides being an alternative to the control of insect vectors, can generate new income sources for guava producers, since in the conduction of the crop a large amount of vegetal matter is generated as a result of successive prunings.

Keywords: *Psidium guajava*; larvicidal activity; sesquiterpenes.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus da dengue, zika e a febre chikungunya, são exemplos de patógenos transmitidos pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae) e ocorrem principalmente em regiões urbanas tropicais e subtropicais do mundo devido à capacidade de adaptação do mosquito transmissor a esses ambientes (RAJ et al., 2015; TAUIL, 2014). O aumento de ocorrência da dengue e de outras viroses tem sido preocupação para a sociedade e autoridades de saúde, uma vez que houve aumento de casos ao longo das últimas décadas ligados à proliferação do principal vetor, o *Aedes aegypti* L. (VIANA; IGNOTTI, 2013).

Uma das principais formas de combater esse vetor é através de produtos químicos, como os piretroides principalmente e organofosforados (MACORIS et al., 2014). Apesar de esses compostos serem eficientes, vários estudos têm demonstrado que a aplicação contínua de inseticidas orgânicos sintéticos pode dar origem ao desenvolvimento de populações resistentes de *A. aegypti* (CADAVID-RESTREPO; SAHAZA; ORDUZ, 2012; MELO-SANTOS et al., 2010). Além disso, a utilização desses produtos possui efeito nocivo à saúde humana e ao ambiente (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008). Essas preocupações alertam a comunidade científica para a busca de alternativas no controle dos vetores de doenças (BEZERRA-SILVA et al., 2016).

Uma opção de controle do *A. aegypti* é a utilização de compostos naturais que tenham efeito larvicida ou inseticida. Os produtos naturais geralmente são preferidos por serem menos nocivos aos organismos não alvos, devido a sua biodegradabilidade, eficiência e baixo custo (GOVINDARAJAN et al., 2011). Assim,

novas alternativas têm sido pesquisadas, como a utilização de bactérias (WILLIAMS et al., 2014) e óleos essenciais com efeito larvicida (DIAS et al., 2015).

Espécies vegetais que apresentam atividade larvicida em vetores, a exemplo das goiabeiras (*Psidium guajava* L.), com ampla ocorrência no país, são de fácil acesso e reconhecimento pela população, podendo ser relevantes na elaboração de alternativas de controle. Recentemente os óleos essenciais das folhas das goiabeiras demonstraram atividade larvicida em *A. aegypti* (LIMA et al., 2011). Outras espécies vegetais com características de óleos essenciais similares, formados majoritariamente por mono e sesquiterpenos, também têm mostrado eficiência para esse fim, como *Psidium myrsinites*, *Eugenia piauiensis*, *Siparuna camporum*, *Lippia gracilis* (DIAS et al., 2015), *Piper aduncum* (OLIVEIRA et al., 2013), *Nigella sativa* (RAJ et al., 2015), *Murraya exótica* (KRISHNAMOORTHY et al., 2015), *Feronia limonia* (SENTHILKUMAR; JAYARAMAN; VENKATESALU, 2012) e *Mentha spicata* (GOVINDARAJAN et al., 2011).

Mas, embora com atividades larvicidas comprovadas, os óleos essenciais podem apresentar variações nas composições químicas devido a causas genéticas, ambientais e do estágio de desenvolvimento da planta (KÜLHEIM et al., 2015; MORAIS, 2009). Essas variações podem interferir em suas bioatividades e conseqüentemente nos potenciais usos. Quanto ao fator genético, cultivares de goiabeiras brasileiras apresentaram quimiotipos distintos relatados (SOUZA et al., 2017). Quimiotipos representam a diversificação da composição química do óleo essencial, resultante da interação entre as características genéticas da planta e das condições ambientais (JANNUZZI et al., 2011). O estudo de cultivares é importante pela padronização do genótipo, pela busca de cultivares mais eficientes para o fim indicado e também por agregar valor ao material vegetal foliar, pois durante o manejo da cultura ocorre grande disponibilidade de folhas em função das sucessivas podas para a produção.

Neste estudo, objetivou-se avaliar a ocorrência de variações nas atividades de óleos essenciais oriundos de cinco cultivares de goiabeiras, de quimiotipos distintos, comercialmente cultivadas no Brasil em relação ao efeito larvicida em *A. aegypti*. Para isso, a concentração e constituição química dos óleos essenciais de cada cultivar foram obtidas, visando direcionamento de aplicação baseado na maior

eficiência em larvas desse vetor. Os resultados obtidos agregam conhecimentos quanto à adoção de alternativas no controle do *A. aegypti* com a espécie *P. guajava*, amplamente disseminada no país.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras vegetais foram coletadas no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, situado na latitude sul (20° 45'), longitude oeste (41° 31') e altitude de 254 metros. O pomar experimental utilizado nesse estudo está localizado no município de Alegre desde julho de 2013, estando sob condições naturais, sem irrigação, sombreamento e podas. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal e laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES) e no laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG).

2.1. Coleta e extração dos óleos essenciais das folhas de cinco cultivares de *P. guajava*

Material vegetal - Foram coletadas folhas de cinco cultivares de *P. guajava*: Paluma (PAL), Século XXI (SEC), Petri (PET), Cortibel Branca LG (C4) e Cortibel RM (C6). O experimento foi instalado em DBC, sendo três blocos. Para cada cultivar utilizada, foram realizadas coletas utilizando plantas de todos os blocos de forma a tornar aleatória qualquer diferença entre elas. As coletas foram realizadas às 9h da manhã do dia 20/02/16. Foram retiradas folhas na altura do peito (1,3 m) e ao redor do diâmetro da copa. Cerca de 1000 folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para obtenção do óleo para a caracterização dos compostos químicos e para os ensaios larvicidas. O material foi acondicionado em sacos de papel, identificado e transportado para o laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do CCAUE-UFES. As folhas foram secas à sombra e em temperatura ambiente por uma semana. Esse processo tem, entre outros objetivos, o de reduzir tempo e custo de destilação, aumentar a estabilidade do produto, inibir atividade enzimática, que pode decompor ou modificar os princípios aromáticos originais e estabilizar cor, odor, sabor e textura (CERIMELE; RINGUELET, 2008). Posteriormente, as folhas secas

foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 100 g de folhas secas 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 e o óleo foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegido de luminosidade.

2.2. Determinação do rendimento da extração dos óleos essenciais

Foram determinados os rendimentos das extrações dos cinco óleos essenciais a fim de observar se além de eficientes, por apresentarem efeito larvicida, são viáveis de serem utilizados. Essa viabilidade pode ser demonstrada por um bom rendimento, por exemplo. Para isso, foi utilizada, em triplicata, a razão massa seca da planta em relação à massa do óleo extraído ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$). A pesagem foi realizada no laboratório de Preparo de Amostra Vegetal do CCAE-UFES, utilizando uma balança analítica (Shimadzu AUY220) com quatro casas decimais.

2.3. Perfil cromatográfico de 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 $50,9$

cm.seg⁻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.seg⁻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 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 Kovats (IK). Para o cálculo dos IK, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇-C₄₀ (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; EL-SAYED, 2016; 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. Ação larvicida dos óleos essenciais em larvas de *A. aegypti*

Para verificar a bioatividade do óleo essencial frente às larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti* (PPCampos strain, Campos dos Goytacazes, RJ), foram realizados ensaios no laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia da UFV durante os dias 13 e 25 de junho de 2016. As larvas foram obtidas a partir de uma colônia de sucessivas gerações mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV. As larvas foram eclodidas e mantidas em água de clorada, 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) e WHO (2005), com algumas adaptações.

Os ensaios biológicos foram realizados em quintuplicata com 25 larvas por tratamento. Foram utilizados cinco óleos essenciais de cultivares de *P. guajava* previamente selecionados a partir dos resultados obtidos por Souza et al. (2017). As cultivares PAL e SEC foram escolhidas para o ensaio larvicida por apresentarem um alto rendimento do óleo essencial, além da PAL ser a mais cultivada no Brasil (PEREIRA; KAVATI, 2011). A variedade PET foi selecionada por ser considerada por Souza et al. (2017) uma das cultivares, com composição química dos óleos essenciais, menos afetada pelo ambiente. As cultivares C4 e C6 foram selecionadas, pois a C4, em ensaio prévio, apresentou efeito larvicida e juntamente com a C6 apresentaram um bom rendimento, além de apresentarem quimiotipos distintos das demais.

Para os ensaios larvicidas, foram preparadas soluções dos cinco óleos essenciais com DMSO 1% (v.v⁻¹) nas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 e 100 µg.mL⁻¹ para as cultivares SEC, C4 e C6; além dessas concentrações foi utilizado 70 µg.mL⁻¹ para as cultivares PAL e PET. 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 fotoperíodos de 12 horas. Além disso, uma solução controle foi

preparada utilizando DMSO 1% como controle negativo e solução de Deltametrina $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Decis 25 EC, 25 g.L^{-1} , concentrado emulsionável, Bayer S. A., São Paulo, SP) como controle positivo (CL_{90}).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), seguindo o esquema fatorial 3×8 (óleos essenciais x concentrações) para SEC, C4 e C6; 2×9 (óleos essenciais x concentrações) para PAL e PET, totalizando 42 tratamentos com cinco repetições em cada, de modo que foram realizados 210 ensaios. Além desses, foi utilizado controle positivo, com cinco repetições. O ensaio com o controle negativo sempre era realizado antes de iniciar os experimentos, utilizando cinco repetições. Dessa forma, foram totalizados 215 ensaios, utilizando 5375 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.

2.5. Análise estatística dos dados

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

Para comparar os rendimentos dos óleos essenciais das cinco cultivares, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do Programa R, versão 3.3.2 (R, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento dos óleos essenciais

As cultivares SEC, PAL e C4 apresentaram os maiores rendimentos ($\% \text{ m.m}^{-1}$) de extrações dos óleos essenciais (0,35%, 0,37% e 0,33%, respectivamente) e diferiram significativamente das cultivares C6 e PET (0,18% e 0,15%,

respectivamente). A maioria dos rendimentos obtidos foi menor que os relatados para as mesmas cultivares em condição de cultivo, com adubação, irrigação e podas para a produção, descritos por Souza et al. (2017), na qual os rendimentos foram de 0,32, 0,54, 0,34, 0,50 e 0,42% para SEC, PAL, C4, C6 e PET, respectivamente. Por outro lado, Lima et al. (2010) obtiveram rendimentos menores de SEC e PAL de 0,11 e 0,09%, respectivamente.

São encontrados diferentes valores de rendimentos de óleos essenciais de goiabeiras sem especificar o genótipo, com 0,4% (KAMRAN et al., 2012) e 0,11% (SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1998). Deve-se considerar que apesar desses resultados terem sido expressos na razão da massa seca da planta em relação à massa do óleo, diferentes metodologias de extração foram utilizadas em espécies sob diferentes condições de cultivo, o que justifica as diferenças observadas. Apesar dessas variações, os rendimentos obtidos neste trabalho estão dentro do esperado, de acordo com o que outros pesquisadores encontraram. Adicionalmente, os valores de rendimentos obtidos estão próximos aos encontrados em espécies exploradas comercialmente (SANTOS, 2011).

3.2. Atividade larvicida

Os óleos essenciais obtidos das cinco cultivares de *P. guajava* apresentaram atividade larvicida, em concentrações variando entre 39,48 e 64,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para obtenção das CL_{50} e de 57,34 a 86,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CL_{90} . As cultivares diferiram quanto ao efeito larvicida e foram organizadas em ordem decrescente de atividade dos óleos. O modelo probit se ajusta aos dados ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Toxicidade dos óleos essenciais de cultivares de *Psidium guajava* em larvas de *Aedes aegypti*.

Cultivar	n ^a	Inclinação ± EP ^b	CL ₅₀ (IC à 95%) ^c	CL ₉₀ (IC à 95%) ^d	Razão de toxicidade (CL ₅₀)	Razão de toxicidade (CL ₉₀)	χ ^{2e}	p ^f
SEC	1000	0,12 ± 0,01	39,48 (30,61-50,85)	57,34 (46,41-71,09)	1,00	1,00	0,04	1,00
C4	1000	0,11 ± 0,01	51,11 (39,91-65,46)	71,56 (58,01-88,64)	0,77	0,80	0,04	1,00
C6	1000	0,11 ± 0,01	53,47 (41,71-68,54)	73,84 (59,73-91,68)	0,74	0,78	0,02	1,00
PAL	1125	0,12 ± 0,01	63,35 (49,51-81,13)	82,44 (66,40-102,76)	0,62	0,70	0,04	1,00
PET	1125	0,11 ± 0,01	64,25 (50,12-81,71)	86,00 (68,30-104,94)	0,61	0,67	0,03	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. Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET).

Como ainda não há uma faixa de concentração padrão para determinar a eficiência da atividade larvicida em óleos essenciais, alguns pesquisadores sugerem alguns critérios. Segundo Komalamisra et al. (2005), óleos essenciais com CL_{50} menor que $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados de plantas promissoras, sendo muito eficientes; valores entre 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são moderadamente ativos; entre 100 e $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são eficazes e acima disso são considerados inativos para ensaios larvicidas, sob 48 horas de exposição ao óleo. De acordo com Kiran et al. (2006), são considerados óleos com efeito larvicida significativo, aqueles com CL_{50} menor do que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sob avaliação de 24 horas. Deve-se considerar que esses critérios estão relacionados ao tempo de exposição aos óleos e à origem das larvas, os quais podem alterar os valores de CL_{50} . Ambos os autores utilizaram larvas de *A. aegypti* mantidas em laboratório em sucessivas gerações.

Nos ensaios não foram observadas larvas mortas no controle negativo, constituído por solução de DMSO 1%. 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 $(90,4 \pm 2,2)\%$, demonstrando a eficiência desse composto.

Os valores de CL_{50} encontrados para os cinco óleos essenciais avaliados neste estudo foram menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, podendo ser considerados ativos em L4 de *A. aegypti*, de acordo com os critérios estabelecidos pelos autores citados (Figura 1). No APÊNDICE foram apresentadas as curvas com seus respectivos intervalos de confiança à 95%.

A atividade larvicida do óleo essencial pode ocorrer por diferentes mecanismos. A mortalidade ou deformidades em diferentes estágios de desenvolvimento pode ocorrer com repelência e dissuasão, sendo a atividade repelente o modo de ação mais comum do óleo essencial e seus principais compostos. Devido ao efeito de contato, o óleo pode atuar em enzimas digestivas e neurológicas e interagir com tegumento do inseto (ISMAN, 2006). Durante os ensaios foram observados tremores seguidos por paralisia e permanência das larvas no fundo dos recipientes, levando a morte.

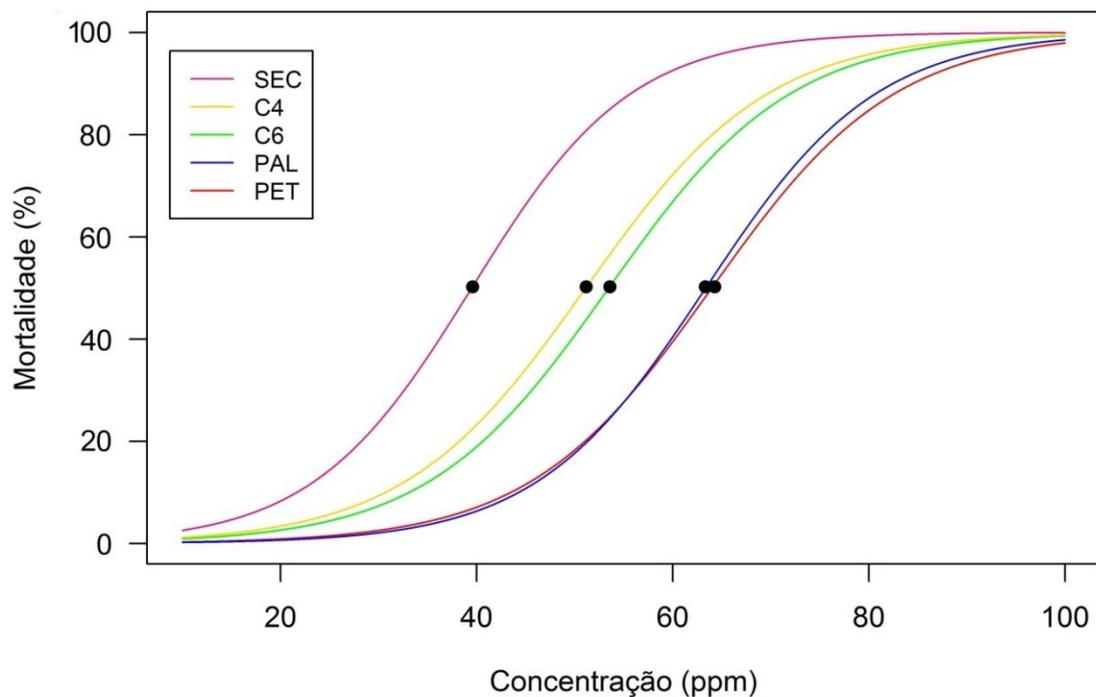


Figura 1. Curvas de mortalidade das larvas após 24h de exposição aos óleos essenciais das cultivares: Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4) e Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET). Os pontos marcados em preto demonstram os valores de CL_{50} = Concentração Letal média para matar 50% da população (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A cultivar SEC apresentou destaque, por ter os menores valores de CL_{50} e CL_{90} . As cultivares C4 e C6 tiveram um comportamento similar quanto à eficiência dos seus óleos e o mesmo foi observado para as cultivares PAL e PET (Figura 1).

Em ensaio larvicida realizado por Lima et al. (2011) com óleo essencial de *P. guajava* em *A. aegypti*, foi relatado o valor de CL_{50} de $24,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (LIMA et al., 2011), porém, sem definir o genótipo utilizado, o que é um problema para essa espécie, que possui polinização cruzada e ampla variabilidade genética (COSER et al., 2014). Aliado a isso, a existência de diferentes quimiotipos de óleos essenciais de goiabeiras (SOUZA et al., 2017), demonstra a necessidade de avaliar diferenças nas atividades dos óleos em função das cultivares, visando identificar as mais indicadas para esse fim. Alterações na composição dos óleos podem ser as responsáveis por diferenças nos efeitos biológicos, o que foi observado através dos resultados obtidos neste trabalho.

3.3. Composição química dos óleos essenciais

Variações quali e semiquantitativas foram observadas entre os óleos essenciais das cultivares, fato que justifica os diferentes valores de CL encontrados e os efeitos variados nas eficiências dos cinco óleos essenciais avaliados.

Vinte e nove compostos com área relativa >1% foram identificados (Figura 2 e 3 e Tabela 2), os quais totalizaram mais de 90% das composições dos óleos essenciais das cinco cultivares. Todos eles apresentaram mais de 70% de sesquiterpenos em suas constituições e teores relativamente baixos de monoterpenos. O único composto encontrado que não possui natureza terpênica foi o Benzaldehyde em baixo teor (1,7%) na cultivar C4.

A cultivar SEC, mais eficiente quanto à atividade larvicida, apresentou 100% da constituição do óleo de sesquiterpenos, dos quais 51,5% foram hidrogenados e 48,5% oxigenados. Essa característica a diferiu dos óleos das demais cultivares, que além de sesquiterpenos, apresentaram monoterpenos e Benzaldehyde. Vários trabalhos associam a presença de um padrão sesquiterpênico majoritário à atividade larvicida em *A. aegypti* (GOIS et al., 2011; KIRAN et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2010; SANTOS et al., 2006), pois os óleos exibiram toxicidade às larvas com baixos valores de CL_{50} , chegando a $16,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (KIRAN et al., 2006) utilizando *Chloroxylon swietenia*, em experimento com 24h de exposição dos óleos às larvas. Nesses trabalhos é possível observar óleos essenciais com presença majoritária de (E)-Caryophyllene (SANTOS et al., 2006) e Caryophyllene oxide (GOIS et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010), que também foram identificados nos óleos essenciais dos cinco genótipos de *P. guajava*.

As cultivares C4 e C6, que tiveram atividade larvicida intermediária, além de grande quantidade de sesquiterpenos, apresentaram monoterpenos hidrogenados, diferindo das demais cultivares que não apresentaram esses compostos com área relativa >1%. Govindarajan, Rajeswary e Benelli (2016), ao estudarem os óleos essenciais de *Pinus kesiya*, observaram a presença majoritária de monoterpenos hidrogenados e atividade larvicida em *A. aegypti* com CL_{50} de $57,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores atribuíram a atividade biológica principalmente à presença desses compostos. Dessa forma, os monoterpenos hidrogenados, aliados a grande

quantidade de sesquiterpenos, podem estar contribuindo para a maior eficiência de C4 e C6 em relação a PAL e PET.

Os perfis cromatográficos dos óleos de PAL e PET foram constituídos majoritariamente por sesquiterpenos oxigenados, bem como também apresentaram monoterpenos oxigenados. Essas cultivares tiveram resultados inferiores em relação à atividade larvicida em *A. aegypti*.

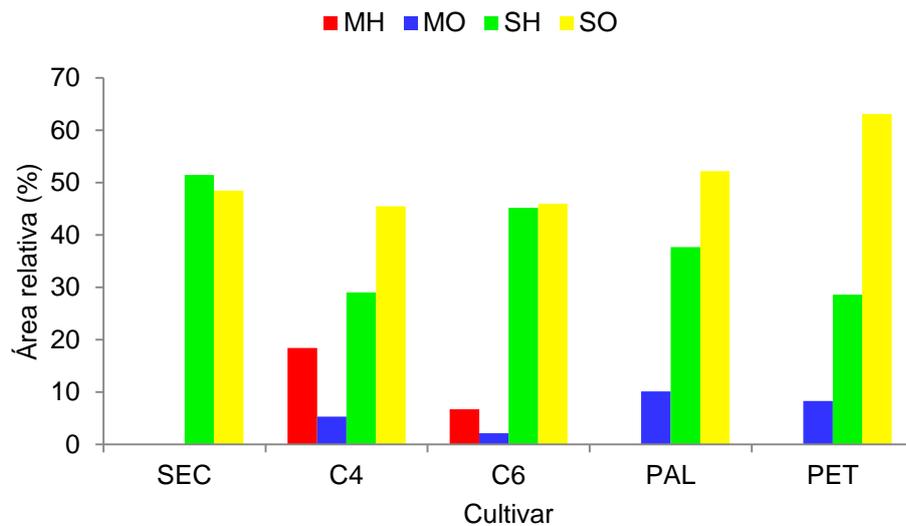
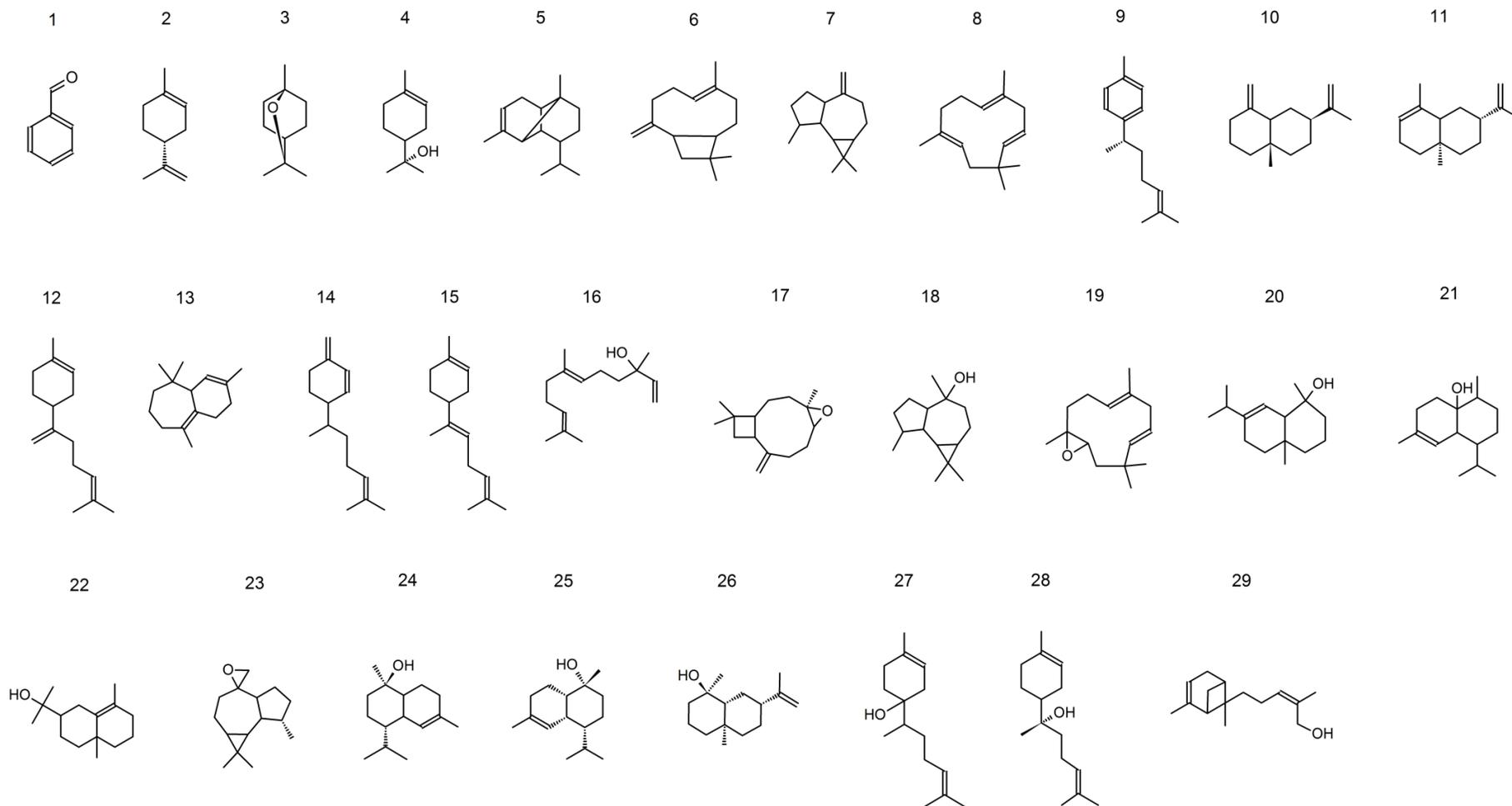


Figura 2. Área relativa das classes terpênicas em relação às cultivares Sécuro XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET). Monoterpeno hidrogenado (MH), Monoterpeno oxigenado (MO), Sesquiterpeno hidrogenado (SH) e Sesquiterpeno oxigenado (SO).

Os compostos que tiveram área relativa >10% estão em destaque na Tabela 2. Em trabalhos que avaliaram a atividade larvicida, após 24h, utilizando larvas de *A. aegypti* em exposição aos padrões majoritários em destaque, a maioria mostrou bioatividade (PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009; RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010; ROCHA et al., 2015; SILVA et al., 2008; SUTTHANONT et al., 2010).



1 – Benzaldehyde; 2 – Limonene; 3 – 1,8-Cineole; 4 – α -Terpineol; 5 – α -Copaene; 6 – (E)-Caryophyllene; 7 – Aromadendrene; 8 – α -Humulene; 9 – α -Curcumene; 10 – β -Selinene; 11 – α -Selinene; 12 – β -Bisabolene; 13 – β -Himachalene; 14 – β -Sesquiphellandrene; 15 – α -Bisabolene; 16 – (E)-Nerolidol; 17 – Caryophyllene oxide; 18 – Ledol; 19 – Humulene epoxide; 20 – Selina-6-en-4-ol; 21 – epi-Cubenol; 22 – γ -Eudesmol; 23 – Aromadendrene epoxide; 24 – τ -Cadinol; 25 – α -Muurolol; 26 – Selin-11-en-4 α -ol; 27 – β -Bisabolol; 28 – α -Bisabolol; 29 – (Z,E)- α -Bergamotol. Monoterpeno hidrogenado: 2; Monoterpeno oxigenado: 3-4; Sesquiterpeno hidrogenado: 5-15; Sesquiterpeno oxigenado: 16-29.

Figura 3. Estruturas químicas dos 29 compostos identificados em cinco cultivares de *Psidium guajava*.

Tabela 2. Identificação química e área relativa (%) dos compostos presentes nos óleos essenciais de cinco cultivares de *Psidium guajava*.

n	Composto ^a	IK _{cal} ^b	IK _{tab} ^c	Cultivar / A _{rel} (%) ^d				
				SEC	C4	C6	PAL	PET
1	Benzaldehyde	960	952	-	1,7	-	-	-
2	Limonene	1028	1024	-	17,8	6,5	-	-
3	1,8-Cineole	1031	1026	-	5,1	2,0	8,4	7,6
4	α -Terpineol	1190	1186	-	-	-	1,4	-
5	α -Copaene	1375	1374	1,8	-	-	1,2	-
6	(E)-Caryophyllene	1417	1417	26,6	7,6	9,4	19,4	10,2
7	Aromadendrene	1438	1437	4,3	-	-	2,9	-
8	α-Humulene	1452	1452	3,3	-	16,5	2,5	1,6
9	α -Curcumene	1484	1487	-	4,5	3,4	-	-
10	β -Selinene	1486	1489	7,6	-	-	5,6	8,2
11	α -Selinene	1495	1498	6,5	2,2	-	4,9	6,3
12	β -Bisabolene	1509	1505	-	5,6	6,3	-	-
13	β -Himachalene	1511	1500	-	2,9	2,8	-	-
14	β -Sesquiphellandrene	1524	1521	-	2,8	2,9	-	-
15	α -Bisabolene	1533	1536	-	2,6	2,5	-	-
16	(E)-Nerolidol	1566	1561	3,8	6,9	7,4	3,4	-
17	Caryophyllene oxide	1582	1582	15,5	3,2	3,7	16,6	8,0
18	Ledol	1600	1602	1,3	-	-	1,3	-
19	Humulene epoxide	1608	1608	-	-	6,0	-	-
20	Selina-6-en-4-ol	1612	1615	-	1,6	-	-	1,9
21	epi-Cubenol	1629	1627	2,7	2,8	2,5	2,8	6,7
22	γ -Eudesmol	1632	1630	3,2	-	3,8	3,7	1,8
23	Aromadendrene epoxide	1639	1639	8,1	-	1,5	9,2	9,5
24	τ -Cadinol	1643	1640	1,6	-	-	1,6	7,9
25	α -Muurolol	1648	1644	1,8	-	-	1,9	2,5
26	Selin-11-en-4α-ol	1658	1658	6,7	3,5	-	7,4	16,7
27	β-Bisabolol	1673	1674	2,4	19,5	15,1	2,7	3,0
28	α -Bisabolol	1685	1685	-	1,6	2,8	-	-
29	(Z,E)- α -Bergamotol	1689	1690	-	4,9	1,8	-	-
Total identificado				97,2	96,8	96,9	96,9	91,9
Monoterpeno Hidrogenado				-	18,4	6,7	-	-
Monoterpeno Oxigenado				-	5,3	2,1	10,1	8,3
Sesquiterpeno Hidrogenado				51,5	29,0	45,2	37,7	28,6
Sesquiterpeno Oxigenado				48,5	45,5	46,0	52,2	63,1
Outros				-	1,8	-	-	-

^aCompostos listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bÍndice de Kovats calculado através de dados obtidos por amostra de n-alcenos saturados (C₇-C₄₀). ^cÍndice de Kovats tabelado (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2016; NIST, 2011). ^dForam identificados compostos com áreas relativas >1%. Cultivares: Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET).

O monoterpeneo hidrogenado Limonene, presente somente nas cultivares C4 e C6, apresentou grande eficiência em L4 de *A. aegypti* quando avaliado isoladamente, com CL_{50} de $17,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ROCHA et al., 2015). Essa eficiência pode justificar o melhor resultado em detrimento das cultivares PAL e PET. Para o composto (E)-Caryophyllene (SH), foi obtido CL_{50} de $88,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009). O α -Humulene (SH), apesar de não ter sido encontrado, sendo avaliado separadamente, é um composto majoritário (31,93%) do óleo essencial de *Zingiber zerumbet*. Essa espécie, apresentou CL_{50} de $48,88 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e provavelmente o α -Humulene está contribuindo para a atividade larvívica (SUTTHANONT et al., 2010). O Caryophyllene oxide (SO), por outro lado, contribui menos para o efeito biológico avaliado, com CL_{50} de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SILVA et al., 2008). O óleo essencial de *Artemisia argyi*, que possui majoritariamente o composto Selin-11-en-4 α -ol (18,0%) (SO), não apresentou atividade larvívica quando avaliado na concentração máxima de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ÖZEK et al., 2014). O β -Bisabolol (SO), em maior proporção nas cultivares C4 e C6, apresentou CL_{50} de $33,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em L4 de *A. aegypti* (RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010).

Em todas as cultivares o sesquiterpeneo hidrogenado (E)-Caryophyllene esteve presente variando entre 7,6 e 26,6%, além dos sesquiterpenos oxigenados Caryophyllene oxide (3,2 a 16,6%) e β -Bisabolol (2,4 a 19,5%). É possível inferir que esses compostos devem contribuir para o efeito larvívica. Mas, não se pode excluir a presença de todos os outros compostos, inclusive os minoritários, que fazem parte dos óleos e também podem estar auxiliando na atividade biológica avaliada. A bioatividade da mistura, em alguns casos, é mais elevada do que de compostos purificados (ROSA et al., 2016). Isto pode ser explicado pelas interações entre os constituintes presentes nos óleos e a presença de compostos minoritários, que podem ser biologicamente ativos, atuando de forma sinérgica (KIRAN et al., 2006).

4. CONCLUSÃO

Existe diferença no efeito larvívica em *A. aegypti* utilizando óleos essenciais de cinco cultivares de *P. guajava*, das quais a SEC foi a que mais se destacou com menor valor de CL_{50} , seguida de C4, C6, PAL e PET. Além disso, ao analisar os

rendimentos dos óleos obtidos, SEC encontra-se no grupo das cultivares com maiores rendimentos, juntamente com PAL e C4. Os valores de rendimentos obtidos estão dentro dos encontrados em espécies que são exploradas comercialmente.

As diferenças nos efeitos estão relacionadas à composição química dos óleos essenciais que variaram quali e semiquantitativamente, entretanto com composição majoritária de sesquiterpenos. Apesar das diferenças, todos os óleos essenciais poderiam ser indicados para o fim proposto, já que foram considerados eficientes por serem letais às L4 utilizando baixas concentrações dos óleos.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. EUA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ARIAS-ESTÉVEZ, M. et al. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, n. 4, p. 247-260, 2008.

BEZERRA-SILVA, P. C. et al. Evaluation of the Activity of the Essential Oil from an Ornamental Flower against *Aedes aegypti*: Electrophysiology, Molecular Dynamics and Behavioral Assays. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010, v. 2, 899 p.

CADAVID-RESTREPO, G.; SAHAZA, J.; ORDUZ, S. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 74-79, 2012.

CERIMELE, E.; RINGUELET, J. A. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas. In: **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória, ES: EDUFES, 2008.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

COSER, S. M. et al. Diversidade genética de seleções de goiabeiras Cortibel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 391-399, 2014.

DIAS, C. N. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, São Luís, v. 2015, n. 490765, p. 1-8, 2015.

EL-SAYED, A. M. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 10 outubro 2016.

GOIS, R. W. da S. et al. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 59-62, 2011.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, Tamil Nadu, Índia, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Tamil Nadu, Índia, v. 129, p. 85-90, 2016.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

JANNUZZI, H. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

KAMRAN, A. et al. Therapeutic Effects of Essential Oil from Waste Leaves of *Psidium guajava* L. against Cosmetic Embarrassment Using Phylogenetic Approach. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 745-752, 2012.

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2481-2484, 2006.

KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 36, n. 6, p. 1412-1422, 2005.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. Identification of chemical constituents and larvicidal activity of essential oil from *Murraya exotica* L. (Rutaceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Tamil Nadu, Índia, v. 114, n. 5, p. 1839-1845, 2015.

KÜLHEIM, C. et al. The *Eucalyptus* terpene synthase gene family. **BMC Genomics**, Canberra, v. 16, n. 450, p. 1-18, 2015.

LIMA, R. K. de. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 41-44, 2010.

LIMA, M. A. A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, 2011.

MACORIS, M. de L. da G. et al. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 573-578, 2014.

MAGALHÃES, L. A. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four guarea species. **Molecules**, Manaus, v. 15, p. 5734-5741, 2010.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Jaguariúna, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Database 69. **NIST Chemistry WebBook**, 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 21 janeiro 2016.

OLIVEIRA, G. L. et al. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, 2013.

ÖZEK, G. et al. Chemical Diversity and Biological Activity of the Volatiles of Five *Artemisia* Species from Far East Russia. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 3, p. 242-261, 2014.

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

PERUMALSAMY, H.; KIM, N.; AHN, Y. Larvicidal Activity of Compounds Isolated From *Asarum heterotropoides* Against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 6, p. 1420-1423, 2009.

RAJ, G. A. et al. Phytochemical profile and larvicidal properties of seed essential oil from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Tamil Nadu, Índia, v. 114, n. 9, p. 3385-3391, 2015.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the

chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

ROCHA, D. K. et al. Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* Essential Oils from Portugal and Cape Verde. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 677-682, 2015.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

SANTOS, A. da S. **Óleos essenciais: Uma abordagem econômica e industrial**. Interciência, 2011.

SANTOS, R. P. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **J. Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 1027-1030, 2006.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the Antinociceptive Effect of *Psidium guajava* Leaf Essential Oil and its Major Constituents. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 24-27, 1998.

SENTHILKUMAR, A.; JAYARAMAN, M.; VENKATESALU, V. Chemical constituents and larvicidal potential of *Feronia limonia* leaf essential oil against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**, Tamil Nadu, Índia, v. 112, n. 3, p. 1337-1342, 2012.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SOUZA, T. da S. de. et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

SUTTHANONT, N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n. 1, p. 106-115, 2010.

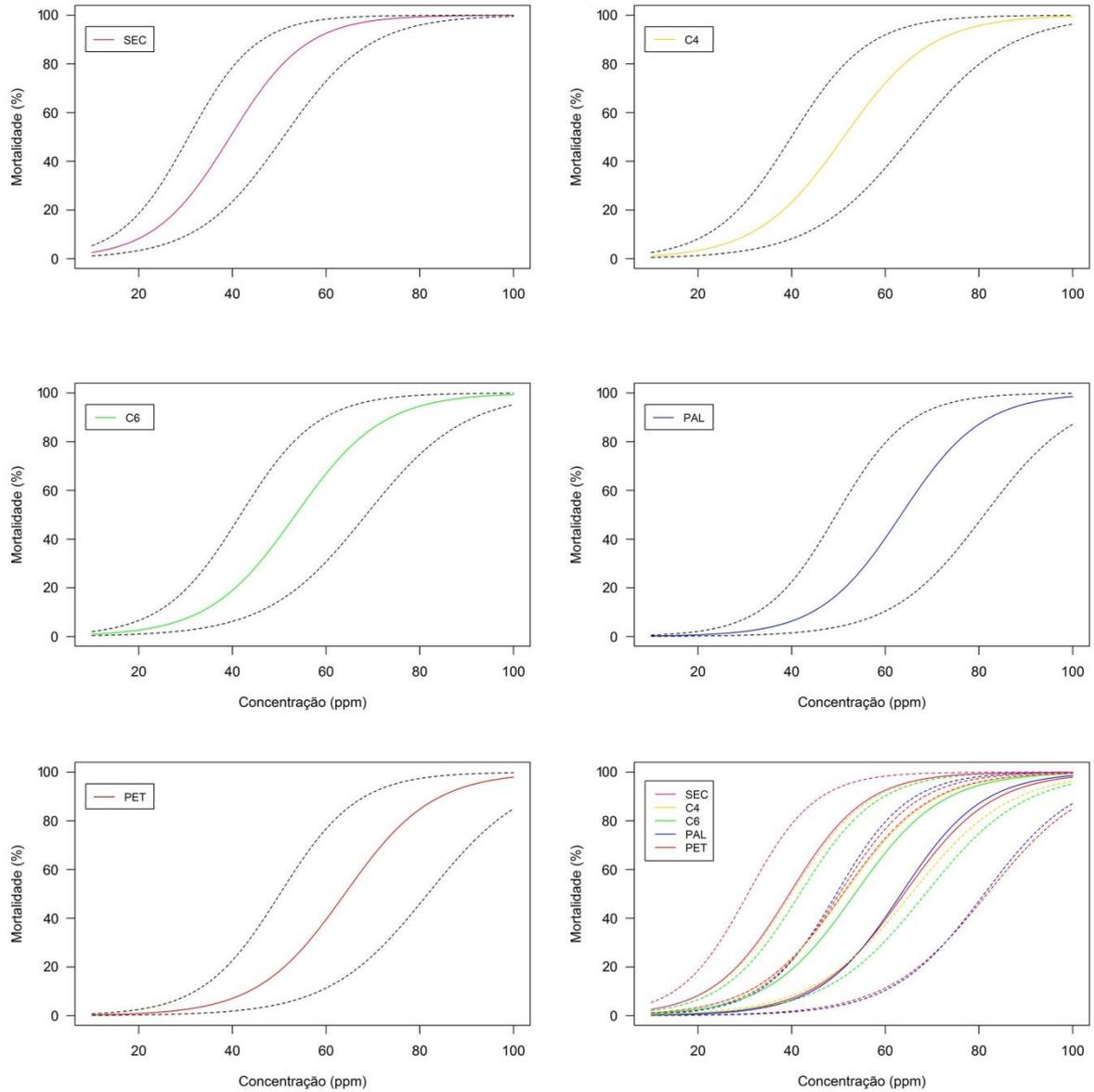
TAUIL, P. L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 773-774, 2014.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240-256, 2013.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva, Switzerland, 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>. Acesso em: 9 março 2016.

WILLIAMS, G. M. et al. Area-Wide Ground Applications of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the Control of *Aedes albopictus* in Residential Neighborhoods: From Optimization to Operation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

6. APÊNDICE



Curvas de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* e respectivos intervalos de confiança à 95%. Cultivares: Século XXI (SEC), Cortibel Branca LG (C4), Cortibel RM (C6), Paluma (PAL) e Petri (PET).

4. CONCLUSÃO GERAL

Os óleos essenciais das folhas de 21 genótipos de *P. guajava* apresentaram predominância de sesquiterpenos e variabilidade quali e semiquantitativa na composição química entre genótipos e durante o ano. Sendo que a qualitativa, ao avaliar o mesmo genótipo na sazonalidade, foi menos relevante, haja vista que ocorre em genótipos que apresentaram compostos com menor área relativa. As mudanças no perfil cromatográfico ocorrem de modo que foram formados agrupamentos diferentes entre os genótipos, considerando a sazonalidade.

A primavera, estação que coincidiu com a época de florescimento das cultivares, diferiu mais significativamente das outras em relação à composição dos óleos essenciais. Essa mudança no perfil químico deve estar associada à maior demanda de alguns compostos nas flores em detrimento das folhas, ocasionando um redirecionamento da via metabólica.

Em relação aos ensaios larvicidas, os óleos essenciais das cinco cultivares selecionadas foram eficientes no combate às larvas de *A. aegypti*. SEC foi a que mais se destacou com menor valor de CL_{50} , além de apresentar um dos melhores rendimentos de extração. Uma das vantagens da utilização de produtos naturais é de ser uma alternativa menos danosa ao ambiente. Além disso, pode agregar valor ao produtor de goiabeiras, através das folhas geradas nas podas periódicas que ocorrem.

Buscando gerar o melhoramento de genótipos superiores e cultivares, este trabalho apresenta a importância de conhecê-los individualmente, com objetivo de obter uma potencial aplicação.

5. REFERÊNCIAS

AGUILERA, L. et al. Efecto letal de Myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 55, n. 2, p. 100-104, 2003.

ALMEIDA, L. F. R. de. et al. Non-Oxygenated Sesquiterpenes in the Essential Oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the Day in the Dry Season. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

ALVES, P. M. et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, 2006.

AMARAL, A. C. F. et al. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2006. 148 p.

ANDRADE, A. M. de.; GOMES, S. da S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 181-189, 2000.

ANDRADE, I. L. de. et al. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5879-5881, 2004.

ARRAIS, L. G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana e farmacológica de *Croton pulegioides* Baill. (EUPHORBIACEAE)**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2007.

BANDEIRA, J. M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BARDAWEEL, S. K. et al. Studies on the *in vitro* antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Jordan, v. 2015, n. 790838, p. 1-6, 2015.

BATISTA, P. F. et al. Quality of different tropical fruit cultivars produced in the Lower Basin of the São Francisco Valley. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 1, 2015.

BIRDI, T. J.; BRIJESH, S.; DASWANI, P. G. Bactericidal effect of selected anti-diarrhoeal medicinal plants on intracellular heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli*. **Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 3, p. 229-235, 2014.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, 2010.

CANAL, D. **Prospecção de genes envolvidos na biossíntese de óleos essenciais em *Psidium guajava* L. usando sequenciamento de nova geração**. 2016. 22 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em ciências biológicas bacharelado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

CARVALHO, C. R. D. de. **Relação entre parâmetros ecofisiológicos e a produção de óleo essencial em espécies arbóreas**. 2013. 28 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2013.

CERIMELE, E.; RINGUELET, J. A. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas. In: **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória, ES: EDUFES, 2008.

CERQUEIRA, M. D. de. et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, Salvador, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

DHARMAGADDA, V. S. S. et al. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresource Technology**, USA, v. 96, n. 2005, p. 1235-1240, 2005.

DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

DIAS, C. N. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, São Luís, v. 2015, n. 490765, p. 1-8, 2015.

EL-KASHOURY, E. A. et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of *Mentha suaveolens* Ehrh. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 67, p. 571-579, 2012.

ELLOUZE, I. et al. Season's Variation Impact on *Citrus aurantium* Leaves Essential Oil: Chemical Composition and Biological Activities. **Journal of Food Science**, v. 0, n. 0, p. 1-8, 2012.

ESCRIG, A. J. et al. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Caracas, Venezuela, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

GALDINO, P. M. et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 276-284, 2012.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

GOIS, R. W. da S. et al. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 59-62, 2011.

GONÇALVES, J. M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano**. 2015. 56 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist of selected plant families - Myrtaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. 2008. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 12 outubro 2015.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, Tamil Nadu, Índia, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2011.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, 2006.

HARADA, H.; MISAWA, N. Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 1021-1031, 2009.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IHA, S. M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, 2008.

KAMRAN, A. et al. Therapeutic Effects of Essential Oil from Waste Leaves of *Psidium guajava* L. against Cosmetic Embarrassment Using Phylogenetic Approach. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 745-752, 2012.

KHADHRI, A. et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KHANI, A.; HEYDARIAN, M. Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 956-961, 2014.

KNUDSEN, J. T. et al. Diversity and Distribution of Floral Scent. **The Botanical Review**, v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.

KUBO, I. et al. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 427-430, 1996.

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

LIMA, M. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, 2011.

LIMA, R. K. de. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 41-44, 2010.

LOPES, N. P.; GOBBO-NETO, L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

LOURA, L. G. **Variação sazonal, horário de coleta e potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Cinnamodendron dinisii* Swacke**. 2015. 32 f. Dissertação (Mestrado em Bioatividade de Plantas Mediciniais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

MAGALHÃES, L. A. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four guarea species. **Molecules**, Manaus, v. 15, p. 5734-5741, 2010.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, 2012.

MELO, E. de A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MENDES, L. A. et al. Óleos essenciais em Myrtaceae. Tópicos Especiais em Produção Vegetal VI. Alegre, ES: CAUFES, 2017. Disponível em: <<https://mega.nz/#!z4Q2SloL!UM16kpQ4vJZka2nTvJWo-n8ZiA8poQWIrplLaUJ3EwFI>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). **Ministério da Saúde**, 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 16 fevereiro 2016.

MOORE, B. D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750, 2013.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Jaguariúna, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, L. A. S. de.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de manjeriço naturalmente submetido ao ataque de cochonilhas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 2178-2182, 2012.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M. da.; NASCIMENTO, J. de M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição geográfica de uma Coleção Botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 317, 2014.

NAPOLI, E. M. et al. Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils. **Chemistry & Biodiversity**, Catania, v. 12, n. 7, p. 1075-1094, 2015.

PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 695-716, 2014.

PEREIRA, A. I. S. et al. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educación Química**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PICHETTE, A. et al. Composition and Antibacterial Activity of *Abies balsamea* Essential Oil. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 371-373, 2006.

RAVI, K.; DIVYASHREE, P. *Psidium guajava*: A review on its potential as an adjunct in treating periodontal disease. **Pharmacognosy Review**, Índia, v. 8, n. 16, p. 96-100, 2014.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SALGADO, A. P. S. P. **Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus***. 2001. 26 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the Antinociceptive Effect of *Psidium guajava* Leaf Essential Oil and its Major Constituents. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 24-27, 1998.

SANTOS, R. P. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 1027-1030, 2006.

SATYAL, P. et al. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 11-14, 2015.

SELESTINO NETA, M. C. et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2016.

SIANI, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. **Pharmaceutical Biology**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 7, p. 881-887, 2013.

SILVA, J. D. da. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 240-243, 2003.

SILVA, R. C. S. da. et al. (E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes aegypti* Oviposition Deterrents Elucidated by Gas Chromatography-Electrophysiological Assay of *Commiphora leptophloeos* Leaf Oil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2008, p. 3251-3255, 2007.

SOLIMAN, F. M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin Facult Pharmacy**, Cairo Univ, p. 1-7, 2016.

SOUZA, T. da S. de. et al. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.

TEIXEIRA, R. de O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 4, 2003.

THORNHILL, A. H. et al. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Austrália, v. 93, p. 29-43, 2015.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

VUUREN, S. F. V.; NKWANYANA, M. N.; WET, H. de. Antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of diarrhoea in a rural community in northern Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, África, v. 15, n. 53, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2014. A global brief on vector-borne diseases. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf>. Acesso em: 13 agosto 2015.

WILLIAMS, G. M. et al. Area-Wide Ground Applications of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the Control of *Aedes albopictus* in Residential Neighborhoods: From Optimization to Operation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

YAPI, A. T. et al. Chemical variability of *Xylopi* *quintasii* Engl. & Diels leaf oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, p. 332-339, 2014.

ZITO, P.; DÖTTERL, S.; SAJEVA, M. Floral Volatiles in a Sapromyiophilous Plant and Their Importance in Attracting House Fly Pollinators. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 340-349, 2015.