

**CLEBER JOSÉ DA SILVA**

**ESTUDOS QUÍMICOS E ANATÔMICOS EM ESPÉCIES DE  
MYRTACEAE E ASTERACEAE E PRIMEIROS REGISTROS DE  
COLÉTERES EM MYRTACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e  
2010

Silva, Cleber José da, 1975-

Estudos químicos e anatômicos em espécies de Myrtaceae e Asteraceae e primeiros registros de coléteres em Myrtaceae / Cleber José da Silva. – Viçosa, MG, 2010.  
ix, 98f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Myrtaceae. 2. Plantas – Anatomia. 3. Compostas (Botânica). 4. *Sphagneticola trilobata*. 5. *Melaleuca*. 6. Essências e óleos essenciais. 7. Bactericidas. 8. Histoquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.765

**CLEBER JOSÉ DA SILVA**

**ESTUDOS QUÍMICOS E ANATÔMICOS EM ESPÉCIES DE  
MYRTACEAE E ASTERACEAE E PRIMEIROS REGISTROS DE  
COLÉTERES EM MYRTACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de dezembro de 2010.

---

Prof. Marcelo Henrique dos Santos

---

Prof. Antônio Jacinto Demuner

---

Prof. Luzimar Campos da Silva

---

Prof. Renata Maria Strozi Alves Meira  
(Coorientadora)

---

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa  
(Orientador)

*“Compreendi que o amor  
não se deve traduzir apenas por palavras.”*

*Santa Teresinha*

*À Deus, fonte e origem de todo conhecimento,*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo carinho, cuidado, amizade, paciência, presença constante e por sempre se revelar a mim a cada dia desta caminhada. Sou eternamente grato!

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, com quem tanto aprendi, pela excelente orientação, amizade, confiança, estímulo e apoio.

À professora Renata M. Strozi Alves Meira, pela paciência, pelo constante estímulo, pelo apoio e pela amizade e por estar sempre nos recebendo com um sorriso calmante e positivo, e por ter me ensinado tanto sobre ciência, botânica e pesquisa, e também por sempre estar torcendo pelo nosso sucesso.

À professora Aristeia Alves Azevedo por ser uma exímia mestra na transmissão dos conhecimentos, e por sua paciência, preciosa amizade e momentos tão agradáveis de convivência.

Ao professores Antônio Lelis Pinheiro pela co-orientação e amizade e ao Prof. Nélcio José de Andrade pelo apoio nos ensaios biológicos.

À toda minha querida família que sempre me acompanhou, cada um do seu jeito sendo presença aqui no coração.

Às doutorandas e amigas do coração Dayana Francino e Waldnéa Casagrande (Dya) da Universidade Federal de Viçosa, pela amizade sincera, pela doação e gratuidade em múltiplas ajudas neste trabalho.

Ao querido amigo Ricardo Marques Montanari, grande pessoa, com quem tanto aprendi neste trabalho, pela amizade, pelos ensinamentos e parceria em todo tempo.

À doutoranda e amiga Ana Marques, por ser uma pessoa tão boa e pela admirável doação de tempo e apoio na realização dos testes para proteínas.

À professora Maria Cristina Baracat pelo apoio nos testes para proteínas.

Ao técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, José Luiz Pereira, pela amizade, dedicação e constante assistência.

À técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal Nívea pela amizade e por ser uma pessoa tão prestativa e amiga.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Ângelo, sempre prestativo e dedicado e eficiente. À todos os colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal e Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos da UFV, pela agradável convivência e ajuda no que foi necessária durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu amor, Fabiana, apoio e compreensão, por estar comigo todo o tempo sendo um sustento e um apoio amoroso, paciente e silencioso, presença firme, alento seguro e um presente de Deus em minha vida.

Ao grande amigo e irmão João Tomaz por tudo.

Ao amigo e irmão do coração Renan e pelo companheirismo e amizade até nos últimos momentos deste trabalho.

Aos amigos Sílvio, Catarina e D. Conceição pelo carinho imenso, pelo apoio, amizade e pelas imprescindíveis orações que tanto me sustentaram.

Aos amigos da ala musical de minha vida: professores do Conservatório Estadual de Música de Visconde do Rio Branco, à turma do Coral Voix-Là que tive o prazer de reger durante os últimos quatro anos, pelo carinho, amizade e bons momentos vividos, ô turminha que vai deixar saudades! E ao amigo Maestro Rogério Moreira Campos pelos tantos ensinamentos que me fizeram crescer musicalmente, e pelo apoio e amizade.

Aos grandes e queridos amigos da República 'Os Papas', Fabrício, Fabiano, Márcio, Felício e aos agregados Maisa, Tiago, Nana, Klebim, Caninha e toda a turma que agora irreversivelmente fazem parte de minha vida.

Aos amigos da República 'Fecha Bar', Rafael, Klaus, Tico, Mateus que se tornaram uma família para mim nestes últimos anos do doutorado.

Enfim, aos não citados, mas que de muitas formas me auxiliaram na realização deste trabalho. Deus abençoe a todos.

## **BIOGRAFIA**

CLEBER JOSÉ DA SILVA, filho de Natalício Dias da Silva e Nair Dias da Silva, nasceu em Guanhães, estado de Minas Gerais em 27 de novembro de 1975.

Em março de 1994 iniciou o Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, diplomando-se em Janeiro de 1999.

Durante este período, foi bolsista por dois anos do programa de Bolsas do CNPq, onde desenvolveu pesquisas na área de Química dos Produtos Naturais.

Exerceu a Licenciatura em escolas da rede pública e particular no período de 2000 a 2004.

Em fevereiro de 2005 ingressou no programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, área de concentração: Anatomia e Caracterização Química de Plantas Vasculares, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2007. No mesmo ano iniciou o Doutorado no mesmo Programa submetendo-se à defesa de Tese em 20 de dezembro de 2010.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE CULTIVADAS NO BRASIL</b>	
1. RESUMO/ABSTRACT.....	5
2. INTRODUÇÃO.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
<b>CAPÍTULO 2: VARIAÇÃO SAZONAL, HISTOLOCAÇÃO, FITOTOXICIDADE E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>Sphagneticola trilobata</i> (ASTERACEAE)</b>	
1. RESUMO/ABSTRACT.....	33
2. INTRODUÇÃO.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
<b>CAPÍTULO 3: PRIMEIROS REGISTROS DE COLÉTERES NA FAMÍLIA MYRTACEAE</b>	
1. RESUMO/ABSTRACT.....	59
2. INTRODUÇÃO.....	60
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4. RESULTADOS.....	64
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	85
<b>APÊNDICE</b> .....	87

## RESUMO

**SILVA**, Cleber José da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010.  
**Estudos químicos e anatômicos em espécies de Myrtaceae e Asteraceae e primeiros registros de coléteres em Myrtaceae.** Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.  
Coorientadores: Antônio Lelis Pinheiro e Renata Maria Strozi Alves Meira.

Este trabalho apresenta dados relativos à composição química e atividade bactericida de óleos voláteis de espécies medicinais pertencentes aos gêneros cultivados *Callistemon*, *Melaleuca* e *Kunzea* (Myrtaceae) e dados relativos à *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), uma espécie nativa ruderal de uso na medicina popular. Os óleos voláteis das espécies de Myrtaceae investigadas apresentaram altas concentrações de monoterpenóides, dos quais, 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0% para *M. hypericifolia*, *C. viminalis* e *C. citrinus* respectivamente), terpinen-4-ol (47,0% e 49,8% para *M. thymifolia* e *C. polandii* respectivamente) e  $\alpha$ -pineno (54,5% para *K. ericoides*) foram os componentes majoritários. O óleo de *M. linariifolia* apresentou altas concentrações de metileugenol (87,2%). Os óleos voláteis foram investigados quanto à atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizando-se o método de disco de difusão e de microdiluição em caldo. Os resultados revelaram diferenças entre as duas técnicas quanto à atividade dos óleos. Os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo revelaram a forte atividade bactericida dos óleos das espécies de Myrtaceae testados. Investigações anatômicas e histoquímicas das estruturas secretoras das folhas e caule de *S. trilobata*, bem como a variação sazonal, atividade bactericida e fitotóxica dos óleos essenciais foram realizadas. As análises histoquímicas permitiram identificar os locais de síntese e acúmulo dos óleos voláteis em estruturas internas (canais secretores) e externas (tricomas). As análises mostraram também que os tricomas secretores produzem esteróides. O óleo volátil de *S. trilobata* exibiu significativa atividade bactericida e fitotóxica. O maior rendimento do óleo essencial desta espécie foi obtido de plantas coletadas no inverno, quando ocorreu baixa temperatura e precipitação. O óleo volátil foi caracterizado por altas porcentagens de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos e baixos níveis de sesquiterpenos oxigenados. Os componentes majoritários foram Germacreno D (11,9%-35,8%),  $\alpha$ -felandreno (1,4%-28,5%),  $\alpha$ -pineno (7,3%-23,8%), *E*-cariofileno (4,6%-19,0%), biciclogermacreno (6,0%-17,0%), limoneno (1,8%-15,1%) e  $\alpha$ -humuleno (4,0%-11,6%). As porcentagens dos componentes do óleo essencial de *S. trilobata* variaram significativamente durante os meses analisados. Este trabalho é o primeiro registro de

ocorrência de coléteres na família Myrtaceae. Espécies da subfamília Leptospermoide e Myrtoideae foram estudadas do ponto de vista da morfologia, anatomia e histoquímica dos coléteres. Esta estrutura é diferenciada na família Myrtaceae por não possuir a composição anatômica típica de uma coluna de células parenquimáticas envolvidas por epiderme secretora. Uma nomenclatura específica é proposta com base nesta característica e na descrição morfológica dos coléteres em Myrtaceae, classificando-os em três tipos: coléteres petalóides, que ocorre apenas na subfamília Leptospermoideae; coléteres cônicos e coléteres euriformes, que ocorrem nas duas subfamílias. Os testes histoquímicos e a análise da secreção por meio de eletroforese pelo método SDS-PAGE revelou a ausência de proteínas na secreção dos coléteres de duas espécies de Myrtaceae.

## ABSTRACT

**SILVA**, Cleber José da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, december, 2010. **Chemical and anatomical studies in Myrtaceae and Asteraceae species and first report of colleters in Myrtaceae.** Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Co-Advisers: Antônio Lelis Pinheiro and Renata Maria Strozi Alves Meira.

This paper presents data on the chemical composition and antibacterial activity of volatile oils from three Myrtaceae genera (*Callistemon*, *Kunzea* and *Melaleuca*) grown in Brazil, and one species of the Asteraceae family (*Sphagneticola trilobata*), ruderal and used in folk medicine. The volatile oils of Myrtaceae species were investigated for its chemical composition. They were characterized by a high content of monoterpenoids of which 1,8-cineole (88.0%, 65.0% and 77.0% for *M. hypericifolia*, *C. viminalis* and *C. citrinus* respectively), terpinen-4-ol (47.0% and 49.8% for *M. thymifolia* and *C. polandii* respectively) and  $\alpha$ -pinene (54.5% for *Kunzea ericoides*) were the major components. The oil from *M. linariifolia* was characterized by a high concentration of methyleugenol (87.2%). The Myrtaceae's volatile oils were investigated for its antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria using both disc diffusion and broth microdilution methods. The results showed disagreement among the diffusion and microdilution techniques. The antimicrobial activity essential oils tests of the can be hindered by the oil volatility, its water insolubility and its chemistry complexity. The microdilution method results showed a strong antibacterial activity of the essential oils tested. Anatomical and histochemical investigations of the *S. trilobata* secretory structures in leaves and stems, and the seasonal variation, antibacterial and phytotoxicity activity of volatile oils were carried out. Histochemical techniques enabled specific location of the site of essential oil accumulation in the internal and external structures (canals and thricomes, respectively). Histochemical analysis showed that the secretory trichomes produced steroids. The *S. trilobata* essential oil exhibited significant suppression on germination and radical growth of seeds in *Allium cepa* and shows a great antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. The highest yield was obtained from plants collected in winter, when occurred low temperature and precipitation. The essential oil was characterized by a high percentage of hydrocarbon sesquiterpenes, hydrocarbon monoterpenes and low levels of oxygenated sesquiterpenes. The major components were Germacrene D (11,9%-35,8%),  $\alpha$ -felandrene (1,4%-28,5%),  $\alpha$ -pinene (7,3%-23,8%), *E*-caryophyllene (4,6%-19,0%), bicyclogermacrene (6,0%-17,0%), limonene (1,8%-15,1%) and  $\alpha$ -humulene (4,0%-11,6%). The percentage of most of the

individual constituents present in *S. trilobata* volatile oil changed significantly during the months. This is the first report of occurrence of colleters in the Myrtaceae family. Species of the Leptospermoideae and Myrtoideae subfamily were studied from the standpoint of morphology, anatomy and histochemistry of colleters. The colleters of Myrtaceae not present the typical anatomical composition of a column of parenchyma cells surrounded by a secretory epidermis. A specific nomenclature is proposed based on this singularity and in the morphological description of Myrtaceae colleters, classifying them into three types: petaloid colleters, which occurs only in the Leptospermoideae subfamily; euriform colleters and conic colleters, which occur in the two subfamilies. The secretion analysis by electrophoresis method (SDS-PAGE) revealed the proteins absence in the Myrtaceae colleter's secretion in two species analyzed.

.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas sintetizam compostos químicos essenciais ao seu desenvolvimento, a partir do processo fotossintético. Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários (lipídios, proteínas, carboidratos), essenciais a todos os seres vivos e com funções bem definidas e os metabólitos secundários ou produtos naturais, compostos que geralmente apresentam estruturas complexas e baixa massa molar, encontrados em concentrações relativamente baixas e em grupos distintos de plantas (Von Poser e Mentz, 2003).

Os metabólitos primários podem ser diferenciados dos produtos naturais conforme sua distribuição no reino vegetal (Taiz e Zeiger, 2004) ou seu papel funcional (Buchanan et al., 2000). Metabólitos primários são encontrados em todo reino vegetal e participam da nutrição e dos processos metabólicos essenciais ao passo que os secundários ou produtos naturais influenciam as interações ecológicas entre a planta e o ambiente e se restringem a determinados grupos de plantas (Buchanan et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2004). Uma das importantes funções dos metabólitos secundários é a proteção contra microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, fungos) e, sobretudo contra herbivoria. Podem também atuar como aleloquímicos, influenciando o crescimento e desenvolvimento de outras plantas. Outros compostos podem ainda atuar na atração de polinizadores e de agentes dispersores de sementes (Buchanan et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2004).

Óleos voláteis (ou essenciais) são metabólitos secundários descritos como misturas complexas e altamente variadas de constituintes que pertencem a dois grupos principais: terpenóides e compostos aromáticos (Bruneton, 1995). São produzidos e/ou acumulados em estruturas especializadas localizadas em diversas partes do corpo das plantas: flores (bergamota); folhas (menta, eucalipto); casca (*Cinnamomum*); caule; raiz (vétiver); rizomas (*Zinger*); frutos (*Anis*) e sementes (Bruneton, 1995). Podem se obtidos por diversos métodos de extração: expressão, fermentação, euflerage, hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, sendo este último, o mais utilizado na produção comercial dos óleos voláteis (Van de Braak e Leijten, 1999).

Os óleos voláteis são fonte de substâncias de usos variados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, e para produção de sabões, perfumes, desinfetantes, artigos de *toilete*, dentre outros. Seu uso vem ganhando impulso, tanto devido ao interesse crescente de consumidores em ingredientes de fontes naturais como

também devido à crescente preocupação relacionada ao uso de substâncias potencialmente prejudiciais como aditivos sintéticos na alimentação (Reische et al., 1998).

As plantas que produzem óleos voláteis são denominadas plantas aromáticas e ocorrem em diversas famílias botânicas. Algumas famílias se destacam pelo grande número de espécies que produzem tais óleos, como por exemplo, as Lamiaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Verbenaceae e Lauraceae. Dentre estas famílias, destaca-se a família Myrtaceae e Asteraceae, produtoras de óleos essenciais medicinais e de importância econômica, com espécies que ainda não foram estudadas do ponto de vista da composição química, atividade biológica e caracterização das estruturas secretoras que produzem estes óleos.

Portanto, neste estudo, serão apresentados dados relativos à composição química e atividade bactericida de óleos voláteis de 14 espécies da família Myrtaceae (gêneros *Callistemon*, *Melaleuca* e *Kunzea*), nativas da Austrália, visando identificar os quimiótipos destas espécies e a possível influência de condições edáficas e climáticas sobre o perfil químico dos óleos essenciais destas espécies cultivadas no Brasil.

São também apresentados dados relativos à histolocalização, variação sazonal, composição química e atividade fitotóxica e bactericida dos óleos voláteis bem como caracterização anatômica das estruturas que sintetizam e acumulam estes compostos em *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), uma espécie ruderal e de uso na medicina popular, da qual não se verificou até o presente momento na literatura, dados relativos ao estudo proposto neste trabalho.

Além das cavidades e tricomas, outras estruturas secretoras são de grande importância por suas funções ecológicas e por sua utilização como ferramenta taxonômica nas famílias botânicas em que ocorrem. Dentre estas destacam-se os coléteres. A palavra coléter vem do grego *colla*, “cola”, indicando a secreção pegajosa desta estrutura, comumente encontrada em órgãos foliares jovens. Frequentemente, produzem uma mistura de terpenos e mucilagem (Esau, 1976) Estruturalmente, eles podem ser tricomas, emergências ou glândulas, neste caso, se vascularizadas (Fahn, 1990). Eles podem estar presentes em órgãos vegetativos, sendo mais comuns em gemas e folhas jovens do que em órgãos adultos, e/ou reprodutivos de diversas famílias (Fahn, 1979; Thomas, 1991). Diversos trabalhos de taxonomia e filogenia destacam a importância dos coléteres como caracteres diagnósticos em Apocynaceae e Rubiaceae, dentre outras (Endress e Bruyns, 2000; Rapini, 2000; Sennblad e Bremer, 2002; Lerstern, 1974; Horner e Lersten, 1968; Miguel et al., 2006). Para a família Myrtaceae não foram encontrados até o presente

momento relatos de ocorrência de coléteres. Este trabalho descreve pela primeira vez a estrutura anatômica dos coléteres em representantes das duas subfamílias de Myrtaceae e sua potencial aplicação nas abordagens sobre as relações filogenéticas nesta família.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bruneton J. 1995.** *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publ. Londres, New York, Paris, 405-466.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000.** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Maryland, Rockville: American society of plant physiologists. 1367p.
- Endress ME, Bruyns PV. 2000.** A revised classification of the Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66: 1-56.
- Esau K. 1976.** *Anatomy of Seed Plants*. 3.ed. New York, John Willey and Sons. 293p.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London, Academic Press.
- Fahn A. 1990.** *Plant anatomy*. 4 ed. Pergamon Press, Oxford.
- Horner HT, Lersten N R. 1968.** Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55: 1089-1099.
- Lersten NR. 1974.** Morphology and distribution of Colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973-981.
- Miguel EC, Gomes VM, De-Oliveira MA, Da-Cunha M. 2006.** Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity. *Plant Biology* 8: 715-722.
- Rapini A. 2000.** Asclepiadaceae ou Asclepiadoideae (Apocynaceae)? Conceitos distintos de agrupamento taxonômico. *Hochnea* 27: 121-130.
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR. 1998.** In: Akoh CC, Min DB. (Eds). *Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, p. 423.
- Sennblad B, Bremer B. 2002.** Classification of Apocynaceae s.l. according to a New Approach Combining Linnean and Phylogenetic Taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* 51: 389-409.
- Taiz L, Zeiger E. 2004.** *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Thomas, V. 1991.** Structural, fuctional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305
- Van de Braak SAAJ, Leijten GCJJ. 1999.** *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

**Von Poser GL, Mentz LA. 2003.** Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed.* Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC. 833 p.

**CAPÍTULO 1:**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS**

**ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE CULTIVADAS**

**NO BRASIL**

## CAPÍTULO 1:

### COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE CULTIVADAS NO BRASIL

**RESUMO:** Os óleos voláteis das espécies de Myrtaceae foram caracterizados por altas concentrações de monoterpenóides, dos quais, 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0% para *Melaleuca hypericifolia*, *Callistemon viminalis* e *C. citrinus* respectivamente), terpinen-4-ol (47,0% e 49,8% para *M. thymifolia* e *C. polandii* respectivamente) e  $\alpha$ -pineno (54,5% para *Kunzea ericoides*) foram os componentes majoritários. O óleo essencial de *M. linariifolia* apresentou altas concentrações de Metileugenol (87,2%). Os óleos essenciais foram investigados em relação à atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizando-se o método de disco de difusão e de microdiluição em caldo. Os resultados revelaram diferenças entre as duas técnicas quanto à atividade dos óleos testados. Os testes podem ser influenciados por fatores como a volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e composição química complexa. Os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo mostraram a forte atividade bactericida dos óleos essenciais testados.

**ABSTRACT:** The Myrtaceae essential oils were investigated for its chemical composition. The volatile oils were characterized by a high content of monoterpenoids of which 1,8-cineole (88.0%, 65.0% and 77.0% for *Melaleuca hypericifolia*, *Callistemon viminalis* and *C. citrinus* respectively), terpinen-4-ol (47.0% and 49.8% for *M. thymifolia* and *C. polandii* respectively) and  $\alpha$ -pinene (54.5% for *Kunzea ericoides*) were the major components. The oil from *M. linariifolia* was characterized by a high concentration of methyleugenol (87.2%). The essential were investigated for its antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria using both disc diffusion and broth microdilution methods. The results showed disagreement among the diffusion and microdilution techniques. The tests of the antimicrobial activity of the essential oils can be hindered by the volatility of the oil, its insolubility in water and its chemistry complexity. The results of the microdilution method showed a strong antibacterial activity of the essential oils tested.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae possui cerca de 130 gêneros e aproximadamente 4000 espécies de distribuição predominantemente tropical e subtropical, concentradas na região neotropical e na Austrália (Heywood, 1993).

Encontra-se dividida em duas grandes subfamílias: Myrtoideae (predominante na América tropical e subtropical com espécies de folhas opostas e frutos carnosos baciformes) e Leptospermoideae (predominante na Austrália e Polinésia e reúne espécies com folhas alternas, fruto seco, geralmente cápsulas loculicidas) (Heywood, 1993). São fontes de condimentos como os botões florais de *Syzygium aromaticum* e os frutos de *Pimenta dioica*. Muitas espécies são fornecedoras de madeira (*Eucalyptus spp*), outras são ornamentais (*Myrtus spp*), e muitas produzem frutos comestíveis como a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) (Judd et al., 2002), goiaba (*Psidium guajava*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e jamelão (*Syzygium jambolana*).

Além disso, os óleos essenciais produzidos por espécies de Myrtaceae são utilizados em vários ramos da indústria. São apontadas substâncias químicas de natureza lipofílica, polifenóis, substâncias aromáticas, monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos como constituintes dos óleos essenciais desta família (Metcalf e Chalk, 1989; Solereder, 1908; Cronquist, 1981; Fahn, 1979).

Embora no Brasil, todos os representantes nativos da família Myrtaceae pertençam à subfamília Myrtoideae, muitas espécies da subfamília Leptospermoideae foram introduzidas no país em cultivos para fins comerciais e/ou ornamentais, existindo poucos estudos dos quimiótipos destas espécies e da atividade biológica de seus óleos essenciais. Sabe-se que os fatores como temperatura, umidade relativa, duração total de exposição ao sol e ao regime de ventos, bem como as condições edáficas, dentre outras, exercem influência direta na produção de óleo essencial (Simões e Sptizer, 1999). Devido à diferença climática da região tropical para as regiões subtropicais onde estas espécies ocorrem naturalmente, novos quimiótipos com importantes implicações comerciais podem surgir em espécies de Myrtaceae-Leptospermoideae cultivadas no Brasil.

O Gênero *Melaleuca* L. compreende aproximadamente 250 espécies (Craven e Lepschi, 1999) que geralmente ocorrem em regiões pouco drenadas ou sazonalmente alagadas, embora possam crescer também em solos de textura pesada e solos ácidos, na Austrália e Papua-Nova Guiné (Craven e Lepschi, 1999). Os óleos essenciais produzidos por espécies de *Melaleuca* contêm compostos voláteis de grande importância econômica,

pois exibem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Furneri et al., 2006), atividade fungicida (Tong et al., 1992) e acaricida (Iori et al., 2005). São utilizados no tratamento de picadas de insetos e infecções de pele (Budhiraja et al., 1999), no tratamento de doenças como herpes simples (Carson et al., 1998), como antisséptico e expectorante, e para tratamento de distúrbios gastrointestinais (Kitanov et al., 1992). Portanto, apresenta amplo uso, desde a indústria de perfumes a componente de germicidas e pesticidas (Boland et al., 1984). *M. alternifolia* destaca-se como uma espécie cultivada para extração de óleo essencial que apresenta largo espectro de ação antimicrobiana, atribuído, sobretudo por apresentar terpinen-4-ol e 1,8-cineol como componentes majoritários (Furneri et al., 2006).

*Callistemon*, com aproximadamente 30 espécies, é amplamente utilizado como ornamental e popularmente conhecido como “escova de garrafa” (Black et al., 1977; Souza e Lorenzi, 2005). Tem sido utilizado para fins ornamentais em áreas costeiras de elevada salinidade, devido à sua capacidade de adaptação a tais condições (Lippi et al., 2003). O óleo produzido por espécies de *Callistemon* exibe atividade bactericida contra diversas bactérias resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Escherichia coli* resistente a vancomicina e *Pseudomonas spp.* multiresistente a diversas drogas (Saxena e Gomber, 2006). O óleo de *C. lanceolatus* (cultivado na Índia) é utilizado contra *Staphylococcus aureus* e apresentou moderada atividade contra outras bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger* (Sudhakar e Raju, 2005; Pandey, 1995). Os óleos essenciais de *C. rigidus* e *C. citrinus* apresentam também atividade antifúngica contra o fungo *Phaeoramularia angolensis*

*Kunzea* possui cerca de 30 espécies. É cultivado principalmente pela atividade antimicrobiana de seus óleos essenciais, destacando-se o óleo de grande valor comercial de Kanuca extraído da espécie *K. ericoides* (Porter e Wilkins, 1998). Entretanto, alguns estudos demonstraram variação na composição de óleos de diferentes proveniências de *K. ericoides* (Perry et al., 1997a,b) e mesmo entre indivíduos de uma única população (Porter et al., 1998), o que reforça a importância de estudos químicos dos óleos voláteis nestas espécies de diferentes procedências. Na medicina popular da Nova Zelândia os óleos essenciais de algumas espécies de *Kunzea* têm sido usados para o tratamento de diarreia, inflamações e feridas (Lis-Balchin e Hart, 1988; Perry et al., 1997). Estudos prévios têm demonstrado a presença de uma variedade de monoterpenos, sesquiterpenos e derivados de floroglucinol que apresentam atividade antimicrobiana (Bloor, 1992; Lis-Balchin et al., 2000), inseticida (Khambay et al., 2002) e/ou espasmolítica (Lis-Balchin e Hart, 1988).

Cabe ressaltar a complexidade química dos compostos produzidos por espécies deste gênero, já observada nos extratos das folhas de *K. ambigua*, onde foram isolados seis floroglucínóis diglicosídeos (kunzeaflorinas A-F), um tanino hidrolizável (Kunzeatanino A), 10 polifenóis (Naoki et al., 2008), um novo falvonol glicosídeo dimérico e vários novos glicosídeos cromonas (Ito et al., 2004), além de três novos metabólitos extraídos da fração que não apresentaram ictiotoxicidade contra *Oryzias latipes*. Da fração não polar do extrato da folhas desta espécie foram isolados três novos metabólitos: Kunzeonona e três metabólitos conhecidos: criptostrobina, espatulenol e globulol, que apresentaram ictiotoxicidade contra *Oryzias latipes* (Ito et al., 2004).

Um problema de saúde pública em destaque nas últimas décadas é o aumento do número de microorganismos resistentes aos antibióticos, em especial as bactérias resistentes frequentemente associadas a doenças prolongadas, hospitalizações frequentes e prolongadas que tem elevado a taxa de mortalidade de humanos (Holmberg et al., 1987). Entretanto, bactérias não patogênicas (como *Bacillus cereus*, Gram-positiva), que provocam intoxicação alimentar, também são de interesse, pois causam diarreia, resultante de alteração na atividade das enterotoxinas e também devido à liberação da toxina emética (Agata et al., 2002; Radhika et al., 2002).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, patogênica, resistente a uma variedade de agentes antimicrobianos (Sharberg et al., 1982) cuja atividade tem sido associada ao aumento das infecções oportunistas, principalmente nos imunocomprometidos (Germano e Germano, 2003).

*Escherichia coli* (*Enterobacteriaceae* Gram-negativa) está presente no trato intestinal dos animais (inclusive do homem) e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. (Krieg e Holt, 1984). Entretanto, dentre as cepas de *E. coli*, há um grupo patogênico para o ser humano cujas cepas ocuparam o segundo lugar entre os principais agentes de doença alimentar nos Estados Unidos, onde responderam por 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas por bactérias naquele país no período de 1993-1997 (Olsen et al., 2000). *E. coli* é também responsável por um terço dos casos de meningite neonatal, com a incidência de 0,1 por 1000 nascidos vivos (Bonacorsi et al., 2000). É a causa mais comum de septicemias adquiridas na comunidade ou no ambiente hospitalar (Sannes et al., 2004).

O surgimento de microorganismos resistentes a antibióticos mais comuns tem-se revelado um problema crescente em nível mundial (Farrar, 1985; Holmberg et al., 1987;

McGowan, 1987; O'Brien, 1987). A indicação de produtos naturais como os óleos essenciais que apresentem atividade contra o desenvolvimento destes microrganismos é uma alternativa ao tratamento de bactérias resistentes à antibióticos.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a composição química de três espécies de *Melaleuca*, três espécies de *Callistemon* e uma espécie de *Kunzea* cultivadas em Viçosa, Minas Gerais, Brasil e verificar a atividade bactericida dos óleos essenciais destas espécies e de outras sete espécies de *Melaleuca* cuja composição dos óleos voláteis já foi determinada em estudos anteriores (Silva et al., 2007).

### 1.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1.3.1. Material vegetal

Foram avaliados os óleos essenciais extraídos das folhas de *Melaleuca hypericifolia* C. Sm., *M. thymifolia* Sm., *M. linariifolia* Sm., *Callistemon polandii* F. M. Bailey, *C. citrinus* (Curtis) Skeels, *C. viminalis* Sol. ex Gartn. e *Kunzea ericoides* (A. Rich.) J. Thompson.

As folhas das espécies foram coletadas em fevereiro de 2008 de pontos aleatórios da copa das plantas cultivadas no arboreto do setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. As espécies de *Melaleuca* foram obtidas desta plantação estabelecida a aproximadamente 10 anos de sementes provenientes da CSIRO - Division of Forestry and Forest Products – Canberra – ACT. O material foi identificado, herborizado e depositado no herbário VIC (números de registro: 31908, 31906, 31905, 30825, 30816, 31116 e 31909) do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Para os ensaios de atividade bactericida, foram utilizados também óleos essenciais previamente obtidos de sete espécies de *Melaleuca* (*M. alternifolia* Cheel, *M. leucadendra* (L.) L., *M. ericifolia* Sm., *M. armillaris* Sm., *M. quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake e *M. cajuputi* Roxb. subesp. *cajuputi* Powell, e *M. cajuputi* Roxb. subesp. *platyphylla* Barlow), de composição química previamente estabelecida. Estas plantas foram coletadas e o óleo extraído no ano de 2007 foi conservado sob refrigeração em atmosfera de nitrogênio (Silva et al., 2007).

### 1.3.2. Extração e análise química dos óleos essenciais

Para a determinação do teor de matéria seca foram utilizadas alíquotas de aproximadamente 3 g das diferentes amostras, em triplicatas. Estas foram colocadas em estufa a aproximadamente 100 °C por um período de 24 horas. Após este período, foi determinada a massa restante e calculado o teor médio de água das amostras (ASAE, 2000).

As folhas das plantas foram coletadas separadamente em pontos aleatórios das copas das árvores. Cada amostra das folhas frescas foi subdividida em três porções de 100 gramas, picadas e submetidas à extração. O processo de extração do óleo essencial utilizado em todas as amostras foi hidrodestilação, por três horas consecutivas e em triplicata, utilizando-se o aparelho tipo Clevenger modificado. O óleo obtido foi recolhido e acondicionado em frascos de vidro âmbar e mantido sob atmosfera de Nitrogênio à temperatura de aproximadamente 0 °C, até o momento da análise por GC-EM.

Para a quantificação dos componentes dos óleos essenciais, utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida SPB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N<sub>2</sub> sob fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C; temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 4 min., seguido de aquecimento a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (10 mg mL<sup>-1</sup> em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); razão de split 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total do cromatograma.

Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais, utilizou-se aparelho Shimadzu GC-17A equipado com coluna de sílica fundida RTX-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) e acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP5050A. Gás de arraste He sob fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor 220 °C, temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (10 mg mL<sup>-1</sup> em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); razão de split 1:10; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV); amplitude de varredura de 30 a 700 Da.

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente com os disponíveis na base de dados do equipamento (Wiley sétima edição) e também pelo índice de retenção relativo calculado a partir da injeção de uma mistura de alcanos lineares (C<sub>9</sub> – C<sub>26</sub>) (Davies, 1990; Adams, 1995; Girard, 1996; Van den Dool e Kratz, 1963).

### 1.3.3. Avaliação da atividade bactericida

Os microorganismos utilizados foram bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus*, Ribotipo 1 222-173-S4 de superfície de equipamentos de pasteurização (Salustiano et al., 2009) e Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 11229) fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. As culturas dos microorganismos foram mantidas em tubos Eppendorf de 1 mL em caldo nutriente e glicerol à temperatura de - 80 °C. Culturas puras dos microorganismos foram ativadas por duas vezes consecutivas, por 24 horas, em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia) e ajustado para aproximadamente 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

A técnica de disco de difusão em ágar foi utilizada para se determinar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, como previamente descrito (NCCLS, 1997). 0,1 mL da suspensão previamente preparada dos microorganismos testados (2 x10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) foi inoculada por espalhamento na superfície das placas de petri com Agar Mueller Hinton. Após a absorção dos microorganismos pelo meio, discos de papel (6 mm de diâmetro) foram individualmente impregnados com 10 µL de óleo essencial e colocados em placas de Petri com 91 mm de diâmetro. As placas foram invertidas e incubadas à temperatura ideal de crescimento dos microorganismos (37 °C para *S. aureus* e *E. coli*; 32 °C para *B. cereus*) por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos utilizando-se um paquímetro e expressos em milímetros. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada experimento. Os antibióticos Vancomicina (30 µg), Penicilina G (10 UI), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Estreptomicina (10 µg), foram usados como controle positivo e água previamente esterilizada foi utilizada como controle negativo. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em triplicata. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA e Scott-Knott (P ≤ 0,05) utilizando-se o software GENES (Genetics and Statistical Analysis. Version 2007.0.0 - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brazil).

O método da microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM) (NCCLS, 1999; Carson et al., 1995). Uma série dupla de diluições de cada óleo essencial foi preparada em placa de microtitulação de 96 poços, com concentração variando de 0.0156 a 2%. O caldo foi suplementado com Tween 80 (Merck, Germany) na concentração de 0,5% (volume/volume) para se obter melhor diluição do óleo essencial. Culturas previamente ativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) (Himedia) de cada microorganismo foram ajustas a aproximadamente  $2 \times 10^5$  UFC/mL e em seguida inoculadas em cada poço. A concentração de cada inóculo foi confirmada por contagem de colônias viáveis em PCA (Plate Count Agar) (Himedia). Controles positivos e negativos foram incluídos em cada teste. A placa de microtitulação foi incubada aerobicamente a 32 °C (Gram-negativas) ou 37 °C (Gram-positivas) de acordo com cada microorganismo e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas. A CIM é definida como a menor concentração do óleo essencial em que os microorganismos testados não demonstram crescimento visível. O crescimento das bactérias foi analisado por turbidez, utilizando o espectrofotômetro UV visível (SP-2000UV) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Rendimento dos Óleos Voláteis

O rendimento do óleo essencial extraído da matéria fresca é apresentado na Tabela 1. *Melaleuca thymifolia* apresentou maior rendimento, seguida de *M. hypericifolia*. Estas espécies apresentaram rendimento semelhante ao encontrado em estudos prévios para *M. alternifolia*, *M. cajuputi* subsp. *cajuputi*, *M. armillaris* e *M. cajuputi* subsp. *platyphylla* ( $4,0 \pm 0,36$  %,  $4,0 \pm 0,21$ %,  $3,9 \pm 0,20$ % e  $3,7 \pm 0,22$ %, respectivamente) (Silva et al., 2007). *M. linariifolia* apresentou baixo rendimento quando comparada às outras duas espécies de *Melaleuca*, mas semelhante ao verificado para outras espécies do gênero como *M. leucadendra*, *M. quinquenervia* e *M. ericifolia* ( $1,5 \pm 0,11$ %,  $1,6 \pm 0,17$ % e  $0,70 \pm 0,01$ %, respectivamente) (Silva et al., 2007).

**Tabela 1:** Rendimento do óleo essencial das folhas das espécies de Myrtaceae

Espécie	Rendimento (%)
<i>Melaleuca thymifolia</i>	4,0%±0,01
<i>M. hypericifolia</i>	3,8%±0,20
<i>M. linariifolia</i>	1,4%±0,02
<i>Callistemon citrinus</i>	1,1%±0,06
<i>C. viminalis</i>	0,3±0,00%
<i>C. polandii</i>	0,2%±0,00
<i>Kunzea ericoides</i>	0,5%±0,07

*Callistemon citrinus* apresentou maior rendimento do óleo essencial ao passo que *C. viminalis* e *C. polandii* apresentaram baixo rendimento. Resultados semelhantes foram observados para *C. citrinus* ocorrente na África do Sul, porém *C. viminalis* ocorrente na mesma região apresentou maior rendimento (0,9%) (Oyedeji et al., 2009)

### 3.2. Composição química dos Óleos Voláteis

A composição química dos óleos voláteis produzidos por cada uma das sete espécies é apresentada na Tabela 2. O óleo essencial de *K. ericoides* demonstrou predominância de monoterpenos (66,8%), tendo  $\alpha$ -pineno como componente majoritário. Os óleos de *Melaleuca* e *Callistemon* são compostos em sua maior parte por monoterpenóides oxigenados. Entretanto, os óleos essenciais de *M. linariifolia* apresentaram alta concentração de metileugenol (86,6%) e traços de *E*-metiliso Eugenol (0,4%). Comparado aos óleos de *M. leucadendra*, quimiótipo proveniente da Austrália (metileugenol e *E*-metiliso Eugenol até 99% e 88% respectivamente) (Brophy e Lassak, 1988) e Brasil (96,6% de metiliso Eugenol) (Silva et al., 2007), o óleo desta espécie pode ser uma potencial fonte de metileugenol, composto com aroma semelhante ao do eugenol, que é utilizado em larga escala na produção de perfumes e como aromatizante na indústria alimentícia (Halcon e Milkus, 2004). O óleo essencial de *M. hypericifolia*, *C. viminalis* e *C. citrinus* apresentou altas concentrações de 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0%, respectivamente). Espécies de *C. citrinus* e *C. rigidus* estudados em Camerão (Camarão, república unitária da África central e ocidental) apresentaram respectivamente, 79,1% e 73,8% deste composto (Jazet et al., 2009) e de *C. sieberi* (Camberra, Austrália) apresentaram 58,9% de 1,8-cineol (Lee et al., 2004). *C. viminalis* e *C. citrinus* ocorrentes na África do Sul apresentaram respectivamente 83,2% e 61,2% de 1,8-cineol. Além da ação inseticida, este composto apresenta atividade antiinflamatória que está associada à

capacidade de inibição da rota da ciclooxygenase, prevenindo a biossíntese de prostanóides (Dewhurst, 1980). Estudos com 42 amostras óleos essenciais de espécies de Myrtaceae constataram que as espécies *Eucalyptus nicholii*, *E. codonocarpa*, *E. blakelyi*, *Callistemon sieberi*, *Melaleuca fulgens* e *M. armillaris*, cujos óleos são ricos em 1,8-cineol apresentaram potente toxicidade contra três maiores espécies de pragas de grãos estocados (*Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum* e *Rhyzopertha dominica*) indicando que tais efeitos fumigantes são promissores para o desenvolvimento de produtos de uso comercial a partir do óleo destas espécies (Lee et al., 2004). O alto teor de 1,8-cineol nos óleos essenciais das espécies estudadas neste trabalho indica que estas podem ser utilizadas como fonte alternativa para produção de compostos de alto valor comercial.

A abundância de 1,8-cineol em *C. viminalis* e *C. citrinus* cultivadas no Brasil confirma a semelhança destas espécies com aquelas ocorrentes em outros países, porém observam-se diferenças nas quantidades relativas de componentes como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol. As diferenças tanto na composição química e rendimento dos óleos essenciais podem ser atribuídas às diferenças na constituição genética, e a fatores geográficos e/ou ambientais.

O óleo essencial de *M. thymifolia* e *C. polandii* apresentou terpinen-4-ol como componente majoritário (47,0% e 49,8%, respectivamente). Este composto é um dos principais e mais ativos componentes dos óleos essenciais do TTO (Tea Tree Oil), o óleo essencial das folhas de *M. alternifolia*, de grande valor comercial (Altman, 1988).

No óleo essencial de *K. ericoides*, os monoterpenos ocorreram em maior quantidade (66,8%) seguido de monoterpenos oxigenados (28,3%). O principal componente de *K. ericoides* foi  $\alpha$ -pineno (54,5%). Este resultado é similar ao encontrado em estudos da composição química do óleo desta espécie na Nova Zelândia (55,5% de  $\alpha$ -pineno) (Porter e Wilkins, 1998). Este composto é utilizado como precursor na preparação de repelentes sintéticos contra mosquitos, com baixa toxicidade para humanos (Wang et al., 2008).

Outros compostos como 1,8-cineol (16,4%),  $\alpha$ -terpineol (5,7%),  $\gamma$ -terpineno (4,1%) e viridiflorol (3,3%) também foram identificados. Tais compostos estão presentes também nos óleos essenciais de *M. alternifolia*.

Amostras de óleos comerciais obtidos de espécies de diferentes áreas da Nova Zelândia apresentaram também o monoterpeno  $\alpha$ -pineno como componente majoritário (55,5%). Porém, óleos essenciais obtidos das áreas próximas a East Cape apresentaram

**Tabela 2:** Constituintes químicos dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae.

CONSTITUINTES	IRR	MHS	ML	MT	CVM	CCT	CPL	KE
1. $\alpha$ -tujeno	930	-	-	1,4 $\pm$ 0,0	-	-	2,0 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0
2. $\alpha$ -pineno	935	3,0 $\pm$ 0,2	-	1,2 $\pm$ 0,0	12,0 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	54,5 $\pm$ 0,5
3. $\beta$ -pineno	979	1,2 $\pm$ 0,1	-	-	-	2,2 $\pm$ 0,9	-	1,1 $\pm$ 0,0
4. mirceno	993	0,1 $\pm$ 0,0	-	-	-	3,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,1
5. $\alpha$ -felandreno	1004	-	0,9 $\pm$ 0,1	-	-	-	6,0 $\pm$ 0,1	-
6. $\alpha$ -terpineno	1021	-	-	-	-	-	7,5 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1
7. $\rho$ -cimeno	1021	-	-	27,7 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,1	-	7,4 $\pm$ 0,4	-
8. <i>o</i> -cimeno	1027	-	1,0 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-
9. Limoneno	1031	-	1,8 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-
10. 1,8-cineol	1041	88 $\pm$ 0,5	-	7,7 $\pm$ 0,3	65,0 $\pm$ 2,3	77,0 $\pm$ 0,9	-	16,4 $\pm$ 0,5
11. $\beta$ -( <i>E</i> )-ocineno	1053	-	-	-	-	0,7 $\pm$ 0,0	-	0,7 $\pm$ 0,2
12. $\gamma$ -terpineno	1065	-	-	-	-	0,7 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 1,6	4,1 $\pm$ 0,0
13. $\alpha$ -terpinoleno	1089	-	-	-	-	-	0,1 $\pm$ 1,6	0,9 $\pm$ 0,1
14. Linalol	1103	-	0,6 $\pm$ 0,0	-	1,1 $\pm$ 0,1	-	-	1,5 $\pm$ 0,0
15. <i>E</i> -pinocarveol	1133	-	-	-	2,3 $\pm$ 0,4	-	-	-
16. Hidrato de <i>Z</i> -pineno	1123	-	-	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,1	-
17. Terpinen-4-ol	1181	3,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,0	47,0 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,0	49,8 $\pm$ 1,1	-
18. $\rho$ -cimen-8-ol	1187	-	-	-	-	-	2,3 $\pm$ 0,1	-
19. $\alpha$ -terpineol	1195	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,1
20. Não identificado	1261	-	-	4,2 $\pm$ 0,2	-	-	-	-
21. Metil eugenol	1415	-	86,8 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-
22. <i>E</i> -cariofileno	1424	-	-	-	-	0,4 $\pm$ 0,1	-	-
23. Aromadendreno	1443	0,1 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-	-
24. $\alpha$ -humuleno	1450	-	0,5 $\pm$ 0,2	-	-	-	-	-
25. Germacreno D	1477	-	1,4 $\pm$ 0,6	-	-	-	-	-
26. Bicyclgermacreno	1494	-	0,9 $\pm$ 0,2	-	-	-	-	3,2 $\pm$ 0,3
27. <i>E</i> -metilisoeugenol	1506	-	0,4 $\pm$ 0,1	-	-	-	-	-
28. Ledol	1566	-	-	-	1,5 $\pm$ 0,7	-	-	0,4 $\pm$ 0,0
29. Espatuleno	1585	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	-	-	0,5 $\pm$ 0,1	-	1,0 $\pm$ 0,0
30. Globulol	1591	0,1 $\pm$ 0,0	-	-	-	0,4 $\pm$ 0,1	-	-
31. Viridiflorol	1585	-	-	-	-	-	-	3,3 $\pm$ 0,0
Total (%)		96,1	95,7	92,4	99,9	97,7	94,0	95,1
Monoterpenos								
Hidrocarbonetos/ Oxigenados		4,4/91,7	6,5/2,0	30,3/57,9	15,6/84,3	10,5/87,2	41,6/52,4	66,8/28,3
Outros		-	86,8	4,2	-	-	-	-

IRR: Índice de retenção relativo a C<sub>9</sub>-C<sub>26</sub> *n*-alcanos em coluna DB5. MHS = *Melaleuca hypericifolia*, ML= *M. linariifolia*; MT= *M. thymifolia*; CVM = *Callistemon viminalis*; CCT = *C. citrinus*; CPL = *C. polandii*; KE = *Kunzea ericoides*

menor concentração de  $\alpha$ -pineno (55,5%) em relação àqueles obtidos em áreas mais restritas em Coromandel (67,8%). Estes resultados podem estar relacionados à variações

genotípicas ocorrentes nestas extensas faixas territoriais onde esta espécie se encontra distribuída na Nova Zelândia (Perry et al., 1997). A espécie cultivada no Brasil apresentou teor de  $\alpha$ -pineno semelhante às aquelas encontradas nas áreas próximas a East Cape, o que sugere que fatores como solo, precipitação e clima tropical do Brasil pode não ter tido influência na composição química do óleo desta espécie.

### 3.3. Atividade bactericida dos óleos voláteis

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão de disco em Agar demonstrou que os óleos essenciais das sete espécies de Myrtaceae estudadas apresentam diferentes níveis de atividade antibacteriana (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade bactericida dos óleos essenciais testados pelo método de halo de inibição (mm).

Espécies Vegetais	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Callistemon viminalis</i>	13,0 Ac	08,6 Bg	13,6 Ac
<i>C. polandi</i>	08,8 Ad	08,7 Ag	10,3 Ad
<i>C. citrinus</i>	07,5 Ae	09,2 Ag	08,6 Ad
<i>Kunzea ericoides</i>	06,0 Bd	09,7 Ag	10,3Ad
<i>Melaleuca alternifolia</i>	10,9Ad	10,3 Ag	11,7 Ac
<i>M. ericifolia</i>	0,87 Be	1,07 Bg	1,29 Ac
<i>M. armillaris</i>	05,9 Cf	10,5 Bg	13,1 Ac
<i>M. quinquenervia</i>	06,0 Bf	09,6 Ag	09,8 Ad
<i>M. cajuputi platiphylla</i>	07,6 Ce	09,9 Bg	12,9 Ac
<i>M. cajuputi cajuputi</i>	04,7 Bf	09,7 Ag	09,7 Ad
<i>M. leucadendra</i>	06,0 Bf	10,3 Ag	10,0 Ad
<i>M. linariifolia</i>	08,0 Ae	06,0 Ah	06,0 Ae
<i>M. hypericifolia</i>	10,00 Ad	08,0 Bh	10,6 Ad
<i>M. thymifolia</i>	22,8 Aa	19,9 Bd	23,6 Aa
<b>Antibióticos</b>			
Vancomicina 30 $\mu$ g	12,7 Bc	24,3 Ac	13,0 Bc
Penicilina G 10 UI	07,7 Be*	51,3 Aa	08,3 Bd
Eritromicina 15 $\mu$ g	06,0 Cf*	31,3 Ab	18,0 Bb
Gentamicina 10 $\mu$ g	16,0 Bb	17,7 Be	19,7 Ab
Estreptomicina 10 $\mu$ g	16,0 Bb	15,0 Bf	24,0Aa
Controle	06,0 Af	06,0 Ah	06,0 Ae

Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na horizontal e mesma letra minúscula na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo para o teste de Scott-knott a  $P \leq 0,05$ . \*cepas resistentes

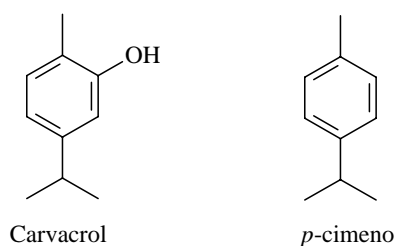
Em geral, por este método, os óleos foram menos ativos que a maioria dos antibióticos testados. Com exceção de *M. thymifolia*, os óleos essenciais de todas as espécies apresentaram baixa atividade. O óleo de *M. thymifolia* foi o mais ativo contra todas as bactérias. Apresentou maior atividade contra *S. aureus* do que os antibióticos gentamicina e estreptomicina.

Embora os óleos de *Melaleuca hypericifolia*, *Callistemon viminalis* e *C. citrinus* possuam altas concentrações de 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0% respectivamente), um composto já conhecido por sua atividade antimicrobiana, apresentaram baixa atividade no

teste de halo de inibição. Da mesma forma, o óleo essencial de *K. ericoides*, composto em sua maioria por monoterpênicos hidrocarbonetos e tendo como componente majoritário  $\alpha$ -pineno (54,5%) apresentou atividade bactericida reduzida.  $\alpha$ -Pineno parece ser um composto que causa comprometimento da integridade celular, inibição da respiração e dos processos de transporte celular (Sikkema et al., 1994). Cerqueira et al. (2007) estudaram os óleos essenciais de *Myrcia myrtifolia* (Myrtaceae) que apresentaram 87,3% de  $\alpha$ -pineno e forte atividade contra *C. albicans* e *S. aureus* resistente a meticilina.

Alguns estudos indicam que o óleo essencial bruto apresenta maior atividade bactericida quando comparado aos componentes majoritários (Gill et al., 2002; Mourey e Canillac, 2002), o que sugere que os componentes presentes no óleo em menor concentração têm papel crítico e podem ter ação sinérgica potencializando a atividade antimicrobiana do óleo. Além disso, a ação dos óleos essenciais parece depender da cepa de bactéria testada e o efeito antagônico e/ou sinérgico deve ser levado em conta em misturas complexas como os óleos essenciais (Kelen e Tepe, 2008).

O óleo essencial de *M. thymifolia* e *C. polandii* apresentaram terpinen-4-ol como componente majoritário (47,0% e 49,8% respectivamente), mas *M. thymifolia* apresentou melhor atividade. O óleo essencial de *M. thymifolia* apresentou apenas um componente não observado no óleo de *C. polandii* (7,7% de 1,8-cineol), e contém *p*-cimeno em maiores concentrações (27,7%) (Tabela 2). *p*-Cimeno é o precursor biossintético do carvacrol e é hidrofóbico (Vernet et al., 1986). Causa maior atividade de desintegração da membrana citoplasmática em relação ao carvacrol (Ultee et al., 2002). Mas *p*-cimeno não apresenta atividade bactericida efetiva, quando utilizado sozinho (Dorman e Deans, 2000; Juliano et al., 2000; Juven et al., 1994). Porém, quando combinado ao carvacrol, o sinergismo entre estes dois compostos tem sido observado (Ultee et al., 2000). A atividade bactericida dos óleos de *M. thymifolia* poderia ser atribuída ao efeito sinérgico de outros componentes presentes no óleo essencial.



**Figura 1:** carvacrol e seu precursor biológico, *p*-Cimeno

Os resultados apresentados na Tabela 3 referentes ao teste de halo de inibição demonstram que óleos essenciais que possuem como componentes majoritários compostos de conhecido potencial antimicrobiano (1,8-cineol, terpinen-4-ol e  $\alpha$ -pineno) apresentaram baixa atividade quando comparados aos antibióticos testados. Além de se levar em conta a possível ação sinérgica e/ou antagônica de componentes presentes nos óleos essenciais em menores proporções, deve-se ter em conta que, embora os testes de avaliação antimicrobiana sejam padronizados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), os mesmos foram desenvolvidos para análises de agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Estes apresentam natureza hidrofílica se difundindo mais facilmente no Agar, ao contrário dos óleos essenciais que são voláteis, insolúveis em água, viscosos e de natureza complexa. Normalmente na literatura referente ao teste de halo de inibição, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com aquelas obtidas pelos antibióticos, no entanto, esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos, bem como, outras variáveis (técnica usada, o meio de crescimento e o microrganismo teste) devem ser levadas em consideração (Duarte et al., 2005; Nostro et al., 2004; Saeed e Sabir, 2004; Christoph et al., 2000). Assim, o teste antimicrobiano utilizando o método da microdiluição deve sempre ser realizado.

Ao contrário do teste de halo de inibição, o método da microdiluição revelou atividade potente de todos os óleos essenciais na inibição do crescimento das bactérias com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,01 a 0,12% (v/v) (Tabela 3).

Estes dados são coerentes, uma vez que o teste de halo de inibição é uma técnica que visa à geração de dados preliminares, fornecendo somente dados qualitativos. Outro fator já discutido é a natureza hidrofóbica da maioria dos óleos essenciais de plantas, característica que impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo Agar (Lambert et al., 2001). Desta forma, esses métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. A Tabela 4 apresenta os valores da CIM obtidos pelo método da microdiluição e os principais componentes do óleo essencial de cada espécie de Myrtaceae.

**Tabela 4.** Valores das CIM dos óleos essenciais testados *in vitro*.

Planta	Principais componentes do óleo essencial (%)	CIM (v/v%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpinen-4-ol (53,7), $\gamma$ -Terpineno (18,9), Terpineno (7,6)	0,12	0,06	0,12
<i>M. ericifolia</i>	1,8-cineol (79,5), $\alpha$ -Terpineol (8)	1,00	0,50	0,50
<i>M. armilaris</i>	1,8-cineol (80,2), $\alpha$ -Terpineol (9,2), $\alpha$ -Tujeno (4,8)	0,03	0,06	0,12
<i>M. cajuputi</i>	1,8-cineol (47,3), $\alpha$ -Terpineol (22,6), Viridiflorol (13,4), Globulol (7,6)	0,06	0,12	0,25
<i>M. platyphylla</i>	1,8-cineol (41,0), Citronelol (13,0), Citronelal (7,0), $\alpha$ -Terpineol (7,0)	0,06	0,12	0,12
<i>M. leucadendra</i>	Metileugenol (96,6)	0,06	0,03	0,03
<i>M. quinquenervia</i>	Viridiflorol (71), 1,8-cineol (7,2), Óxido de cariofileno (3,5)	0,01	0,03	0,06
<i>M. hypericifolia</i>	1,8-cineol (87,9), Terpinen-4-ol (3,2), $\alpha$ -pineno (2,9)	0,06	0,03	0,03
<i>M. linariifolia</i>	Metileugenol (87,8), Limoneno (1,8)	0,01	0,01	0,62
<i>M. thymifolia</i>	Terpinen-4-ol (47), $\rho$ -cimeno (27), 1,8-cineol (7,7)	0,06	0,06	0,06
<i>Callistemon viminalis</i>	1,8-cineol (64,9), $\alpha$ -pineno (12), $\alpha$ -Terpineol (13,2), $\rho$ -Cimeno (3,6)	0,06	0,06	0,01
<i>C. polandi</i>	Terpinen-4-ol (49,8), $\gamma$ -Terpineno (16,8), $\rho$ -Cimeno (7,4), Terpineno (6,7), $\alpha$ -felandreno (5,9)	0,06	0,03	0,5
<i>C. citrinus</i>	1,8-cineol (77,2), $\alpha$ -Terpineol (8,8), $\alpha$ -pineno (3,2), $\beta$ -pineno (2,2), Mirceno (2,3)	0,12	0,12	0,06
<i>Kunzea ericoides</i>	$\alpha$ -pineno (54,5), 1,8-cineol (16,4), $\alpha$ -terpineol (5,7), viridiflorol (3,3)	0,01	0,03	0,03

Pode-se observar o predomínio de compostos oxigenados como metileugenol (87,8-96,6%), 1,8-cineol (41-87,9%), terpinen-4-ol (3,2-53,7%),  $\alpha$ -Terpineol (8,8-22,6%), Citronelol (13,0%), viridiflorol (71,0%) e globulol (7,6%). Apenas em *K. ericoides* apresentou o monoterpene não oxigenado bicíclico  $\alpha$ -pineno (54,5%) como componente majoritário, mas apresentou os oxigenados 1,8-cineol (16,4%),  $\alpha$ -terpineol (5,7%) e viridiflorol (3,3%). A literatura reporta os efeitos citotóxicos provocados em testes *in vitro* para a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas submetidas aos testes de halo de inibição e microdiluição em caldo utilizando-se óleos essenciais. Alguns autores (Bruni et al., 2003; Sacchetti et al., 2005) associam esta atividade à presença de fenóis, aldeídos e alcoóis, como observados no presente estudo. Esta classe de terpenos se ligaria aos grupos amina e hidroxiamina das proteínas da membrana plasmática das bactérias alterando sua permeabilidade e levando-as à morte (Juven et al., 1994).

Outros autores (por exemplo, Carson et al., 2002) indicam que a citotoxicidade dos óleos essenciais parece estar relacionada também ao diversificado número de constituintes presentes em alguns óleos que parece lhes conferir maior campo de ação nos diversos componentes celulares. A facilidade de penetração através da membrana plasmática devido à sua natureza lipofílica, leva à desorganização estrutural de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos danificando a estrutura das membranas. A alteração da integridade das membranas celulares leva a uma alteração na permeabilidade resultando na perda de radicais, citocromo C, cálcio, outros íons e proteínas. A permeabilização da membrana

externa e interna das mitocôndrias, por exemplo, leva à morte celular (Yoon et al., 2000; Armstrong, 2006). Compostos como, por exemplo, eugenol, carvacrol e timol, que tem natureza fenólica apresentam grande atividade antimicrobiana (Davidson, 1993). A exata relação causa-efeito para o mecanismo de ação dos compostos fenólicos ainda não é bem esclarecida, mas há evidências de que estes compostos podem inativar enzimas essenciais, reagindo com a membrana celular (Davidson, 1993).

Os óleos das espécies *Callistemon polandi* e *M. alternifolia* que tem o monoterpene terpinen-4-ol como componente majoritário (49,8% e 53,7% respectivamente), apresentaram maiores atividades bactericidas, evidenciada pelos baixos valores de CIM (Tabela 4). Óleo essencial de *M. alternifolia* é amplamente utilizado pela indústria, tendo largo espectro de ação antimicrobiana. Estes óleos, conhecidos como “Tea Tree Oil” (TTO) contém cerca de 100 componentes bioativos, mas o principal componente antimicrobiano é o terpinen-4-ol que provoca danos estruturais em paredes celulares e membranas de bactérias e fungos, comprometendo a integridade celular (Halcon e Milkus, 2004). Estas alterações provocam aumento da fluidez e modificam a permeabilidade da membrana (Bard et al., 1998; Uribe et al., 1985), levando à perda de componentes citoplasmáticos (Carson et al., 2002). Além de seus efeitos em nível de membrana, o TTO pode ter efeito danoso em mitocôndrias (que também possuem membrana lipídica) comprometendo assim a respiração celular (Uribe et al., 1985; Cox et al., 2000). A análise em microscopia eletrônica de bactérias tratadas com TTO revelou danos à membrana plasmática, reconhecidos pelas alterações observadas no mesossomo e pela perda de conteúdo citoplasmático das bactérias (Gustafson et al., 1998). Além dos terpenos, os sesquiterpenos podem inibir a ação da ATPase mitocondrial em leveduras, comprometendo o processo respiratório (Lunde et al., 2000). Estudos reforçam a teoria de que o TTO age sobre a membrana plasmática induzindo também a perda de potássio e a inibição da respiração (Cox et al., 2000). A perda de material intracelular, a incapacidade de manter a homeostase e a inibição da respiração após tratamento com TTO são consistentes com o mecanismo de ação que envolve a perda da integridade e função da membrana (Carson et al., 2006).

Os óleos essenciais de *Kunzea ericoides* apresentaram valores de MIC de 0,01%; 0,03%; e 0,03% para *B. cereus*, *E.coli* e *S. aureus*, respectivamente. O óleo desta espécie apresentou elevado teor de monoterpene hidrocarbonetos sendo  $\alpha$ -pineno o componente majoritário (54,5%). Apresentou também modestos níveis de sesquiterpenos como, por

exemplo, viridiflorol e outros terpenos como 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol (Tabela 2), compostos presentes também nos óleos essenciais de *M. alternifolia*.

*M. quinquenervia*, *M. linariifolia* e *K. ericoides* apresentaram maior atividade contra *B. cereus* apresentando valor de CIM de 0,01% v/v. *M. linariifolia* foi também mais ativa contra *E. coli* (CIM =0,01%) seguida por *K. ericoides*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *M. hypericifolia* e *C. polandi* (CIM =0,03%). *C. viminalis* foi mais ativo contra *S. aureus* (CIM =0,01% v/v) seguido por *K. ericoides* (CIM =0,03% v/v). Christoph et al. (2000) conduziu investigações sobre atividade dos óleos de Kanuka (*K. ericoides*), manuka (*Leptospermum scoparium*), cajuput (*M. cajuputi*), niaouli (*M. quinquenervia*), TTO-Tea Tree Oil (*M. alternifolia*) e o complexo de  $\beta$ -trietonas (contendo flavesona, isoleptospermona e leptospermona) sobre vários microorganismos.  $\alpha$ -Terpineol foi usado como controle positivo. Cada óleo foi testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra fungos por meio da determinação da CIM. O óleo de *M. alternifolia* foi o mais ativo seguido por *M. cajuputi* e *M. quinquenervia*, ambas com altos teores de 1,8-cineol. O óleo de kanuka (*K. ericoides*) foi ativo contra bactérias Gram-positivas em concentrações entre 0,2-0,4% v/v. Na Tabela 2, podemos observar que o óleo de *K. ericoides* foi ativo contra bactérias Gram-positivas testadas em concentrações bem menores (0,01%-0,03% v/v).

Diversos fatores podem influenciar a atividade dos óleos essenciais de mesma espécie. Fatores como variações geográficas (latitudes e longitudes), variações genéticas intraespecíficas da espécie, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, irrigação, tempo e condições ambientais, processamento do material vegetal (fresco ou seco), técnica de extração, podem afetar a composição química dos óleos, provocando alterações na atividade antimicrobiana (Sefidkon et al., 2007; Apel et al., 2006; Asekun et al., 2006; Potzernheim et al., 2006; Viljoen et al., 2005).

Embora na correlação da atividade bactericida com a composição química do óleo essencial seja difícil associar tal atividade a um composto específico, devido à complexidade e variabilidade dos componentes dos óleos, a presença de altos teores de eucaliptol (1,8-cineol) em *Melaleuca hypericifolia* (87,9%), *M. armillaris* (80,2%), *Callistemon citrinus* (77,2%), *C. viminalis* (64,9%), *M. cajuputi* (47,3%) e *M. platyphylla* (41,0%), pode estar relacionado à potente atividade bactericida verificada pelos baixos valores de CIM encontrados para os óleos essenciais destas espécies (Tabela 2).

Hayouni et al. (2008) afirmam que a presença de 1,8-cineol e outros compostos oxigenados no óleo essencial de *M. armillaris* poderiam estar relacionados à forte atividade bactericida verificada para os óleos essenciais desta espécie, uma vez que a polaridade de tais moléculas, permitiria sua melhor solubilidade em meio aquoso. Os possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos têm sido reportados em vários trabalhos científicos já citados anteriormente. Entretanto, estes mecanismos ainda não foram completamente elucidados (Lambert et al., 2001). Embora existam muitos estudos sobre algumas espécies da família Myrtaceae, como *Eucalyptus* spp. e *M. alternifolia*, por exemplo, dados sobre diversas outras espécies são escassos, sobretudo relativos a atividade bactericida de óleos essenciais. Tanto o estudo dos mecanismos de ação como a atividade bactericida dos óleos essenciais dentro desta família se constituem um campo promissor, dada a importância econômica dos óleos essenciais já estudados de espécies de Myrtaceae.

### 3. CONCLUSÕES

Os óleos voláteis das espécies estudadas são compostos em sua maioria por monoterpenos, dos quais 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0% para *Melaleuca hypericifolia*, *Callistemon viminalis* e *C. citrinus*, respectivamente), terpinen-4-ol (47,0% e 49,8% para *M. thymifolia* e *C. polandii* respectivamente) e  $\alpha$ -pineno (54,5% para *Kunzea ericoides*) foram os componentes majoritários. O óleo essencial de *M. linariifolia* apresentou altas concentrações do fenilpropanóide metileugenol (86,8%). Estas espécies são promissoras fontes destes compostos que são largamente utilizados nos diversos ramos da indústria.

Este estudo revelou também a forte atividade bactericida dos óleos essenciais das espécies de Myrtaceae estudadas. A baixa atividade da maioria dos óleos essenciais revelada pelo teste de halo de inibição parece estar relacionada às características do óleo (volatilidade, hidrofobicidade, viscosidade, natureza complexa) que dificultam sua difusão no Agar. Os resultados encontrados no teste de microdiluição em caldo revelam o potencial bactericida dos óleos essenciais destas espécies indicando seu potencial para uso na indústria de alimentos e medicamentos em geral.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams RP. 1995.** *Identification of Essential oil Components by Gas chromatography/Mass Spectroscopy*. Illinois: Allured Publishing Corporation. Carol Stream.
- Agata, N, Ohta M, Yokoyama K. 2002.** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereude) in various foods. *International Journal at Food Microbiology* 73: 23-27.
- Altman PW. 1988.** Australian tea-tree oil. *Australian Journal of Pharmacy* 69: 276-278.
- American Society of Agricultural Engineers, 2000.** *ASAE S358.2 DEC99, Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement – Forages*.
- Apel MA, Sobral M, Henriques AT. 2006.** Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia* 16: 402-407.
- Armstrong, J. 2006.** The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*. *Oxon* 6: 225-234.
- Arnal-Schnebelen B, Hadji-Minaglou F, Peroteau JF, Ribeyre F, de Billerbeck VG. 2004.** Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *International Journal of Aromatherapy* 14: 192-197.
- Asekun OT, Grierson DS Afolayan AJ. 2006.** Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis*. *Food Chemistry* 101: 995-998.
- Bard M, Albrecht MR, Gupta N. 1988.** Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* 23: 534-538.
- Black RJ, Sheehan TJ, Smith GS. 1977.** Evaluation of *Callistemon* species for north florida1. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 90: 117-118
- Bloor SJ. 1992.** Antiviral phloroglucinols from New Zealand *Kunzea* species. *Journal of Natural Products* 55: 43-47.
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, Hall N, Hyland BPM, Johnston RD, Kleinig DA, Turner JD. 1984.** *Forest Trees of Australia*. Nelson and CSIRO, Melbourne.
- Bonacorsi SPP, Clermont O, Tinsley C, Le-Gall I, Beaudoin JC, Elion J, Nassif X, Bingen E. 2000.** Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and Immunity* 68: 2096-2101.
- Brophy JJ, Lassak EV. 1988.** *Melaleuca leucadendra* L. leaf oil: two phenylpropanoid chemotypes. *Flavour and Fragrance Journal* 3: 43-46.
- Brunetti IL, Vendramini RC, Januário AH, França SC, Pepato MT. 2006.** Effects of toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 44: 35-43.
- Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M. 2003.** Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 85: 415-421.

- Budhiraja SS, Cullum ME, Sioutis SS, Evangelista I, Habanova ST. 1999.** Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* 22: 447-453.
- Burt S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. 2006.** *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 50-62.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46: 1914-1920.
- Carson CF, Riley TV. 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 264-269.
- Christoph F, Kaulfers P-M, Stahl-Biskup E. 2000.** A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of *b*-triketones. *Planta Medica* 66: 556-560.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000.** The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- Craven LA, Lepschi BJ. 1999.** Enumeration of the species and infraspecific taxa of *Melaleuca* (Myrtaceae) occurring in Australia and Tasmania. *Australian Systematics Botany* 12: 819-927.
- Cronquist A. 1981.** *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University: New York.
- Davidson, PM. 1993.** Parabens and phenolic compounds. In: Davidson PM, Branen, AL (Eds.) *Antimicrobials in foods* (pp. 263–305). New York, Marcel Dekker, Inc.
- Davies NW. 1990.** Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20m Phases. *Journal of Chromatography* 503: 01-24.
- Desmarchelier PM, Grau FH. 1997.** *Escherichia coli*. In: Hocking, AD, Arnold G, Jansen I. (Ed.). *Foodborne microorganisms of public health significance*. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc. Cap. 7, p. 231-264.
- Dewhirst FE. 1980.** Structure-activity relationships for inhibition of *prostaglandin* cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* 20: 209-222.
- Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. 2006.** Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 2745-2749.
- Doran JC, Gunn BV. 1994.** Exploring the Genetic Resources of Tropical Melaleucas. *Forest Genetic Resources Bulletin* 22: 12-24.
- Dorman, H.J.D.; Deans, S.G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Bacteriology* 88: 308-316.

- Duarte MCT, Figueira, GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. 2005.** Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 305-311.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London, Academic Press.
- Farrar WE. 1985.** Antibiotic resistance in developing countries. *Journal of Infectious Disease* 152: 1103-1106.
- Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 2002.** *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology* 19: 423-430.
- Furneri PM, Paolino D, Saija A, Marino A, Bisignano G. 2006.** In vitro antimycoplasmal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 706-707.
- Germano PML, Germano MIS. 2003.** *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2. ed. São Paulo, p. 215-220.
- Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. 2002.** Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73: 83-92.
- Girard B. 1996.** Retention Index Calculation using Kováts constant model for Linear Temperature-programmed Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A* 721: 279-288.
- Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26: 194-198.
- Halcon L, Milkus K. 2004.** *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *American Journal of Infection Control* 32: 402-408.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2002.** In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 195-199.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2004.** Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 1081-1085.
- Harris R. 2002.** Progress with superficial mycoses using essential oils. *International Journal of Aromatherapy* 12: 83-91.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ., Gorris LGM, Von Wright A. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46: 3590-3595.
- Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. 1987.** Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Review of Infectious Diseases* 9: 1065-1078.
- Hong EJ, Na KJ, Choi IG, Choi KC, Jeung EB. 2004.** Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 863-866.
- Iori A, Grazioli D, Gentile E, Marano G, Salvatore G. 2005.** Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Veterinary Parasitology* 129: 173-176.

- Ito, H, Kasajima N, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. 2004.** Dimeric Flavonol Glycoside and Galloylated C-Glucosylchromones from *Kunzea ambigua*. *Journal of Natural Products* 67: 411-415.
- Jazet PMD, Tatsadjieu LN, Ndongson BD, Kuate J, Zollo PHA, Menut, C. 2009.** Correlation between chemical composition and antifungal properties of essential oils of *Callistemon rigidus* and *Callistemon citrinus* of Cameroon against *Phaeoramularia angolensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 3: 9-15.
- Juliano C, Mattana A, Usai M. 2000.** Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-borana* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12: 516-522.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 626-631.
- Kalemba D, Kunicka A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-829.
- Kameswara RB, Apparao CH. 2001.** Hypoglycemic and anti-hyperglycemic activity of *Syzygium alternifolium* (Wt.) Walp. Seed extracts in normal and diabetic rats. *Phytomedicine* 8: 88-93.
- Kasajima N, Ito H, Hatano T, Yoshida T. 2008.** Phloroglucinol diglycosides accompanying hydrolyzable tannins from *Kunzea ambigua*. *Phytochemistry* 69: 3080-3086.
- Kelen M, Tepe B. 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096-4104.
- Khambay BPS, Beddie DG, Simmonds MSJ. 2002.** An insecticidal mixture of tetramethylcyclohexenedione isomers from *Kunzea ambigua* and *Kunzea baxterii*. *Phytochemistry* 59: 69-71.
- Kitanov GM, Van DT, Assenov I. 1992.** Flavonols from *Melaleuca leucadendron* leaves. *Fitoterapia* 68: 379-380.
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1: 119-128.
- Kosalec I, Pepeljnjak S, Kustrak D. 2005.** Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica* 55: 377-385.
- Krieg NR, Holt JG. (Ed.). 1984.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Bacteriology* 91: 453-462.
- Lee BH, Annis PC, Tumaalii F, Choi WS. 2004.** Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research* 40: 553-564.
- Lippi G, Serra G, Vernieri P, Tognoni F. 2003.** Response of potted *callistemon* species to high salinity. *Acta Horticulturae* 609: 247-250.

- Lis-Balchin M, Hart SL, Deans SG 2000.** Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or manuka and *Kunzea ericoides* or kanuka), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research* 14: 623-629.
- Lis-Balchin M, Hart SL. 1998.** An investigation of the actions of the essential oils of Manuka (*Leptospermum scoparium*) and Kanuka (*Kunzea ericoides*), Myrtaceae on guinea-pig smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50: 809-811.
- Lozoya X, Reyes-Morales H, Chávez-Soto MA, Martínez-García MC, Soto-González Y, Doubova SV. 2002.** Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 19-24.
- Lunde CS, Kubo I. 2000.** Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 1943-1953.
- Mabberley DJ. 1999.** *The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants.* 4th ed. Cambridge University Press: New York, 1993.
- McGowan JE. 1987.* Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use? *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 63: 253-268.
- Metcalfe CR, Chalk L. 1988.** *Anatomy of the Dicotyledons.* 2 ed. Clarendon, Oxford.
- Mourey A, Canillac N. 2002.** Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289-292.
- NCCLS, 1997.** *National Committee for Clinical Laboratory Standards; Performance standards for antimicrobial susceptibility test.* Ninth International Supplement, M100-S9, NCCLS, Wayne.
- NCCLS. 1999.** *National Committee for Clinical Laboratory Standards; Performance standards for antimicrobial susceptibility test.* Ninth International Supplement. M100-S9, Wayne, PA.
- Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V. 2004.** Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol *FEMS Microbiology Letters* 230: 191-195.
- O'Brien TF, the Members of Task Force 2. 1987.** Resistance of bacteria to antimicrobial agents: report of task force 2. *Review of Infectious Diseases* 9: 244-260.
- Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS. 2000.** Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49: 1-51.
- Opeoluwa O. Oyedeji, Lawal OA, Shode FO, Oyedeji, AO. 2009.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. *Molecules* 14: 1990-1998.
- Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. 2006.** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69: 1046-1055.
- Pandey DK. 1995.** Fungitoxicity of essential oil of *Callistemon lanceolatus* against some sugarcane pathogens. *Biological Science* 65: 73-80.

- Paula JAM, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD, Paula JR. 2005.** Estudo Farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento 2*: 153-156.
- Pauli A. 2006.** Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews* 26: 223-268.
- Perry NB, Van-Klink JW, Brennan NJ, Harris W, Anderson RE, Douglas MH, Smallfield BM. 1997.** *Phytochemistry* 45: 1605-1612.
- Pitarokili D, Couladis M, Petsikos-Panayotarou N, Tzakou O. 2002.** Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6688-6691.
- Porter NG, Wilkins, AL. 1998.** Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochemistry* 50: 407-415.
- Potzernheim MCL, Bizzo HR, Vieira RF. 2006.** Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 246- 251.
- Radhika B, Padmapriya BP, Chandrashekar A, Keshava N, Varadaj MC. 2002.** Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 74: 131-138.
- Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. 2004.** In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67: 1252-1256.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- Saeed MA, Sabir AW. 2004.** Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. *Fitoterapia* 75: 204-208.
- Salustiano VC, Andrade NJ, Soares NFF, Lima JC, Bernardes PC, Luiz LMP, Fernandes PE. 2009.** Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20: 439-442.
- Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. 2004.** Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* Isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *Journal of Infectious Diseases* 190: 2121-2128.
- Saxena S, Gomber C. 2006.** Antimicrobial Potential of *Callistemon rigidus*. *Pharmaceutical Biology* 44: 194-201.
- Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S. 2007.** The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry* 100: 1054-1058.
- Sharberg, DR, Clonell, DB, Glatzer, L.1982.** Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22: 204-207.

- Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z. 2006.** Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100: 296-305.
- Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. 1995.** Membrane toxicity of cyclic hydrocarbons. *Microbiological Review* 59: 201-222.
- Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8022-8028.
- Silva CJ, Barbosa LCA, Maltha CRA, Pinheiro AL, Ismail FMD. 2007.** Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour and Fragrance Journal* 22: 474-478.
- Solereder H. 1908.** *Systematic anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford, v.1, p.350-355.
- Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. 2006.** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.* 61: 160-164.
- Sonboli A, Eftekhari F, Yousefzadi M, Kanani MR. 2005.** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. *Z. Naturforsch.* 60: 30-34.
- Sonboli A, Mirjalili MH, Hadian J, Ebrahimi SN, Yousefzadi M. 2006.** Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech. f. from Iran. *Z. Naturforsch.* 61: 677-680.
- Souza VC, Lorenzi H. 2005.** *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em APG/II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Sridhar SB, Sheetal UD, Pai MRS, Shastri MS 2005.** Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 463-468.
- Sudhakar M, Raju D B. 2005.** Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of Indian *Callistemon lanceolatus* leaves. *International Journal of Chemical Sciences* 3: 513-516.
- Tong MM, Altman PM, Barnetson R S. 1992.** Tea tree oil in the treatment of *Tinea pedis*. *Australasian Journal of Dermatology* 33: 145-149.
- Turina AV, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA. 2006.** Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry* 122: 101-113.
- Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1561-1568.
- Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. 2000.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174: 233-238.
- Uribe S, Ramirez J, Peña A. 1985.** Effects of  $\alpha$ -pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology* 161: 1195-1200.

- Van Den Dool, H, Kratz PD. 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 11: 463-471.
- Vernet P, Gouyon PH, Valdeyron G. 1986.** Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: A case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica* 69: 227-231.
- Viljoen AM, Subramoney S, Vuuren SFV, Baser KHC, Demirci B. 2005.** The composition geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 271-277.
- Wang SY, Chen PF, Chang ST. 2005.** Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96: 813-818.
- Wang Z, Song J, Chen J, Song Z, Shang S, Jiangd Z, Han Z. 2008.** QSAR study of mosquito repellents from terpenoids with a six-member-ring. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18: 2854-2859.
- Wink M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3-19
- Yoon HS, Moon SC, Kim ND, Park BS, Jeong MH, Yoo YH. 2000.** Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 151-6.
- Yoshikawa M, Shimada H, Nishida N, Li Y, Toguchida I, Yamara J, Matsuda H 1998.** Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 46: 113-119.

**CAPÍTULO 2:**

**VARIAÇÃO SAZONAL, HISTOLOCALIZAÇÃO, FITOTOXICIDADE  
E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE  
*Sphagneticola trilobata* (ASTERACEAE)**

## CAPÍTULO 2:

### VARIAÇÃO SAZONAL, HISTOLOCAÇÃO, FITOTOXICIDADE E ATIVIDADE BACTERICIDA DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Sphagneticola trilobata* (ASTERACEAE)

**RESUMO:** investigações anatômicas e histoquímicas das estruturas secretoras das folhas e caule de *Sphagneticola trilobata*, bem como a variação sazonal, atividade bactericida e fitotóxica dos óleos essenciais foram realizadas. As análises histoquímicas permitiram identificar os locais de síntese e acúmulo dos óleos voláteis em estruturas internas (canais) e externas (tricomas). As análises mostraram também que os tricomas secretores produzem esteróides. O óleo volátil de *S. trilobata* exibiu significativa supressão da germinação e desenvolvimento radicular nas sementes de *Allium cepa* e apresentou forte atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. O maior rendimento do óleo essencial desta espécie foi obtido de plantas coletadas no inverno, quando ocorreu baixa temperatura e precipitação. O óleo volátil foi caracterizado por altas porcentagens de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos e baixos níveis de sesquiterpenos oxigenados. Os componentes majoritários foram germacreno D (11,9%-35,8%),  $\alpha$ -felandreno (1,4%-28,5%),  $\alpha$ -pineno (7,3%-23,8%), *E*-cariofileno (4,6%-19,0%), biciclogermacreno (6,0%-17,0%), limoneno (1,8%-15,1%) e  $\alpha$ -humuleno (4,0%-11,6%). As porcentagens dos componentes do óleo essencial de *S. trilobata* variaram significativamente durante os meses do ano.

**ABSTRACT:** Anatomical and histochemical investigations of the *Sphagneticola trilobata* secretory structures in leaves and stems, and the seasonal variation, antibacterial and phytotoxicity of essential oils were carried out. Histochemical techniques enabled specific location of the site of essential oil accumulation in the internal structures (canals). Histochemical analysis showed that the secretory trichomes produced steroids. The *S. trilobata* essential oil exhibited significant suppression on germination and radical growth of seeds in *Allium cepa* and shows a great antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. The highest yield was obtained from plants collected in winter, when it was registered low temperature and precipitation. The essential oil was characterized by a high percentage of hydrocarbon sesquiterpenes, hydrocarbon monoterpenes and low levels of oxygenated sesquiterpenes. The major components were Germacrene D (11,9%-35,8%),  $\alpha$ -felandrene (1,4%-28,5%),  $\alpha$ -pinene (7,3%-23,8%), *E*-caryophyllene (4,6%-19,0%), bicyclogermacrene (6,0%-17,0%), limonene (1,8%-15,1%) and  $\alpha$ -humulene (4,0%-11,6%). The percentage of most of the individual constituents present in *S. trilobata* essential oil changed significantly during the months.

## 2.1. INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas são economicamente importantes devido ao óleo essencial que produzem. Nos últimos anos, os óleos essenciais destas plantas têm despertado grande interesse como fonte de produtos naturais para a indústria em geral (Buchanan et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2004).

Os óleos essenciais são responsáveis pelo odor distintivo das plantas aromáticas. Aproximadamente 3000 deles são conhecidos e 10% destes têm importância comercial na indústria de cosméticos, indústria farmacêutica e de alimentos (FAO, 1995). Assim eles são geralmente reconhecidos como seguros pela FDA (Food and Drug Administration) (Trongtokit et al., 2005). Sua composição pode variar entre as espécies e variedades de plantas aromáticas e mesmo dentro da mesma espécie ou variedade, quando cultivadas em diferentes áreas geográficas (Zygodlo e Juliani, 2003).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados e acumulados em estrutura secretoras especiais presentes na maioria das plantas vasculares. Os óleos essenciais podem atrair agentes polinizadores e vetores de dispersão de sementes ou podem repelir herbívoros ou proteger a planta contra o ataque de patógenos (Fahn, 1988).

Os tecidos secretores se diferenciam em sua estrutura, localização na planta e natureza do material secretado. Esses tecidos podem ser constituídos por uma única, poucas ou um grande grupo de células. O processo de extração dos óleos essenciais deve sempre levar em conta o tipo de estrutura secretora que sintetiza e armazena tais substâncias.

Dentre as famílias de plantas aromáticas, destaca-se a família Asteraceae, com várias espécies de uso na medicina popular e que tem despertado grande interesse do ponto de vista químico. Diversas espécies dessa família são estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Zomlefer, 1994).

Esta família é uma das maiores famílias dentre as Magnoliophyta representando aproximadamente cerca de 10% de toda a flora existente. Compreende aproximadamente 1.535 gêneros e 23.000 espécies (Bremer, 1994, 1996; Judd et al. 2009) e é subdividida em três subfamílias e 17 tribos.

*Sphagneticola trilobata* é nativa do Brasil, e pertence à tribo Heliantheae, que com aproximadamente 189 gêneros e 2.500 espécies, é uma das mais numerosas e diversificadas morfológicamente (Bremer, 1994). Esta tribo dispersou-se por todo

continente americano, nas regiões tropicais e subtropicais, com poucos representantes nas regiões temperadas. Os maiores gêneros são *Verbesina* (300 spp.), *Bidens* (240 spp.), *Viguiera* (180 spp.), *Wedelia* (130 spp.) e *Calea* (110 spp.). No Brasil, está estabelecida por cerca de 60 gêneros e 374 espécies (Pereira, 2001). Uma característica importante nesta tribo é a presença de fitomelanina, uma substância negra, depositada no espaço intercelular entre a camada mais externa do pericarpo e a camada mediana do mesmo, que estaria relacionada à proteção da cipsela contra a predação por insetos, porém pouco se sabe sobre esta substância (Pandey e Dhakal, 2001).

*S. trilobata* cresce em regiões costeiras e de terra árida e é conhecida popularmente como "Pseudo-arnica", "Margaridão", "Picão da Praia" e "Vedélia" (Correa, 1984; Cechinel-Filho, 2000). Na medicina popular é utilizada no tratamento de dor nas costas, câibras musculares, reumatismo, feridas persistentes, dores e inchaços, artrite e dor nas articulações (Arvigo e Balik, 1993). Apesar da ausência de estudos sobre a composição química e atividade biológica dos óleos voláteis desta espécie, vários efeitos biológicos têm sido descritos para os extratos da parte aérea de *S. trilobata* incluindo antinoceptivo (Block et al, 1998), tripanocida (Vieira et al, 2002), hipoglicemiante (Novaes et al, 2001), bactericida e larvicida (Wilkens et al, 2002). O extrato da parte aérea sem flores de *S. trilobata* em hexano e acetato de etila apresentou propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativas, mas foi inativa contra fungos e leveduras (Taddei e Rosas-Romero, 1999).

Outro importante efeito dos óleos essenciais na interação planta-planta é sua atividade alelopática, já descrita na literatura para o óleo volátil de espécies da família Asteraceae (Lopez et al., 2009). Sabemos que ao longo da evolução, características químicas selecionadas permitiram às plantas vários tipos de interações com outros organismos, como a autodefesa, atração sexual, simbiose dentre outras (Rice, 1984; Harborne, 1989). A produção e acúmulo de metabólitos secundários, que inibem e/ou estimulam a germinação e o desenvolvimento de outras plantas, é um mecanismo importante nas interações planta-planta. Plantas aromáticas podem conter diversos princípios ativos, que desempenham um papel importante nestas interações e constituem uma fonte primária de aleloquímicos (Aliotta et al., 1989; Vokou, 1992). Os aleloquímicos mais comuns são compostos fenólicos e terpenóides (Einhellig e Leather, 1988; Wójcik-Wojtkowiak, 1992). Além disto, a estação do ano e o número de horas de luz solar que as plantas recebem pode influenciar a fitoquímica da planta, uma vez que alguns compostos podem ser acumulados em um período particular para responder às mudanças ambientais

(Koenen, 2001). Desta forma, as condições climáticas e a disponibilidade de água no solo podem alterar o metabolismo secundário vegetal e, conseqüentemente, alterar a composição dos óleos essenciais, ao longo das estações do ano (Freire et al., 2006). A composição química dos compostos produzidos por uma planta é, portanto, sujeita a variações quantitativas e qualitativas. Material vegetal coletado em diferentes épocas do ano pode conter compostos bioativos diferenciados (Eloff, 1999). Para *S. trilobata* não se verificou até o presente momento, na literatura, trabalhos referentes à possível atividade alelopática de seus óleos voláteis e da variação da composição química e atividade biológica destes óleos coletados em diferentes estações do ano.

Portanto, em virtude da utilização de *S. trilobata* como planta medicinal e pelo desta espécie ser uma planta ruderal e de fácil acesso, este estudo objetivou fornecer dados relativos à caracterização das estruturas secretoras de caule e folha, histolocalização, análise do rendimento e composição química dos óleos essenciais de *S. trilobata* coletados ao longo de 15 meses, além da avaliação da atividade bactericida e fitotóxica destes óleos.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Material vegetal

Folhas de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski foram coletadas mensalmente, entre setembro 2008 e outubro de 2009 entre 08-09 horas. Flores e caule foram coletados apenas nos meses de novembro de 2009 e fevereiro de 2010, respectivamente. As amostras foram provenientes de população ocorrente no arboreto do Herbário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. O material foi identificado, herborizado depositado no Herbário VIC (nº 32.484), do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os dados de temperatura e precipitação utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil. A estação utilizada foi a de Viçosa, latitude -20.7667° e longitude -42.8666°.

### 2.2.2. Microscopia de luz e análise histoquímica

Fragmentos frescos de folhas e caules foram fixados em FAA (formaldeído-ácido acético-etanol 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen, 1940). As amostras foram armazenadas em etanol 70%. Parte delas foi desidratada em série de álcool butílico terciário, incluída em

parafina histológica com DMSO (Histosec® Merck), cortada transversalmente e longitudinalmente (4 ou 5µm de espessura) em um micrótomo rotativo (RM 2155-Leica). Os cortes foram corados com azul de Astra e safranina aquosa. As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount®, Fisher).

Para os testes histoquímicos, folhas e caules frescos de *Sphagneticola trilobata* foram seccionados transversalmente e longitudinalmente em micrótomo manual de mesa (LPC). Os cortes foram submetidos a testes histoquímicos para detecção das seguintes classes de metabólitos: Sudan Red (Johansen, 1940) e vermelho neutro (sob luz UV) para lipídeos totais, Azul do Nilo (Jensen, 1962) para lipídios neutros e ácidos; reagente de Nadi (David e Carde, 1964) para terpenóides e tricloreto de antimônio (Mace e Howell, 1974) para detecção de esteróides.

Os respectivos controles foram realizados simultaneamente, segundo recomendações contidas na literatura (Johansen, 1940; Jensen, 1962; David e Carde, 1964; Gabe, 1968; Mace e Howell, 1974; Brundett et al., 1991).

A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (Modelo AX70TRF, Olympus Optical), conectado a um sistema de fotomicrografia (U-Photo), pertencente ao Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Foi utilizado um microscópio com epifluorescência (Olympus BX60) equipado com um filtro UV (WU: 330-385 nm), um espelho dicróico (400 nm) e um filtro de barreira (420 nm) para as amostras frescas submetidas ao tricloreto de antimônio (Mace e Howell, 1974) para detecção de esteróides e para verificação de autofluorescência.

### 2.2.3. Extração e análise dos óleos essenciais

As folhas, caules e flores das plantas foram coletados separadamente em pontos aleatórios da população de *S. trilobata*. Cada amostra foi subdividida em três porções de 100, 90 e 60 gramas, respectivamente para folhas, caule e flores, picadas e submetidas à extração. O processo de extração do óleo essencial utilizado em todas as amostras foi o de hidrodestilação, por três horas consecutivas e em triplicata, utilizando-se o aparelho tipo Clevenger modificado. O óleo obtido foi recolhido e acondicionado em frascos de vidro âmbar e mantido sob atmosfera de nitrogênio à temperatura de aproximadamente 0° C, até o momento da análise por GC /GC-MS.

A determinação do peso seco foi realizada para cada amostra (2 g à temperatura de  $103 \pm 2$  °C durante 24 horas) de acordo com métodos publicados (ASAE, 2000). Cada determinação foi feita em triplicata.

Para a quantificação dos componentes dos óleos essenciais, utilizou-se cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida SPB-5 (30 m  $\times$  0,25 mm, espessura do filme de 0,25  $\mu$ m) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N<sub>2</sub> sob fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C; temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 4 min., seguido de aquecimento a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0  $\mu$ L (10 mg mL<sup>-1</sup> em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); razão de split 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total do cromatograma.

Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais, utilizou-se cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-17A) equipado com coluna de sílica fundida RTX-5 (30 m  $\times$  0,25 mm, espessura do filme de 0,25  $\mu$ m) e acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP5050A). Gás de arraste He sob fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor 220 °C, temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0  $\mu$ L (10 mg mL<sup>-1</sup> em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); razão de split 1:10; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV); amplitude de varredura de 30 a 700 Da.

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente com os disponíveis na base de dados do equipamento (Wiley sétima edição) e também pelo índice de retenção relativo calculado a partir da injeção de uma mistura de alcanos lineares (C<sub>9</sub> – C<sub>26</sub>) (Davies, 1990; Adams, 1995; Girard, 1996, Van den Dool e Kratz, 1963).

#### 2.2.4. Atividade Bactericida e Testes de fitotoxicidade

A atividade bactericida foi testada conforme descrito no Capítulo 1 deste trabalho.

A atividade fitotóxica dos óleos essenciais foi avaliada pelas alterações no crescimento das radículas das plantas utilizadas como modelo: pepino (*Cucumis sativus*) e cebola (*Allium cepa*) cultivadas em placas de Petri em câmara de germinação Marconi –

MA 402, sob as seguintes condições: temperatura de  $25 \pm 0,2$  °C; fotoperíodo de 24 h de luz; 20 sementes por placa; dois discos de papel de germinação por placa; volume final de solução de 4,0 mL. Um total de 20 sementes de cada espécie em cinco repetições por tratamento foram colocadas para germinar em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo duas camadas de papel de filtro (Whatman n° 1) umedecido com 4 ml de óleo essencial em solução de Tween 80 (5% v/v), em concentrações de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ . As placas de Petri foram lacradas e colocadas em uma câmara de germinação (MA 402, Marconi), a  $25$  ° C sob luz fluorescente (8 x 4 Watts). As plântulas de pepino foram cultivadas por 4 dias e as de cebola por 7 dias. Os comprimentos das radículas foram medidos. As porcentagens de inibição foram calculadas com base em dados obtidos em relação ao controle realizado sob as mesmas condições de tratamento. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e os resultados foram analisados pela ANOVA e teste de Scott-Knott a  $P \leq 0,05$ , utilizando o programa computacional GENES (*Genetics and Statistical Analysis* Versão 2007.0.0 – Universidade Federal de Viçosa).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial das folhas, com base na massa seca da amostra (ml/100 g de massa seca) durante os meses analisados é apresentado na Tabela 1, juntamente com os dados de precipitação e temperatura. No Brasil, duas estações principais são geralmente consideradas: a estação chuvosa, no verão (novembro a março) e a estação seca (abril a outubro), mas foram realizadas coletas em todos os meses do ano, para melhor análise das possíveis variações na composição química do óleo essencial.

O maior rendimento foi obtido a partir de plantas coletadas no inverno, quando ocorreram baixos índices de temperaturas e precipitação, o que é habitual nesta época no Brasil. A literatura relata a variação sazonal do rendimento e composição química do óleo essencial para muitas espécies. Pitarevic et al. (1985) constataram que o rendimento do óleo essencial de *Salvia officinalis* coletados em várias estações ao longo do ano variou. Parece que a biossíntese do óleo essencial durante o crescimento da planta é particularmente sensível às condições ambientais (luz, disponibilidade de nutrientes e

comprimento do dia) (Circella et al., 1995; Skoula et al., 2000) e uma longa estação seca poderia estimular a produção de óleo essencial (Pitarevic et al., 1985).

**Tabela 1.** Rendimento do óleo essencial de *S. trilobata*, precipitação e temperatura registradas durante os meses de coleta.

	Primavera			Verão			Outono			Inverno			Primavera		
	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Rend. <sup>a</sup>	0.48	0.49	0.57	0.60	0.51	0.56	0.54	0.55	0.78	0.77	0.77	0.64	0.60	0.56	0.54
Precip. <sup>b</sup>	147.4	41.4	22.4	605.7	253.1	224.1	243.1	90.9	9.6	53.6	14.6	13.7	72.2	127.9	131.5
Temp. <sup>c</sup>	18.7	21.4	21.1	21.4	22.6	22.9	22.8	20.6	18.4	16.5	17.6	17.5	21.2	21.7	23.1

<sup>a</sup>Rend.=Rendimento (ml/g peso seco); <sup>b</sup>Precip.=Precipitação (mm); <sup>c</sup>Temp.=Temperatura (°C). Set=setembro; Out=outubro; Nov=novembro; Dez=dezembro; Jan=janeiro; Fev=fevereiro, Mar=março; Abr=abril; Mai=maio; Jun=junho; Jul=julho, Ago=agosto.

Estudos sobre os efeitos do estresse salino e da deficiência de água no rendimento e composição química do óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) mostraram que o aumento de estresse salino foi acompanhado pela redução nos teores de óleo essencial, ao passo que o aumento no déficit de água provocou aumento do rendimento do óleo (Ozturk et al., 2004). De acordo com Hussain et al. (2008), o menor rendimento do óleo essencial no verão poderia ser atribuído às elevadas temperatura e à evaporação parcial de alguns componentes do óleo essencial, fato que se observa também neste estudo.

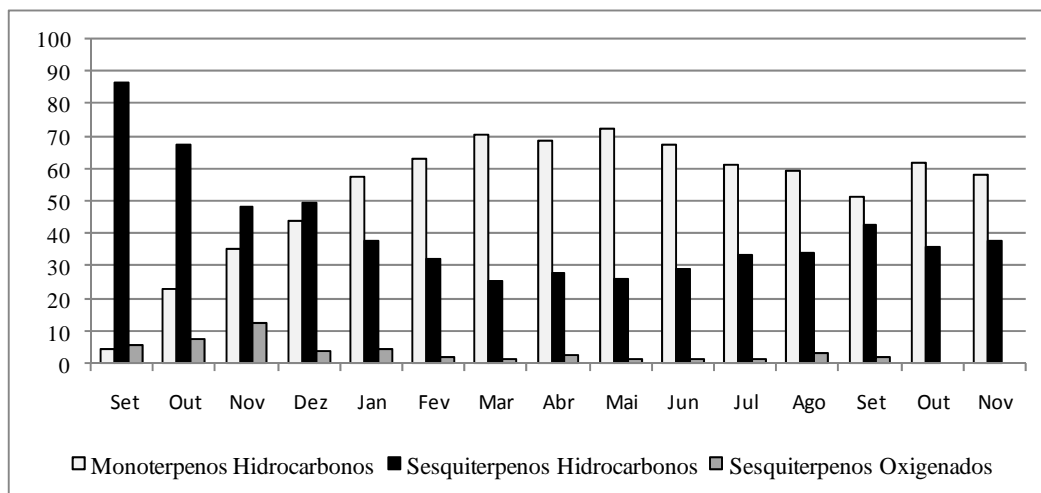
### 2.3.2. Composição química do óleo essencial

Os 14 componentes identificados dos óleos essenciais das folhas, caule e flores de *S. trilobata* são apresentados na Tabela 2. O óleos essenciais foram caracterizados por apresentarem alta percentagem de sesquiterpenos hidrocarbonetos (SHs) (25,5%-86,4%), monoterpenos hidrocarbonetos (MHs) (22,9%-70,3%) e baixos níveis de sesquiterpenos oxigenados (SOs) (0,0%-7,4%). A variação das duas principais classes de terpenos em óleos voláteis *S. trilobata* foi inversamente relacionada: o aumento do teor de MHs foi acompanhado por uma diminuição no teor de SHs. O máximo conteúdo de SHs foi observado em setembro (86,4%). Houve uma diminuição no teor de SHs a partir do mês de janeiro com um mínimo durante os meses de março, abril e maio (25,5%, 27,7% e 26,1%).

Os MHs também apresentaram uma variação sazonal, com um teor mínimo em setembro de 2008 (4,3%), e máximo em março, abril e maio de 2009 (respectivamente, 70,3%, 68,4% e 72,3%) (Figura 1).

Ocorreram variações quantitativas e qualitativas nos componentes dos óleos voláteis de *S. trilobata* durante os meses analisados. Os componentes majoritários foram germacreno D (11,9%-35,8%),  $\alpha$ -felandreno (1,4%-28,5%),  $\alpha$ -pineno (7,3%-23,8%), *E*-

cariofileno (4,6%-19,0%), biciclogermacreno (6,0%-17,0%), limoneno (1,8%-15,1%) e  $\alpha$ -humuleno (4,0%-11,6%).



**Figura 1.** Variações na porcentagem relativa das classes de terpenos no óleo essencial das folhas de *S. trilobata*. Set=setembro; Out=outubro; Nov=novembro; Dez=dezembro; Jan=janeiro; Fev=fevereiro, Mar=março; Abr=abril; Mai=maio; Jun=junho; Jul=julho, Ago=agosto.

A porcentagem da maioria dos constituintes presentes no óleo essencial de *S. trilobata* variou significativamente durante os meses (Tabela 2). O teor de sesquiterpenos *E*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D e biciclogermacreno aumentou ligeiramente a partir do final da estação seca até o início da próxima estação chuvosa. O conteúdo dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno e limoneno aumentou a partir da estação chuvosa até meados da próxima estação seca no período observado neste estudo (Figura 2).

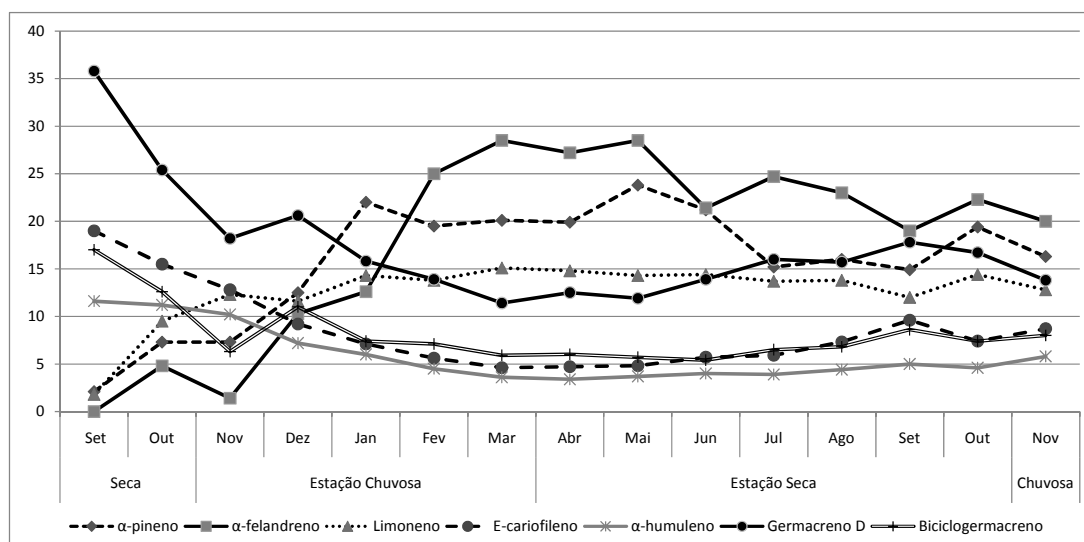
As condições climáticas e a disponibilidade de água no solo podem alterar o metabolismo vegetal e, conseqüentemente, alterar a composição dos óleos essenciais, ao longo das estações do ano (Putievsky et al., 1986; Figueiredo et al., 1997). Este estudo detectou variações qualitativas e quantitativas no óleo essencial de *S. trilobata* de uma estação para outra. Muitos fatores afetam a composição química e o rendimento de óleo essencial, tais como a estação do ano, herbivoria, temperatura e o estágio de desenvolvimento da planta (Putievsky et al., 1986; Figueiredo et al., 1997). Estes fatores influenciam as rotas biossintéticas da planta e, conseqüentemente, a proporção relativa dos componentes do óleo essencial.

Embora a precipitação e a temperatura possam afetar o rendimento e composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* deve-se levar em conta também o estágio de desenvolvimento das plantas. Neste estudo, as plantas em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletadas a partir da população disponível. Assim, um estudo mais detalhado seria necessário para se averiguar a influencia de cada fator supracitado.

**Tabela 2.** Composição química dos óleos essenciais de folha, caule e flor de *S. trilobata* (%)\*.

Composto	RRI	Seca		Chuvosa					Seca						Chuvosa		Caule	flor
		Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov		
<i>MHs</i>																		
1. $\alpha$ -pineno	937	2,1±2,9	7,3±4,0	7,3±3,7	12,5±1,1	22,0±0,0	19,5±1,3	20,1±0,6	19,9±0,4	23,8±0,0	21,2±0,0	15,2±2,0	16,0±1,8	14,9±3,9	19,0±1,3	16,3±3	31,3±3,3	13,6±2,4
2. Canfeno	945	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7±0,5	-
3. $\beta$ -pineno	979	0,4±0,5	1,3±0,9	1,8±0,1	2,0±0,1	3,4±0,1	2,9±0,1	3,0±0,0	3,1±0,0	2,9±0,3	2,5±0,1	2,2±0,0	2,3±0,1	2,3±0,4	2,0±0,0	2,6±0,3	4,0±0,5	1,3±0,9
4. $\beta$ -mirreno	996	-	-	-	-	-	-	1,5±0,0	1,0±0,0	1,3±0,1	1,2±0,0	1,6±0,6	1,0±0,2	1,1±0,0	1,4±0,0	1,4±0,0	1,8±0,1	0,8±0,6
5. $\alpha$ -felandreno	1007	-	4,8±1,0	-	10,3±3,9	12,6±3,3	25,0±1,2	28,5±0,9	27,2±0,4	28,5±2,0	21,4±0,1	24,7±0,3	23,0±1,6	19,0±5,0	22,3±0,4	20,0±3,0	22,4±2,0	25,4±2,1
6. $\rho$ -cimeno	1030	-	-	12,4±0,1	7,2±3,2	5,2±1,1	1,7±0,1	2,1±0,2	2,4±0,3	1,5±0,0	6,4±0,2	3,8±0,3	3,3±0,6	3,3±0,6	3,6±0,0	4,2±0,7	9,5±0,4	6,1±0,5
7. limoneno	1035	1,8±2,5	9,5±1,2	12,3±1,5	11,6±1,7	14,3±1,7	13,8±0,6	15,1±0,3	14,8±0,8	14,3±0,8	14,4±0,1	13,7±0,8	13,8±0,0	12,0±2,7	14,4±0,4	12,8±0,4	16,4±0,4	11,7±0,2
<i>SHs</i>																		
8. $\beta$ -eleneo	1394	1,4±0,1	1,6±0,2	0,5±0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7±0,01	-	-	-	-
9. <i>E</i> -cariofileno	1421	19,0±0,4	15,5±1,4	12,8±2,3	9,2±1,1	7,1±0,8	5,6±0,3	4,6±0,1	4,7±0,4	4,8±1,0	5,7±0,3	5,9±0,9	7,3±0,5	9,6±2,6	7,4±0,1	8,7±0,1	1,6±0,5	6,8±2,3
10. $\alpha$ -humuleno	1455	11,6±0,8	11,2±0,6	10,2±2,3	7,2±1,8	6,0±0,6	4,5±0,4	3,6±0,0	3,4±0,1	3,7±0,7	4,0±0,1	3,9±0,5	4,4±0,2	5,0±1,4	4,6±0,2	5,8±1,2	2,7±0,9	5,8±1,8
11. Germacreno D	1484	35,8±0,2	25,4±5,8	18,2±5,6	20,6±1,5	15,8±0,0	13,9±0,9	11,4±0,3	12,5±1,5	11,9±2,9	13,9±0,9	16,0±0,1	15,7±0,8	17,8±4,7	16,7±0,8	13,8±1,4	3,2±0,7	19±6,2
12. Bicyclgermacreno	1497	17,0±1,2	12,6±4,4	6,3±3,1	11,0±1,0	7,4±0,7	7,1±1,1	5,9±0,0	6,0±0,2	5,7±1,1	5,4±0,4	6,5±0,0	6,8±0,5	8,6±1,9	7,4±0,3	8,0±0,5	2,1±0,9	9,1±2,8
13. $\delta$ -cadineno	1527	1,6±0,1	1,2±0,9	-	1,4±0,1	1,2±0,0	1,0±0,1	-	1,1±0,7	-	-	0,9±0,2	0,7±0,0	1,2±0,1	-	-	0,7±0,0	-
<i>SOs</i>																		
14. Espatuleno	1578	5,3±0,4	7,4±3,4	12,3±6,4	3,4±1,0	4,3±1,0	1,9±0,0	1,4±0,0	2,7±0,2	1,4±0,2	1,1±0,0	1,0±0,1	1,0±0,0	1,0±0,3	-	-	1,1±0,4	-
TOTAL		96,1	97,8	94,1	96,4	99,3	96,9	97,2	98,8	99,8	97,2	95,4	95,3	96,5	98,8	93,6	97,5	99,6
MHs/SHs		4,3/86,4	22,9/67,5	33,8/48,0	43,6/49,4	57,5/37,5	62,9/32,1	70,3/25,5	68,4/27,7	72,3/26,1	67,1/29	61,2/33,2	59,4/34,2	52,6/42,9	62,7/36,1	57,3/36,3	86,1/10,3	58,9/40,7
SOs		5,3	7,4	12,3	3,4	4,3	1,9	1,4	2,7	1,4	1,1	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	1,1	0,0

RRI: Índice de retenção relativo da mistura de n-alcenos (C<sub>9</sub>-C<sub>27</sub>) em uma coluna DB5. Set=setembro; Out=outubro; Nov=novembro; Dez=dezembro; Jan=janeiro; Fev=fevereiro, Mar=março; Abr=abril; Mai=maio; Jun=junho; Jul=julho, Ago=agosto. SHs= sesquiterpenos hidrocarbonetos ; MHs= monoterpenos hidrocarbonetos; SOs =sesquiterpenos oxigenados. \*Média ± Desvio padrão



**Figura 2.** Variações nas porcentagens relativas dos terpenes no óleo essencial das folhas de *S. trilobata*

### 2.3.3. Atividade bactericida

A atividade bactericida do óleo essencial de *S. trilobata* contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi examinada qualitativamente e quantitativamente pela presença ou ausência de zonas de inibição e pela determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM), respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 3. A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de disco de difusão em Agar mostrou que, em geral, estes óleos são menos ativos do que a maioria dos antibióticos avaliados (Tabela 3). Por outro lado, os resultados do CIM revelaram uma grande atividade antimicrobiana dos óleos voláteis de *S. trilobata*. Como observado no Capítulo 1 deste trabalho, além de se levar em conta a possível ação sinérgica e/ou antagônica dos componentes presentes nos óleos essenciais em menor concentração, deve-se considerar que, embora os testes de avaliação antimicrobiana sejam padronizados pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), os mesmos foram desenvolvidos para a análise de agentes antimicrobianos convencionais, como antibióticos, que têm natureza hidrofílica se difundindo com maior facilidade pelo Agar, ao contrário dos óleos essenciais, que são voláteis, insolúveis em água e viscosos (Duarte et al., 2005; Nostro et al., 2004; Saeed e Sabir, 2004; Christoph et al., 2000).

**Tabela 3.** Atividade bactericida dos óleos essenciais de *S. trilobata* determinada pelos métodos de disco de difusão em Agar (mm) e método de microdiluição em caldo (%v/v).

Microorganisms	Zona de Inibição (mm)		
	G(-) <i>E. coli</i>	G(+) <i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Estação			
Seca	06,0 Bd	09,4 Af	09,4 Ae
Chuvosa	07,2 Bc	08,7 Af	09,4 Ae
Caule	0,6 Ad	0,6 Ag	0,6 Ag
Padrões			
Vancomicina 30 µg	12,7 Bb	24,3 Ac	13,0 Bd
Penicilina G 10 UI	07,7 Bc*	51,3 Aa	08,3 Bf
Eritromicina 15 µg	06,0 Cd*	31,3 Ab	18,0 Bc
Gentamicina 10 µg	16,0 Ca	17,7 Bd	19,7 Ab
Estreptomicina 10 µg	16,0 Ba	15,0 Be	24,0 Aa
Controle	06,0 Ad	06,0 Ag	06,0 Ag
Estação CIM (%v/v)			
Seca <sup>a</sup>	0,01	0,01	0,01
Chuvosa <sup>b</sup>	0,03	0,01	0,03
Caule	0,12	1,00	0,50

Valores seguidos pela mesma letra maiúscula na horizontal e mesma letra minúscula na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo para o teste de Scott-knott a  $P \leq 0,05$ . \*cepa resistente. <sup>a</sup>Óleo coletado no mês de maio; <sup>b</sup>óleo coletado nos meses de setembro, outubro e novembro

Os resultados indicam que o óleo essencial das folhas coletadas na estação seca e chuvosa é bastante ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas com valores de CIM de 0,03-0,01% v/v (Tabela 3). Já os óleos voláteis do caule, com  $\alpha$ -pineno como componente majoritário (31,3%) mostrou fraca atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (CIM 1,0% e 0,5% para *S. aureus* e *B. cereus*, respectivamente).

Os monoterpenos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno são capazes de inibir a respiração e os processos de transporte de íons, comprometendo a integridade celular. Eles também aumentam a permeabilidade da membrana das células de levedura e de mitocôndrias isoladas (Andrews et al., 1980; Uribe et al., 1985).  $\beta$ -Pineno é um terpeno bicíclico e é um componente comum, juntamente com o seu isômero  $\alpha$ -pineno, de óleos voláteis de coníferas, Lamiaceae, *Citrus* e muitas outras plantas (Belletti et al., 2004; Burt, 2004; Canillac e Mourey, 2001; Hong et al., 2004; Marino et al., 2001). Foi identificado como um dos componentes bioativos mais importantes de muitos óleos essenciais (Aligiannis et al., 2001; Couladis et al., 2003). Por outro lado, alguns autores encontraram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana para este terpeno (Filipowicz et al., 2003; Pichette et al.,

2006). A atividade do óleo volátil pode estar relacionada à configuração química dos componentes, às proporções em que estão presentes e às interações entre eles (Dorman e Deans 2000; Marino et al. 2001).

A maioria dos estudos que investigam a ação de óleos essenciais contra microorganismos que causam deterioração de alimentos concordam que, em geral, os óleos essenciais são mais potentes contra bactérias Gram-positivas do que contra as bactérias Gram-negativas (Marino et al. 2001). As bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis à ação de agentes antibacterianos, já que possuem uma membrana externa à celular (Ratledge e Wilkinson, 1988), que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos (Vaara, 1992).

A alta atividade dos óleos voláteis das folhas de *S. trilobata* pode ser atribuída à presença dos hidrocarbonetos que parecem agir sobre as proteínas da membrana citoplasmática, as enzimas ATPases, como são conhecidos por estarem localizadas na membrana citoplasmática (Knobloch et al., 1989). Dois possíveis mecanismos pelos quais os hidrocarbonetos cíclicos poderiam atuar sobre elas são considerados: as moléculas de hidrocarbonetos lipofílicos podem acumular-se na bicamada lipídica distorcendo a interação destas proteínas com os lipídios, ou poderiam interagir diretamente com partes hidrofóbicas destas proteínas (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1995).

#### 2.3.4. Atividade Fitotóxica

A Tabela 4 mostra os efeitos do óleo de *S. trilobata* sobre a germinação e desenvolvimento radicular de cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*), 72h após o tratamento.

**Tabela 4.** Comprimento médio (mm) das radículas de pepino (*Cucumis sativus*) e cebola (*Allium cepa*) após o cultivo com óleos essenciais das espécies de *S. trilobata*.

	Tratamento (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Allium cepa</i>
Folhas	1,0	1.1950b	0.6026d
	0,1	2.0905a	0.8169c
Caule	1,0	1.8072a	0.7934c
	0,1	2.1330a	0.9807b
Controle	0,0	2.0183a	1.2113a

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo para o teste de Scott-knott a  $P \leq 0,05$ .

O efeito fitotóxico dos óleos essenciais tanto do caule como da folha de *S. trilobata* sobre a germinação e o desenvolvimento radicular variou de acordo com a espécie testada:

em *Allium cepa* provocou uma significativa supressão da germinação e desenvolvimento radicular em todas as concentrações, mas em *Cucumis sativus* foi ativo somente a 1.0 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 4).

A redução da germinação e desenvolvimento radicular pode ser atribuído à redução nas taxas de divisão e alongamento celular, devido à presença dos aleloquímicos (Javaid e Anjum, 2006). Diferentes alterações fisiológicas e bioquímicas foram relatadas pela ação alelopática de óleos essenciais (Asplund, 1968; Lorber e Muller, 1976; El-Deek e Dan Hess, 1986; Fischer, 1986; Koitabashi et al., 1997). Peroxidação lipídica, amplamente reconhecida como um evento toxicológico primário é causada pela produção de radicais a partir de uma variedade de fontes, incluindo hidroperóxidos orgânicos e processos redox. Os eventos secundários incluem mudanças na estrutura, permeabilidade e fluidez da membrana, desestabilização lisossômica e estímulo à apoptose (Dorman et al., 1995; Sikkema et al., 1995). Estudos adicionais são necessários para se estabelecer o mecanismo de ação alelopática dos óleos essenciais de *S. trilobata*.

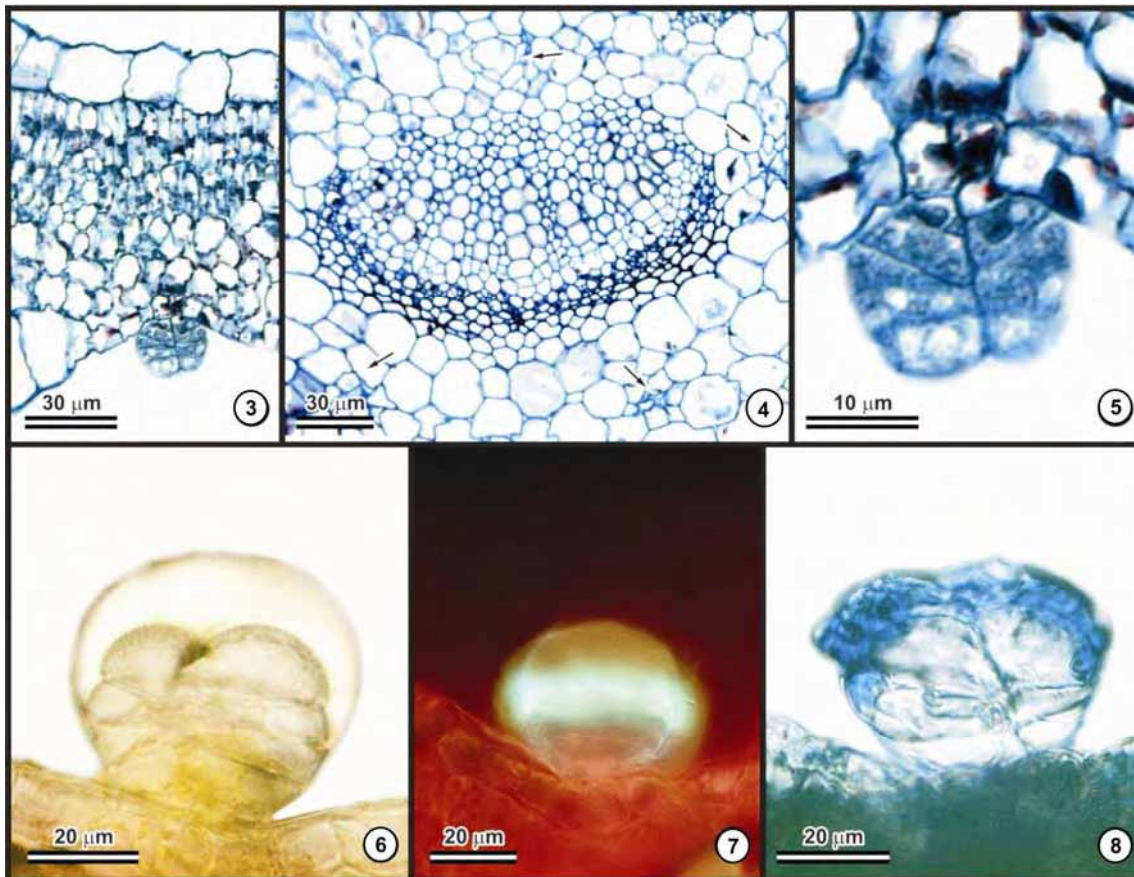
Os óleos essenciais das folhas foram mais ativos que os óleos essenciais do caule. O óleo essencial do caule de *S. trilobata* contém 86,1% de monoterpenos hidrocarbonetos e os óleos das folhas, 86,4% de hidrocarbonetos sesquiterpenos. De acordo com Scrivanti et al., 2003 e López et al., 2009, os óleos essenciais, ricos em compostos oxigenados foram mais ativos que os óleos essenciais com altas porcentagens de monoterpenos hidrocarbonetos. Mas outros autores sugeriram que os monoterpenos hidrocarbonetos são responsáveis pela inibição da germinação (Dudai et al., 2004; Armirante et al., 2006). Os monoterpenos hidrocarbonetos têm insignificante solubilidade em água em comparação com outras classes de compostos orgânicos. No entanto, são provavelmente importantes agentes alelopáticos em climas quentes e secos onde atuam na fase de vapor, porque a densidade de vapor dos óleos essenciais pode penetrar no solo, afetando negativamente as plantas emergentes do solo (Kohli e Singh, 1991; Vaughn e Spencer, 1993; Koitabashi et al., 1997).

### 2.3.5. Histolocalização dos compostos naturais

Foram observados tricomas (Figura 3 a 8) e canais secretores (Figura 9 a 17) nas folhas. Tais estruturas secretoras comumente ocorrem em muitas espécies de Asteraceae. Ductos, idioblastos, hidatódios e diferentes tipos de tricomas secretores são descritos para espécies de Asteraceae que ocorrem no cerrado (Castro et al., 1997, vegetação de floresta

(Meira et al., 1991), de restinga (Claro, 1994) e de afloramentos rochosos em campos de altitude.

Os tricomas secretores são bisseriados, com duas células basais, um pedúnculo curto bicelular e uma cabeça secretora, geralmente composta de 08 células. As células secretoras da cabeça apresentam cutícula espessa, formando uma grande câmara subcuticular onde a secreção se acumula (Figuras 5 e 6). Tricomas semelhantes foram observados em *Siegesbeckia orientalis*, que também pertence à tribo Heliantheae (Aguilera et al., 2004), porém outros tipos de tricoma ocorrem na tribo, sendo considerado de valor diagnóstico o tricoma descrito como ‘tipo II’ que é unisseriado, filamentoso, recurvado ou não, com número variável de células; a forma da célula distal varia de globóide a espatulada (Castro et al., 1997). As análises histoquímicas mostraram que os tricomas secretores produzem principalmente esteróides, confirmado pelo teste com tricloreto de



**Figuras 3-8.** Folha de *S. trilobata* em corte transversal. **3.** Limbo foliar; **4.** Região da nervura medianada folha evidenciando a presença de canais circundando o feixe vascular (setas); **5.** Detalhe do tricoma; **6.** Tricoma sem coloração (branco). **7.** Fluorescência do tricoma em tricloreto de antimônio; **8.** Reação positiva do tricoma ao reagente de NADI.

antimônio sob luz fluorescente (Figura 7). Óleos essenciais também foram detectados pela reação positiva ao reagente de NADI (Figura 8).

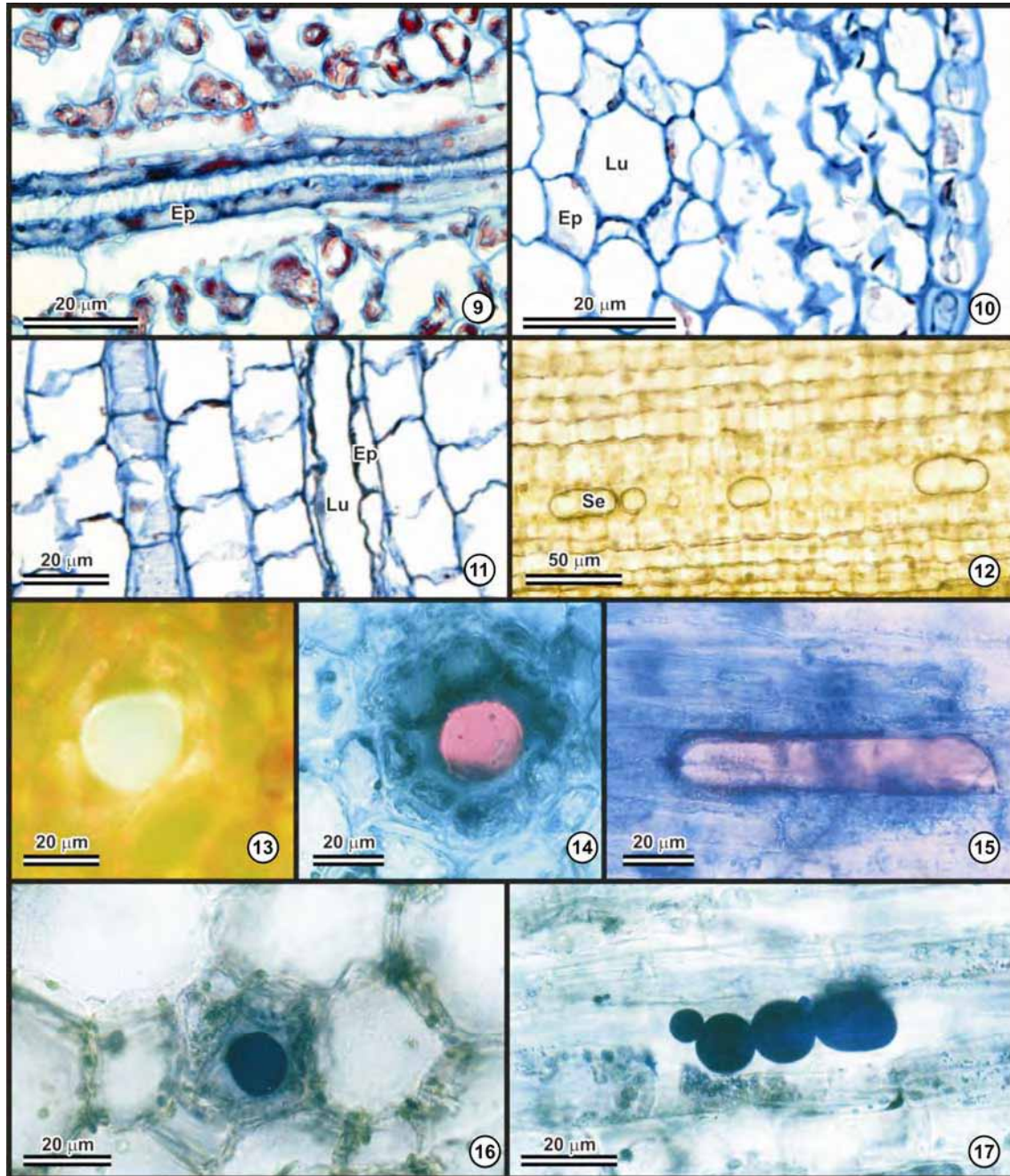
Assim como observado em *S. trilobata*, em muitos casos, óleos voláteis foram encontrados em tricomas, ocorrendo juntamente com compostos menos voláteis. Por exemplo, os tricomas de espécies da família Lamiaceae podem conter monoterpenos e compostos não relacionados biossinteticamente, tais como diterpenóides do tipo labdano\* em *Marrubium vulgare* L (marroio branco) (Piccoli e Bottini, 2008), fenilpropanóides em *Ocimum basilicum* (manjeriço doce) (Gang et al. al, 2001), flavona e agliconas em *Origanum vulgare* (orégano) (Bosabalidis al., 1998) e *Mentha spicata* (hortelã) (Voirin et al., 1993). Os tricomas de algumas espécies de outras famílias também contêm óleos essenciais juntamente com uma variedade de compostos como resinas diterpênicas do tipo labdano encontradas em *Helianthemum nummularium* (Cistaceae; Falara et al. 2008), flavonóides em *Medicago sativa* (alfafa) (Fabaceae; Aziz et al. 2005), glicosídeos flavonóides em *Phillyrea latifolia* (Oleaceae; Tattini e Gucci, em 1999), benzoquinonas em *Primula obconica* (Primulaceae; Horper e Marner, 1996), policetídeos em *Humulus lupulus* (lúpulo) (Cannabaceae; Nagel et al., 2008) e alcalóides em *Zeyheria montana* (Bignoniaceae; Machado et al., 2006). Os dados encontrados neste estudo para *S. trilobata* evidenciam a natureza complexa da secreção presente nos tricomas desta espécie.

Os canais secretores das folhas de *S. trilobata* estão associados aos feixes vasculares colaterais, e frequentemente se ramificam formando uma rede que acompanha estes tecidos (Figuras 4 e 11). A presença de ductos associados aos tecidos condutores é descrita para outras espécies da tribo Heliantheae e é indicada como uma característica que pode ter valor diagnóstico na tribo (Meira, 1991; Claro, 1994; Poli et al., 1995; Castro et al., 1997). Esta característica também é observada em outras espécies da família Asteraceae como em *Ageratum fastigiatum* (Vieira et al., 2008) e *Baccharis dracunculifolia* (Budel et al., 2004). Em secções transversais, os canais revelam lúmen alongado delimitado por apenas uma camada de células (Figura 11).

No caule, os canais secretores ocorrem no parênquima cortical (Figura 10). Da mesma forma que nas folhas, em cortes longitudinais, o lúmen é alongado delimitado por apenas uma camada de células (Figura 11).

---

\* Labdano é um diterpeno bicíclico natural que forma o núcleo estrutural de uma grande variedade de produtos naturais conhecidos como labdanos ou diterpenos do tipo labdano. Uma variedade de atividades biológicas foram determinados para diterpenos labdano incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoário, antiinflamatórios (Atta-ur-Rahman, 2002).



**Figuras 9-17.** Folha e caule de *S. trilobata*. **9.** Limbo foliar; **10-17.** Caule de *S. trilobata*. **10.** Canais na região cortical; **11.** Detalhe do canal; **12.** Secreção no canal em sem coloração (branco). **13.** Fluorescência do óleo no canal tricloreto de antimônio; **14-15.** Reação positiva da secreção do canal ao Azul do Nilo; **16-17.** Reação positiva do óleo nos canais ao reagente de NADI. **10, 13, 14 e 16** = cortes transversais; **9** = corte paradérmico; **11, 12, 15 e 17** = cortes longitudinais. *Ep*=epitélio secretor; *Lu*=lúmen; *Se*=secreção.

Os testes histoquímicos revelaram uma composição lipídica predominante na secreção acumulada no lúmen dos canais, como se observa na fluorescência amarela brilhante sob luz fluorescente em cortes submetidos ao vermelho neutro, confirmando a natureza lipídica da secreção (Figuras 13). A reação ao Azul do Nilo demonstrou coloração

rósea na secreção dos canais do caule de *S. trilobata*, evidenciando lipídios neutros (Figuras 14 e 15), em concordância com as análises químicas dos óleos essenciais do caule de *S. trilobata* que indicaram predominância de terpenos hidrocarbonetos, de caráter neutro (Tabela 2). Os cortes submetidos ao reagente de Nadi evidenciaram coloração azul na secreção contida no lúmen dos canais, o que demonstra a presença de óleos essenciais. A secreção no lúmen dos canais do caule de *S. trilobata* indicando a presença de terpenóides (Figura 16 e 17). De acordo com as análises químicas dos óleos voláteis, os principais componentes dos óleos voláteis são terpenos, como  $\alpha$ -pineno (31,3 %) e  $\alpha$ -felandreno (22,4%) (Tabela 2).

## 2.4 – CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro a apresentar informações sobre: a composição química do óleo essencial de folhas, caules e flores de *S. trilobata*, a análise da variação sazonal óleos essenciais das folhas destas espécies, a atividade antibacteriana e fitotóxica dos óleos essenciais das folhas e caules da *S. trilobata* e a histolocalização dos locais de síntese e acúmulo de óleos voláteis no corpo da planta.

Os óleos voláteis são sintetizados e acumulados em estruturas internas (canais) e externas (tricomias) no corpo da planta. Estes caracterizam-se por apresentar em sua composição, altas porcentagens de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos e baixos níveis de sesquiterpenos oxigenados, apresentando significativa atividade fitotóxica e bactericida. O maior rendimento do óleo essencial foi obtido de plantas coletadas no inverno, quanto ocorreu baixa temperatura e precipitação. As porcentagens dos componentes do óleo essencial de *S. trilobata* variaram significativamente durante os meses do ano.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Adams RP. 1995.** *Identification of Volatile oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

**Aguilera DB, Meira RMSA, Ferreira FA. 2004.** Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). *Planta Daninha* 22: 483-489.

**Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsarbopoulos A, 2001.** Composition and antibacterial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 811-815.

**Aliotta G, De Napoli L, Piccialli G. 1989.** Inhibition of seedling growth by *Anagallis arvensis* extracts. *Giornale Botanico Italiano* 123: 291-296.

**Andrews RE, Parks LW, Spence KD. 1980.** Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 301-304.

**Armirante F, De-Falco E, De-Feo V, De-Martino L, Mancini E, Quaranta E. 2006.** Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. *Acta Horticulturae* 723: 347-352.

**Arvigo R, Balik M. 1993.** *Rainforest remedies, One Hundred Healing Herbs of Belize*. Lotus Press, Twin Lakes, WI.

**ASAE STANDARDS. 2000.** ‘Standards Engineering Practices Data: Moisture measurement-forages, ASAE S358.2 DEC99.’ (Adopted and published by: American Society of Agricultural Engineers p. 565-572)

**Asplund RO. 1968.** Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry* 7: 1995-1997.

**Aziz N, Paiva NL, May GD, Dixon RA. 2005.** Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* 221: 28-38.

**Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R, Gardini F. 2004.** Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essence on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6932-6938.

**Block LC, Scheidt C, Quintão NLM, Santos ARS, Cechinel-Filho V. 1998.** Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC (Compositae). *Pharmazie* 53: 716-718.

**Bosabalidis A, Gabrieli C, Niopas I. 1998.** Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum intercedens*. *Phytochemistry* 49: 1549-1553.

**Bremer K. 1994.** *Asteraceae: cladistics and classification*. Portland: Timber Press. 727p.

**Bremer K. 1996.** *Major clades and grades of the Asteraceae*. In: Hind DJN, Beentjeh J (ed). *Compositae: systematics*. Proceedings. London: Kew, V. 2, p 1-7. 1996.

**Brundrett M C, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient Lipid Staining in Plant Material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in Polyethylene Glycol-Glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* 66: 111-116.

- Buchanan BB, Gruissen W, Jones, RL. 2000.** *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of plant Physiologists, 1367 p.
- Budel JM, Duarte MR, Santos CAM, Farago PV. 2004.** Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC. Asteraceae. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23: 477-483.
- Burt S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Canillac N, Mourey A. 2001.** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18: 261-268.
- Castro MM, Leitão-Filho HF, Monteiro WR. 1997.** Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 163-174.
- Cechinel-Filho V. 2000.** Advances and perspectives in the field of active natural products: studies conducted at NIQFAR/UNIVALI. *Química Nova* 23: 680-685.
- Christoph F, Kaulfers P-M, Stahl-Biskup E. 2000.** A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of b-triketones. *Planta Medica* 66: 556-560.
- Chung IM, Seigler D, Miller DA, Kyung SH. 2000.** Autotoxic compounds from fresh alfalfa leaf extracts: identification and biological activity. *Journal of Chemical Ecology* 26: 315-327.
- Circella G, Franz C, Novak J, Resch H. 1995.** Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil. *Flavour Fragrance Journal* 10: 371-374.
- Claro SMCA. 1994.** *Levantamento dos tipos de estruturas secretoras em folhas de Asteraceae da restinga de Setiba, Guarapari (ES)*. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 101 pp.
- Corrêa MP. 1984.** *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol I*. Imprensa Nacional (ed.), Rio de Janeiro, p. 458-459.
- Couladis M, Chinou IB, Tzakou O, Petrakis PV. 2003.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). *Phytotherapy Research* 17: 152-154.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Paris* 258: 1338-1340.
- Davies NW. 1990.** Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20m Phases. *Journal of Chromatography* 503: 01-24.
- Dorman HJD, Deans SG, Noble RC, Surai P. 1995.** Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research* 7: 645-651.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.

- Duarte MCT, Figueira, GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. 2005.** Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 305-311.
- Dudai N, Ben-Ami M, Chaimovich R, Chaimovitch D. 2004.** Essential oils as allelopathic agents: bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. *Acta Horticulturae* 629: 505-508.
- Einhellig FA, Leather GR. 1988.** Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1829-1844.
- El-Deek MH, Dan-Hess F. 1986.** Inhibited mitotic entry is the cause of growth inhibition by cinmethylin. *Weed Science* 34: 684-688.
- Eloff JN. 1999.** It is possible to use the herbarium specimens to screen for antibacterial activity components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 355-360.
- Emerenciano V P, Militão JSLT, Campos CC, Romofe P, Kaplan MAC, Zambon M, Brant AJC. 2001.** Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytology* 108: 229-257.
- Falara V, Fotopoulos V, Margaritis T, Anastasaki T, Pateraki I, Bosabalidis AM, Kafetzopoulos D, Demetzos C, Pichersky E, Kanellis AK. 2008.** Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Molecular Biology* 68: 633-651.
- FAO. 1995.** *Flavours and Fragrances of Plant Origin*. Rome.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 1997.** Physiological aspects of essential oil production. In: Franz Ch, Máthé Á, Buchbauer G. (Eds.), *Essential oils: basic and applied research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL., pp. 95–107.
- Filipowicz N, Kaminski M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka JR. 2003.** Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research* 17: 227-231.
- Fischer NH. 1986.** The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In: Putnam AR, Tang CS. (Eds.). *The Science of Allelopathy*. Wiley, New York, pp. 203-218.
- Freire CMM, Marques MOM, Costa M. 2006.** Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 161-166.
- Gabe M. 1968.** *Techniques histologiques*. Paris, Masson e Cie.
- Gang DR, Wang J, Dudareva N, Hee-Nam K, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E. 2001.** An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology* 125: 539-555.
- Girard B. 1996.** Retention Index Calculation using Kováts constant model for Linear Temperature-programmed Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A* 721: 279-288.

- Harborne JB. 1989.** *Introduction to Ecological Biochemistry*, 3rd Ed. Academic Press, New York.
- Hong EJ, Na AJ, Choi BG, Choi CC, Jeung EB. 2004.** Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmacological Bulletin* 27: 863-866.
- Horper W, Marner FJ. 1996.** Biosynthesis of primin and miconidin and its derivatives. *Phytochemistry* 41: 451-456.
- Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chemistry* 108: 986-995.
- Javaid A, Anjum T. 2006.** Control of *Parthenium hysterophorus* L., by aqueous extracts of allelopathic grasses. *Pakistan Journal of Botany* 38: 139-145.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. WH Freeman, San Francisco.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. McGraw- Hill, New York.
- Judd WS, Campbel CS, Kellongg EA, Steens PF, Donogue MJ. 2009.** *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 612p.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 626-631.
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1: 119-128.
- Koenen EV. 2001.** *Medicinal poisonous and edible plants in Namibia*. Klaus Hess Publishers, Verlag, Berlin.
- Kohli RK, Singh D. 1991.** Allelopathic impact of volatile components from *Eucalyptus* on crop plants. *Biologia Plantarum (Praha)* 33: 475-483.
- Koitabashi R, Suzuki T, Kawazu T, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T. 1997.** 1,8-Cineole inhibits roots growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110: 1-6.
- López ML, Bonzani NE, Zygadlo JA. 2009.** Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical anatomical and phytotoxic approach. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 882-890.
- Lorber P, Muller WH. 1976.** Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effects on seedling root tip ultrastructure. *American Journal of Botany* 63: 196-200.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in root of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426.
- Macías FA, Galindo JCG, Castellano D and Velasco RF. 2000.** Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48:5288-5296.

- Machado SR, Gregorio EA, Guimaraes E. 2006.** Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* 97: 357-369.
- Marino M, Bersani C, Comi G. 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187-195.
- Meira RMSA. 1991.** Levantamento dos tipos de estruturas secretoras em folhas de espécies de Asteraceae em vegetação de floresta (Atibaia, SP). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 99 pp.
- Miller DA. 1983.** Allelopathic effects of alfalfa. *Journal of Chemical Ecology* 9: 1059-1072.
- Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, Page JE. 2008.** EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *Plant Cell* 20: 186-200.
- Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V. 2004.** Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230: 191-195.
- Novaes AP, Rossi C, Poffo C, Pretti EJ, Oliveira EA, Schlemper V, Niero R, Cechinel-Filho V, Burguer C. 2001.** Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie* 56: 427-430.
- Ozturk A, Unlukara A, Ipek A, Gurbuz B. 2004.** Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) *Pakistan Journal of Botany* 36: 787-792.
- Pandey AK, Dhakal M.R. 2001.** Phytomelanin in Compositae. *Current Science* 80: 933-940.
- Pereira RCA. 2001.** Revisão taxonômica do gênero *Ichthyothere* Mart. (*Heliantheae-Asteraceae*). Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife- PE. 226 p.
- Piccoli PN, Bottini R. 2008.** Accumulation of the labdane diterpene Marrubiin in glandular trichome cells along the ontogeny of *Marrubium vulgare* plants. *Plant Growth Regulation* 56: 71-76.
- Pichette A, Larouche PL, Lebrun M, Legault J. 2006.** Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research* 20: 371-373.
- Pitarevic I, Kustrak D, Kuflinec J, Blazevic N. 1985.** Influence of ecological factors on the content and composition of the essential oil in *Salvia officinalis*. *Proc. 15th International Symposium on Essential Oils*, July 19-21, 1984, The Netherlands, 203-207.
- Poli F, Sacchetti G, Bruni A. 1995.** Distribution of internal secretory structures in *Tagetes patula* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany* 15: 197-205.
- Putievsky E, Ravid U, Dudai N. 1986.** The influence of season and harvest frequency on the essential oil and the herbal yield from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. *Journal of Natural Products* 49: 326-329.
- Ratledge C, Wilkinson SG. 1988.** An overview of microbial lipids. In: Ratledge C, Wilkinson SG (Eds). *Microbial Lipids, vol 1*. Academic Press, London, pp 3-22.

- Rice EL. 1984.** *Allelopathy, 2nd Ed.* Academic Press, New York.
- Saeed MA, Sabir AW. 2004.** Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. *Fitoterapia* 75: 204-208.
- Scrivanti LR, Zunino MP, Zygadlo JA. 2003.** *Tagetes minuta* and *Schinus aroeira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 563-572.
- Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. 1995.** Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222.
- Skoula M, Abbes JE, Johnson CB. 2000.** Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 551-561.
- Taddei A, Rosas-Romero AJ. 1999.** Antimicrobial activity of *Wedelia trilobata* crude extracts. *Phytomedicine* 6: 133-134.
- Taiz L, Zeiger E. 2004.** *Fisiologia Vegetal.* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Tattini M, Gucci R. 1999.** Ionic relations of *Phillyrea latifolia* L. plants during NaCl stress and relief from stress. *Canadian Journal of Botany* 77: 969-975.
- Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. 2005.** Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research* 19: 303-309.
- Uribe S, Ramirez T, Pena A. 1985.** Effects of  $\alpha$ -pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology* 161: 195-200.
- Vaara M. 1992.** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56: 395-411.
- Van den Dool H, Kratz PDJ. 1963.** A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11: 463-467.
- Vaughn SF, Spencer GF. 1993.** Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. *Weed Science* 41: 114-119.
- Vieira HS, Takahashi JA, Oliveira AB, Chiari EB. 2002.** Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13: 151-157.
- Vieira GD, Barbosa MVD, Lopes BC, Souza OV, Fernandes LDRS, Esteves RL, Kaplan MAC. 2008.** Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 769-776.
- Voirin B, Bayet C, Couloso M. 1993.** Demonstration that flavone aglycones accumulate in the peltate glands of *Mentha piperita* leaves. *Phytochemistry* 34: 85-87.
- Vokou D. 1992.** The allelopathic potential of aromatic shrubs in phryganean (east Mediterranean) ecosystems. In: Rizvi, S.J.H., Rizvi, V. (Eds.), *Allelopathy*. Basic and Applied Aspects. Chapman and Hall, London, pp. 303-320.

**Wilkens M, Alarcon C, Urzua A, Mendoza L. 2002.** Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. *Planta Medica* 68: 452–454.

**Wojcik-Wojtkowiak D. 1992.** Allelopathic effects in agroecosystems. *Acta Acad. Agricult. Tech. Ols. Agricultura* 55: 7-16.

**Zomlefer W B. 1994.** *Guide to flowering plant families*. Chapel Hill & London: Carolina, USA.

**Zygodlo JA, Juliani HR. 2003.** Recent progress in medicinal plants. In: Majundar DK, Govil JN, Singh VK, Shailaja MS, Gangal SV. (Eds.) *Phytochemistry and Pharmacology II, VIII*. Studium Press LLC, Texas, pp. 273-281.

**CAPÍTULO 3:**  
**PRIMEIROS REGISTROS DE COLÉTERES NA FAMÍLIA**  
**MYRTACEAE**

### **CAPÍTULO 3: PRIMEIROS REGISTROS DE COLÉTERES NA FAMÍLIA MYRTACEAE**

**RESUMO:** Este trabalho é o primeiro registro de ocorrência de coléteres na família Myrtaceae. Coléteres de espécies da subfamília Leptospermoideae e Myrtoideae foram estudadas quanto à morfologia e anatomia. A natureza mucilaginosa da secreção foi comprovada por testes histoquímicos. Esta estrutura é diferenciada em Myrtaceae por não possuir epiderme secretora. Três tipos morfológicos de coléteres são descritos: coléteres petalóides, que ocorre apenas na subfamília Leptospermoideae; coléteres cônicos e coléteres euriformes, que ocorrem nas duas subfamílias. A análise da secreção por meio de eletroforese pelo método SDS-PAGE revelou a ausência de proteínas na secreção dos coléteres de Myrtaceae. Os coléteres de Myrtaceae possuem uma potencial aplicação nas abordagens filogenéticas da família.

**ABSTRACT:** This is the first report of occurrence of colleter in the Myrtaceae family. Colleters from species of the Leptospermoideae and Myrtoideae subfamily were studied regarding its morphology and anatomy. The secretion mucilaginous nature was confirmed by histochemical tests. This structure is distinguished in Myrtaceae by not having differentiated secretory epidermis. Three morphological types are described: petaloid colleter, which occurs only in the Leptospermoideae subfamily; euriform and conic colleter, which occur in the two subfamilies. The secretion analysis by electrophoresis method (SDS-PAGE) revealed the proteins absence in the Myrtaceae colleter's secretion. The Myrtaceae's colleter exhibit a potential application in studies about the phylogenetic relationships in the family.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Coléteres são estruturas secretoras que produzem uma substância viscosa, constituída por mucilagens ou por uma mistura de mucilagem, terpenos e proteínas, que lubrifica e protege as gemas em início de desenvolvimento (Fahn, 1979). Ocorrem na face adaxial de estípulas, pecíolos e lâminas foliares, brácteas, bractéolas, cálice e corola (Thomas, 1991). Como podem apresentar diferentes tipos morfológicos, têm sido utilizados com sucesso como marcadores morfológicos em abordagens sobre relações filogenéticas em diferentes famílias botânicas (Woodson e Moore 1938; Thomas 1991; Rio e Kinoshita 2005; Rio et al., 2005; Simões et al., 2006).

Em sua extensa revisão sobre anatomia de coléteres, Thomas (1991) não fez menção à ocorrência destas estruturas em Myrtaceae. Na ordem Myrtales relatos sobre coléteres são fragmentados e abordados somente do ponto de vista morfológico. Sua presença é mencionada para as axilas das folhas de Lythraceae (Graham e Cavalcanti, 2010)<sup>1</sup> e de forma mais imprecisa como grandes glândulas, semelhantes a coléteres associadas às estípulas de Penaeceae e de Vochysiaceae e como estípulas semelhantes a coléteres em Myrtaceae (Angiosperm Phylogeny Website)<sup>2</sup>.

Myrtaceae é uma das maiores famílias da ordem Myrtales, com mais de 9.000 espécies (Conti et al., 1997). É constituída por árvores ou arbustos e está presente em regiões tropicais e subtropicais. Claramente trata-se de uma família monofilética, entretanto não existe consenso quanto às relações entre os gêneros e espécies (Conti et al., 1998; Lucas et al., 2005; Wilson et al., 2001, 2005; Judd et al., 2009). Os gêneros de Myrtaceae estão organizados em duas subfamílias polifiléticas. Myrtoideae reúne principalmente os gêneros americanos e as espécies que possuem frutos tipo bagas e com folhas opostas. Leptospermoideae, que ocupa posição basal, inclui principalmente os gêneros australianos *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Metrosideros*, *Callistemon* e *Melaleuca*, cujas espécies possuem frutos tipo cápsula ou noz e folhas alternas ou opostas. De acordo com as análises moleculares, aparentemente, os frutos tipo baga evoluíram independentemente em dois clados: o clado mirtóide que compreende, por exemplo, *Acca*, *Calyptantes*, *Eugenia*, *Psidium*, *Mosiera*, *Myrcianthes* e *Myrtos* e o grupo *Acmena*, que compreende *Acmena* e *Syzigium* dentre outros (Judd et al., 2009).

<sup>1</sup><http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Lythraceae.htm#> - Consultado em 27/11/2010

<sup>2</sup><http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/> - Consultado em 27/11/2010

Foram avaliados os meristemas apicais de espécies pertencentes às subfamílias Myrtoideae e Leptospermoideae com o objetivo de analisar a ocorrência e os tipos morfológicos de coléteres e sua potencial contribuição para o esclarecimento das relações filogenéticas em Myrtaceae.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1. Material vegetal

Espécies pertencentes às subfamílias Leptospermoideae e Myrtoideae foram coletadas nos locais indicados na Tabela 1, sendo plantas adultas e cultivadas. A plantação de Leptospermoideae foi estabelecida há 10 anos a partir de sementes originadas do CSIRO - Division of Forestry and Forest Products – Canberra – ACT. O material foi identificado, herborizado e incorporado ao acervo do Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

**Tabela 1.** Locais de coleta dos espécimes de Myrtaceae.

Espécies	Local de Coleta	Nº de Registro no Herbário VIC
Leptospermoideae		
1. <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel	A	30839
2. <i>M. armillaris</i> (Sol. ex Gaertn.) Sm	A	30842
3. <i>M. ericifolia</i> Sm	A	30841
4. <i>Melaleuca cajuputi</i> Roxb. subesp. <i>cajuputi</i> Powell	A	30844
5. <i>Melaleuca cajuputi</i> Roxb. subesp. <i>platyphylla</i> Barlow	A	30845
6. <i>M. quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake	A	30843
7. <i>M. leucadendra</i> (L.) L	A	30840
8. <i>Callistemon viminalis</i> (Sol. ex Gaertn.) G. Don.	A	31116
9. <i>Leptospermum flavescens</i> Smith.	B	34177
Myrtoideae		
10. <i>Campomanesia</i> sp	B	34179
11. <i>Eugenia</i> sp. L	B	34178
12. <i>Psidium guajava</i> L. variedade <i>Paloma</i>	B	34163
13. <i>Psidium guajava</i> L. variedade <i>Pedro Sato</i>	B	34164
14. <i>Myrciaria cauliflora</i> Berg	B	34161
15. <i>Eugenia uniflora</i> L	B	34162

A - Sítio Refúgio, Município de São Geraldo, distrito de Monte Celeste – MG, georeferenciamento: Altitude – 762 m; Latitude - 20° 52' 49.6''S; Longitude - 42° 51' 42.1''W

B - Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da UFV, georeferenciamento: Altitude – 651 m; Latitude - 20° 45' 20''S; Longitude - 42° 52' 40''W

### 3.2.2. Microscopia de luz e testes histoquímicos

Meristemas apicais de ramos vegetativos foram coletados e posteriormente selecionados como o auxílio de microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C). As amostras destinadas à microscopia foram fixadas em FAA50 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, v/v), Formalina Neutra Tamponada e Karnovsky (glutaraldeído (2.5% e paraformaldeído 4%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) (Karnovsky, 1965), e posteriormente estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais e longitudinais de 4-6µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM2155), com utilização de navalhas de vidro. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina, pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981) para caracterização estrutural. Lâminas permanentes foram montadas com resina sintética (Permount®, Fisher).

Para os testes histoquímicos em material fresco, fragmentos de ramos contendo coléteres foram previamente selecionados em microscópio estereoscópico e submetidos a testes com PAS (Reação Ácido Periódico-Reagente de Schiff) para detecção de polissacarídeos gerais (McManus, 1948) e Ácido tânico/Cloreto de Ferro III para detecção de mucilagem (Pizzolato e Lillie, 1973). Os cortes do material incluído em metacrilato foram submetidos a testes histoquímicos para detecção das seguintes classes de metabólitos: PAS para detecção de polissacarídeos gerais (McManus, 1948) e Xilidine Pounceau (XP) para detecção de proteínas (O'Brien e McCully, 1981). Os respectivos controles foram realizados simultaneamente, segundo recomendações da literatura (McManus, 1948, Pizzolato e Lillie, 1973, O'Brien e McCully, 1981).

A análise do material, a captura de imagens e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-Photo e com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0). Os desenhos foram feitos em microscópio acoplado à câmara clara (Olympus CDA).

Fragmentos de primórdios foliares e gemas foliares contendo coléteres foram isolados e preparados para observação em microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 (Karnovsky, 1965). Após desidratação em série etílica, o material foi seco ao ponto crítico (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), utilizando

CO<sub>2</sub>. Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador (FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A captura de imagens foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (Zeiss, LEO 1430 VP), localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

### 3.2.3. Extração e análise das proteínas

Os coléteres dos ápices de duas espécies pertencentes a cada uma das subfamílias de Myrtaceae (*Eugenia uniflora*-Myrtoideae e *Callistemon viminalis*-Leptospermoideae) foram submersos em solução de Tris-HCl 0,1M por 1 hora. Em seguida foram mergulhados e agitados vigorosamente em solução de Triton X-100, pH 8.0 a 0.1% por aproximadamente 10 segundos (Klein et al., 2004), obtendo-se um extrato das secreções. Uma alíquota de 1 mL do extrato da secreção foi submetida à microfiltração utilizando membrana de ultrafiltração (microcon 10KD, Millipore Corporation, USA) até a redução do volume para 100µL. Do volume obtido (100µL), fez-se a análise para verificação de proteínas totais utilizando-se o método de Bradford (1876), usando-se soroalbumina bovina como padrão. A absorvância foi medida em 595 nm em um espectrofotômetro UV visível (SP-2000UV).

O extrato da secreção dos coléteres das espécies de Myrtaceae foi analisado por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato) com concentração de acrilamida + bis 12% (p/v) como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 3 horas a 80 V no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1mM e SDS 3,5mM). Após este procedimento, o gel foi revelado em solução corante (metanol 45% v/v, etanol 9% v/v, e *coomassie brilliant blue* R250 0.01% p/v) por 3 horas e em seguida, descorados em solução descorante (metanol 25% v/v e ácido acético glacial 7,5% v/v) por 24 horas. Foram aplicadas três alíquotas do extrato da secreção dos coléteres (4, 8 e 16 µL) no gel SDS-PAGE. Para confirmação dos resultados os procedimentos foram realizados novamente, porém, utilizando-se a coloração com *Comassie blue* G-250 - 2%. Em todas as análises foi utilizado o padrão molecular BROAD - Broad Range Protein Molecular (Promega, V491). As proteínas utilizadas como padrões de massa molecular para SDS-PAGE foram miosina (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21 kDa), lizozima (14 kDa) e aprotimina (6 kDa). As imagens dos géis foram capturadas por fotodocumentador (LabImage® 1D 2006

Professional). As análises foram realizadas no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

### 3.3. RESULTADOS

Foram observados coléteres em todas as 15 espécies analisadas. Entretanto, eles são anatomicamente diferentes dos tipos descritos na literatura para outras famílias botânicas. Assim foram classificados e descritos três novos tipos de coléteres nas espécies estudadas:

1) *Coléteres petalóides* - apresentam-se, em secção transversal, achatados dorsiventralmente e com largura maior que espessura, sendo curtos e geralmente ocorrendo associados aos catáfilos que envolvem as gemas apicais dos ramos vegetativos no período da seca (Figura 1 e 2 e Esquema 1-C);

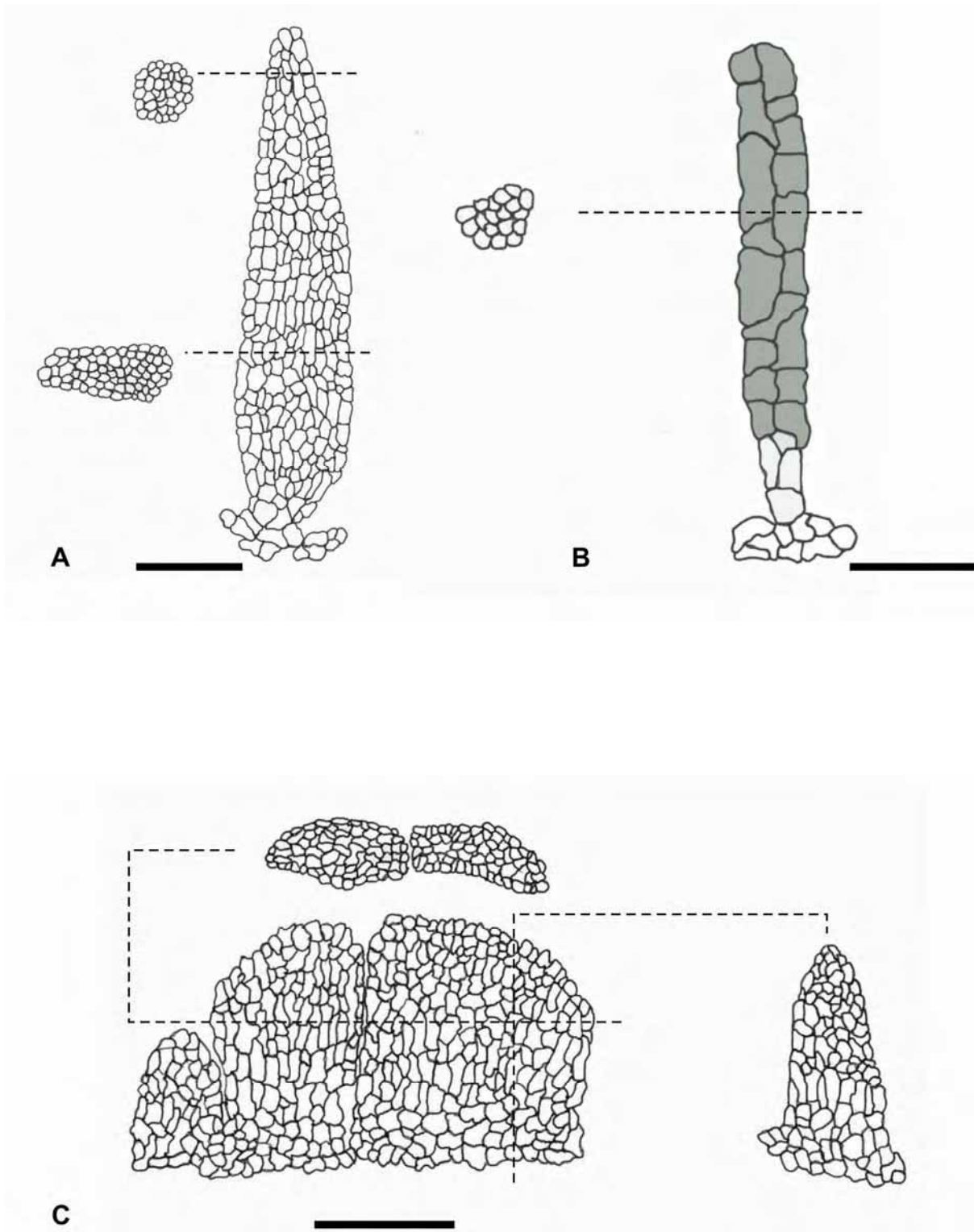
2) *Coléteres cônicos* – em secção transversal têm forma circular ou elipsóide e possuem estrutura cônica, com progressiva diminuição do diâmetro em direção ao ápice. Podem ser sésseis ou possuir pedúnculo curto (Figura 3-5 e Esquema 1-B e 2-B);

3) *Coléteres euriformes* (*eur*=largo) – assim como os coléteres petalóides, apresentam-se achatados dorsiventralmente em secção transversal porém, são mais longos que largos (Figura 3-5 e Esquema 1-A e 2<sup>a</sup> e C).

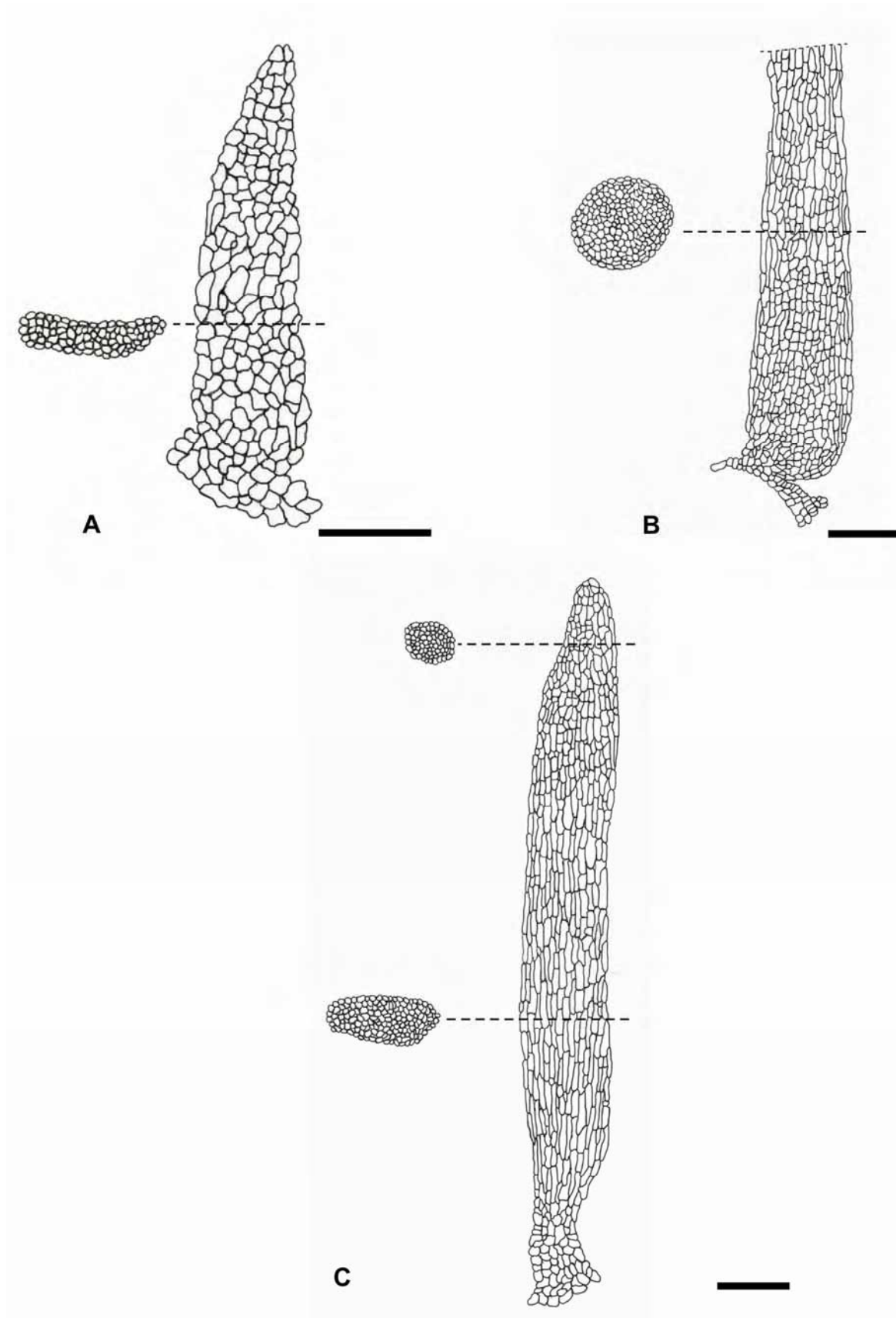
A Tabela 2 apresenta a ocorrência dos coléteres nas espécies das subfamílias Leptospermoideae e Myrtoideae estudadas.

**Tabela 2.** Ocorrência de coléteres nas espécies de Myrtaceae

Família Myrtaceae			Tipo de Coléter		
Subfamília	Gênero	Espécies	Cônico	Petalóide	Euriforme
Leptospermoideae	<i>Melaleuca</i>	<i>M. alternifolia</i>	+	-	-
		<i>M. armillaris</i>	+	-	-
		<i>M. ericifolia</i>	+	-	-
		<i>M. leucadendra</i>	-	+	-
		<i>M. cajuputi</i>	-	+	-
		<i>M. platyphylla</i>	-	+	-
		<i>M. quinquenervia</i>	-	+	-
	<i>Callistemon</i>	<i>C. viminalis</i>	-	+	+
	<i>Leptospermum</i>	<i>L. flavescens</i>	+	-	+
	Myrtoideae	<i>Campomanesia</i>	<i>C. pubescens</i>	+	-
<i>Eugenia</i>		<i>E. uniflora</i>	+	-	+
		<i>Eugenia</i> sp	+	-	+
<i>Myrciaria</i>		<i>M. cauliflora</i>	+	-	-
<i>Psidium</i>		<i>P. guajava</i> var. <i>Pedro Sato</i>	+	-	-
		<i>P. guajava</i> var. <i>Paloma</i>	+	-	-



**Esquema 1.** Desenho dos coléteres nos ápices vegetativos de espécies de Leptospermoideae (Myrtaceae). Coléter euriforme de *Callistemon viminalis* (A), coléter cônico de *Leptospermum flavescens* (B) e coléter petalóide de *Melaleuca leucadendra* (C). Linhas pontilhadas indicam o plano de corte. Barras=100µm.



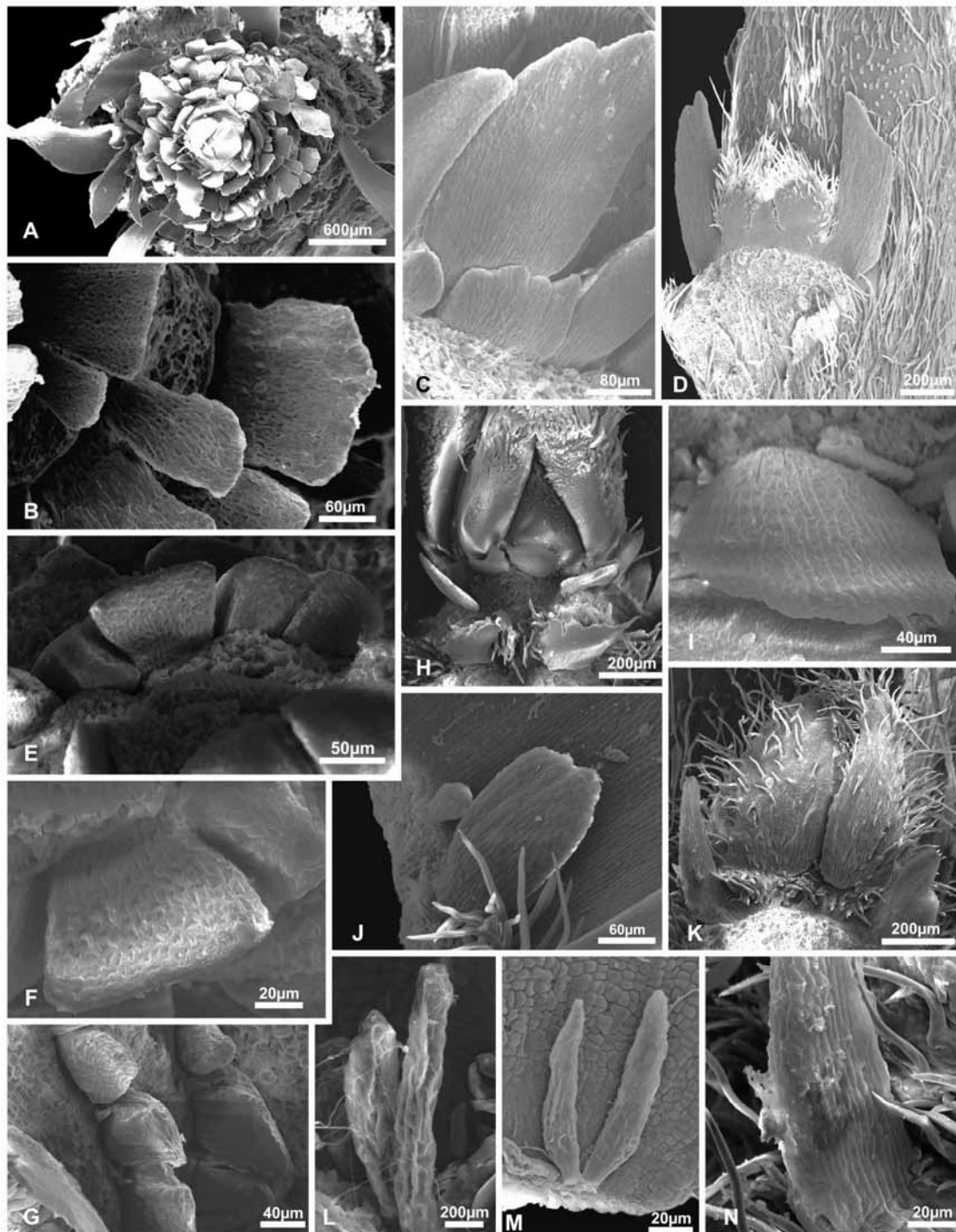
**Esquema 2.** Desenho dos coléteres nos ápices vegetativos de espécies de Myrtoideae (Myrtaceae). Coléter euriforme de *Eugenia uniflora* (A) e *Eugenia* sp. (C), coléter cônico de *Psidium guajava* var. *Pedro Sato* (B). Linhas pontilhadas indicam o plano de corte. Barras=100µm.



**Figura 1.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies da subfamília Leptospermoideae (Myrtaceae) visualizados sob microscópio estereoscópico. Coléteres petalóides em *Melaleuca quinquenervia* (A-C), *M. cajuputi* (D-E), *M. platyphylla* (F), *M. leucadendra* (G-I) e *Callistemon viminalis* (J-L). A, D, G, J e L: amostras frescas. B-H: amostras submetidas ao ácido tânico e cloreto de ferro III evidenciando mucilagens. C, E, F, I e K, amostras submetidas ao PAS evidenciando polissacarídeos. Setas: coléteres de coloração amarelada em fase senescente.

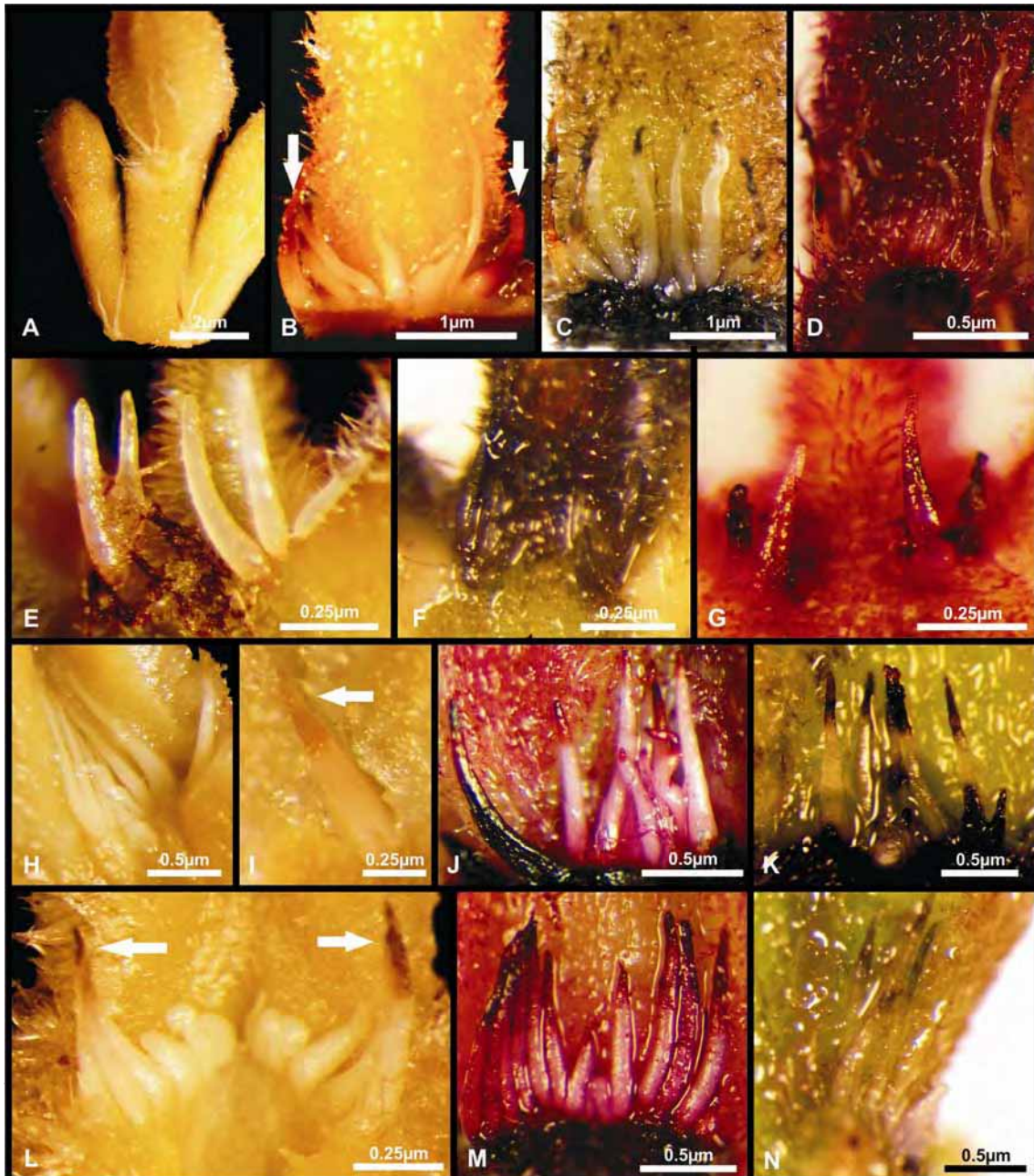
Em Leptospermoideae ocorrem os três tipos de coléteres. Coléteres petalóides foram observados em *M. cajuputi cajuputi*, *M. cajuputi platyphylla*, *M. leucadendra* e *M. quinquenervia* na face adaxial dos catáfilos imbricados que formam um arcabouço de proteção das porções meristemáticas nas regiões apicais dos ramos. Esta estrutura é persistente durante o período da seca. No início da primavera, no mês de setembro, as

regiões meristemáticas tornam-se ativas, adicionando novas células ao eixo caulinar, que se desenvolve originando um ramo jovem (Figura 1-G).



**Figura 2.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies da subfamília Leptospermoideae (Myrtaceae) visualizados sob microscópio eletrônico de varredura. Coléteres petalóides em *M. cajuputi* (A, B), *M. leucadendra* (C, D), *M. platyphylla* (E-G), *M. quinquenervia* (H, I) e *Callistemon viminalis* (J). Coléteres cônicos e euriformes em *Leptospermum flavescens* (L e M, respectivamente). Coléteres cônicos em *C. viminalis* (K e N).

Os coléteres petalóides acompanham o desenvolvimento inicial do caule e permanecem associados às novas porções meristemáticas que formam as gemas laterais dos caules (Figura 1). Com o completo desenvolvimento do ramo, os coléteres entram em senescência e caem. Os coléteres petalóides que ocorrem associados aos catáfílos são sésseis, possuem diferentes formatos e dimensões, e apresentam elevações cuticulares que formam ornamentações por toda sua superfície (Figura 2).

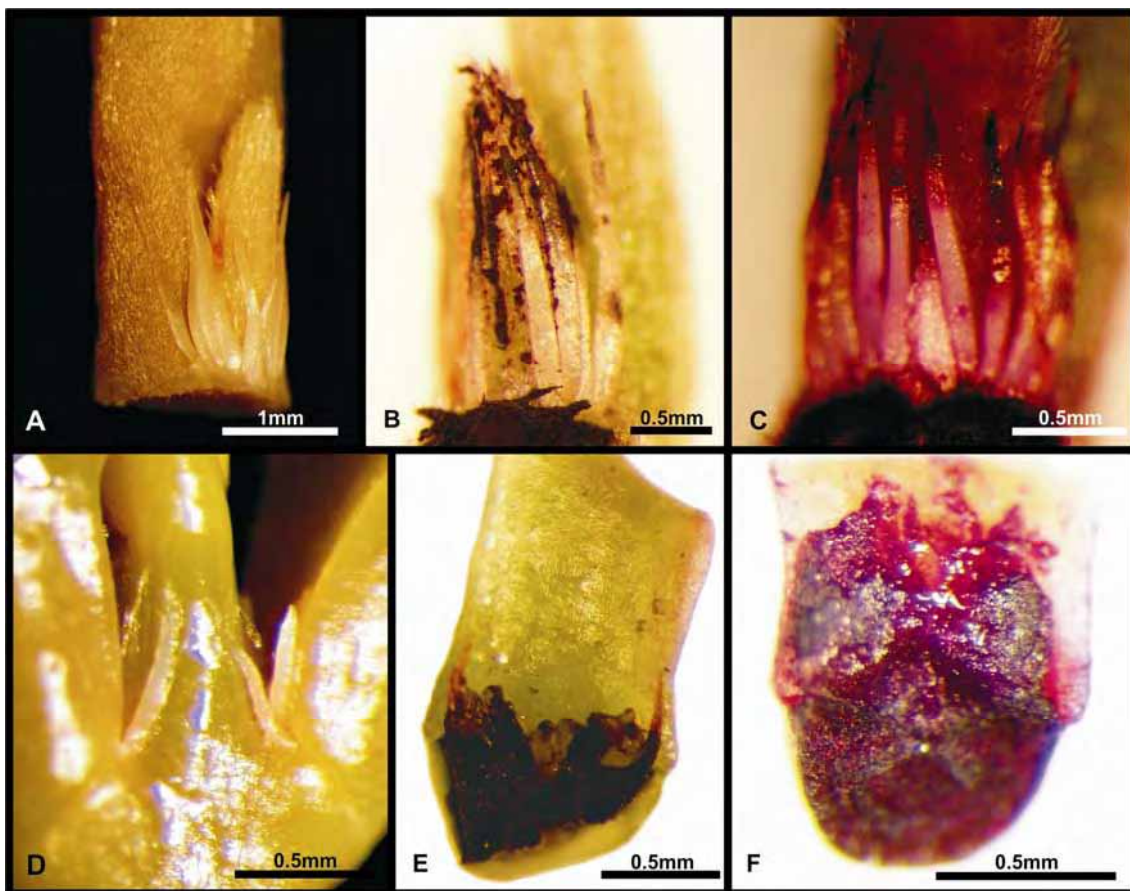


**Figura 3.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies da subfamília Myrtoideae (Myrtaceae) visualizados sob microscópio estereoscópico. Coléteres cônicos em *Campomanesia pubescens* (A-D), *Myrciaria cauliflora* (E-G), *Psidium guajava* var. *Paloma* (H-K) e var. *PedroSato* (L-N). A, B, E, H, I e L: amostras frescas. C, F, K e N: amostras submetidas ao ácido tânico e cloreto de ferro III evidenciando mucilagens. D, G, J e M: amostras submetidas ao PAS evidenciando polissacarídeos. Setas: coléteres de coloração amarelada em fase senescente.

*M. cajuputi* subesp. *platyphylla* apresentou coléteres de menores dimensões em relação às demais espécies desta subfamília (Tabela 3). Coléteres petalóides foram observados também em *Callistemon viminalis*, onde ocorrem na face adaxial das folhas nos ramos jovens (Figura 1-L e L e 2-J).

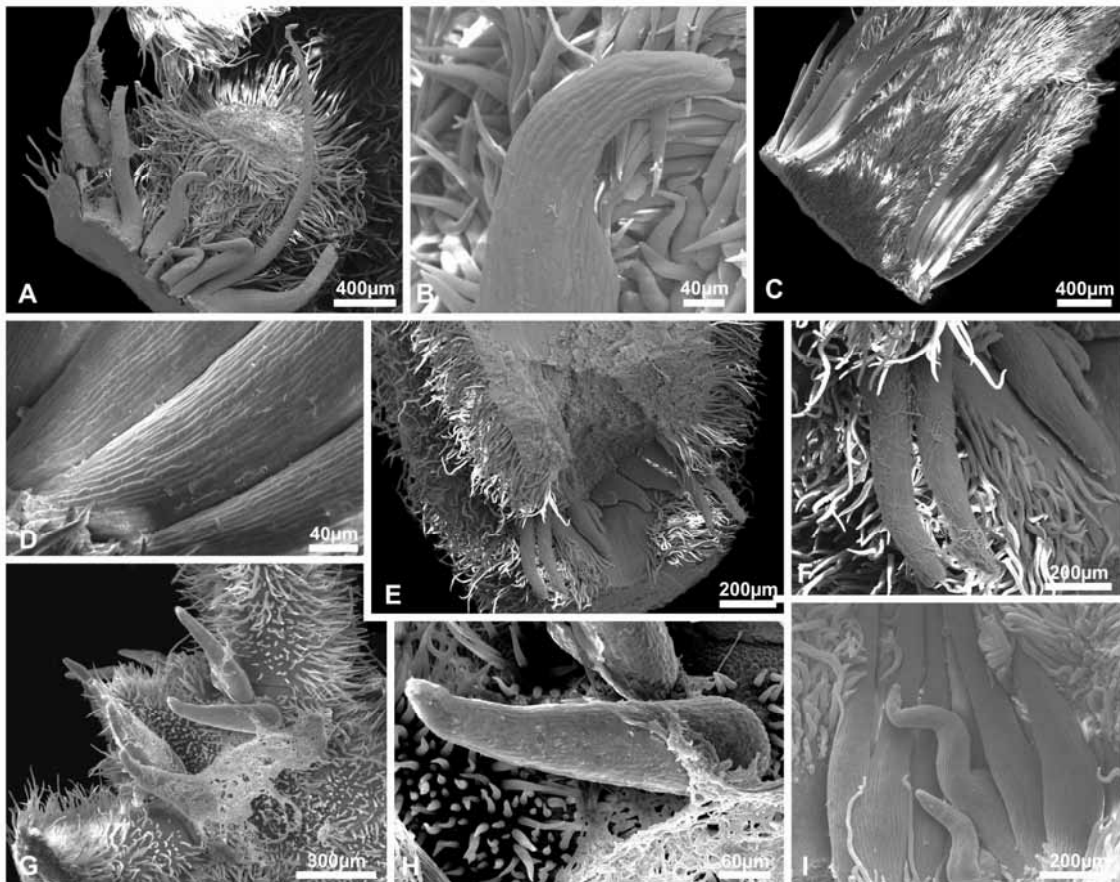
Coléteres cônicos foram observados associados às gemas apicais e dos ramos jovens em *Melaleuca alternifolia*, *M. armillaris*, *M. ericifolia* e *Leptospermum flavescens*. Nestas espécies, os meristemas estão envolvidos pelos primórdios foliares que se dispõem de forma justaposta em torno das gemas protegendo os meristemas apicais.

Coléteres euriformes foram observados em *Leptospermum flavescens* e *C. viminalis*. Em *C. viminalis*, apresentaram-se bifurcados e não bifurcados, com base alargada e ocorrendo na porção apical do caule, com superfície repleta de grumos ou flocos que correspondem a restos da secreção (Figura 2-N). Em *Leptospermum flavescens* ocorrem na face adaxial das folhas nos ramos em desenvolvimento (Figura 2L e M, respectivamente). Os coléteres euriformes, em secção transversal, apresentam-se achatados ou ovóides, dependendo da altura do corte (Esquema 1-A).



**Figura 4.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies da subfamília Myrtoideae (Myrtaceae) visualizados sob microscópio estereoscópico. Coléteres euriformes em *Eugenia* sp (A-C) e *E. uniflora* (D-F). A e D: amostras frescas. B e E: amostras submetidas ao ácido tânico e cloreto de ferro III evidenciando mucilagens. C e F: amostras submetidas ao PAS evidenciando polissacarídeos.

As espécies da subfamília Myrtoideae apresentaram coléteres cônicos e euriformes. Somente coléteres cônicos foram observados em *Campomanesia pubescens*, *Eugenia sp*, *Psidium guajava*, variedade Pedro Sato, *P. guajava* variedade Paloma e *Myrcia cauliflora* (Figura 3). Nesta última espécie foram observadas hifas de fungos recobrindo quase totalmente os coléteres (Figura 8-H). *Eugenia uniflora* e *Eugenia sp*, apresentaram os dois tipos de coléteres, que ocorrem justapostos entre as folhas jovens que recobrem as gemas (Figura 4). Coléteres de maior comprimento ocorrem em *Campomanesia pubescens*, *Eugenia sp* e *Psidium guajava*, var. *Pedro Sato* (Figura 5-AE e B; C e D; E e F, respectivamente e Tabela 2).



**Figura 5.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies da subfamília Myrtoideae (Myrtaceae) visualizados sob microscópio eletrônico. Coléteres cônicos em *Campomanesia pubescens* (A e B), *Psidium guajava* var. *Pedro Sato* (E e F), *M. cauliflora* (G e H), *P. guajava* var. *Paloma* (I). Coléteres euriformes em *Eugenia sp*. (C e D)

Nas espécies das duas subfamílias, observou-se que os coléteres são translúcidos durante a fase secreta, e assumem coloração marrom-acastanhada do ápice para a base, conforme senescem (Figura 1-A, D e L; Figura 3 B, I e L). A secreção presente nestas estruturas em fragmentos de material fresco reagiu positivamente ao teste com ácido tânico/Cloreto de Ferro III evidenciando a presença de mucilagem e ao teste com PAS

evidenciando a presença de polissacarídeos (Figura 1; 3-4). Em *Psidium guajava* foi possível verificar que o desenvolvimento dos coléteres na base foliar é centrífugo, e os coléteres periféricos iniciam primeiramente o processo de senescência (Figura 3-L).

**Tabela 2.** Dimensões dos coléteres das espécies das subfamílias de Myrtaeae.

Leptospermoideae				Myrtoideae			
Espécie <sup>1</sup>	Nº de coléteres verificados	Comprimento (µm)	Largura (µm) Ápice/Meio/Base	Espécie <sup>2</sup>	Nº de coléteres verificados	Comprimento (µm)	Largura (µm) Ápice/Meio/Base
MCJ	1	169	188/178/1163	CAM	1	1651	29/31/80
	2	132	65/80/46		2	504	42/124/131
MLD	1	356	119/159/155	MCL	1	468	30/78/35
	2	463	122/147/116		2	352	13/66/26
MPL	1	48	83/66/52	Esp	1	1235	23/96/37
	2	62	88/74/56		2	1302	26/94/56
MQQ	1	119	172/125	PGP	1	1019	24/94/222
	2	93	28/70/120		2	1002	11/42/138
LEP	1	40	9/19/12	PGPa	1	752	40/103/85
	2	173	13/30/18		2	736	37/144/104
CVM	1	392	39/88/53	EUG	1	718	41/228/147
	2	247	48/127/109		2	526	47/152/108

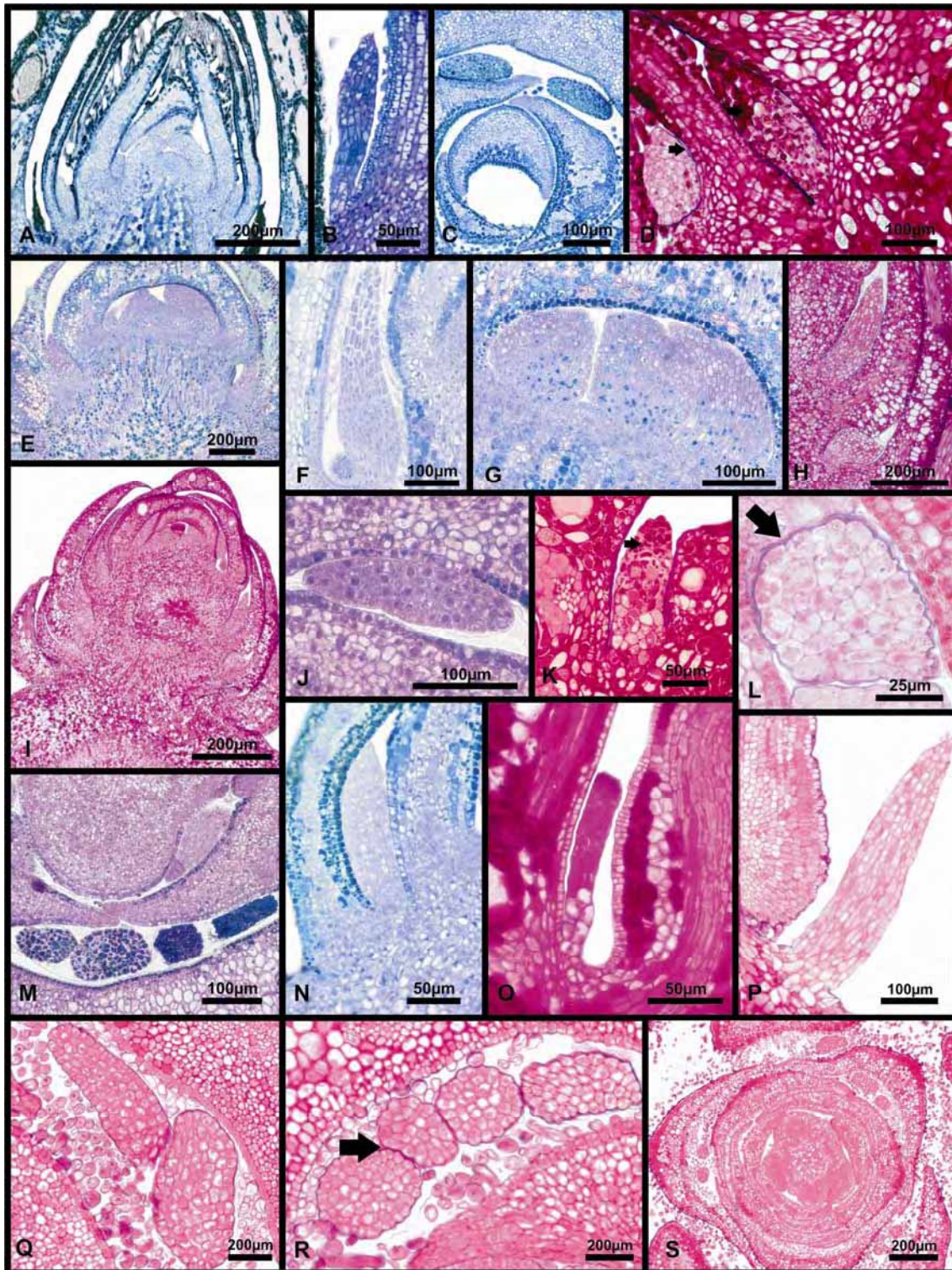
<sup>1</sup>MCJ= *Melaleuca cajuputi*; MLD=*M. leucadendra*; MPL=*M. platyphylla*; MQQ=*M. quinquenervia*; LEP=*Leptospermum flavescens*; CVM=*Callistemon viminalis*

<sup>2</sup>CAM=*Campomanesia sp*; MCL=*Myrcia cauliflora*; Esp=*Eugenia sp*; PGP=*Psidium guajava*, var. *P. Sato*; PGPa=*P. guajava*, var. *Paloma*; EUG=*Eugenia. uniflora*

Os três tipos de coléteres apresentam composição celular simples e homogênea. Não são vascularizados e as células epidérmicas que os recobrem são de formato não alongado e compactamente arranjadas (Figuras 6 e 7). A porção central é constituída por uma coluna de células parenquimáticas alongadas e/ou isodiamétricas, com citoplasma semelhante ao das células epidérmicas. As células apresentam paredes finas, citoplasma de aspecto denso, com núcleo em posição mediana ou basal e nucléolo evidente (Fig. 6 e 7). O tamanho das células da porção central varia de acordo com as espécies, as maiores dimensões foram visualizadas em *E. uniflora*, cujas células do pedúnculo apresentam-se hialinas (Figura 6). Nas espécies de *Melaleuca* observou-se que na porção apical do coléter em fase secretora as células da coluna central são frouxamente arranjadas (Figura 6).

Nos testes histoquímicos com material incluído em resina, observou-se reação positiva do material secretado ao teste com PAS, para polissacarídeos, confirmando-se a natureza mucilaginosa da secreção produzida por estas estruturas (Figuras 6 e 7). Nas células dos coléteres, diversos vacúolos de diferentes tamanhos foram evidenciados, pois o seu conteúdo, embora preservado pela fixação com Formalina Neutra Tamponada e com fixador de Karnovsky, não foi corado pelo azul de toluidina e reagiram positivamente ao

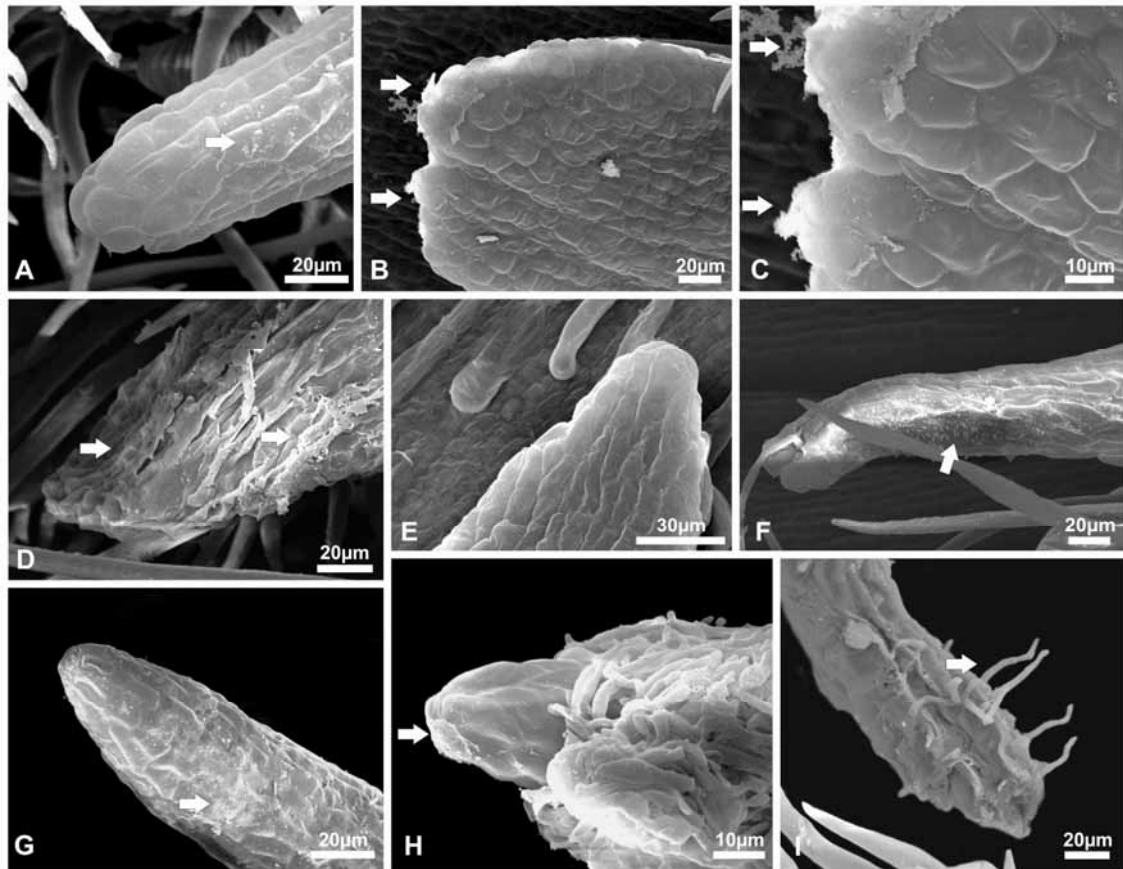
teste com PAS para detecção de polissacarídeos. Estas células vacuolizadas se concentram na região apical do coléter, onde parece haver a liberação da secreção (Figura 6).



**Figura 6.** Estrutura anatômica dos coléteres de espécies de Leptospermoideae (Myrtaceae) em seções transversais (C, J, L, M, Q-S) e longitudinais (A, B, D, E-I, K, N-P). Coléteres petalóides em *M. cajuputi* (A-D); *M. leucadendra* (E-H); *M. platyphylla* (I-L) e *M. quinquenervia* (M-N). Coléter cônico em *Leptospermum flavescens* (O) e *C. viminalis* (P-S): Coloração com azul de toluidina: A, B, C, E, F, G, J, M, N. Reação ao PAS evidenciando polissacarídeos na secreção (setas): D, I, K, L, O, P-S.



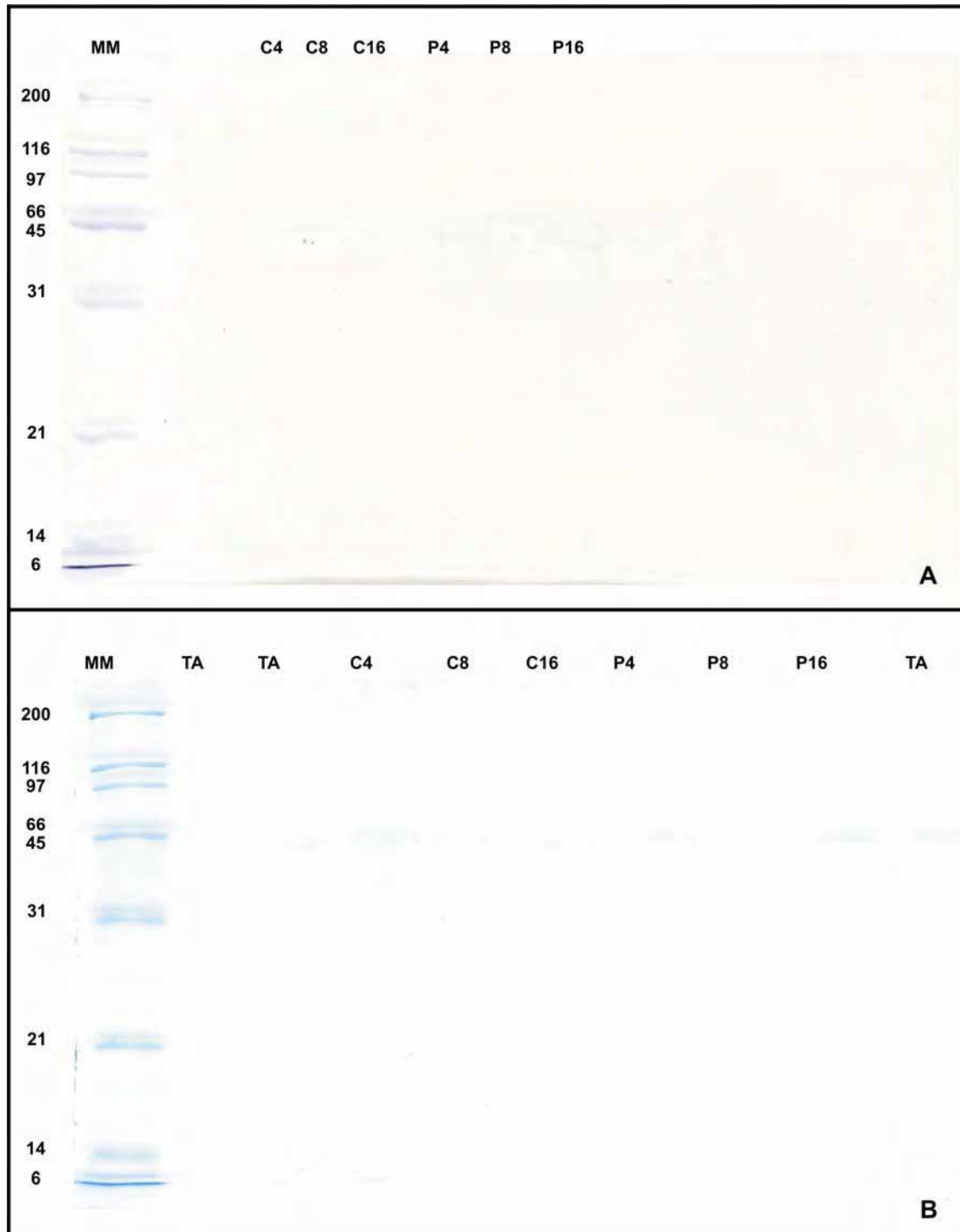
Embora não haja evidências de poros ou fissuras na cutícula, a secreção parece ser liberada preferencialmente na região apical dos coléteres (Figura 8).



**Figura 8.** Coléteres nos ápices vegetativos de espécies das duas subfamílias de Myrtaceae visualizados sob microscópio eletrônico. Leptospermoideae: coléter cônico e petalóide de *C. viminalis* (A e B-C, respectivamente). Coléter petalóide em *M. cajuputi* (D) e *M. leucadendra* (E). Myrtoideae: coléter cônico em *P. guajava* var. *Paloma* (F) e *Myrciaria cauliflora* (G e H) e *Campomanesia pubescens* (I). Notar hifas de fungos recobrendo todo o coléter de *Myrciaria cauliflora* (H). Observar também os grumos ou gotículas de secreção nos ápices dos coléteres (setas).

Observações preliminares indicam que os três tipos de coléteres se formam precocemente durante o desenvolvimento do órgão em que se inserem. No início, os coléteres são visualizados na base da folha ou catáfilo como grupos de células protodérmicas e do meristema fundamental. Estas se dividem anticlinalmente e em vários planos culminando com o aumento no número e volume celular que dá origem a estrutura madura.

Os testes histoquímicos utilizando-se Xylidine Ponceau, bem como as análises pelo método SDS-PAGE (Figura 9) não detectaram proteínas nas secreções dos coléteres em duas das espécies de Myrtaceae analisadas.



**Figura 9.** Eletroforese das secreções das espécies *Callistemon viminalis* (Leptospernoideae) e *Eugenia uniflora* (Myrtoideae) evidenciando a ausência de proteínas. C4, C8 e C16 correspondem as aplicações de 4, 8 e 16  $\mu\text{L}$  da solução de proteínas da secreção de *C. viminalis*. P4, P8 e P16 correspondem às aplicações de 4, 8 e 16  $\mu\text{L}$  da solução de proteínas da secreção de *E. uniflora* (Pitanga). TA=Tampão da Amostra, utilizada como 'branco'. MM=padrão molecular de proteínas, cujas massas moleculares de cada proteína-padrão estão indicadas ao lado das respectivas bandas.

### 3.4. DISCUSSÃO

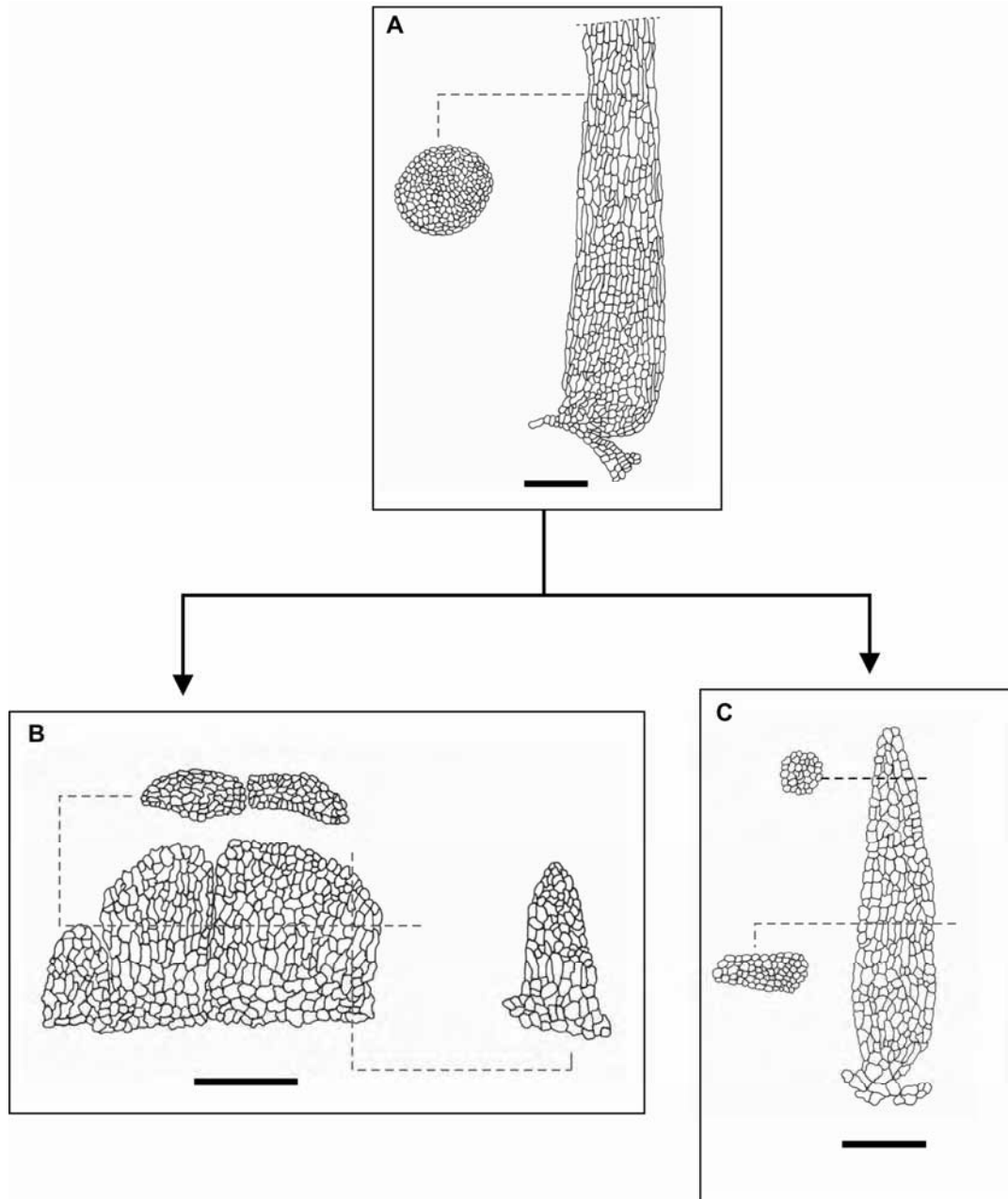
Este é o primeiro relato de ocorrência de coléteres em 15 espécies de Myrtaceae, distribuídas em sete gêneros das subfamílias Leptospermoideae e Myrtoideae. Três novos tipos morfológicos são descritos, pois os tipos observados em Myrtaceae não coincidem com aqueles propostos para outras famílias botânicas.

Os coléteres em Myrtaceae parecem ser estruturas comuns para a família, pois estão presentes em todas as espécies analisadas. A ausência de dados na literatura pode ser devido à falta de observações mais acuradas, do ponto de vista da Anatomia, que é uma ferramenta de suma importância na descrição de estruturas secretoras.

Existem descrições de tipologias de coléteres em Eudicotiledoneas (Lersten, 1968; Thomas, 1991; Gonzalez, 1998; Simões, 2006) e Monocotiledoneas (Mayer et al., 2010). O coléter do tipo padrão é mais comumente citado para Eudicotiledoneas. Caracteriza-se pela ausência de vascularização e por apresentar um eixo de células parenquimáticas, envolto por uma epiderme secretora em paliçada (Thomas, 1991). Entretanto os coléteres observados em Myrtaceae são anatomicamente diferentes dos tipos relatados. Entre as espécies de Myrtaceae analisadas, o tipo mais comum foi o tipo cônico que diferiu anatomicamente do tipo padrão por não apresentar epiderme em paliçada e nem possuir vascularização, características observadas também nos coléteres petalóides e euriformes.

A partir do coléter tipo cônico, que ocorre em espécies das duas subfamílias de Myrtaceae, é possível que tenha derivado o tipo petalóide em Leptospermoideae e o tipo euriforme em Myrtoideae. Uma série hipotética de transformações para se explicar a transformação dos coléteres em Myrtaceae é apresentada no Esquema 1. Embora a família seja tradicionalmente dividida nas subfamílias Leptospermoideae, de frutos secos, e Myrtoideae, de frutos carnosos, estudos filogenéticos incluíram a tradicional subfamília Leptospermoideae em Myrtoideae criando 17 tribos, e propuseram uma nova subfamília Psiloxylloideae com apenas um gênero *Heteropyxis*, nativas do sul da África (Wilson et al., 2005). Na subfamília Myrtoideae, a tribo Myrteae (frutos carnosos) é um dos grupos mais derivados. A tribo Melaleuceae, de frutos secos, que inclui dentre outros gêneros *Melaleuca* e *Callistemon*, é mais basal em Myrtoideae (Judd et al., 2009, Wilson et al., 2001, 2005). Levando em conta que coléteres cônicos sejam um caráter plesiomórfico, podemos propor a partir dele as seguintes séries de transformações que ocorreram em duas direções distintas: a) originando coléteres petalóides por proliferação das células do eixo no sentido vertical resultando no alargamento do coléter, com simultânea diminuição de

sua altura que se tornou menor que a largura, ou b) originando os coléteres euriformes pelo mesmo processo inicial que deu origem aos coléteres cônicos, porém mantendo-se a altura maior que a largura, o que é esperado para que tal estrutura achatada e alongada possa se sustentar verticalmente (Esquema 3).



**Esquema 3.** Série hipotética de transformações dos coléteres em Myrtaceae. **A**=coléter cônico; **B**=coléteres petalóide; **C**=coléter euriforme. Linhas pontilhadas indicam planos de corte. Barras=100 $\mu$ m

A utilidade dos coléteres para abordagens sobre afinidades filogenéticas tem sido enfatizada na literatura para as Apocynaceae (Simões et al., 2006), Rubiaceae (Lersten, 1968; Thomas, 1991) e Turneraceae (Gonzalez, 1998). Os resultados apresentados neste

trabalho devem ser considerados e demonstram uma potencial aplicação da anatomia dos coléteres para como subsidio para a filogenia de Myrtaceae. Entretanto, são necessários estudos em um maior número de espécies compreendendo as duas subfamílias.

Coléteres petalóides foram exclusivos de *Callistemon* e *Melaleuca*, gêneros filogeneticamente relacionados (Mabberley, 1993; Craven, 1999). Estes dados respaldam as afirmativas de Craven (2006) de que as diferenças entre os dois gêneros são insuficientes para justificar sua separação taxonômica e corroboram sua proposta de inclusão de *Callistemon* em *Melaleuca*.

A presença de mucilagem nos coléteres de Myrtaceae demonstram sua importância na manutenção das gemas e podem ser considerados como um fator adaptativo, pois a natureza higroscópica da mucilagem mantém estas regiões lubrificadas tanto em climas temperados onde há baixa umidade relativa do ar, como em climas tropicais, onde há alta incidência de radiação solar e altas temperaturas e ventos. A função de proteção dos coléteres é bem documentada na literatura tanto para Eudicotiledôneas quanto para Monocotiledôneas. Esta proteção é feita por meio da produção e eliminação de secreção viscosa ou gomosa de coloração variada (Thomas, 1991) que pode ser constituída por mucilagem, lipídios e proteínas (Fahn 1979, 1990; Thomas, 1991), ou ainda, por uma mistura de ambas (Fahn, 1979). A presença de proteínas na secreção estaria relacionada à proteção contra microorganismos como fungos (Demarco, 2005).

A ausência de proteínas nas secreções da espécie de Leptospermoideae e Myrtoideae pode estar relacionada à função primária da secreção nesta família. Baseando-se na hipótese de que a proteção das gemas era inicialmente feita pelos catáfilos fortemente aderidos entre si formando uma barreira contra patógenos, a função primária da secreção seria apenas a lubrificação do meristema. Assim, pode-se supor que esta característica permaneceu nas demais espécies da família. Secreção de proteínas em exsudados de coléteres têm sido registrados em Apocynaceae (Miguel et al., 2006) e Rubiaceae (Klein et al., 2004), pertencentes às Euasterídeas I, (Judd et al., 2009), que são filogeneticamente derivadas em relação à Myrtaceae, que atualmente está inserida no clado Eurosídeas I (Judd et al., 2009). Isto pode indicar que a função de proteção contra microorganismos exercida pela secreção de coléteres em algumas famílias de Angiospermas, surgiu posteriormente, como um passo evolutivo. A proliferação de hifas nos coléteres de *Myrciaria cauliflora*, sugere que não esteja ocorrendo em Myrtaceae à função de proteção exercida pelas proteínas presentes na secreção de algumas espécies de Angiospermas.

A senescência observada nos coléteres de Myrtaceae se inicia a partir do ápice em direção à base. A coloração acastanhada, relacionada a este processo já foi descrita para coléteres de outras famílias, como por exemplo, em Apocynaceae (Apezato-da-Glória e Estelita, 2000; Demarco, 2005; Castro e Demarco, 2000). Segundo Thomas (1991), após cessar sua função secretora, o coléter entra em senescência, com a mudança de coloração para amarelo-pálido a marrom. A necrose tem início no ápice do coléter, onde ocorre o espessamento da parede celular e degeneração do citoplasma a partir das células apicais e prossegue em direção à base. Entretanto, nenhum tipo de necrose foi observado nos coléteres das espécies investigadas. Aparentemente o que ocorre é uma mudança na fase secretora onde predomina polissacarídeos para outra fase em que ocorre predomínio de compostos fenólicos (Paiva, 2009). Entretanto, são necessárias análises histoquímicas complementares para se confirmar a secreção de fenólicos na fase pós-secretora.

A ausência de vascularização nos coléteres de Myrtaceae pode indicar que o transporte de materiais ocorre via simplasto célula a célula a partir das células centrais dos coléteres que estabeleceriam, entre si, conexões simplásticas por meio de plasmodesmos, localizados especialmente em suas paredes terminais. Assim, as células centrais transportariam os elementos precursores da secreção até as demais células (Lersten e Horner, 1968; Paiva e Machado, 2006). Estudos detalhados em microscopia eletrônica de transmissão são necessários para se confirmar estas hipóteses nos coléteres de Myrtaceae.

Quanto à vascularização, são necessários estudos em um número maior de espécies para se verificar se essa condição é universal, pois em outras famílias botânicas foram observados tanto coléteres vascularizados quanto não vascularizados. A não vascularização dos coléteres em Myrtaceae é uma característica já observada em outras famílias de Angiospermas como Apocynaceae (Apezato-da-Glória e Estelita, 2000), Caryocaraceae (Paiva e Machado, 2006), Rubiaceae (Vitarrelli e Santos, 2009) e Fabaceae (Caesalpinioideae) (De-Paula e Oliveira, 2007).

Em relação à eliminação da secreção, a ausência de poros, a permanência da integridade da cutícula, que não se distende tampouco se rompe, indica que a eliminação da secreção se dá por permeabilidade da cutícula. Esse tipo de mecanismo de liberação da secreção produzida por coléteres foi descrito em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae) onde é enfatizado o acúmulo de secreção em espaços intercelulares (Paiva, 2009), o que está de acordo com o observado em algumas das espécies de *Melaleuca* estudadas.

Estudos complementares são necessários para se esclarecer a processo de liberação das secreções nos coléteres de Myrtaceae.

### **3.5. CONCLUSÕES**

Este trabalho descreve pela primeira vez a estrutura anatômica dos coléteres em representantes das duas subfamílias de Myrtaceae. Foram descritos três novos tipos de coléteres, que exibem uma potencial aplicação nas abordagens sobre as relações filogenéticas em Myrtaceae.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Appezato-Da-Glória B, Estelita MEM. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23: 113-120.

**Bradford MM. 1976.** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Biochemistry* 72: 248–254.

**Castro MM, Demarco D. 2008.** Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3: 1273-1284.

**Conti E, Litt A, Wilson PG, Graham SA, Briggs BG, Johnson LAS, Sytsma KJ. 1997.** Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22: 629-647.

**Conti ESA, Graham A, Litt PG, Wilson BG, Briggs LAS, Sytsma JKJ. 1998.** Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22, 629-647.

**Craven LA. 1999.** *Behind the names: the botany of tea tree, Cajuput and Niaouli.* In: Southwell, I. A.; Lowe, R., eds. *Tea Tree: The Genus Melaleuca.* Australia: Harwood Academic Publ, 1999. p. 11.

**Craven LA. 2006.** New combinations in *Melaleuca* for Australian species of *Callistemon* (Myrtaceae). *Novon* 16: 468–475.

**Demarco D. 2005.** Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae *s.l.*). Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas

**De-Paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). Nota científica. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 348-350.

**Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants.* London, Academic Press.

**Fahn A. 1990.** Plant anatomy. 4 ed. Pergamon Press, Oxford.

**Gonzalez AM. 1998.** Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 215-228.

**Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique.* London: McGraw Hill.

**Judd WS, Campbel CS, Kellongg EA, Steens PF, Donogue MJ. 2009.** *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético.* 3.ed. Porto Alegre: Artmed.

**Karnovsky MJ 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 27: 137-138.

- Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M. 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733-740.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lersten NR, Horner HTJr. 1968.** Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55: 1089-1099.
- Lucas EJ, Belsham SR, NicLughadha EM, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW, Wilson PG. 2005.** Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Mabberley DJ. 1993.** *The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants.* 4th ed. Cambridge University Press: New York, 1993
- Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-da-Glória, B. 2010.** Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* - Article in Press
- McManus JFA. 1948.** Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- Miguel EC, Gomes VM, De-Oliveira MA, Da-Cunha M. 2006.** Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity. *Plant Biology* 8: 715-722.
- O'brien TP, McCully ME. 1981.** The study of plant structure principles and select methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006.** Colleters in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* 66: 301-308.
- Paiva, EAS. 2009.** Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C. R. Biologies* 332: 1078–1084.
- Pizzolato TD, Lillie RD. 1973.** Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 56-64.
- Rio MCS, Kinoshita LS. 2005.** *Prestonia* (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32: 233-258.
- Rio MCS, Kinoshita LS, Castro MM. 2005.** Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 713-726.
- Simões AO, Castro MM, Kinoshita LS. 2006.** Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 387-398.

**Thomas, V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305.

**Vitarelli NC, Santos M. 2009.** Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica* 23: 923-928.

**Woodson JRE, Moore JA. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-169.

**Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001.** Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.

**Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn CJ. 2005.** Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251, 3-19.

## CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os óleos voláteis das espécies de Myrtaceae são constituídos em sua maioria por monoterpenóides, dos quais 1,8-cineol (88,0%, 65,0% e 77,0% para *Melaleuca hypericifolia*, *Callistemon viminalis* e *C. citrinus*, respectivamente), terpinen-4-ol (47,0% e 49,8% para *M. thymifolia* e *C. polandii* respectivamente) e  $\alpha$ -pineno (54,5%) para *Kunzea ericoides*) foram os componentes majoritários. O óleo essencial de *M. linariifolia* apresentou altas concentrações do fenilpropanóide metileugenol (87,2%). Estas espécies são promissoras fontes destes compostos que são largamente utilizados nos diversos ramos da indústria. Os óleos das espécies de Myrtaceae apresentaram forte atividade bactericida indicando seu potencial para uso na indústria de alimentos e medicamentos em geral.

Este é o primeiro estudo sobre a composição química do óleo essencial de folhas, caules e flores de *S. trilobata*, a análise da variação sazonal óleos essenciais das folhas desta espécie; a atividade antibacteriana e fitotóxica dos óleos essenciais das folhas e caules da *S. trilobata*, bem como a histolocalização dos locais de síntese e acúmulo de óleos voláteis no corpo da planta. Os óleos voláteis são sintetizados e acumulados em estruturas internas (canais) e externas (tricomas) no corpo da planta. Caracterizam-se por apresentar em sua composição, altas porcentagens de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos e baixos níveis de sesquiterpenos oxigenados, apresentando significativa atividade fitotóxica e bactericida. O maior rendimento do óleo essencial foi obtido de plantas coletadas no inverno, quando ocorreu baixa temperatura e precipitação. As porcentagens dos componentes do óleo essencial de *S. trilobata* variaram significativamente durante os meses do ano.

Este trabalho registra pela primeira vez a ocorrência de coléteres na família Myrtaceae. Os três novos tipos de coléteres descritos são anatomicamente diferenciados daqueles já descritos para outras famílias botânicas. Esta descoberta é uma importante contribuição para as abordagens filogenéticas infrafamiliar, e desta família com outras famílias de Angiospermas. A nomenclatura aqui proposta pretende ser uma ferramenta para orientar as descrições dos coléteres dentro da família Myrtaceae.

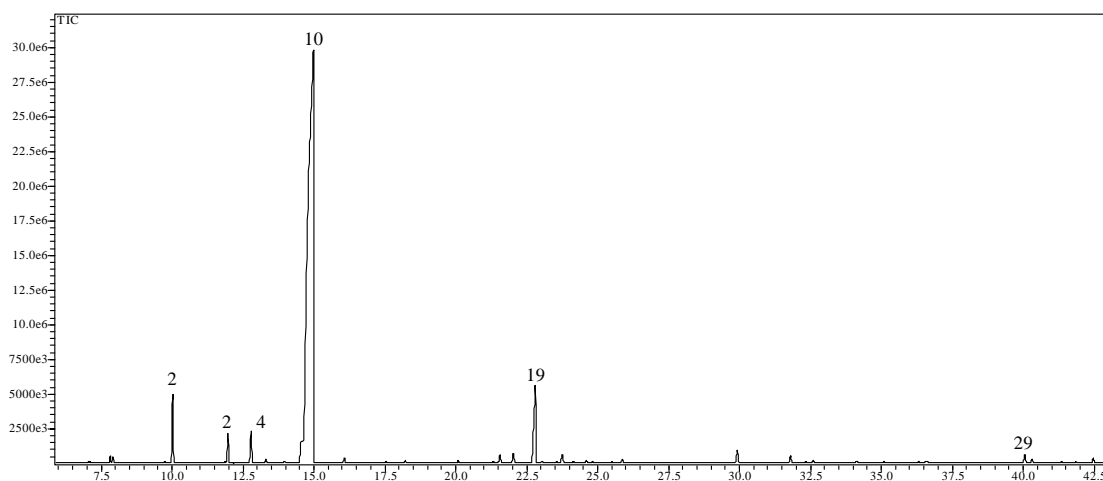
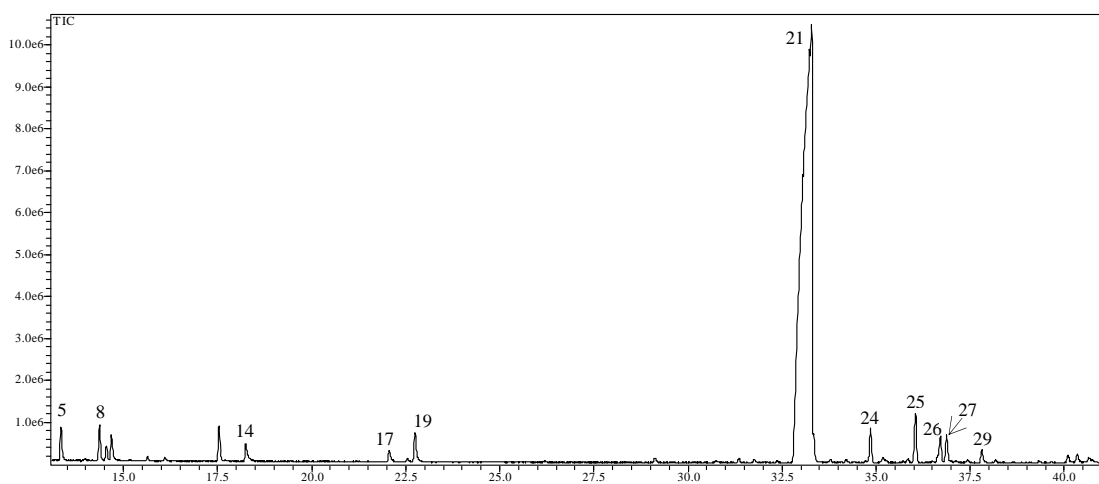
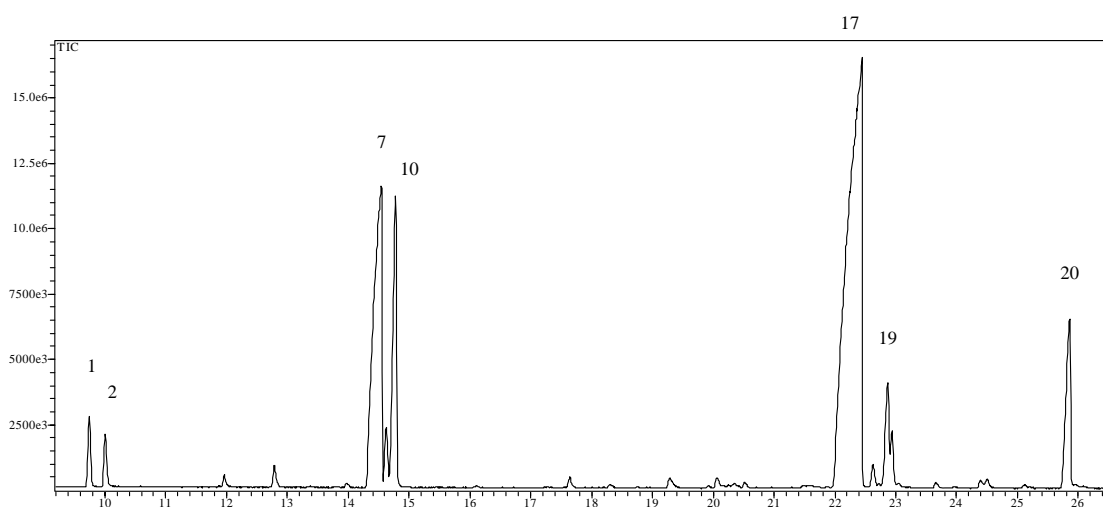
Com o crescente uso dos óleos essenciais em larga escala nos diversos setores da indústria, fontes alternativas destes compostos com ampla atividade biológica e baixa toxicidade são requeridos no mercado que busca cada vez mais substituir aditivos alimentares sintéticos por aqueles de origem natural. O estudo dos óleos essenciais de espécies tanto nativas como introduzidas pode, em um primeiro momento, parecer trivial,

no entanto, é uma área promissora, pois aponta novas fontes alternativas de compostos de reconhecida atividade biológica como metileugenol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, dentre muitos outros. Entretanto estes estudos devem ser acompanhados de testes biológicos que comprovem sua baixa toxicidade para os humanos aliada à alta toxicidade contra microorganismos patogênicos em geral. Óleos essenciais como de *S. trilobata*, que apresenta uma gama de compostos bioativos com comprovada atividade bactericida como mostrado neste trabalho tem potencial uso na indústria alimentícia, já que apresentam suave odor que possivelmente não altera o gosto e odor dos alimentos.

Aliado ao estudo da composição química, os estudos de caracterização das estruturas que sintetizam e/ou acumulam óleos voláteis são de grande importância, pois orientam a manipulação e processamento do material vegetal. Além disto, estes estudos têm provado que estruturas secretoras tipicamente conhecidas como produtoras de óleos essenciais, também sintetizam compostos de alto peso molecular de diversas classes químicas, como da classe dos esteróides indicados pelos testes histoquímicos nos tricomas de *S. trilobata*. Estes compostos podem atuar sinergisticamente com os componentes dos óleos essenciais potencializando sua atividade biológica. Portanto metodologias que permitam a extração de todos estes compostos devem ser desenvolvidas e aplicadas em estudos futuros, já que os métodos usuais de extração de óleos essenciais, só extraem compostos de baixo peso molecular.

A importância das estruturas secretoras não se dá somente no campo econômico, mas aplica-se em um sentido mais amplo, na compreensão das relações filogenéticas entre as diversas famílias botânicas. A descoberta e a descrição dos três novos tipos de coléteres nas duas subfamílias de Myrtaceae apontam novas perspectivas de uso destas estruturas secretoras como ferramenta nas discussões filogenéticas tanto em nível inframiliar como em níveis hierárquicos superiores. Esta primeira descrição abre também perspectivas de estudos mais amplos envolvendo um número maior de espécies que fornecerão dados consistentes que poderão contribuir para inferências futuras sobre a filogenia de Myrtaceae.

## APENDICE 1: CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE MYRTACEAE

Figura 1.A - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Melaleuca hypericifolia*Figura 1.B - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Melaleuca linariifolia*Figura 1.C - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Melaleuca thymifolia*

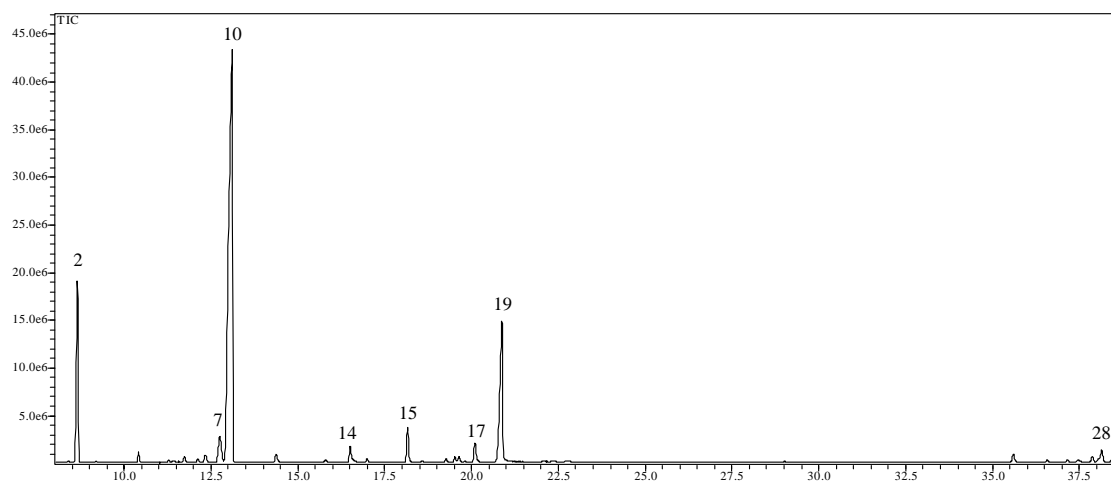


Figura 1.D - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Callistemon viminalis*

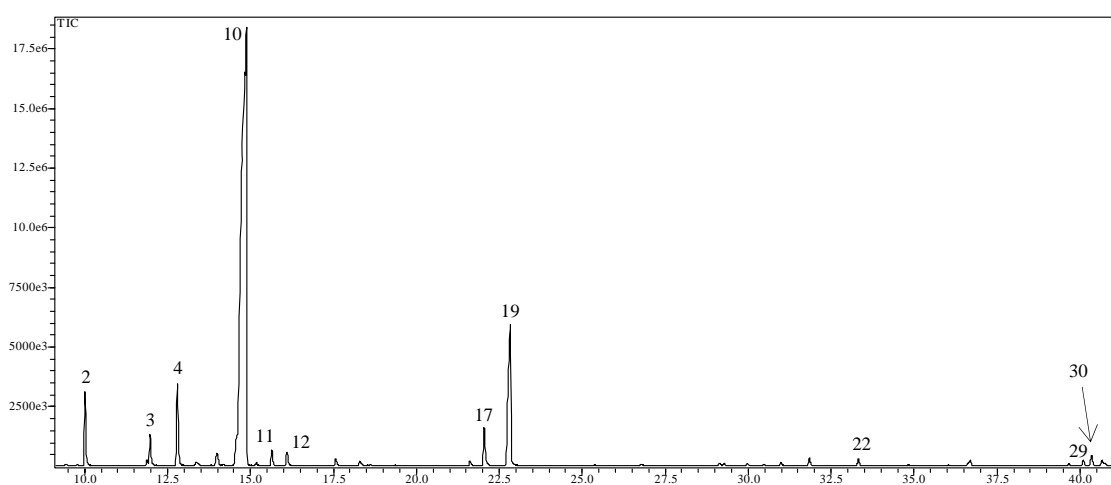


Figura 1.E - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Callistemon citrinus*

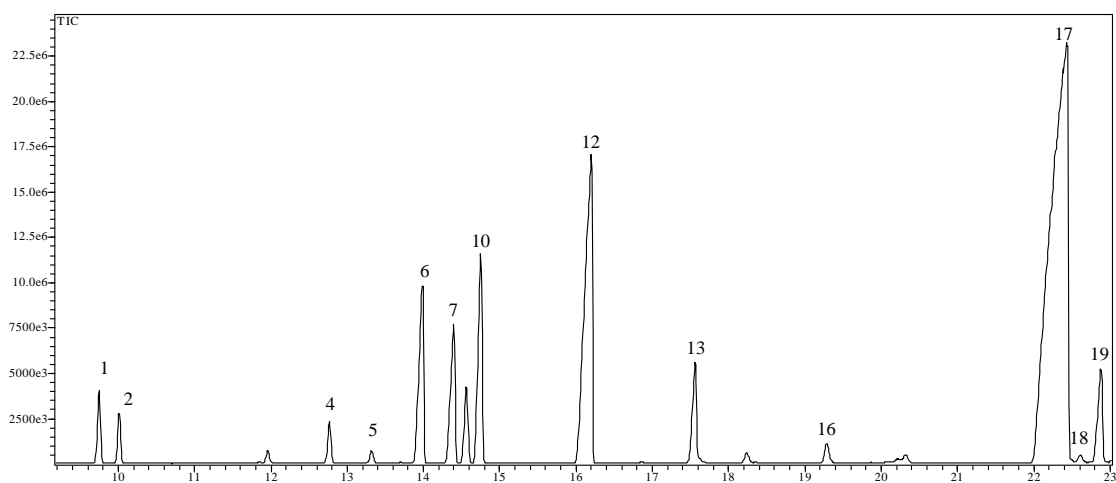


Figura 1.F - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Callistemon polandi*

1.  $\alpha$ -tujeno; 2.  $\alpha$ -pineno; 3.  $\beta$ -pineno; 4. Mirceno; 5.  $\alpha$ -felandreno; 6.  $\alpha$ -terpineno; 7.  $p$ -cimeno; 8.  $o$ -cimeno; 9. Limoneno; 10. 1,8-cineol; 11.  $\beta$ -(*E*)-ocineno; 12.  $\gamma$ -terpineno; 13.  $\alpha$ -terpinoleno; 14. Linalol; 15. *E*-pinocarveol; 16. Hidrato de *Z*-pineno; 17. Terpinen-4-ol; 18.  $p$ -cimen-8-ol; 19.  $\alpha$ -terpineol; 20. Não identificado; 21. Metil eugenol; 22. *E*-cariofileno; 23. Aromadendreno; 24.  $\alpha$ -humuleno; 25. Germacreno D; 26. Bicyclodermacreno; 27. *E*-metiliso Eugenol; 28. Ledol; 29. Epatulenol; 30. Globulol; 31. Viridiflorol.

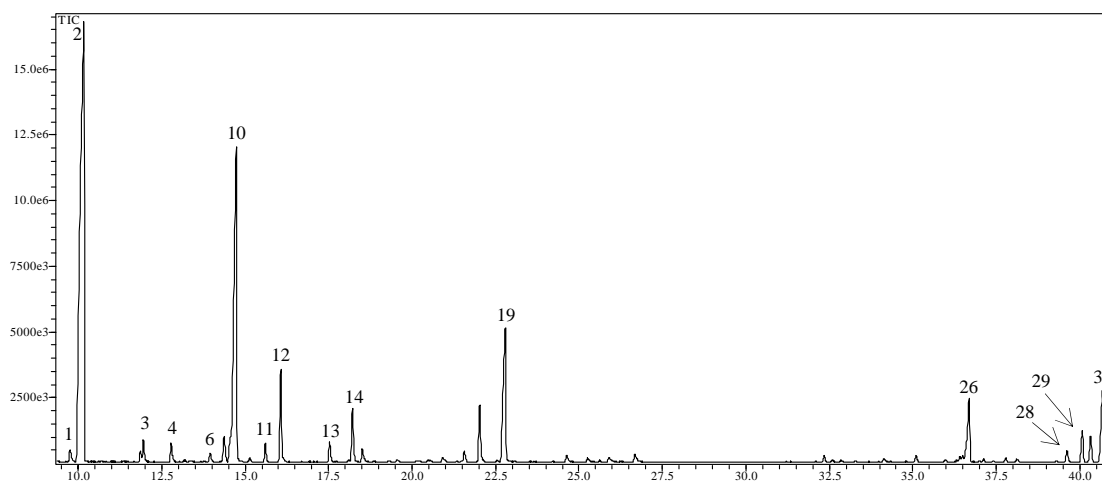
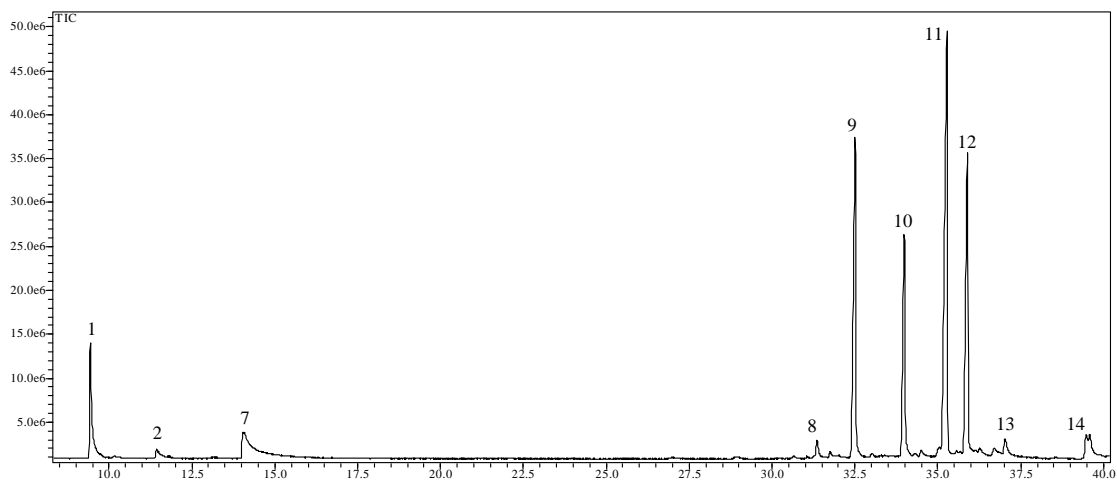
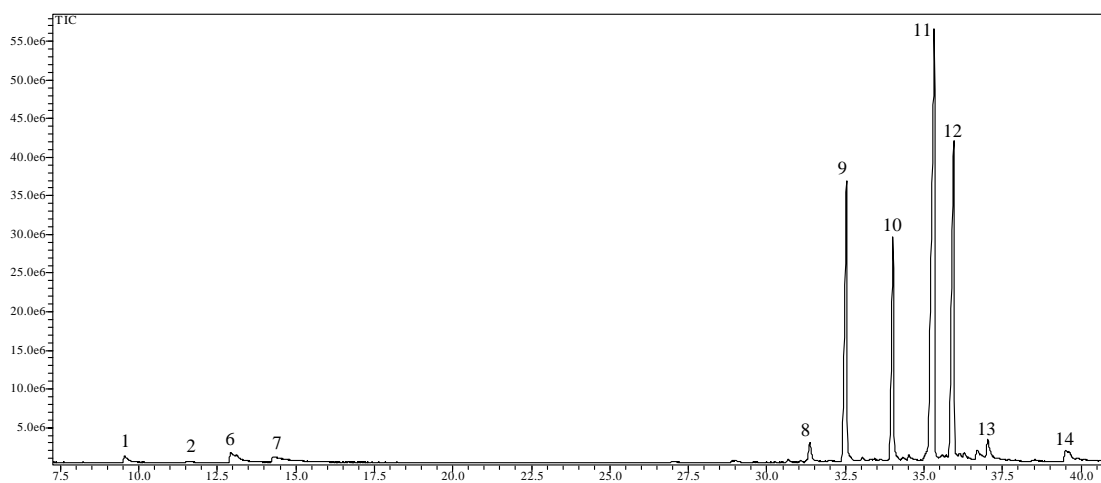
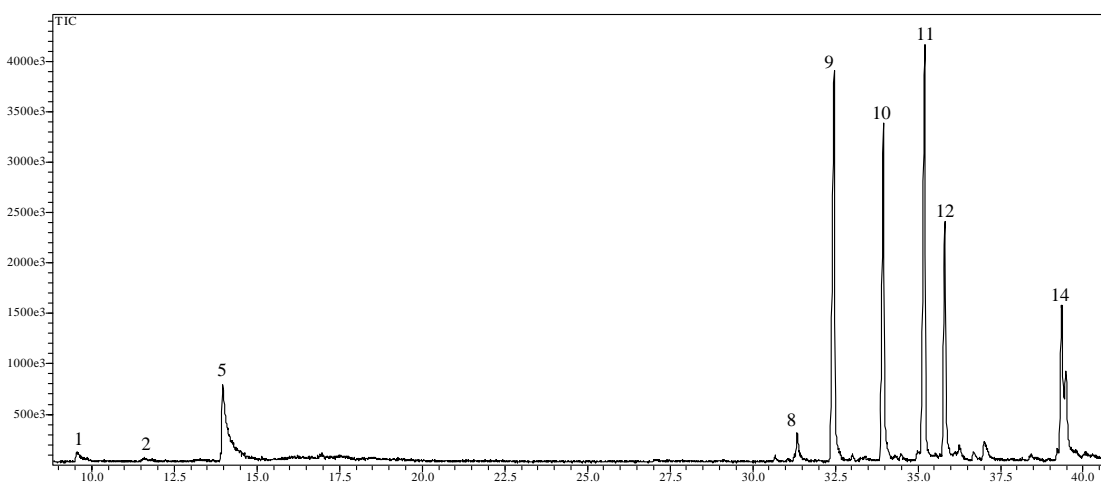


Figura 1.G - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *Kunzea ericoides*

APENDICE 2: CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *S. trilobata* (ASTERACEAE)Figura 2.A - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Setembro/2009Figura 2.B - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Outubro/2009Figura 2.C - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Novembro/2009

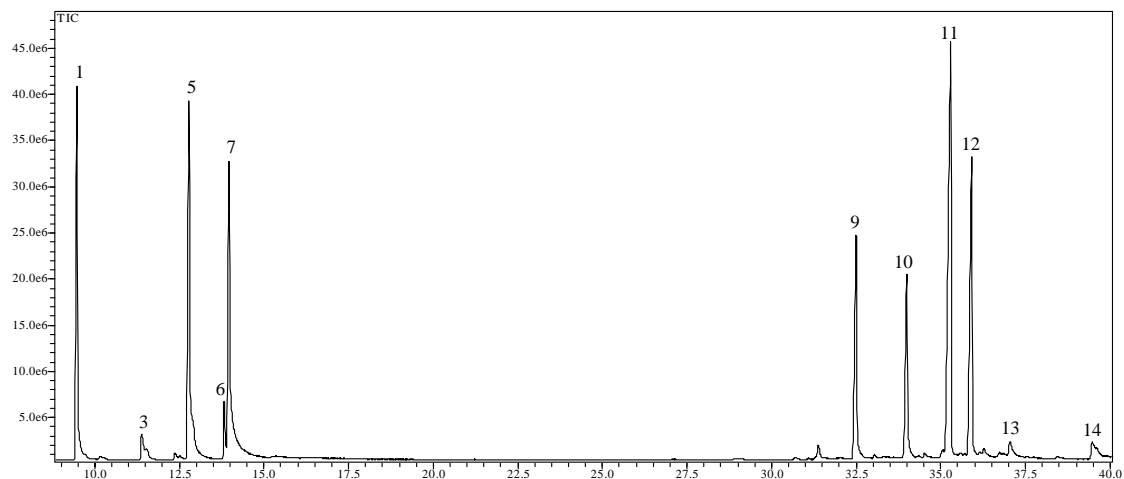


Figura 2.D - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Dezembro/2009

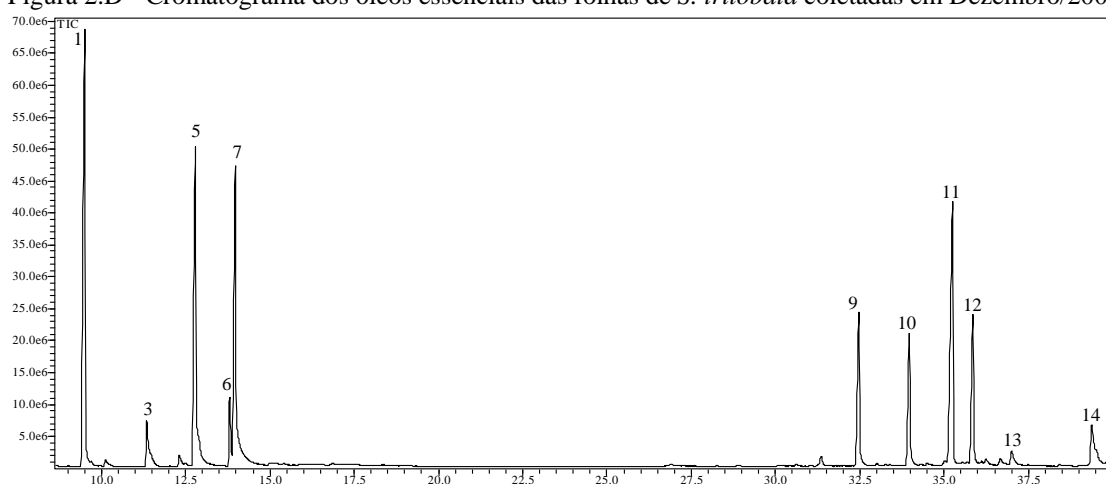


Figura 2.E - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Janeiro/2010

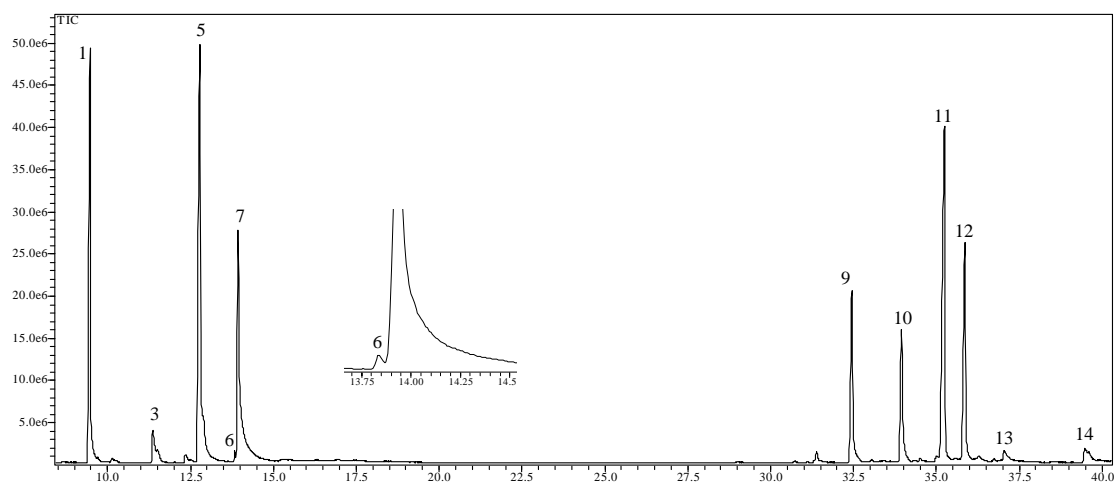


Figura 2.F - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Fevereiro/2010

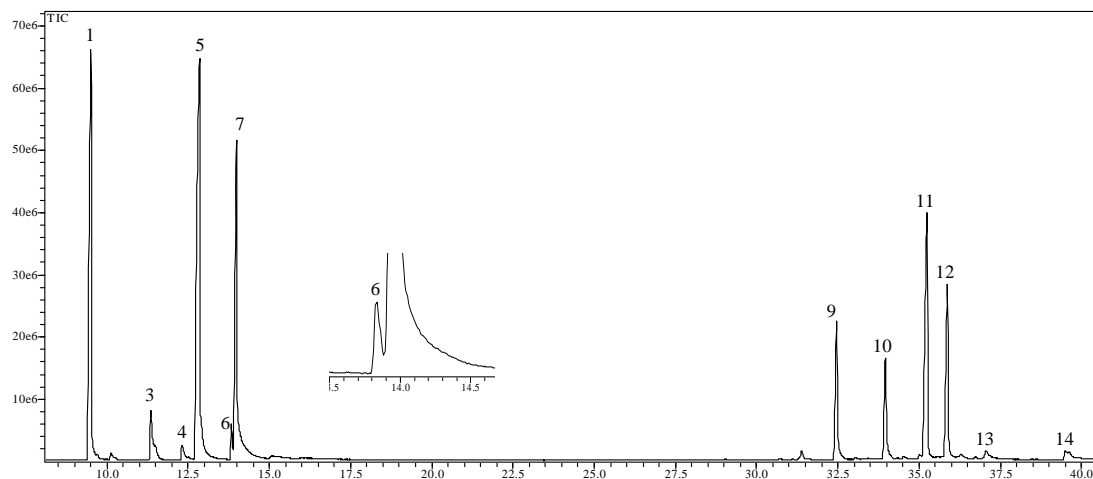


Figura 2.G - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Março/2010

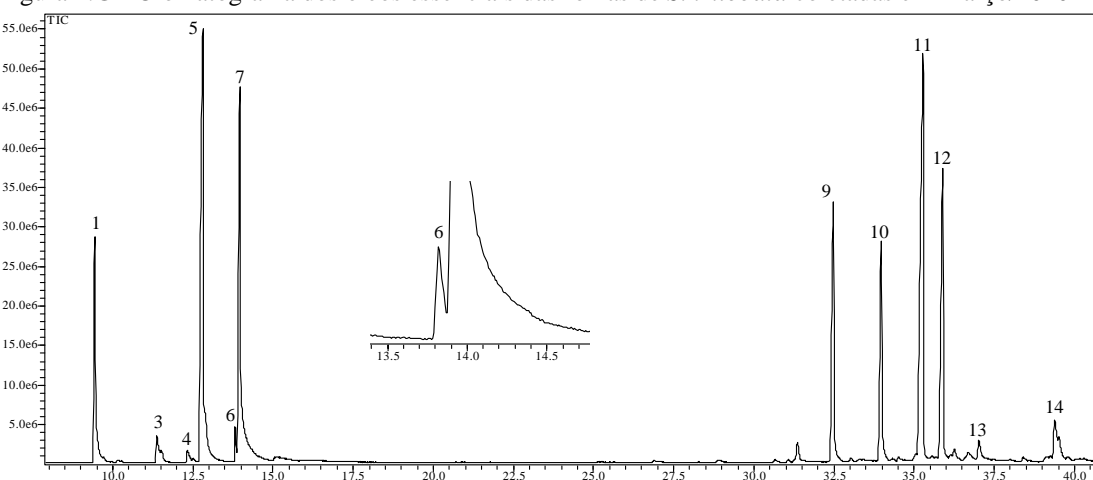


Figura 2.H - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Abril/2010

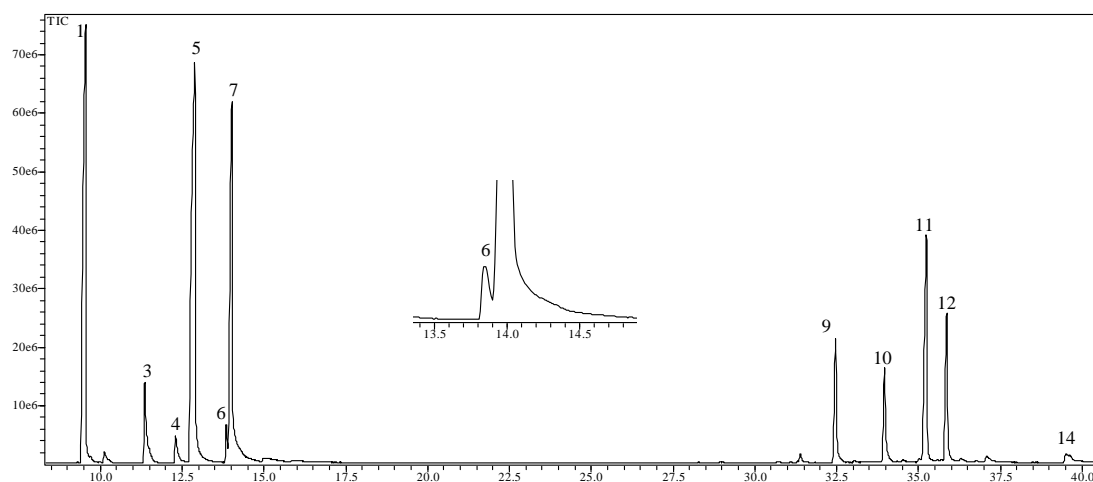


Figura 2.I - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Maio/2010

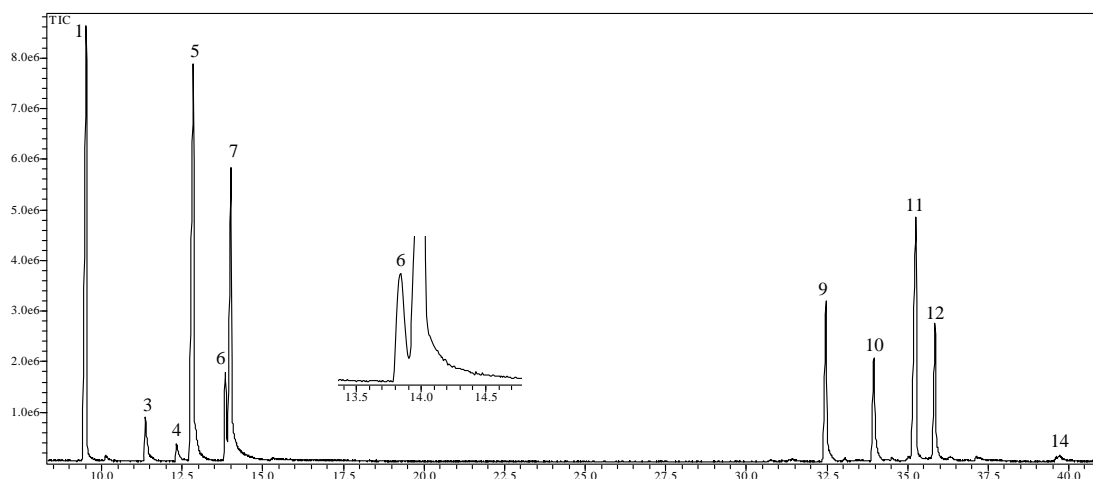


Figura 2.J - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Junho/2010

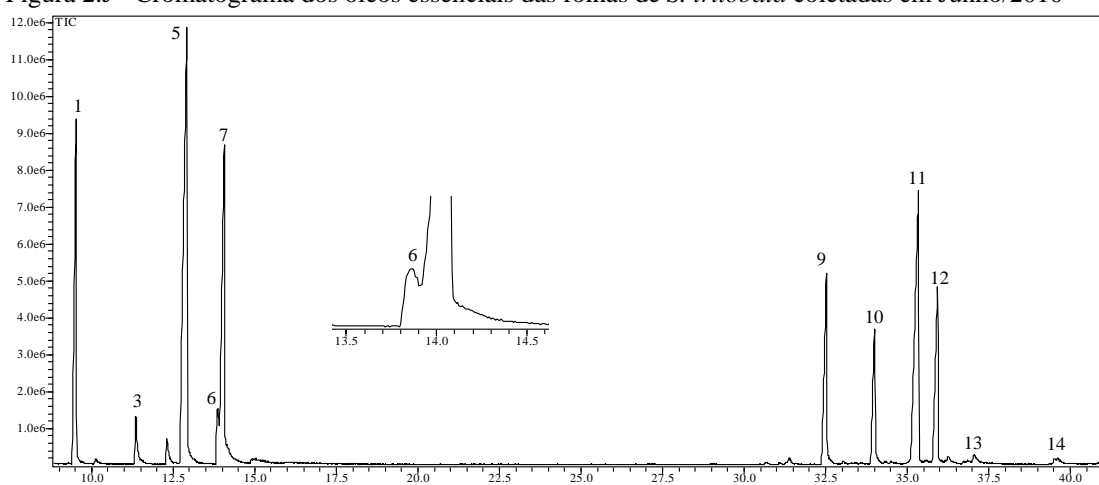


Figura 2.K - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Julho/2010

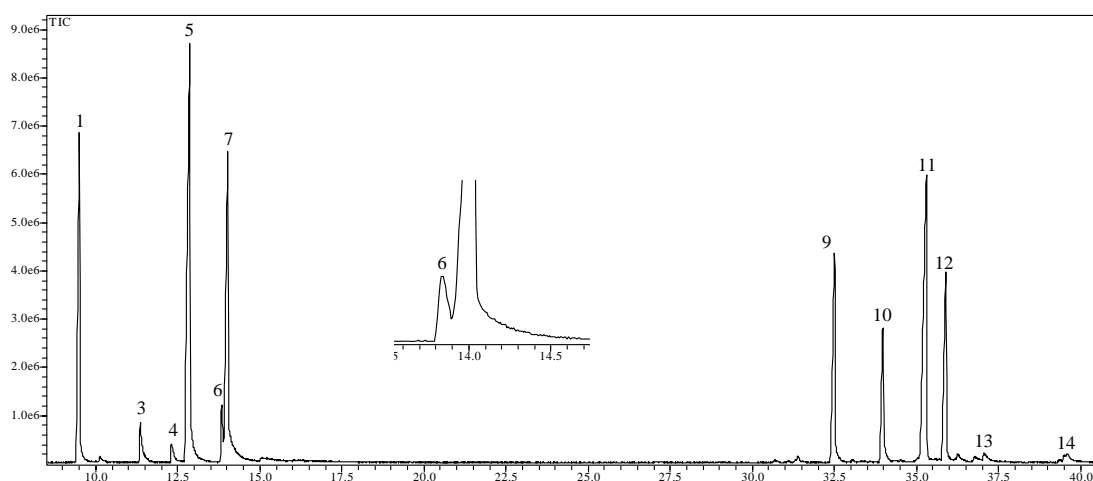


Figura 2.L - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Agosto/2010

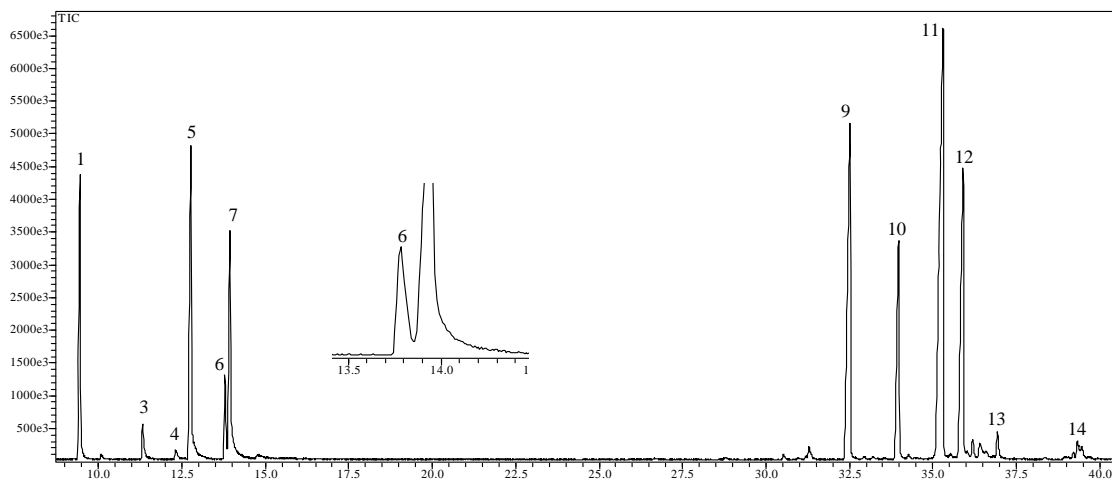


Figura 2.M - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Setembro/2010

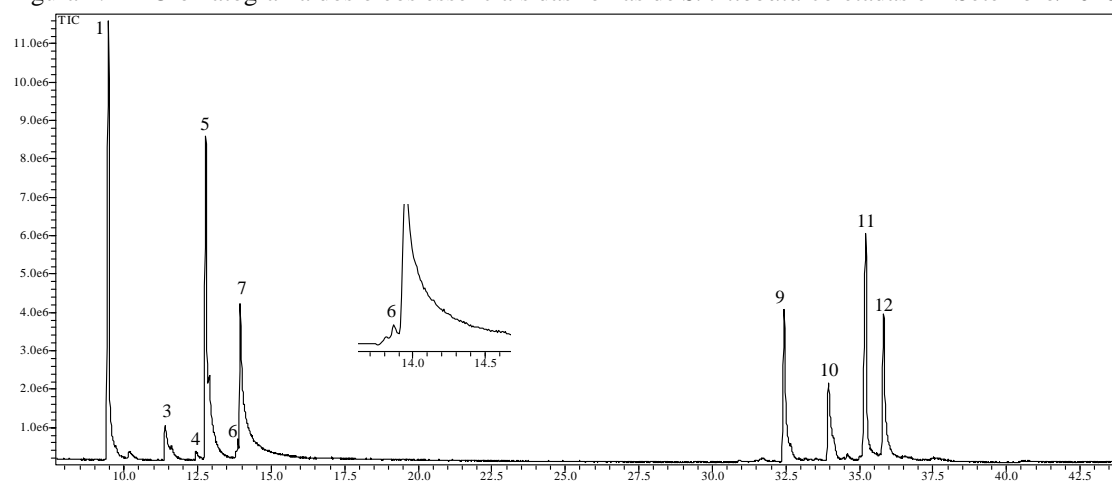


Figura 2.N - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Outubro/2010

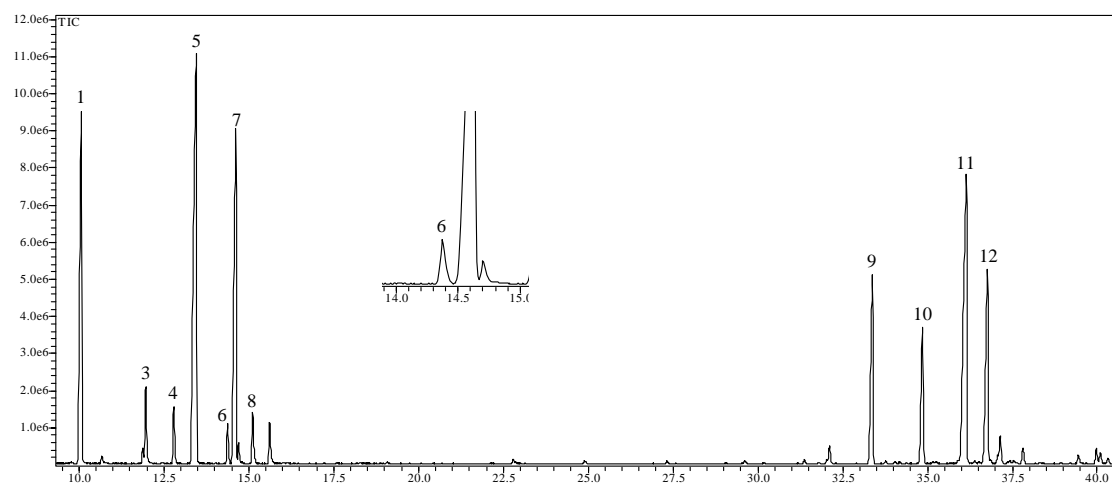


Figura 2.O - Cromatograma dos óleos essenciais das folhas de *S. trilobata* coletadas em Novembro/2010

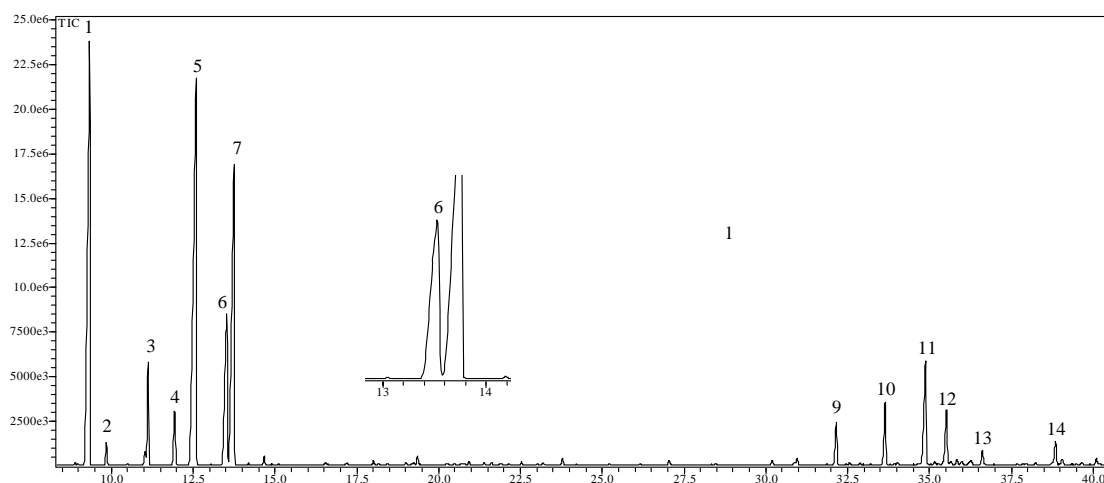


Figura 2.P - Cromatograma dos óleos essenciais do caule de *S. trilobata*

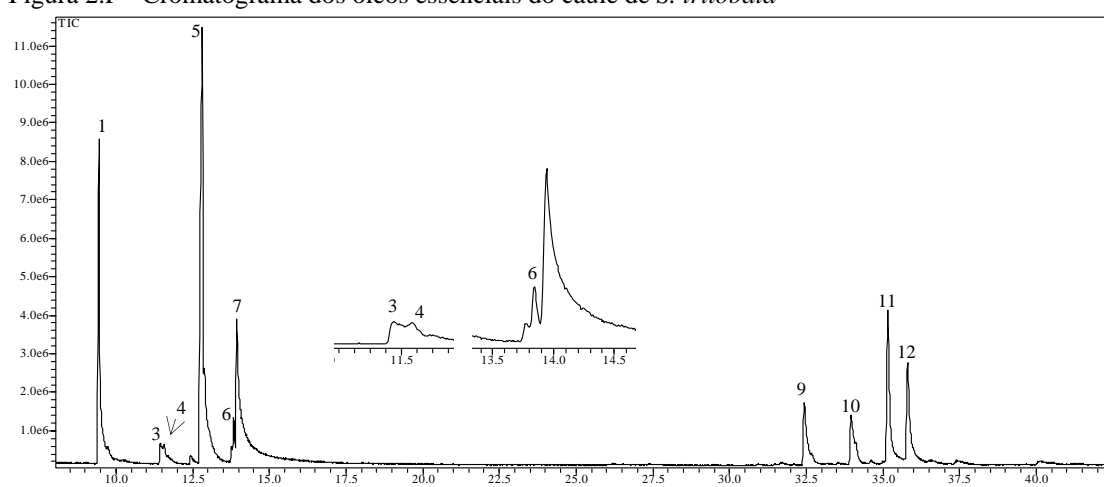


Figura 2.Q - Cromatograma dos óleos essenciais das flores de *S. trilobata*

APÊNDICE 3: Fórmulas estruturais dos principais componentes identificados nos óleos essenciais das espécies de ASTERACEAE E MYRTACEAE

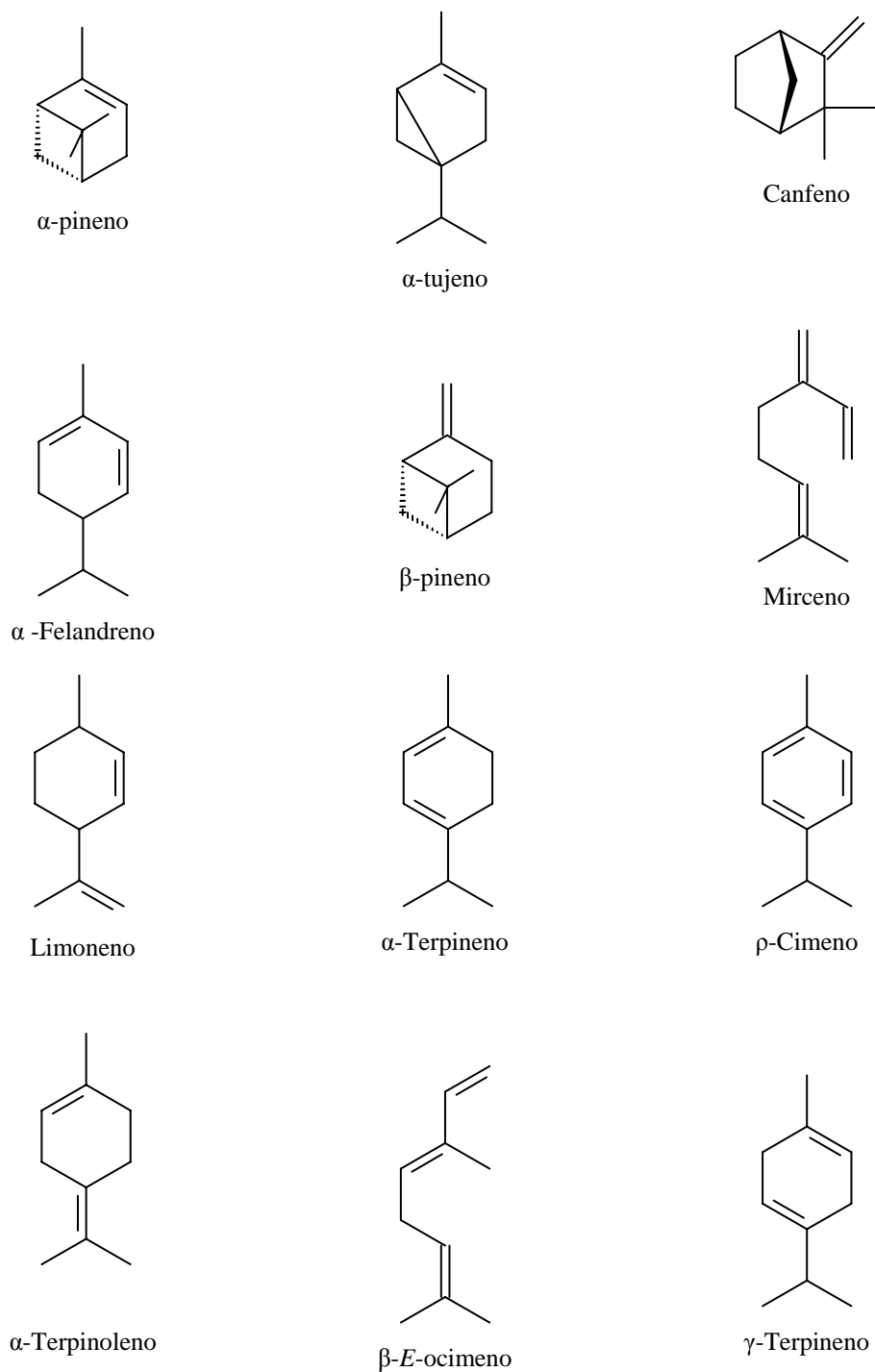


Figura 3.A - Monoterpenos hidrocarbonetos

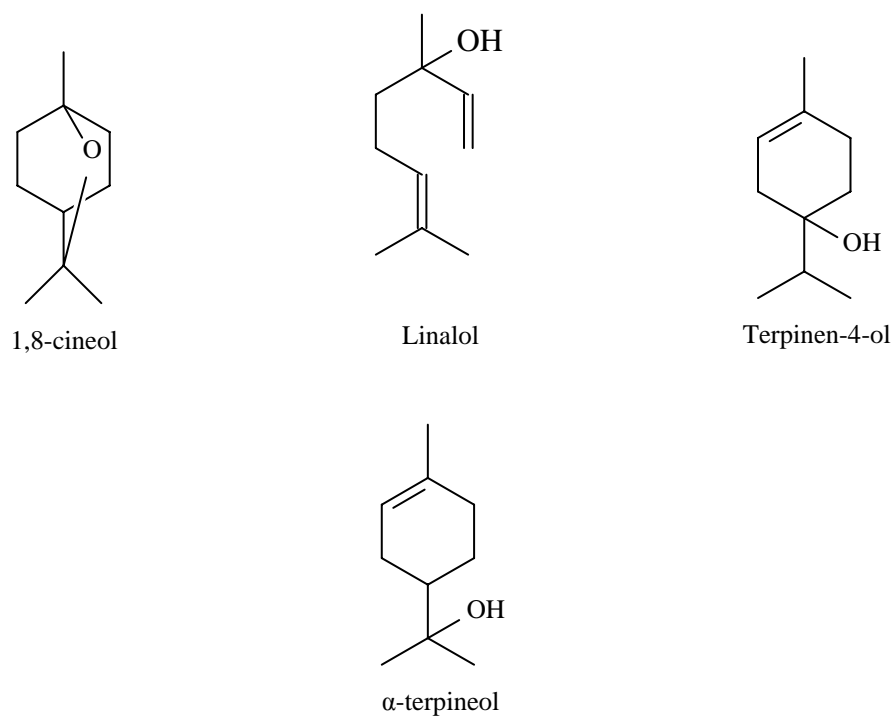


Figura 3.B - Monoterpenos oxigenados

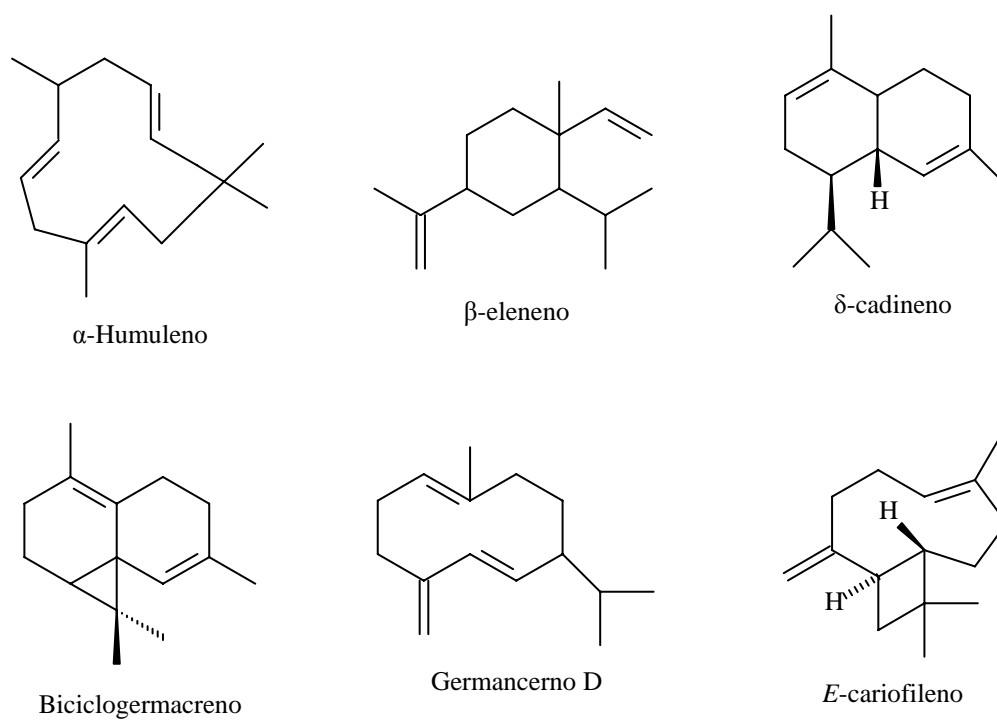


Figura 3.C – Sesquiterpenos hidrocarbonetos

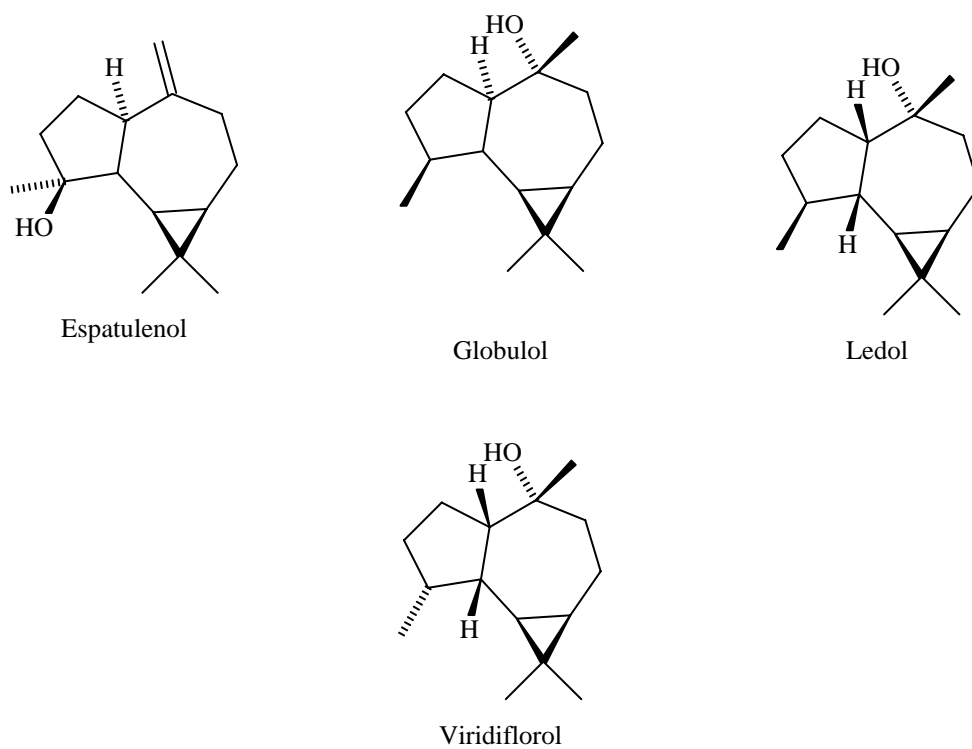
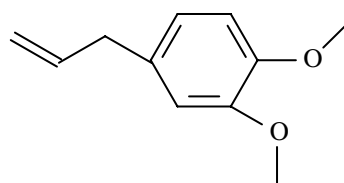


Figura 3.D – Sesquiterpenos oxigenados



Metil Eugenol

Figura 3.E – Fenilpropanóides