

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES

**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TRÊS ESPÉCIES DE *LEPTOSPERMUM*
J. R. FORST & G. FORST (MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
Programa de Pós - Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES

**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TRÊS ESPÉCIES DE *LEPTOSPERMUM*
FORST J. R. FORST & G. FORST (MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do
Programa de Pós - Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de junho de 2008.

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Co-orientador)

Prof^a Célia Regina Álvares Maltha
(Co-orientadora)

Prof. Antônio Lelis Pinheiro

Prof. Róbson Ricardo Teixeira

Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e fortaleza, por mais essa bênção concedida.

À minha família, alicerce fundamental no decorrer dessa caminhada. Em especial à minha mãe, Nely Damasceno, pelo amor incondicional.

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

Aos professores Antônio Jacinto Demuner e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela confiança e pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação dedicada, incentivo e amizade.

Ao professor Antônio Lelis Pinheiro, pelo auxílio e por disponibilizar o material utilizado na realização deste trabalho.

À professora Célia Regina Álvares Maltha, pelos ensinamentos e amizade.

Ao grande amigo Leandro Marcos Cunha, pelo incentivo em todos os momentos e por ter me ajudado a descobrir as belezas da pesquisa em Química.

Ao professor Rafael Bastos, por disponibilizar parte do material utilizado na realização deste trabalho.

Ao funcionário do Setor de Dendrologia (DEF) Ademir pelo auxílio e amizade.

Ao professor Nélio Andrade e às amigas Iara Dias e Larissa Santos, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial (DTA), pelo grande auxílio na realização dos ensaios biológicos.

Ao técnico José Luiz Pereira pela amizade, cooperação e momentos de alegria.

Aos amigos Vânia Valente, Patrícia Pinheiro, Cléber Silva, Guilherme Carvalho, Ulisses Pereira, Róbson Teixeira, Márcio Dionízio e demais colegas do LASA e DEQ pela força, auxílio e pelos momentos de alegria durante a realização deste trabalho.

À secretária da pós-graduação em Agroquímica, Marisa Ferreira, pela atenção e amizade em todo o processo.

À Fátima Maffili e família pela amizade e convívio harmonioso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

A meus pais, **José** e **Nely**, que atravessaram obstáculos monumentais para que eu tivesse uma educação exemplar,

DEDICO.

Às minhas irmãs, Poliana e Danúbia, pelo carinho e incentivo,
OFEREÇO.

BIOGRAFIA

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES, filha de José Magalhães Maia e Nely Damasceno Gonçalves Maia, nasceu em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, em 17 de outubro de 1982.

Em julho de 2006, recebeu o título de Licenciada em Química pela Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, iniciou os estudos no Curso de Mestrado em Agroquímica, área de concentração em Química Orgânica na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em junho de 2008, concluiu os requisitos para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”, com defesa de dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 - Obtenção do material vegetal.....	10
3.2 - Determinação do teor de matéria seca	11
3.3 - Extração do óleo essencial das folhas e flores.....	11
3.4 - Análise qualitativa e quantitativa dos óleos voláteis de <i>Leptospermum</i>	11
3.5 - Extração dos compostos voláteis liberados pelas flores de <i>L. petersonii</i>	12
3.6 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Leptospermum</i>	13
3.6.1 - Microorganismos.....	13
3.6.2 - Manutenção e ativação dos microorganismos.....	13
3.6.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 - Rendimento do óleo essencial.....	15
4.2 - Composição do óleo essencial.....	17
4.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	27
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS - Cromatogramas e fórmulas estruturais dos principais componentes dos óleos essenciais das espécies de <i>Leptospermum</i>	43

RESUMO

MAGALHÃES, Cássia Gonçalves. M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008.

Efeito do estresse hídrico sobre a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de três espécies de *Leptospermum* J. R. Forst & G. Forst (Myrtaceae). Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Co-orientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Célia Regina Álvares Maltha.

O presente trabalho visou avaliar o efeito do estresse hídrico sobre o teor e a composição química do óleo essencial das espécies *Leptospermum flavescens*, *L. madidum* ssp *sativum* e *L. petersonii* cultivadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. São apresentados dados relativos à composição química dos óleos essenciais das folhas dessas espécies, além da composição do óleo essencial e dos voláteis liberados pelas flores de *L. petersonii*. A identificação dos compostos dos óleos essenciais foi feita empregando-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Para a determinação dos voláteis das flores utilizou-se a técnica de headspace - microextração em fase sólida. As espécies de *Leptospermum* apresentaram padrões diferenciados na composição do óleo essencial. Observou-se que após a ocorrência de chuvas houve redução no teor do óleo essencial para *L. madidum* ssp *sativum* e um ligeiro aumento para as demais. O componente majoritário do óleo essencial de *L. flavescens* foi nerolidol ($55,1 \pm 3,4\%$ na estiagem; $68,6 \pm 1,8\%$ no período chuvoso). Em *L. madidum* ssp *sativum* no período de estiagem, os componentes encontrados em maior proporção foram β -pineno ($18,5 \pm 0,5\%$), α -pineno ($15,2 \pm 0,7\%$), α -humuleno ($10,2 \pm 0,2\%$), 1,8-cineol ($7,1 \pm 0,7\%$) e *trans*-cariofileno ($5,8 \pm 0,01\%$). Com a ocorrência de precipitação, as concentrações desses compostos foram alteradas, sendo α -humuleno o componente majoritário ($30,8 \pm 1,2\%$), seguido de *trans*-cariofileno ($11,9 \pm 0,1\%$). Tanto no óleo essencial das flores quanto das folhas de *L. petersonii* os principais componentes foram citronelal, neral e geranial, sendo que nas flores as concentrações foram de $35,0 \pm 0,5\%$, $16,5 \pm 2,1\%$ e $26,1 \pm 0,3\%$, respectivamente. Nas folhas, as concentrações encontradas foram de $33,9 \pm 0,8\%$ na estação seca e $26,5 \pm 1,0\%$ na estação chuvosa para citronelal, $22,7 \pm 0,7\%$ e $23,5 \pm 1,5\%$ para neral, $29,8 \pm 0,4\%$ e $32,8 \pm 0,5\%$ para geranial. Os principais componentes encontrados nos voláteis liberados

pelas flores de *L. petersonii* foram citronelal ($27,4 \pm 1,6\%$) e β -citronelol ($22,1 \pm 3,6\%$). Observou-se que o efeito do estresse hídrico sobre o teor e a composição química dos óleos voláteis é diferente para cada uma das espécies. Avaliou-se a atividade dos óleos essenciais obtidos contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Tanto o óleo de *L. flavescens* como o de *L. madidum* ssp *sativum* apresentaram atividade contra os dois primeiros microorganismos, porém foram ineficazes contra *E. coli*. O óleo de *L. petersonii* inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados. Os resultados obtidos mostram que os óleos essenciais de *Leptospermum* podem ser uma alternativa no controle dessas bactérias que deterioram os alimentos.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Cássia Gonçalves. M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, Juny, 2008.
Effect of the water stress on the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of three species of *Leptospermum* J. R. Forst & G. Forst (Myrtaceae). Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-Advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Célia Regina Álvares Maltha.

This study aimed to evaluate the effect of the water stress on the yield and chemical composition of the of *Leptospermum flavescens*, *L. madidum* ssp *sativum* and *L. petersonii* essential oil growing in Viçosa, state of Minas Gerais, Brazil. Result on the compared chemical composition of the leaves essential oil of these species and the composition of the essential oil and the volatile release from *L. petersonii* flowers. Compound identification was done by gas chromatography - mass spectrometry; for determination of the volatile compounds from flowers was utilized headspace solid-phase microextraction. The *Leptospermum* species showed differences within their relative essential oil composition. After rainfall, there was a reduction in the yield of essential oil for *L. madidum* ssp *sativum* and a slightly increase for others. The major constituent found in the *L. flavescens* essential oil was nerolidol ($55.1 \pm 3.4\%$ in drought; $68.6 \pm 1.8\%$ in the rainy period). In the *L. madidum* ssp *sativum* essential oil in the drought period, the main compounds were β -pinene ($18.5 \pm 0.5\%$), α -pinene ($15.2 \pm 0.7\%$), α -humulene ($10.2 \pm 0.2\%$), 1,8-cineol ($7.1 \pm 0.7\%$) and *trans*-cariophyllene ($5.8 \pm 0.01\%$). With rainfall, the concentration these compounds was changed; α -humulene ($30.8 \pm 1.2\%$) and *trans*-cariophyllene ($11.9 \pm 0.1\%$) were the main compounds. As so flowers essential oil as leaves of the *L. petersonii*, the main compounds found were citronellal, neral and geranial; in the flowers the concentration were $35.0 \pm 0.5\%$, $16.5 \pm 2.1\%$, and $26.1 \pm 0.3\%$, respectively. The concentration found in the leaves were $33.9 \pm 0.8\%$ in drought and $26.5 \pm 1.0\%$ in the rainy period for citronellal, $22.7 \pm 0.7\%$ and $23.5 \pm 1.5\%$ for neral, $29.8 \pm 0.4\%$ and $32.8 \pm 0.5\%$ for geranial. The main compounds in the volatile emitted for *L. petersonii* flowers were citronellal ($27.4 \pm 1.6\%$) and β -citronellol ($22.1 \pm 3.6\%$). The effect of water stress on the yield and chemical composition of the volatile oils is different for each species. It was evaluated the activity of the essential oils

against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The *L. flavescens* and *L. madidum* ssp *sativum* oils exhibited activity against Gram-positive bacteria, but were inactive against *E. coli*. The *L. petersonii* essential oil showed activity against all tester microorganisms tested. The results showed that the *Leptospermum* essential oils could be an efficient alternative for the control of foodborne bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde a época primitiva na busca por alívio e cura de doenças, pela ingestão de ervas e folhas. Com o passar do tempo, foram sendo utilizados também no controle de pragas. Atualmente, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Além disso, produtos naturais tem sido úteis como compostos-modelos (“lead structures”) para a obtenção de novos fármacos e para o desenvolvimento de novos agroquímicos (COPPING *et al.*, 2007).

Dentre os diversos metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas de diversos compostos voláteis, odoríferos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Apresentam uma grande importância terapêutica e econômica. São obtidos como misturas por destilação de arraste a vapor, que é um dos métodos mais utilizados para sua extração. Sua constituição química é formada, principalmente, por terpenos e/ou fenilpropanóides (SILVA *et al.*, 2003).

A síntese e armazenamento de produtos naturais em plantas é um processo dinâmico. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários, ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diários, intraplanta, inter e intraespecífico) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão dos metabólitos pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, evolutivos e ecológicos. Dessa forma, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). A limitação da quantidade de água é uma restrição ambiental importante para a produtividade das plantas. Deficiências de umidade não somente limitam o crescimento e a sobrevivência das plantas, mas também induzem várias respostas metabólicas e fisiológicas. A quantidade de óleo essencial produzida sob condição de estresse hídrico pode ser alterada ou não, dependendo da espécie e da magnitude do estresse (GIRARD, 2005).

As espécies produtoras de óleos essenciais não são restritas a grupos taxonômicos específicos, mas ocorrem amplamente no reino vegetal (SANGWAN *et al.*, 2001). Dentre as famílias de plantas que sintetizam óleos essenciais, destaca-se a família Myrtaceae, com cerca de 130 gêneros e aproximadamente 4000 espécies de distribuição predominantemente tropical

e subtropical, concentradas na região neotropical e na Austrália. Representa uma das maiores famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e 1000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Encontra-se dividida em duas subfamílias: *Myrtoideae*, de ampla ocorrência na América tropical e *Leptospermoidae*, que ocorre, principalmente, na Austrália e Ilhas do Oceano Índico (VIEIRA *et al.*, 2004).

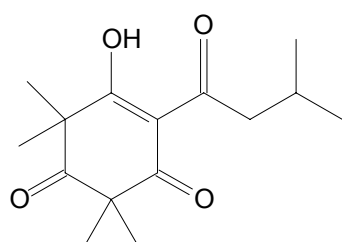
O gênero *Leptospermum*, pertencente à subfamília *Leptospermoidae*, abrange cerca de 83 espécies de arbustos a pequenas árvores, que possuem freqüentemente folhagem aromática. Ecologicamente, espécies de *Leptospermum* desempenham um importante papel em ambientes de baixa fertilidade e pouco drenados. Além disso, podem ocorrer como arbustos em sucessões ecológicas onde também poderiam ser consideradas tanto como plantas invasoras ou como espécies úteis para o controle de erosão, seqüestro de carbono e restauração da vegetação. Os principais produtos econômicos derivados de espécies de *Leptospermum* são arbustos ornamentais, óleos essenciais e mel (STEPHENS *et al.*, 2005).

Muitos voláteis de flores são agradáveis ao olfato humano e tem aplicações em formulações de diversos perfumes. O conhecimento sobre componentes específicos em fragrâncias florais pode assim ser usado para a produção de perfumes sintéticos. Por isso, muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de identificar as substâncias responsáveis por aromas e, dessa forma, realizar a síntese e caracterização de novos compostos odoríferos (LI *et al.*, 2006). O perfume das flores é responsável por interações múltiplas entre plantas e outros organismos. Além disso, pode ser crucial na garantia de fertilização, tendo assim um relevante impacto sobre o rendimento de colheitas economicamente importantes (CUSTÓDIO *et al.*, 2006).

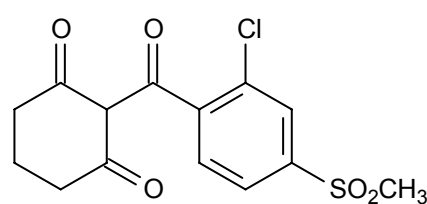
Em muitas espécies de plantas aromáticas, variações na constituição química do óleo produzido são utilizadas para identificação de distintos quimiótipos (SILVA *et al.*, 2007). Estudos preliminares indicam a existência de quimiótipos em populações de espécies de *Leptospermum* (DOUGLAS *et al.*, 2004). Dessa forma, espécies de *Leptospermum* crescidas no Brasil podem exibir quimiótipos diferentes dos encontrados em outros ambientes, podendo até haver quimiótipos que tenham aplicações comerciais de maior relevância na produção de óleos essenciais.

Tendo em vista a grande aplicabilidade dos óleos essenciais, o gênero *Leptospermum* se apresenta como uma fonte próspera, devido à presença de compostos com atividade biológica já conhecida e, em algumas espécies, à ocorrência de β -tricetonas na composição desses óleos. Dentre essas substâncias pode-se citar a leptospermona (**1**), importante

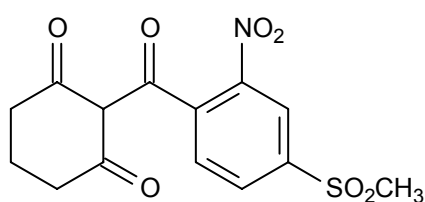
constituente do óleo essencial de *Leptospermum scoparium*, que apresenta atividade fitotóxica, causando o branqueamento e intensa queda das folhas de ervas daninhas (DAYAN *et al.*, 2007). Essa substância foi utilizada como composto-modelo para o desenvolvimento dos herbicidas comerciais sulcotriona (2) e mesotriona (3) (VYVYAN, 2002). Flavesona (4), detectada primeiramente no óleo essencial de *Leptospermum flavescens*, possui atividade antiviral, além de atividade contra bactérias gram-positivas e dermatófitos (MUSTAFA *et al.*, 2003a; REICHLING *et al.*, 2005; CHRISTOPH *et al.*, 2000).



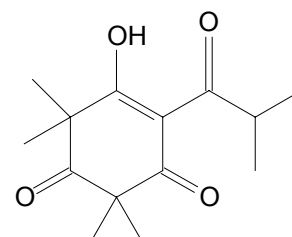
(1)



(2)



(3)



(4)

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico sobre o teor e a constituição química do óleo essencial das folhas de *Leptospermum flavescens*, *Leptospermum madidum ssp sativum* e *Leptospermum petersonii*, além da atividade antimicrobiana desses óleos contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus cereus* A16.

Considerando-se também a importância da investigação do perfume das flores, no que se refere a seu uso na perfumaria, além de seu papel crucial na ecologia da polinização, propõe-se o também estudo dos voláteis liberados pelas flores de *L. petersonii* crescida no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Espécies da família Myrtaceae são consideradas de importância econômica, em razão de seu uso ornamental, medicinal e condimentar. Botões de flores de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (cravo-da-Índia) e frutos de *Pimenta dioica* (L.) Merr. (pimenta-da-Jamaica) são usados como tempero. *Eugenia sprengelli* DC e *Callistemon* spp R. BR são utilizadas como plantas ornamentais. *Psidium guajava* Raddi (goiaba), *Eugenia uniflora* L. (pitanga) produzem frutos comestíveis (VIEIRA, 2002). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi utilizado na Segunda Guerra Mundial como um agente antimicrobiano geral e repelente de insetos. Hoje em dia, o óleo essencial desta espécie, assim como o de *Leptospermum scoparium*, é usado como forte agente antimicrobiano em cremes, sabonetes, anti-sépticos bucais e em outros produtos (LIS-BALCHIN *et al.*, 2000; TAKARADA *et al.*, 2004). O óleo essencial extraído de folhas de *Eucalyptus tereticornis* Sm., é rico em cineol e atua como repelente de insetos, desempenhando também forte ação larvicida, pupicida e adulticida sobre o mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera), vetor da malária (NATHAN, 2007).

O gênero *Leptospermum* J. R. Forst. & G. Forst., pertencente à família Myrtaceae, engloba cerca de 83 espécies de arbustos silvestres a pequenas árvores, nativas principalmente da Austrália, além da Nova Zelândia e Sudeste Asiático. O nome é derivado do grego *Leptos* = fino, e *sperma* = semente, referindo-se às sementes lineares de plantas deste gênero (STARR *et al.*, 2003). Este gênero se distingue dentro da família Myrtaceae por suas flores, já que essas plantas possuem pétalas e estames livres que são menores que as pétalas, além de anteras versáteis, frutos capsulares e folhas alternadas. Espécies de *Leptospermum* são encontradas em muitos tipos de habitat, tais como florestas, ambientes de clima quente e em solos ácidos com baixa quantidade de nutrientes. Algumas espécies são bem conhecidas por sua folhagem aromática e são frequentemente cultivadas como plantas ornamentais (BROPHY *et al.*, 1998).

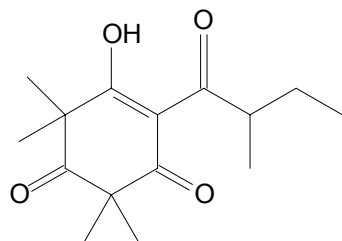
PENFOLD (1921, citado por BROPHY *et al.*, 2000a) estudou os óleos de várias coleções de plantas que ele determinou como sendo de *Leptospermum flavescens* Sm. THOMPSON (1989, citado por BROPHY *et al.*, 2000a) concluiu que este táxon de fato compreendia duas espécies, *L. morisonii* e *L. polygalifolium*, esta última com sete subespécies. Estudos posteriores demonstraram que exemplares considerados como variedades de *L. flavescens* são na verdade espécies distintas (BROPHY *et al.*, 2000a). A espécie

Leptospermum flavescens [Syn. *Leptospermum polygalifolium* subsp. *polygalifolium*] atinge de 2 a 7 m de altura, sendo algumas vezes levemente aromática. Do final da primavera ao verão apresenta flores em forma de taça nas cores branca ou creme e algumas vezes rósea (STARR *et al.*, 2003). É tradicionalmente usada na Malásia como estimulante de apetite, como remédio para o estômago e na atenuação de cólicas menstruais (MUSTAFA *et al.*, 2003a).

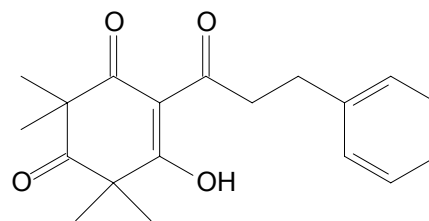
Leptospermum madidum ssp. *sativum* é um arbusto arredondado de aproximadamente 3 m de altura. É atrativa pelo exsudato de sua folhagem e tronco, que é colorido. Suas folhas são estreitas e as flores são bem pequenas. É uma planta que se desenvolve bem em ambientes de clima quente (WRIGLEY e FAGG, 1996).

L. petersonii Bailey é um arbusto ou pequena árvore de até 5 m de altura, de tronco persistente e fibroso, com aparência fragmentada. As folhas são sésseis e frequentemente possuem cheiro de limão. As flores são usualmente solitárias, brancas, sendo que as mais jovens podem se apresentar nas cores vermelha ou violeta, medindo de 10 a 15 mm de diâmetro. É encontrada em florestas tropicais, em solos arenosos ou sobre escarpas rochosas (WRIGLEY e FAGG, 1996). O óleo essencial de *L. petersonii* foi primeiramente estudado como sendo de *L. citratum*, pois é rico em citronelal e citral. Este óleo tem um agradável aroma de limão, devido à presença desses componentes. Além disso, desempenha atividade bactericida semelhante ao eugenol, um dos componentes do óleo de cravo-da-índia, que atua como analgésico dental (BROPHY *et al.*, 2000b).

Os óleos essenciais de várias plantas nativas da Austrália e Nova Zelândia contêm quantidades relativamente grandes das cetonas naturais leptospermona (**1**), flavesona (**4**), isoleptospermona (**5**) e grandiflorona (**6**) (DAYAN *et al.*, 2007), conhecidas como β -tricetonas. Esses compostos possuem quatro grupos substituintes metila em um anel de seis membros e um grupo acila (VAN KLINK *et al.*, 1999). Esses óleos desempenham atividade fungicida, bactericida, antiviral, inseticida e moluscicida. Os agroquímicos à base de tricetonas foram provavelmente sintetizados quando se descobriram as propriedades herbicidas de leptospermona, oriunda da planta *Callistemon* spp. As indústrias têm investido milhões de dólares no desenvolvimento e comercialização de análogos à leptospermona com atividade herbicida (DAYAN *et al.*, 2007).

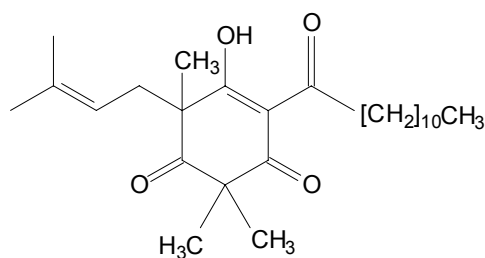


(5)



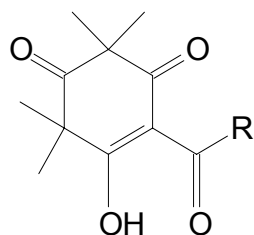
(6)

Tendo em vista a atividade antimicrobiana das β -tricetonas, estudos recentes propuseram a síntese de análogos a esses compostos, que foram testados contra bactérias já resistentes a antibióticos, dentre elas *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. O composto sintético (7) se mostrou muito eficiente contra as bactérias citadas, aparentemente devido a sua alta lipofilicidade. A atividade antibacteriana de (7), que apresentou concentração inibitória mínima (MIC) de 0.5-1.0 mg.mL⁻¹, é de mesma ordem de magnitude que o antibiótico comercial Vancomicina, que é largamente utilizado no combate a *Staphylococcus aureus* (VAN KLINK *et al.*, 2005).



(7)

O extrato etanólico de *L. polygalifolium* ssp *polygalifolium* apresenta atividade antimicrobiana, antiviral e antifúngica, associada à presença das tricetonas (8), (9) e (10) (MUSTAFA *et al.*, 2003a).



(8) R = - CH(CH₃)₂

(9) R = - CH(CH₃)CH₂CH₃

(10) R = - CH₂CH(CH₃)₂

O extrato etanólico das folhas de *L. recurvum* possui atividade antiviral. Esta planta é endêmica em regiões da Malásia e contém, dentre outros compostos, cianidina, quercetina e ácido elágico (MUSTAFA *et al.*, 2003b).

Documentos históricos reportam o uso de *Leptospermum scoparium* como remédio para febre, resfriados, queimaduras e infecções da gengiva. A goma desta planta contém manitol como componente principal, também sendo utilizado para fins medicinais, especialmente no tratamento da tosse. A madeira desta planta foi utilizada na construção de canoas e na confecção de ferramentas para pesca por tribos da Nova Zelândia e colonos europeus (MADDOCKS-JENNINGS *et al.*, 2005).

Os óleos voláteis das plantas são sintetizados e armazenados em estruturas epidérmicas ou mesofílicas, que tendem a ser características do grupo taxonômico ao qual pertencem. Essas estruturas estão presentes nas folhas, tronco, raízes, flores e frutos e incluem glândulas secretoras, pêlos ou tricomas glandulares (SANGWAN *et al.*, 2001). A partição do carbono fixado fotossinteticamente é um importante componente do mecanismo fisiológico da produção de óleos essenciais. Desse modo, as características fotossintéticas e o desempenho dos tecidos, entre outros fatores, são o estágio principal na construção de carbono disponível para a síntese dos componentes dos óleos (GIRARD, 2005). Os estresses de natureza abiótica, como radiação (alta ou baixa), temperatura (excessivamente elevada ou baixa), precipitação (alta, deficiente ou seca total), estresse salino e o solo, bem como estresses de natureza biótica (herbivoria, patógenos como fungos, bactérias e vírus) podem afetar a composição química e a quantidade de óleos essenciais produzidos pela planta (VALLAT *et al.*, 2005). Em condições de baixa disponibilidade de água no solo, fatores fisiológicos críticos, tais como fechamento estomático, declínio na taxa de crescimento, acúmulo de solutos e espécies reativas de oxigênio, bem como a expressão de genes específicos de proteção ao estresse podem ser influenciados. Assim, podem ocorrer alterações no metabolismo secundário, geralmente com um aumento na produção de vários destes compostos, tais como glucosinolatos, antocianinas, alguns terpenos e alcalóides. Exemplos da influência do índice pluviométrico na produção de metabólitos secundários são a correlação positiva de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinifolia* e a correlação negativa na produção de saponinas, como a lemmatoxina em *Phytolacca dodecandra*, com os níveis de precipitação (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Odores florais são importantes sinais para a comunicação química entre plantas e animais polinizadores, estando envolvidos na atração e condução de polinizadores aos órgãos

reprodutivos. O perfume da flor, juntamente com a cor são considerados os principais sinais atrativos para insetos, sendo o perfume particularmente importante para espécies noturnas, quando a percepção visual torna-se ineficiente devido à escuridão (DÖTTERL *et al.*, 2005). Alguns compostos voláteis têm propriedades fagorrepelentes, sendo produzidos e emitidos pelas plantas como defesa no ataque contra herbívoros. A investigação do perfume das flores representa um importante campo da pesquisa biológica moderna, direcionada para teorias de reconhecimento biológico. Além disso, muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de identificar as substâncias responsáveis pelo aroma, podendo assim surgir aplicações destas na indústria alimentícia, além da perfumaria (LI *et al.*, 2006).

Teorias modernas estabelecem que todos os metabólitos secundários se expressam como resultado de estímulos e se integram com os sistemas receptores adequados. Isso indica que um organismo pode produzir padrões completamente diferentes de metabólitos dependendo das condições ambientais, duração e intensidade de estresse, composição e plasticidade genética das plantas (SILVA *et al.*, 2007). Dessa forma, espécies de *Leptospermum* crescidas no Brasil podem apresentar uma constituição química diferente da encontrada em espécies crescidas em outras regiões, podendo até haver a ocorrência de quimiótipos de maior valor comercial para a produção de óleos essenciais.

O uso de óleos essenciais como ingredientes em alimentos, bebidas, desinfetantes e cosméticos está em franca expansão devido ao crescente interesse dos consumidores em ingredientes oriundos de recursos naturais, além do aumento no interesse sobre aditivos potencialmente úteis. Dentro da vasta série de produtos acima mencionados, extratos naturais com agradável cheiro ou sabor podem ainda desempenhar uma ação conservativa, evitando deterioração, oxidação e outros danos causados por microorganismos. Assim, a importância de se conduzir estudos sobre óleos essenciais leva não somente à caracterização química, como também à possibilidade de ligar aos constituintes químicos, propriedades funcionais particulares (SACCHETTI *et al.*, 2005).

Os óleos essenciais de *Leptospermum* não atraíam a atenção de químicos tanto como outras espécies da mesma família, como eucaliptos e melaleucas. A considerável confusão no que se referia à identificação de muitas *taxa* desse gênero foi um fator limitante da credibilidade de investigações anteriores. Conseqüentemente, há poucos trabalhos descritos na literatura sobre óleos essenciais de *Leptospermum* (BROPHY *et al.*, 1998). Na atualidade, as espécies do gênero *Leptospermum* vêm se destacando cada vez mais pelo consumo de óleo essencial e de mel, devido às suas propriedades medicinais, além de sua utilização como

plantas ornamentais (STEPHENS *et al.*, 2005). Embora seja um gênero aparentemente pouco cultivado no Brasil, *Leptospermum* possui grande potencial para comercialização e uso. Adicionalmente, sua alta plasticidade ecológica permite-lhe ocupar diversos tipos de ambientes e formações vegetais, favorecendo e aumentando as chances de seu cultivo em diversas regiões do Brasil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Obtenção do material vegetal

As amostras de folhas frescas para a determinação do teor e da constituição química do óleo essencial de *Leptospermum madidum* ssp *sativum*, *Leptospermum flavescens* e *Leptospermum petersonii* (Figura 1) foram obtidas a partir de exemplares adultos, estando a primeira espécie (1) localizada no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal (DEF) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, a segunda espécie (2) localizada no Setor de Dendrologia do DEF (UFV) e a terceira espécie (3) localizada no quintal da residência situada à Rua Maestro João Salgado Amorim, número 100, Bairro de Lourdes, também em Viçosa. Em seguida, foram identificadas, herborizadas e incorporadas ao acervo do Herbário VIC (*L. flavescens* e *L. petersonii* estão registradas sob os números 21524 e 21585, respectivamente) do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. As amostras foram coletadas nos meses de setembro e dezembro de 2007. Cabe ressaltar que a espécie *L. petersonii* coletada em dezembro de 2007 estava em período de floração. As flores desta espécie foram também coletadas para análise da constituição química de seus compostos voláteis e de seu óleo essencial.



Figura 1 – Exemplares das espécies de *Leptospermum madidum* ssp *sativum* (1), *L. flavescens* (2) e *L. petersonii* (3).

As folhas foram coletadas em pontos aleatórios na copa das árvores por volta das 10 horas da manhã. As amostras foram divididas em três partes de até 50 g para a extração do óleo.

3.2 - Determinação do teor de matéria seca

Para a determinação do teor de matéria seca foram utilizadas aproximadamente 1g das diferentes amostras, em triplicata. Estas foram colocadas na estufa a aproximadamente 120 °C por 24 horas. Decorrido este período, determinou-se a massa restante, calculando-se assim, o teor médio de água das amostras (ASAE, 2000).

3.3 - Extração do óleo essencial das folhas e flores

Na extração do óleo essencial das folhas e flores das plantas, foram utilizadas amostras inteiras. O processo utilizado na extração do óleo essencial para todas as amostras foi a hidrodestilação, realizada por três horas consecutivas, em triplicata, utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger. O óleo obtido foi recolhido com aproximadamente 50 mL de água e extraído com pentano (3 x 30 mL). Descartou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, sendo o solvente removido sob baixa pressão, a 40 °C. O óleo foi acondicionado em frascos de vidro e mantido sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 0 °C até o momento das análises qualitativa e quantitativa. Determinou-se a massa do óleo essencial obtido e a porcentagem correspondente de óleo em relação à massa da planta seca foi calculada.

3.4 - Análise qualitativa e quantitativa dos óleos voláteis de *Leptospermum*

As amostras dos óleos essenciais foram submetidas à análise por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas e Cromatografia em Fase Gasosa (CG-EM e CG, respectivamente). Utilizou-se para este fim um aparelho Shimadzu, modelo GC17A com detector seletivo de massa (Shimadzu) modelo QP5050. Utilizou-se uma coluna do tipo sílica fundida, com fase estacionária DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro

interno, sendo a espessura do filme de 0,25 μm . As condições de análise foram: detector de ionização de chama (FID) a 240 °C, fluxo do gás de arraste He de 1,8 mL/min, razão de split 1:10; pressão inicial da coluna 118 KPa; temperatura do injetor de 220 °C, temperatura inicial da coluna de 40 °C aumentando na taxa de 3 °C por minuto até 240 °C, permanecendo constante por 20 minutos. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons 70 eV com amplitude de varredura de 30 a 700 Da. Foi injetado 1 μL de cada amostra preparada a partir de 10 mg de óleo essencial, diluídas em 1 mL de diclorometano. As análises foram realizadas em triplicata.

A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os espectros de massas obtidos experimentalmente com os disponíveis na base de dados do equipamento (Wiley, 7ª edição) e também pelo índice de retenção relativo calculado a partir da injeção de uma mistura de alcanos lineares (ADAMS, 1995).

3.5 - Extração dos compostos voláteis liberados pelas flores de *L. petersonii*

Na análise da composição química dos voláteis liberados pelas flores de *L. petersonii*, utilizou-se a técnica de headspace - microextração por fase sólida (HS-MEFS). Para este fim, foi utilizada uma fibra revestida de polidimetilsiloxano, com 75 μm de espessura. Esta fibra foi condicionada, via aquecimento no injetor do cromatógrafo a gás a 120 °C por 1 hora. Aproximadamente 1 g de flores coletadas às 10 horas da manhã foram introduzidas em um frasco de vidro de 30 mL vedado com um lacre de alumínio e septo de borracha. A fibra de MEFS foi inserida no frasco permanecendo em contato com os voláteis liberados pelas flores por 40 minutos a 40 °C. Decorrido este período, a fibra foi recolhida e transferida para o injetor do cromatógrafo. As condições de análise cromatográfica foram: fluxo de gás de arraste He de 1,8 mL/min, sem divisão de fluxo (“splitless”); temperatura do injetor de 220 °C, temperatura inicial da coluna de 40 °C aumentando na taxa de 3 °C por minuto até 240 °C, permanecendo constante por 30 minutos. Este procedimento foi realizado em triplicata. A identificação dos compostos foi realizada da mesma maneira que para os óleos essenciais das folhas e flores de *Leptospermum*.

3.6 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Leptospermum*

3.6.1 - Microorganismos

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos obtidos, foram empregados os microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* A16, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

3.6.2 - Manutenção e ativação dos microorganismos

Foram utilizadas culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus*, que foram mantidas em tubos Eppendorf de 1 mL em caldo nutriente e glicerol à temperatura de – 80 °C. Para ativação, as culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus* foram repicadas por duas vezes consecutivas, por 24 horas, em caldo nutriente (Oxoid[®]) às temperaturas de 35 °C para os dois primeiros microorganismos e 32 °C para *B. cereus*.

3.6.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram avaliadas as atividades dos óleos essenciais de *Leptospermum flavescens*, *Leptospermum madidum* ssp *sativum* e *Leptospermum petersonii* extraídos em uma época de estiagem e após a ocorrência de chuvas. Como controle, utilizou-se água destilada e esterilizada a 121 °C por 15 minutos. Os experimentos foram conduzidos com três repetições, em triplicata. Empregou-se o método de difusão em disco de papel (AURELLI *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 1995), onde discos de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL do óleo essencial. Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL da cultura ativada, que foi inoculada utilizando-se a técnica do espalhamento superficial em ágar Mueller Hinton (Oxoid), adicionado em volumes de 20 mL em placas de Petri com 91 mm de diâmetro. Após a

absorção dos microorganismos pelo meio, os discos contendo as amostras foram colocados sobre o meio; as placas foram invertidas e incubadas à temperatura ideal de crescimento dos microorganismos.

Na avaliação da sensibilidade microbiana ao óleo, utilizou-se o experimento fatorial 3 x 6 (três microorganismos e seis óleos essenciais provenientes de Viçosa), disposto no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram expressos empregando-se a média dos diâmetros dos halos de inibição observados, medidos com régua milimetrada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Teor do óleo essencial

O teor médio do óleo essencial, em porcentagem, obtido em relação à matéria seca das espécies de *Leptospermum* coletadas no período de estiagem e após a ocorrência de chuvas pode ser observado na Figura 2. As espécies *L. madidum ssp sativum* e *L. flavescens* colhidas na estação seca apresentaram um rendimento de $1,09 \pm 0,05\%$ e $1,49 \pm 0,2\%$, respectivamente. *L. petersonii*, por sua vez, apresentou um rendimento maior ($2,79 \pm 0,3\%$). Observou-se neste trabalho que o rendimento do óleo essencial após a ocorrência de chuvas apresentou um ligeiro aumento em *L. flavescens* ($1,60 \pm 0,2\%$). Em *L. madidum ssp sativum*, contudo, o rendimento do óleo essencial sofreu uma queda considerável ($0,71 \pm 0,03\%$). Os teores encontrados para o óleo essencial das folhas e flores de *L. petersonii*, observadas nessa espécie após a estação chuvosa, foram $3,7 \pm 0,1\%$ e $1,3 \pm 0,1\%$, respectivamente.

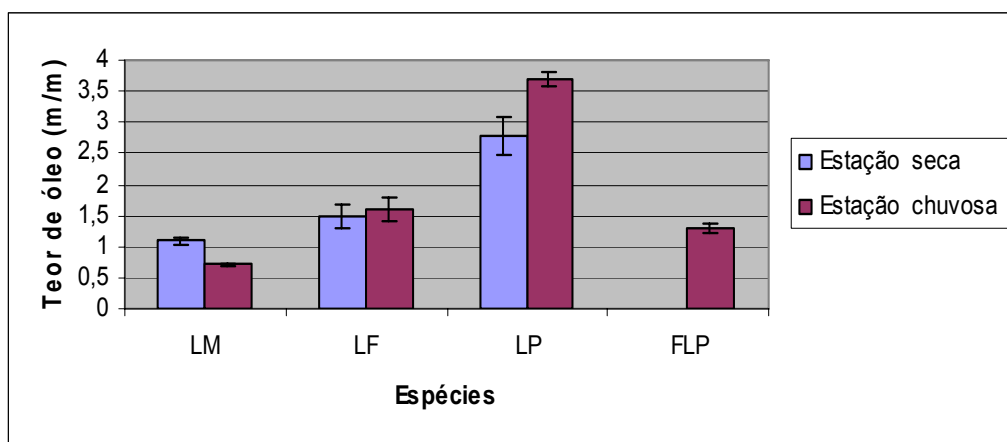


Figura 2 – Teor (m/m) do óleo essencial das três espécies de *Leptospermum* em relação à matéria seca. **LM** = *L. madidum ssp sativum*; **LF** = *L. flavescens*; **LP** = *L. petersonii*; **FLP** = flores de *L. petersonii*.

O maior teor de óleo encontrado nas folhas de *L. petersonii*, em relação às flores, (Figura 2) provavelmente pode estar relacionado ao fato deste órgão estar mais propenso ao ataque de herbívoros e patógenos. O período de floração influencia a produção de óleos essenciais nas plantas. Nessa época, há maior consumo de energia, que é destinada à formação

dos botões florais e frutificação, o que pode levar à diminuição do teor de óleo essencial em algumas espécies (SILVA, 2001). Demonstrou-se que na extração do óleo de gerânio (*Pelargonium graveolens*), o volume de óleo tende a aumentar no pico da floração (SANGWAN *et al.*, 2001). Em *Artemisia dracunculus*, o maior rendimento do óleo coincide com o período de floração (HAY, 1993). Também no presente trabalho, o aumento no rendimento do óleo essencial de *L. petersonii* foi constatado quando a planta estava no período de floração, que coincidiu com a estação chuvosa. É importante ressaltar a necessidade da avaliação, em estudos posteriores, dos fatores estação chuvosa e período de floração para essa espécie isoladamente, para constatar se eles atuam em conjunto ou não.

PETROPOULOS e colaboradores (2007) verificaram um aumento no rendimento do óleo essencial de dois cultivares de salsa (*Petroselinum crispum*) quando submetidos a estresse hídrico, o que pode ser comparado aos resultados obtidos com o óleo de *L. madidum* ssp *sativum*. Em contrapartida, FATIMA e colaboradores (2002) observaram a queda do rendimento do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* em período de seca, da mesma maneira que no presente trabalho foi constatada a redução do rendimento do óleo essencial de *L. flavescens* e *L. petersonii*.

Parâmetros climáticos, tais como temperatura atmosférica e precipitação, têm sido apontados como fatores que influenciam a composição e conteúdo de óleo essencial em várias plantas aromáticas. O efeito da seca na concentração de metabólitos é, em alguns casos, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que efeitos em curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto a longo prazo é observado um efeito oposto. Um fator contrastante é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e óleos voláteis (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A umidade do solo tem importante influência sobre o comportamento estomatal e as trocas gasosas nas folhas, diminuindo com o aumento no nível de estresse hídrico. Tendo em vista que metabólitos secundários são formados por carbono fotossintético, a redução da fotossíntese devido ao estresse hídrico pode reduzir a quantidade de monoterpenos (DELFINI *et al.*, 2005).

4.2 - Composição do óleo essencial

Na tabela 1 estão relacionados os principais componentes do óleo essencial das folhas de *Leptospermum* coletadas nos meses de setembro (estação seca) e dezembro (estação chuvosa) de 2007 e das flores de *L. petersonii* coletada em dezembro de 2007. As espécies de *Leptospermum* apresentam padrão diferenciado na composição do óleo essencial. O óleo essencial extraído das folhas de *L. madidum* ssp *sativum* cultivadas na Austrália apresenta como principais constituintes os compostos β -pineno (16%), α -pineno (9%), γ -terpineno (7%), 1,8-cineol (4%), biciclogermacreno (4%), terpinoleno (3%), α -terpineol (1-3%), β -cariofileno (2-7%), calameneno (3%), globulol (2%), α -, β - e γ -eudesmol (9 % no total) (BROPHY *et al.*, 2000a). No período de estiagem, o componente encontrado em maior proporção no óleo essencial da espécie *L. madidum* ssp *sativum* cultivada em Viçosa foi o β -pineno ($18,5 \pm 0,5\%$), seguido dos compostos α -pineno ($15,2 \pm 0,7\%$), α -humuleno ($10,2 \pm 0,2\%$), 1,8-cineol ($7,1 \pm 0,7\%$) e *trans*-cariofileno ($5,8 \pm 0,01\%$). Com a ocorrência de chuvas, a concentração desses compostos foi alterada, sendo constatadas a ausência de α -pineno e um forte declínio na concentração de β -pineno ($0,3 \pm 0,04\%$), além da queda considerável da concentração de 1,8-cineol ($0,4 \pm 0,07\%$). Em contrapartida, *trans*-cariofileno sofreu um ligeiro aumento ($11,9 \pm 0,1\%$) e α -humuleno teve um aumento considerável ($30,8 \pm 1,2\%$), sendo o componente majoritário na estação chuvosa. De maneira análoga, em estudos feitos com *Pinus sylvestris* L., a concentração de β -pineno aumentou consideravelmente sob seca severa (VALLAT *et al.*, 2005). β -pineno é encontrado em grandes quantidades em essências de limão. Possui atividades antioxidante e estrogênica conhecidas, bem como atividade antiespasmódica (BELLETTI *et al.*, 2004). O componente α -humuleno se encontra na proporção de 13,1% do óleo essencial das folhas de *Eugenia zuchowskiae* (Myrtaceae), onde desempenha atividade citotóxica frente a células tumorais humanas, incluindo o adenocarcinoma mamário (COLE *et al.*, 2007). Além disso, α -humuleno possui atividade antiinflamatória, que foi confirmada a partir de estudos feitos com o óleo essencial de *Cordia verbenacea* (FERNANDES *et al.*, 2007).

Dentre os constituintes observados no óleo essencial de *L. madidum* ssp *sativum* após a ocorrência de chuvas, alguns compostos não tiveram sua identificação realizada pelo índice de retenção relativo. Sugere-se que esses compostos pertençam à classe dos sesquiterpenos. Os compostos **58**, **63**, **64** e **70** possuem os seguintes fragmentos nos seus espectros de massas:

58 m/z (%): C₁₅H₂₄; M⁺ 204 (18), 161 (33), 121 (86), 107 (64), 93 (96), 79 (59), 55 (38), 41 (100).

63 m/z (%): C₁₅H₂₂; M⁺ 202 (11), 159 (100), 131 (11), 105 (18), 77 (6), 55 (4), 41 (17).

64 m/z (%): C₁₅H₂₄; M⁺ 204 (21), 161 (47), 119 (100), 105 (76), 77 (15), 41 (47).

70 m/z (%): C₁₅H₂₄O; M⁺ 220 (2), 205 (23), 187 (10), 159 (19), 119 (28), 91 (38), 43 (100).

Os espectros de massa dos compostos **58** e **63**, de maior concentração, estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

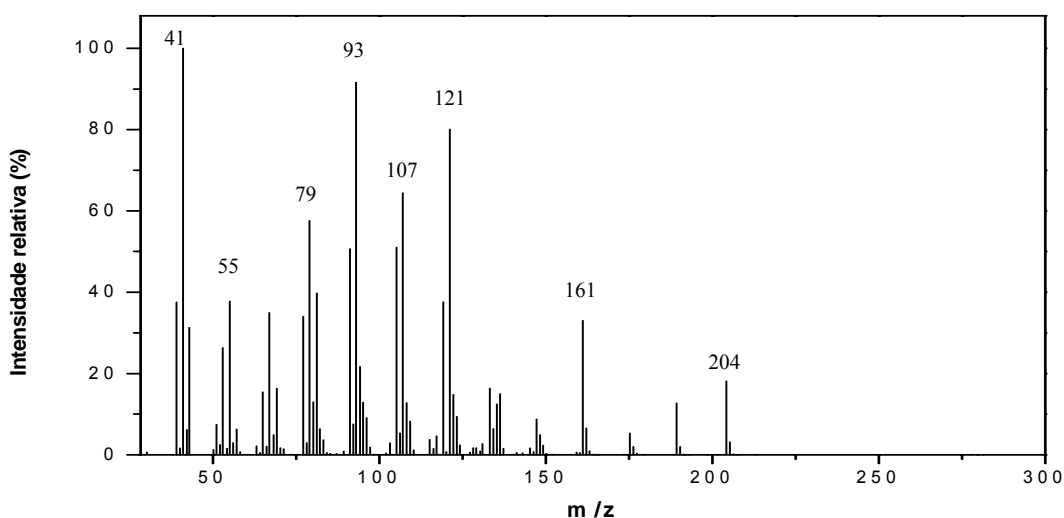


Figura 3 - Espectro de massa do composto não identificado (n° **58**, TR = 36,019 minutos), presente no óleo essencial de *L. madidum* ssp *sativum* na estação chuvosa.

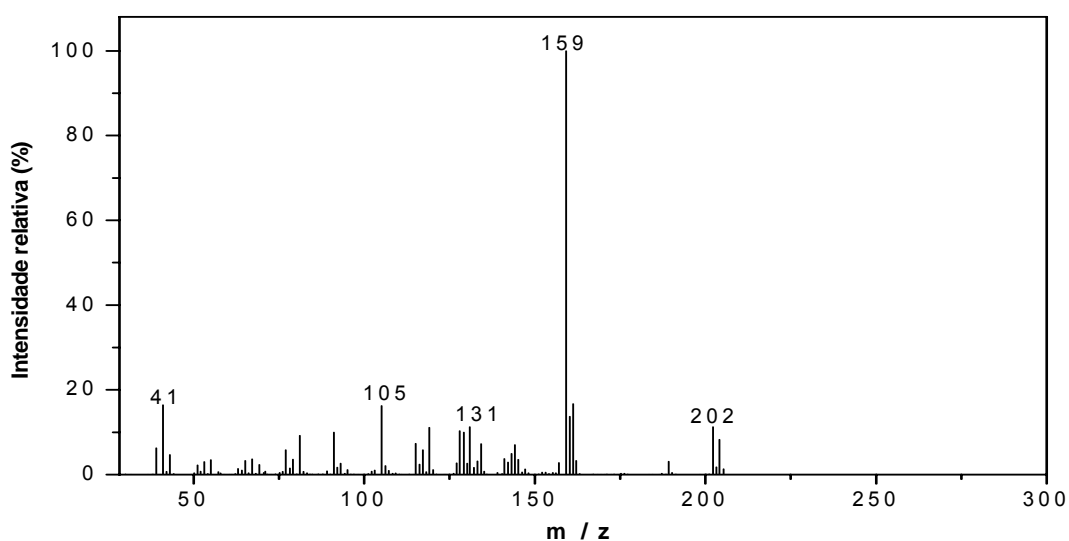


Figura 4 - Espectro de massa do composto não identificado (n° **63**, TR = 37,080 minutos), presente no óleo essencial de *L. madidum* ssp *sativum* na estação chuvosa.

Tabela 1 - Teores (%) dos componentes dos óleos essenciais das três espécies de *Leptospermum* determinados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

N°	Constituinte	IR	<i>L. madidum ssp sativum</i>		<i>L. flavescens</i>		<i>L. petersonii</i>		Flores de <i>L. petersonii</i>	
			Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Chuvosa HD*	MEFS*
1	α -tujeno	930	0,1 \pm 0,05	-	-	-	-	-	-	-
2	α -pineno	938	15,2 \pm 0,7	-	2,1 \pm 0,6	0,2 \pm 0,03	-	-	-	4,1 \pm 0,2
3	benzaldeído	965	0,6 \pm 0	-	-	-	-	-	-	-
4	β -pineno	980	18,5 \pm 0,5	0,3 \pm 0,04	5,6 \pm 1,4	0,3 \pm 0,08	-	-	-	-
5	β -mirceno	993	0,6 \pm 0,1	-	0,4 \pm 0,09	-	0,6 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,04	10,7 \pm 0,5
6	Acetato de (Z)-hex-3-en-1-ila	1015	-	-	-	-	-	-	-	3,2 \pm 0,07
7	α -terpineno	1017	0,3 \pm 0,05	-	0,2 \pm 0,02	-	-	-	-	-
8	<i>p</i> -cimeno	1027	-	-	0,5 \pm 0,08	0,5 \pm 0,1	-	-	-	-
9	limoneno	1031	0,2 \pm 0,04	0,1 \pm 0,03	2,6 \pm 0,6	-	-	-	-	-
10	1,8-cineol	1035	7,1 \pm 0,7	0,4 \pm 0,07	2,9 \pm 1,0	0,6 \pm 0,08	-	-	-	-
11	β -ocimeno	1053	1,5 \pm 0,5	0,1 \pm 0,03	-	-	-	-	-	2,1 \pm 0
12	γ -terpineno	1062	0,6 \pm 0,1	0,1 \pm 0,01	2,2 \pm 0,3	0,5 \pm 0,07	-	-	-	-
13	α -terpinoleno	1089	0,4 \pm 0,1	-	0,6 \pm 0,06	-	-	-	-	-
14	linalol	1102	-	0,2 \pm 0,05	0,1 \pm 0,03	-	1,5 \pm 0,04	1,6 \pm 0,06	2,5 \pm 0,05	1,1 \pm 0,02
15	óxido de rosa	1115	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,3
16	<i>endo</i> -fenchol	1116	-	-	0,3 \pm 0,01	0,2 \pm 0	-	-	-	-
17	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1124	-	-	0,2 \pm 0,01	-	-	-	-	-
18	isopulegol	1150	-	-	-	-	3,4 \pm 0,2	3,7 \pm 0,6	4,1 \pm 0,1	2,2 \pm 0,3
19	hidrato de canfeno	1152	-	-	0,1 \pm 0,01	-	-	-	-	-
20	citronelal	1154	-	-	-	-	33,9 \pm 0,8	26,5 \pm 1,0	35,0 \pm 0,5	27,4 \pm 1,6
21	borneol	1171	-	-	0,4 \pm 0,5	0,3 \pm 0,01	-	-	-	-
22	neo(iso)isopulegol	1175	-	-	-	-	-	-	0,5 \pm 0,01	-
23	terpinen-4-ol	1178	-	0,7 \pm 0,06	7,2 \pm 0,5	4,7 \pm 0,3	-	-	-	-
24	<i>p</i> -cimen-8-ol	1190	-	-	0,1 \pm 0,02	-	-	-	-	-
25	α -terpineol	1194	3,7 \pm 0,05	2,2 \pm 0,7	3,1 \pm 0,3	2,2 \pm 0,1	-	-	-	-
26	β -citronelol	1238	-	-	-	-	0,04 \pm 0,01	0,1 \pm 0,01	4,0 \pm 0,3	22,1 \pm 3,6

Tabela 1 – (Continuação) - Teores (%) dos componentes dos óleos essenciais das três espécies de *Leptospermum* determinados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

N°	Constituinte	IR	<i>L. madidum ssp sativum</i>		<i>L. flavescens</i>		<i>L. petersonii</i>		Flores de <i>L. petersonii</i>	
			Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Chuvosa HD*	MEFS*
27	neral	1239	-	-	-	-	22,7 ± 0,7	23,5 ± 1,5	16,5 ± 2,2	2,4 ± 0,1
28	geraniol	1257	-	-	-	-	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,02	2,0 ± 0,08
29	geranial	1269	-	-	-	-	29,8 ± 0,4	32,8 ± 0,5	26,1 ± 0,3	2,0 ± 0,5
30	geranato de metila	1330	-	-	-	-	-	-	-	1,2 ± 0,4
31	δ-elemeno	1341	-	0,1 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
32	α-cubebeno	1352	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,2	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,2
33	acetato de citronelila	1359	-	-	-	-	1,0 ± 0,07	1,0 ± 0,01	2,0 ± 0,04	0,7 ± 0,6
34	eugenol	1362	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,1	-	-	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,04	0,9 ± 0,02	-
35	acetato de nerila	1369	-	-	-	-	0,5 ± 0,05	0,04 ± 0	0,3 ± 0,02	-
36	α-ilangeno	1375	-	0,3 ± 0,04	-	-	-	-	-	-
37	α-copaeno	1380	1,0 ± 0,09	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,03	-	-	-	0,4 ± 0,3
38	acetato de geranila	1387	-	-	-	-	0,5 ± 0,05	0,7 ± 0,06	0,5 ± 0,01	-
39	β-burboneno	1388	-	0,05 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
40	β-elemeno	1393	0,3 ± 0,03	0,2 ± 0	0,3 ± 0,03	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,03	0,4 ± 0,03	0,1 ± 0	3,9 ± 1,2
41	α-gurjuneno	1412	0,6 ± 0,03	1,1 ± 0	-	-	-	-	-	-
42	trans-cariofileno	1424	5,8 ± 0,01	11,9 ± 0,07	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	-	-	-	0,4 ± 0,05
43	β-gurjuneno	1435	-	0,7 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
44	aromadendreno	1443	1,5 ± 0,2	2,8 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
45	acetato de cinamila	1453	-	-	-	-	-	-	0,1 ± 0	-
46	α-humuleno	1459	10,2 ± 0,2	30,8 ± 1,2	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2	-	-	-	-
47	(E)-β-farneseno	1461	-	-	1,5 ± 0,02	1,4 ± 0,06	-	-	-	-
48	aloaromadendreno	1465	0,9 ± 0,07	1,2 ± 0,04	-	-	-	-	-	-
49	β-chamigreno	1470	-	-	0,5 ± 0,06	0,6 ± 0	-	-	-	-
50	γ-muuroleno	1477	1,1 ± 0,05	0,6 ± 0,08	-	-	-	-	-	-
51	Germacreno D	1480	1,1 ± 0,05	2,2 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
52	β-selineno	1489	0,3 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 – (Continuação) - Teores (%) dos componentes dos óleos essenciais das três espécies de *Leptospermum* determinados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

N°	Constituinte	IR	<i>L. madidum ssp sativum</i>		<i>L. flavescens</i>		<i>L. petersonii</i>		Flores de <i>L. petersonii</i>	
			Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Seca*	Estação Chuvosa*	Estação Chuvosa HD*	MEFS*
53	<i>cis</i> - β -guaieno	1491	-	-	1,9 \pm 0,2	-	-	-	-	-
54	valenceno	1492	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,6
55	α -selineno	1500	-	-	2,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2	-	-	-	-
56	biciclogermacreno	1501	-	-	-	-	-	-	-	1,4 \pm 0,7
57	Ledeno	1501	6,3 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-
58	não identificado	1508	-	10,5 \pm 0,2	-	-	-	-	-	-
59	farneseno	1512	-	-	-	-	-	-	-	0,3 \pm 0,04
60	γ -cadineno	1518	0,3 \pm 0,04	-	-	-	-	-	-	-
61	<i>cis</i> -calameneno	1528	2,4 \pm 0	-	-	-	-	-	-	-
62	δ -cadineno	1529	-	-	0,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	-	-	-	0,2 \pm 0,02
63	não identificado	1535	-	6,6 \pm 1,1	-	-	-	-	-	-
64	não identificado	1543	-	3,0 \pm 1,1	-	-	-	-	-	-
65	germacreno B	1562	0,7 \pm 0,04	0,4 \pm 0	-	-	-	-	-	-
66	ledol	1568	-	0,2 \pm 0,01	-	-	-	-	-	-
67	nerolidol	1570	4,8 \pm 0,05	-	55,1 \pm 3,8	67,6 \pm 0,4	-	-	-	-
68	óxido de cariofileno	1577	-	-	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,03	-	-	-	-
69	espatulenol	1585	-	-	-	-	-	0,1 \pm 0	-	-
70	não identificado	1589	-	2,4 \pm 0,2	-	-	-	-	-	-
71	viridiflorol	1595	2,0 \pm 0,03	2,7 \pm 0,4	-	-	-	-	-	-
72	<i>E,E</i> -farnesol	1730	-	0,1 \pm 0,01	-	-	-	-	-	-
TOTAL			87,7	82,7	92,8	85,6	95,0	93,0	95,0	89,5

IR = índice de retenção calculado; (*) = média \pm desvio padrão; HD = hidrodestilação; MEFS = microextração em fase sólida.

Os compostos citronelal ($33,9 \pm 0,8\%$ estação seca; $26,5 \pm 1,0\%$ estação chuvosa), neral ($22,7 \pm 0,7\%$; $23,5 \pm 1,5\%$) e geranial ($29,8 \pm 0,4\%$; $32,8 \pm 0,5\%$) se apresentam como principais constituintes do óleo essencial de *L. petersonii* cultivada em Viçosa em ambos os períodos. Os compostos β -mirceno, citronelal e acetato de nerila presentes no óleo essencial desta espécie sofreram aumento na concentração no período de seca, ao passo que neral, geranial e acetato de geranila apresentaram diminuição de concentração neste período. Em estudos feitos com o óleo essencial de *Cymbopogon martinii*, o teor de acetato de geranila diminuiu acentuadamente em todos os cultivares na estação seca. Nesta espécie, supõe-se que o geraniol esteja armazenado ou foi transformado em outros metabólitos secundários. Contudo, parece que a conversão do geraniol em acetato de geranila é inibida em plantas submetidas a secas intensas e, como resultado, observam-se o aumento na concentração de geraniol e diminuição da concentração de acetato de geranila. Essas alterações na composição do óleo essencial podem ser consequência do efeito do estresse hídrico sobre enzimas envolvidas na biossíntese dos monoterpenos. A atividade de geraniol-desidrogenase, por exemplo, que está envolvida na catálise da transformação geraniol-citral, é modulada pelo estresse hídrico (FATIMA *et al.*, 2002).

Estudos da composição química do óleo essencial de *L. petersonii* cultivadas na Austrália resultaram na identificação de três diferentes quimiótipos: (a) a forma comum (**'Type'**), que possui cheiro de limão e alta concentração de aldeídos, e é composta de citral (45-50%) e citronelal (35%); (b) **variedade A**, que apresenta agradável odor, mas possui ao invés de aldeídos, alto teor de terpenos, tais como γ -terpineno, α -pineno e *p*-cimeno, além de uma série de compostos não identificados; (c) **variedade B**, que possui odor de rosas e contém citral (16-20%), geraniol, citronelol e seus ésteres (Brophy *et al.*, 2000b). A análise química do óleo essencial de *L. petersonii* cultivada no município de Viçosa mostrou que este se enquadra na forma comum (**'Type'**). Este quimiótipo tem sido desenvolvido para aplicações comerciais em países como Quênia e Guatemala, além da Austrália (BROPHY *et al.*, 2000b).

A análise do óleo essencial das flores de *L. petersonii* coletadas no mês de dezembro de 2007 no município de Viçosa mostrou que a composição deste é bastante semelhante à do óleo essencial extraído das folhas dessa espécie. Apresenta como principais constituintes os compostos citronelal ($35,0 \pm 0,5\%$), neral ($16,5 \pm 2,1\%$) e geranial ($26,1 \pm 0,3\%$). Os principais componentes encontrados nos voláteis liberados

pelas flores de *L. petersonii* foram citronelal ($27,4 \pm 1,6\%$) e β -citronelol ($22,1 \pm 3,6\%$). Citronelal está presente em altas concentrações no óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e é o componente principal de *Melissa officinalis* ssp *officinalis* (NHU-TRANG *et al.*, 2006). É utilizado como material básico para a síntese de iononas e vitamina A; possui ação repelente contra insetos, além de ação fungicida e bactericida (CASTRO *et al.*, 2007). Além de atrair polinizadores, outro importante papel dos voláteis liberados pelas flores é a proteção dos órgãos reprodutivos e suas células germinativas contra patógenos ou danos causados por O₃ (HOLOPAINEN, 2004).

O citral, presente no óleo essencial de *L. petersonii*, existe naturalmente como uma mistura dos isômeros neral e geranial. Estes são conhecidos como citral A e citral B, respectivamente. Sabe-se que o citral tem propriedades antiinflamatória e antimicrobiana, além de ser empregado na indústria alimentícia. FISCHER e colaboradores (2007) verificaram a atividade antibacteriana do citral presente no óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*) contra *Arcobacter butzleri*. Estudos feitos com o óleo das cascas de limão (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinescens*) mostraram a atividade inseticida do citral contra *Culex pipiens quinquefasciatus* na fase adulta (YANG *et al.*, 2005). Citronelal, neral e geranial, principais constituintes do óleo essencial de *L. petersonii*, exibiram atividade antifúngica contra os dermatófitos *Mycrosporium canis*, *Mycrosporium gypseum* e *Trycophyton mentagrophytes*. Entretanto, o geranial se mostrou como constituinte antifúngico mais ativo dentre esses compostos (PARK *et al.*, 2007).

Leptospermum flavescens creescida na Austrália produz um óleo no qual os principais componentes são α -eudesmol (4-13%), β -eudesmol (5-27%), γ -eudesmol (9-17%), além dos sesquiterpenos espatulenol, viridiflorol e globulol (1-2% para os três compostos), biciclogermacreno (1-2%), β -cariofileno (1-2%) e aromadendreno (0,5-0,7%). Os principais monoterpenos são α -pineno (1-10%), β -pineno (5-24%), γ -terpineno (0,9-2%) e *p*-cimeno (1-3%) e os álcoois terpinen-4-ol (4-6%) e α -terpineol (0,8-2%) (BROPHY *et al.*, 2000a). No óleo essencial de *L. flavescens* creescida no município de Viçosa, o sesquiterpeno nerolidol se apresentou como componente majoritário, exibindo uma concentração de $55,1 \pm 3,4\%$ na época de estiagem, aumentando para $67,6 \pm 0,4\%$ na estação chuvosa. Outros componentes que sofreram variações mais significativas com relação ao estresse hídrico nessa espécie foram α -pineno ($2,1 \pm 0,6\%$ na estação seca; $0,2 \pm 0,03\%$ na estação chuvosa), β -pineno ($5,6 \pm 1,4\%$; $0,3 \pm 0,08\%$), γ -terpineno ($2,2 \pm 0,3\%$; $0,5 \pm 0,1\%$), 1,8-cineol ($2,9 \pm 1,0\%$; $0,6 \pm 0,1\%$) e terpinen-4-ol

($7,2 \pm 0,5\%$; $4,7 \pm 0,3\%$). Esses compostos, porém, apresentaram diminuição no teor com a ocorrência de chuvas. Isso está de acordo com estudos de DELFINE e colaboradores (2005), que mostraram o aumento da concentração de 1,8-cineol e γ -terpineno nos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Rosmarinus officinalis* quando submetidos a secas severas. A presença de altas concentrações de nerolidol em *L. flavescens* crescida em Viçosa sugere que esta espécie pode ser utilizada como fonte alternativa deste composto, que é usado como flavorizante, aromatizante e tem o poder de aumentar a permeabilidade de drogas de uso tópico (LEE *et al.*, 2007). Altas concentrações de nerolidol (66%) são encontradas também em um dos quimiótipos de *Leptospermum novae-angliae* (BROPHY *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram a atividade antifúngica do nerolidol contra fungos da espécie *Mycrosporium gypseum*, causadores de dermatites (LEE *et al.*, 2007). Demonstrou-se também que o nerolidol é a substância larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho), mostrando-se bastante eficaz sobre larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue (SIMAS *et al.*, 2004).

A Figura 5 mostra a comparação dos teores de monoterpenos e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais das espécies de *Leptospermum* estudadas com relação à disponibilidade hídrica. Observou-se a predominância de sesquiterpenos no óleo essencial de *L. flavescens* em ambas as condições. Na espécie *L. madidum* ssp *sativum*, porém, há o predomínio de monoterpenos na estação seca, contrastando com o predomínio de sesquiterpenos na estação chuvosa, enquanto para *L. petersonii* observou-se o predomínio de monoterpenos em ambos os períodos. Tanto no óleo essencial das flores de *L. petersonii* quanto nos voláteis liberados pelas mesmas, observou-se o predomínio de monoterpenos. Feita a análise do óleo essencial das três espécies, observou-se um aumento no teor de sesquiterpenos na estação chuvosa.

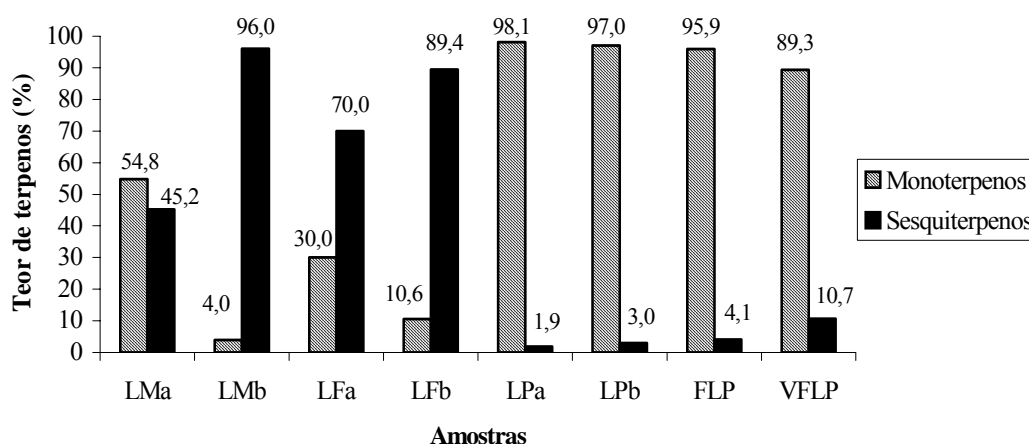


Figura 5 – Comparação dos teores (%) de monoterpenos e sesquiterpenos presentes no óleo essencial das folhas de *L. madidum* ssp *sativum* (**LM**), *L. flavescens* (**LF**), *L. petersonii* (**LP**) na estação seca (a) e chuvosa (b); **FLP** = óleo essencial das flores de *L. petersonii*; **VFLP** = voláteis das flores de *L. petersonii*.

A mudança nos teores desses componentes nos óleos essenciais pode estar relacionada ao fato de que sesquiterpenos são provavelmente substituídos por monoterpenos quando a seca é prolongada, pois esta poderia impedir a ciclização dos precursores de sesquiterpenos. A diferente resposta à seca desses dois tipos de componentes poderia estar ligada ao fato de que esses isoprenóides têm diferentes características físico-químicas e são sintetizados em locais distintos. Monoterpenos atuam mais rapidamente na proteção da planta contra secas severas. A emissão de sesquiterpenos na atmosfera contribui para a formação de aerossol, que é uma efetiva proteção contra o excesso de radiação UV-B (HOLOPAINEN, 2004). Contudo, a formação de aerossol pode contribuir para irregularidades no regime de chuvas; isso explicaria porque algumas plantas param de produzir sesquiterpenos sob estresse hídrico severo. Como exemplo, estudos recentes demonstraram a queda na produção do sesquiterpeno aloaromadendreno em *Pinus hapelensis* e *Quercus coccifera* quando submetidas a estresse hídrico, chegando a ponto de ausência na produção desse composto quando sob secas severas (ORMEÑO *et al.*, 2007). Terpenos detêm herbívoros e atraem polinizadores; podem estabilizar e proteger a membrana da planta contra altas temperaturas. Além disso, podem agir como antioxidantes nas folhas. Dessa forma, em plantas submetidas a estresse hídrico, pode haver aumento na concentração de componentes com propriedades antioxidantes, como

eugenol, timol e carvacrol (DELFINE *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005). Estudos feitos com o óleo essencial das folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) mostram que antioxidantes (tocoferóis, carotenóides e diterpenos abietanos) aumentam quando a planta é submetida a secas severas. A acumulação de monoterpenos em folhas sob estresse hídrico pode ter funções ecológicas, tais como defesa ou armazenamento. A construção de metabólitos secundários poderia também aliviar danos oxidativos causados pela acumulação de radicais livres sob condições de estresse hídrico, já que terpenos podem repor a fotorrespiração em proteção a fotodanos sob condições de estresse (DELFINE *et al.*, 2005).

Mudanças na composição de metabólitos secundários podem, no caso de uma colheita de valor econômico, ter uma significativa influência sobre o sabor e aroma. O estresse hídrico é conhecido como fator abiótico chave, influenciando profundamente o metabolismo da planta. Ele altera de maneira bastante acentuada o deslocamento de carbono entre raízes e galhos, além da troca e deslocamento de nutrientes, com maiores implicações sobre a emissão de voláteis e a ecologia (VALLAT *et al.*, 2005). Variações na composição química do óleo de várias espécies de *Leptospermum* são observadas em espécies coletadas de diferentes localidades. Como exemplo, o óleo essencial de *L. scoparium* crescida na Austrália apresenta maiores níveis de monoterpenos que o óleo da mesma espécie crescida na Nova Zelândia. Além disso, a variedade australiana da espécie apresenta baixos níveis ou até mesmo ausência de tricetonas, ao contrário da variedade neozelandesa (DOUGLAS *et al.*, 2004). Isso explicaria a ausência dos compostos α -, β - e γ -eudesmol no óleo essencial de *L. flavescens* crescida em Viçosa, contrastando com níveis bastante significativos desses compostos na variedade australiana (BROPHY *et al.*, 2000a). De maneira análoga, as tricetonas flavesona e leptospermona, observadas primeiramente no óleo essencial de *L. flavescens* não foram identificadas em estudos realizados por BROPHY e colaboradores com plantas da referida espécie (MUSTAFA *et al.*, 2003a).

Pelos dados descritos na literatura e comparação com os resultados obtidos neste trabalho, é possível verificar que existe variação entre os compostos majoritários presentes no óleo essencial das espécies estudadas. A variação na constituição química das amostras em diferentes trabalhos leva a crer que se trata de quimiótipos diferentes, o que enfatiza a importância do estudo da composição química dessas espécies cultivadas em diferentes regiões.

4.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana

O diâmetro do halo obtido devido à ação antimicrobiana do óleo das espécies de *Leptospermum* estudadas sobre os três microorganismos reflete a inibição significativa do óleo essencial sobre os microorganismos estudados. Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que os óleos essenciais das espécies de *Leptospermum* estudadas exibiram atividade antimicrobiana diferenciada, sendo mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* que contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Tabela 2). O óleo essencial de *L. flavescens* exibiu atividade contra *S. aureus* e *B. cereus*, mas foi inativo para *E. coli* (Figura 6).

Os valores dos halos de inibição exibidos pelo óleo essencial de *L. flavescens* contra os microorganismos citados foram estatisticamente iguais em ambas as estações. Essa atividade contra bactérias Gram-positivas pode estar relacionada à alta concentração de nerolidol presente nessa espécie coletadas em ambas as estações. De maneira análoga, as propriedades antibacterianas do óleo essencial de *Momordica charantia* foram relacionadas ao alto teor de nerolidol nela encontrado (BRACA *et al.*, 2008). Sugere-se que a atividade deste composto sobre esses microorganismos está relacionada ao dano causado à membrana celular da bactéria (INOUE *et al.*, 2004). Estudos preliminares revelam que o nerolidol é praticamente inativo contra *E. coli* (KIM *et al.*, 1995). CUNICO *et al.* (2007) avaliaram as propriedades antibacterianas do óleo essencial de *Ottonia martiana* Miq., que possui nerolidol como componente principal e não apresentou atividade contra *E. coli*.



Figura 6 - Halo de inibição observado na superfície do meio Mueller Hinton devido à ação antimicrobiana do óleo essencial de *L. flavescens* na estação chuvosa (LFB) e do controle (C) contra *E. coli*.

Tabela 2 - Valores médios para o tamanho do halo (cm) observado na superfície do meio Mueller Hinton devido à ação antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas das espécies de *Leptospermum* estudadas com relação à disponibilidade hídrica.

Óleo	Estação	<i>B. cereus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>
Controle		0,60±0,00eA*	0,60±0,00cA	0,60±0,00cA
<i>L. madidum sativum</i>	Seca	1,87±0,12cA	1,03±0,03bB	0,60±0,00cC
<i>L. madidum sativum</i>	Chuvosa	1,20±0,00dA	1,07±0,07bB	0,60±0,00cB
<i>L. flavescens</i>	Seca	1,12±0,05dA	0,87±0,09bB	0,60±0,00cC
<i>L. flavescens</i>	Chuvosa	1,10±0,10dA	0,90±0,06bA	0,60±0,00cB
<i>L. petersonii</i>	Seca	4,17±0,27aA	2,07±0,17aB	0,83±0,07bC
<i>L. petersonii</i>	Chuvosa	3,77±0,14bA	2,10±0,10aB	1,13±0,09aC

*Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias na mesma linha seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O óleo essencial de *L. madidum ssp sativum* exibiu estatisticamente a mesma atividade contra *S. aureus* em ambas as estações, sendo mais eficaz contra *B. cereus* na estação seca (Tabela 2 e Figura 7). Na estação seca, o óleo essencial dessa espécie apresenta altas concentrações de α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol, que possuem forte atividade contra *B. cereus* (MAGWA *et al.*, 2006). Pode-se relacionar a inibição do crescimento de *S. aureus* à presença dos compostos terpinen-4-ol e α -terpineol, que são ativos contra o microorganismo citado e podem exercer um efeito sinérgico entre os componentes do óleo essencial, potencializando sua atividade biológica (MATASYOH *et al.*, 2007; DORMAN e DEANS, 2000). Assim como *L. flavescens*, o óleo essencial de *L. madidum ssp sativum* não mostrou atividade contra a bactéria *E. coli*. De maneira análoga, o óleo essencial de *S. tomentosa*, rico em α -pineno e β -pineno, possui atividade contra *B. cereus* e *S. aureus*, porém não é eficaz contra *E. coli* (TEPE *et al.*, 2005).

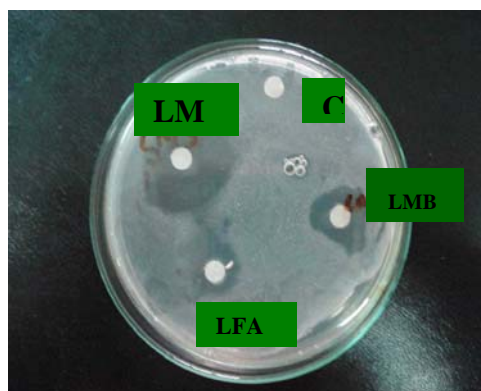


Figura 7 - Halo de inibição observado na superfície do meio Mueller Hinton devido à ação antimicrobiana do óleo essencial de *L. madidum ssp sativum* na estação seca (LMA) e chuvosa (LMB), de *L. flavescens* na estação seca (LFA) e do controle (C) contra *B. cereus*.

O óleo essencial de *L. petersonii* foi o mais eficiente dos óleos estudados, apresentando atividade antimicrobiana contra todos os microorganismos testados, devido principalmente ao alto conteúdo de citral e citronelal nele presente. *B. cereus* foi extremamente sensível ao óleo dessa espécie na estação seca, exibindo um halo de 4,17 cm. Para *S. aureus*, a inibição do crescimento foi estatisticamente igual no período de estiagem e após a ocorrência de chuvas (Figura 8). Estudos feitos com o óleo essencial de *Cunila galioides* mostram a alta atividade do citral contra *B. cereus* e *S. aureus* (SANDRI *et al.*, 2007). Óleos essenciais cítricos podem ter atividade antimicrobiana bastante pronunciada, mesmo se sua complexidade e variabilidade dificultam correlacionar sua ação a um componente específico (BELLETTI *et al.*, 2004).

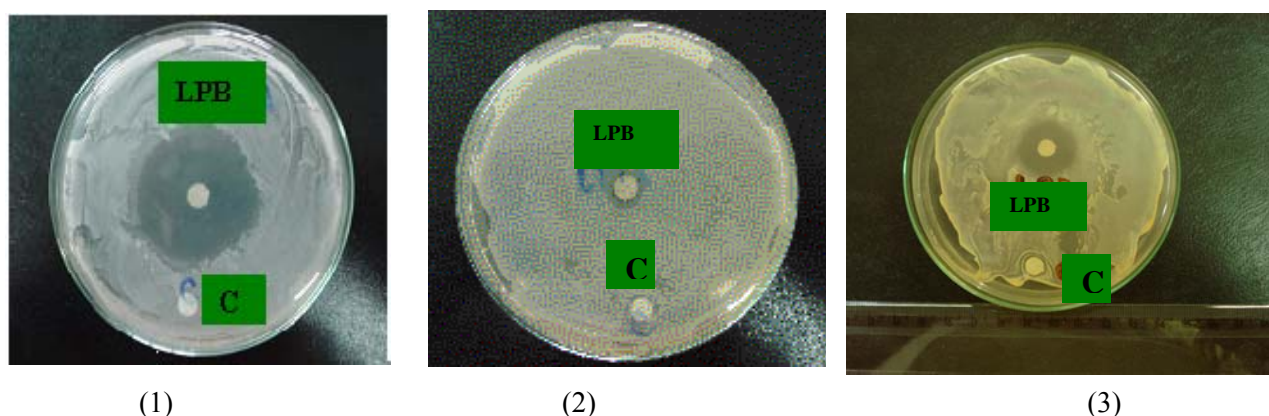
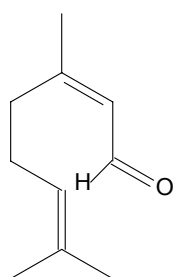


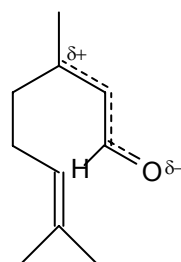
Figura 8 - Halo de inibição observado na superfície do meio Mueller Hinton devido à ação antimicrobiana do óleo essencial de *L. petersonii* na estação chuvosa (LPB) e do controle (C) contra *B. cereus* (1), *E. coli* (2) e *S. aureus* (3).

KIM e colaboradores (1995) demonstraram a alta atividade de citral e geraniol contra *E. coli*. DORMAN e DEANS (2000) mostraram o melhor desempenho do acetato de geranila frente ao geraniol na inibição de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Isso explicaria a maior atividade do óleo essencial de *L. petersonii* na estação chuvosa frente a *E. coli*, onde os níveis de acetato de geranila são maiores.

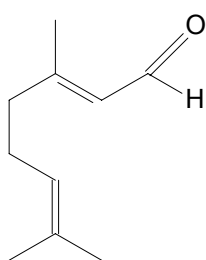
A atividade dos óleos essenciais está relacionada à composição dos óleos voláteis das plantas, da configuração estrutural e dos grupos funcionais de seus componentes e a possíveis interações sinérgicas ou antagonísticas entre estes (DORMAN e DEANS, 2000). Em geral, os efeitos antimicrobianos em óleos essenciais têm sido explicados principalmente pela presença de monoterpenos e sesquiterpenos com anéis fenólicos capazes de formar ligações de hidrogênio com os sítios ativos das enzimas-alvo. Entretanto, outros terpenos ativos, como aldeídos, álcoois e ésteres podem também contribuir para o efeito antimicrobiano total dos óleos essenciais. O efeito inibitório do citral contra microorganismos é devido à presença do grupo carbonila adjacente aos carbonos alfa e beta dos aldeídos α,β -insaturados neral (11) e geranial (13). A deslocalização dos elétrons, visível nos híbridos de ressonância (12) e (14), torna o carbono beta polarizado positivamente e o aldeído pode agir como um alquilante capaz de se ligar a grupos nucleofílicos celulares (BELLETTI *et al.*, 2004).



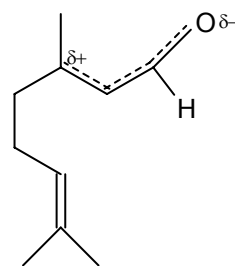
(11)



(12)



(13)



(14)

Alguns óleos essenciais exercem uma atividade inibitória maior contra bactérias Gram-positivas, pois sugere-se que bactérias Gram-negativas são mais resistentes (BAJPAI *et al.*, 2007). Isso se deve à presença em bactérias Gram-negativas de uma membrana fosfolipídica adicional, praticamente impermeável a compostos lipofílicos. A ausência desta barreira em bactérias Gram-positivas leva ao contato direto entre as substâncias hidrofóbicas do óleo essencial e a bicamada lipídica da membrana celular, onde os óleos executam seu efeito, aumentando a permeabilidade iônica, o que leva à perda de constituintes intracelulares, ou alterando sistemas enzimáticos das bactérias (SANDRI *et al.*, 2007).

O diâmetro do halo reflete a sensibilidade do microorganismo ao agente antimicrobiano, estando relacionado à quantidade de amostra, à sua difusão no meio de cultura e ao volume do meio. Variações nesses fatores podem influenciar o diâmetro do halo e levar a interpretações incorretas sobre a atividade da amostra. A adição de agentes emulsificantes ao meio e/ou à amostra pode melhorar a difusão de amostras oleosas, como os óleos essenciais e, conseqüentemente, aumentar os valores dos halos de inibição (SILVA, 2001). Estudos feitos por INOUE e colaboradores (2006) mostraram a contribuição dos vapores de óleos essenciais ao efeito antimicrobiano no método de difusão em disco. Demonstrou-se que somente compostos solúveis em água difundiam bem através do agar, enquanto a redeposição dos componentes vaporizados eram responsáveis pelo resto da inibição. Além disso, confirmou-se que óleos contendo como componentes principais álcoois, cetonas, ésteres e hidrocarbonetos a principal inibição vem do vapor, enquanto que para óleos contendo maiores volumes de aldeídos, a inibição vem principalmente da difusão (FISHER e PHILIPS, 2008).

Pelos dados descritos na literatura e comparação com os resultados obtidos neste trabalho, é possível verificar que os óleos essenciais de *L. madidum ssp sativum*, *L. flavescens* e *L. petersonii* podem ser usados no controle das bactérias estudadas, dando-nos uma perspectiva promissora para o cultivo e extração do óleo essencial dessas espécies no Brasil.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo confirmou que o estresse hídrico exerce forte influência sobre o teor e a composição química dos óleos essenciais das espécies *Leptospermum flavescens*, *L. madidum* ssp *sativum* e *L. petersonii* crescidas em Viçosa, Brasil. Observou-se que após a ocorrência de chuvas houve redução no teor do óleo essencial para *L. madidum* ssp *sativum* e um ligeiro aumento para as demais. *L. flavescens* mostrou-se um quimiótipo rico em nerolidol, o que sugere que essa espécie possa ser utilizada como fonte alternativa desse composto, que possui desde aplicações medicinais, atuando como fungicida, a aplicações na indústria alimentícia, como aromatizante.

O óleo volátil de *L. madidum* ssp *sativum* apresentou altas concentrações de α -pineno e β -pineno na estação seca, compostos de reconhecida atividade antimicrobiana. Na estação chuvosa, apresentou como principal componente α -humuleno, que possui relevante atividade antiinflamatória e antitumoral.

Tanto o óleo essencial das folhas como o das flores de *L. petersonii* se revelaram como fontes promissoras de citral, que possui atividade fungicida e bactericida. O principal componente encontrado nos voláteis liberados pelas flores de *L. petersonii* foi o citronelal, utilizado como material básico para a síntese da vitamina A e como repelente contra insetos.

Através da análise dos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o estresse hídrico atua sobre as espécies estudadas de maneira diferente. Assim, a coleta dessas espécies deve ser feita conforme o interesse na extração de determinado composto. Por exemplo, se há interesse em se extrair α -humuleno de *L. madidum* ssp *sativum*, é conveniente que se faça a extração após a ocorrência de chuvas, onde seu teor é mais acentuado. Por outro lado, se o composto de interesse em *L. petersonii* é o citronelal, é conveniente que se faça a extração em um período de estiagem, no qual sua concentração é mais significativa.

Os estudos de atividade antimicrobiana revelaram que a atividade está relacionada à sensibilidade de cada microorganismo aos óleos, pois os óleos essenciais de *L. flavescens* e *L. madidum* ssp *sativum* inibiram o crescimento apenas das bactérias Gram-positivas. *L. petersonii*, por sua vez, inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados. Dessa forma, os óleos essenciais de espécies de *Leptospermum* cultivadas no Brasil podem

ter aplicabilidade na indústria alimentícia, atuando como conservantes naturais no controle de bactérias que podem contaminar os alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream.1995, 469p.

American Society of Agricultural Engineers, ASAE S358.2 DEC99, **Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement – Forages**, 2000.

AURELLI, P; COSTANTINI, A; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 55, p. 344-348, 1992.

BAJPAI, V. K; RAHMAN, A; CHOI, U. K; YOUN, S. J; KANG, S. C. Inibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. **Food Chem.**, v.105, p.1061-1066, 2007.

BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.

BRACA, A; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANÒ, M. P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, p.123-125, 2008.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FORSTER, P. I.; BEAN, A. R.; CLARKSON, J. R.; LEPSCHI, B. J. Leaf Essential Oils of the Genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 1. *Leptospermum brachyandrum* and *Leptospermum pallidum* groups. **Flav. Fragr. J.**, v. 13, p. 19-25, 1998.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; BEAN, A. R.; FORSTER, P. I.; LEPSCHI, B. J. Leaf Essential Oils of the Genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 5. *Leptospermum continentale* and allies. **Flav. Fragr. J.**, v.14, p. 98-104, 1999.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; BEAN, A. R.; FORSTER, P. I.; LEPSCHI, B. J. Leaf Essential Oils of the Genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 6. *Leptospermum polygalifolium* and allies. **Flav. Fragr. J.**, v.15, p. 271-277, 2000a.

BROPHY J. J.; GOLDSACK R. J.; PUNRUCKVONG A.; BEAN A. R.; FORSTER P. I.; LEPSCHI B. J.; DORAN, J. C.; ROZEFELDS, A. C. Leaf Essential Oils of the Genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 7. *Leptospermum petersonii*, *L. liversidgei* and allies. **Flav. Fragr. J.**, v. 15, p. 342-351, 2000b.

CASTRO, H. G., BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 9, p. 55-61, 2007.

CHRISTOPH, F.; KAULFERS, P. M.; STAHL-BISKUP, E. A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of beta-triketones. **Planta Med.**, v. 66, p. 556-60, 2000.

COLE, R. A.; BANSAL, A.; MORIAIRTY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. **J. Nat. Med.**, v. 61, p. 414-417, 2007.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. **Microbiological Methods**. 7. ed. Boston: Butterworth-Heinemann. 1995, 493 p.

COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Man. Sci.**, v. 63, p. 524-554, 2007

CUNICO, M. M.; LOPES, A. R.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C.; PLOCHARSKI, R. C. B.; MIGUEL, M. D.; JUNIOR, A. G.; AUER, C. G.; MIGUEL, O. G. Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia Martiana* Miq (Piperaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.18, p. 184-188, 2007.

CUSTÓDIO, L.; SERRA, H.; NOGUEIRA, J. M. F.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Analysis of the volatiles emitted by whole flowers and isolated flower organs of the carob tree using HS – SPME – GC/MS. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 929-942, 2006.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O.; SAULDOBOIS, A.; SINGH, N.; MCCURDY, C.; CANTRELL, C. p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β -triketones from *Leptospermum scoparium*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2004-2014, 2007.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNTTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agric. Ecos. Env.**, v. 106, p. 243-252, 2005.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microb.**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DÖTTERL, S.; WOLFE, L. M.; JÜRGENS, A. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Selene latifolia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 203-213, 2005.

DOUGLAS, M. H.; VAN KLINK, J. W.; SMALLFIELD, B. M.; PERRY, N. B.; ANDERSON, R. E.; JOHNSTONE, P.; WEAVERS, R. T. Essential oils from New Zealand manuka: triketone and others chemotypes of *Leptospermum scoparium*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1255-1264, 2004.

FATIMA, S.; FAROOQI, A. H. A.; SHARMA, S. Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus* to water stress. **Plant Growth Regul.**, v. 37, p. 143-149, 2002.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds *alpha*-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur. J. Pharm.**, v. 569, p.228-236, 2007.

FISCHER, K.; PHILIPS, C. A. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends Food Sci. Tech.**, v.19, p.156-164, 2008.

FISCHER, K.; ROWE, C.; PHILIPS, C. A. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. **Lett. Appl. Microb.**, v.44, p.495-499, 2007.

GIRARD, E. A. **Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em floresta ombrófila mista.** Curitiba: UFPR, 2005. 81 p. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, 2005.

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

HAY, R. K. M. Phenology and ontogeny. In: **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production.** London: Longman Scientific & Technical. 1993,185 p.

HOLOPAINEN, J. K. Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in Plant Sci.**, v. 9, p. 529-533, 2004.

INOUE, Y.; SHIRAIISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microb. Lett.**, v. 237, p.325-331, 2004.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, N.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Jpn. J. Med. Mycol.**, v. 47, p. 91-98, 2006.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.2839-2845, 1995.

- LEE, S-J, HAN, J. I.; LEE, G. S.; PARK, M. J.; CHOI, I. G.; NA, K. J.; JEUNG, E. B. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microporum gypseum* in a guinea pig model. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, p.184-188, 2007.
- LEE, S-J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem.**, v. 91, p. 131-137, 2005.
- LI, Z. G.; LEE, M. R.; SHEN, D. L. Analysis of volatiles compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different florescence by headspace solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 576, p. 43-49, 2006.
- LIS-BALCHIN, M. L.; HART, S. L.; DEANS, S. G. 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. **Phyt. Res.**, v. 14, p. 623-629, 2000.
- MADDOCKS-JENNINGS, W.; WILKINSON, J. M.; SHILLINGTON, D.; CAVANAGH, H. A fresh look at manuka and kanuka essential oils from New Zealand. **The Int. J. Arom.**, v. 15, p. 141-146, 2005.
- MAGWA, M. L.; GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; HUMPHREY, G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **J. Ethnoph.**, v.103, p.85-89, 2006.
- MATASYOH, J. C.; KIPLIMO, J. J.; KARUBIU, N. M.; HAILSTORKS, T. P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphoratus*. **Food Chem.**, v. 101, p.1183-1187, 2007.
- MUSTAFA, K. A.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. 2- Hydroxyflavanones from *Leptospermum polygalifolium* subsp. *polygalifolium* equilibrating sets of hemiacetal isomers. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1285-1293, 2003a.

MUSTAFA, K. A.; KJAERGAARD, H. G.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. Hydrogen-bonded rotamers of 2',4',6'-trihydroxy-3'-formyldihydrochalcone, an intermediate in the synthesis of a dihydrochalcone from *Leptospermum recurvum*. **Tetrahedron**, v.59, p. 6113-6120, 2003b.

NATHAN, S. S. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (*Myrtaceae*) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Biores. Technol.**, v. 98, p. 1856-1860, 2007.

NHU-TRANG, T. T.; CASABIANCA, H.; LOUSTALOT, M. F. G. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable – isotope gas - chromatographic analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 386, p. 2141-2152, 2006.

ORMEÑO, E.; MÉVY, J. P.; VILA, B.; BOUSQUET-MÉLOU, A.; GREFF, S.; BONIN, G.; FERNANDEZ, C. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. **Chemosphere**, v. 67, p. 276-284, 2007.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, Y.; CHOI, W. S.; JO, H. J.; CHANG, J. W.; JEUNG, E. B.; CHOI, I. G. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. **J. Microb.**, v. 45, p.460-465, 2007.

PETROPOULOS, S. A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M. G.; PASSAM, H. C. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. **Sci. Hort.**, doi: 10.016/j.scientia.2007.10.008. 2007.

REICHLING, J.; KOCH, C.; STAHL-BISKUP, E.; SOJKA, C.; SCHNITZLER, P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. **Planta Med.**, v.71, p.123-1127, 2005.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chem.**, v.103, p. 823-828, 2007.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v.34, p.3-21, 2001.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA C. R. A.; PINHEIRO, A. L.; ISMAIL, F. M. D. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. **Flav. Fragr. J.**, v.22, p.474-478, 2007.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 6, p.63-70, 2003.

SILVA, S. R.S. **Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Cheel crescida no Brasil.** Viçosa: UFV, 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LAGE, L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím. Nova**, v.27, p. 46-49, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG/II**. Nova Odessa: SP. Instituto Plantarum, 2005.

STARR, F.; STARR, K.; LOOPE, L. *Leptospermum sp.* United States Geological Survey – Biological Resources Division – Haleakala Field Station, Maui, Hawaii, 2003.

STEPHENS, J. M. C.; MOLAN, P. C.; CLARKSON, B. D. A review of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) in New Zealand. **New Zeal. J. Bot.**, v.43, p.431-449, 2005.

TAKARADA, K.; KIMIKUZA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol. Immun.**, v.19, p. 61-64, 2004.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem.**, v. 90, p.333-340, 2005.

VALLAT, A.; GU, H.; DORN, S. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. **Phytochemistry**, v. 66, p.1540–1550, 2005.

VAN KLINK J.W.; BROPHY, J. J.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. β -triketones from Myrtaceae: isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and papuanone from *Corymbia dallachiana*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p.487- 489, 1999.

VAN KLINK, J. W.; LARSEN, L.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T.; COOK, G. M.; BREMER, P. J.; MACKENZIE, A. D.; KIRIKAE, T. Triketones active against antibiotic-resistant bacteria: synthesis, structure–activity relationships, and mode of action. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 13, p. 6651-6662, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna **Quím. Nova**, v. 29, p.326-337, 2006.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Quím. Nova**, v. 27, p. 536-539, 2004.

VIEIRA, T. R. **Anatomia foliar de espécies do gênero *Melaleuca* L. e caracterização da composição química de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)**. Viçosa: UFV, 2002. 122 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58 p. 1631-1646, 2002.

WRIGLEY, J. W.; FAAG, M. **Australian Native Plants**. 4. ed. Melbourne: Reed Books, 1996, 696 p.

YANG, P.; YAJUN, M. A.; ZHENG, S. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. **J. Pest. Sci.**, v. 30, p. 84-89, 2005.

ANEXOS

1. Cromatogramas dos óleos essenciais das espécies de *Leptospermum* estudadas com relação à disponibilidade hídrica.

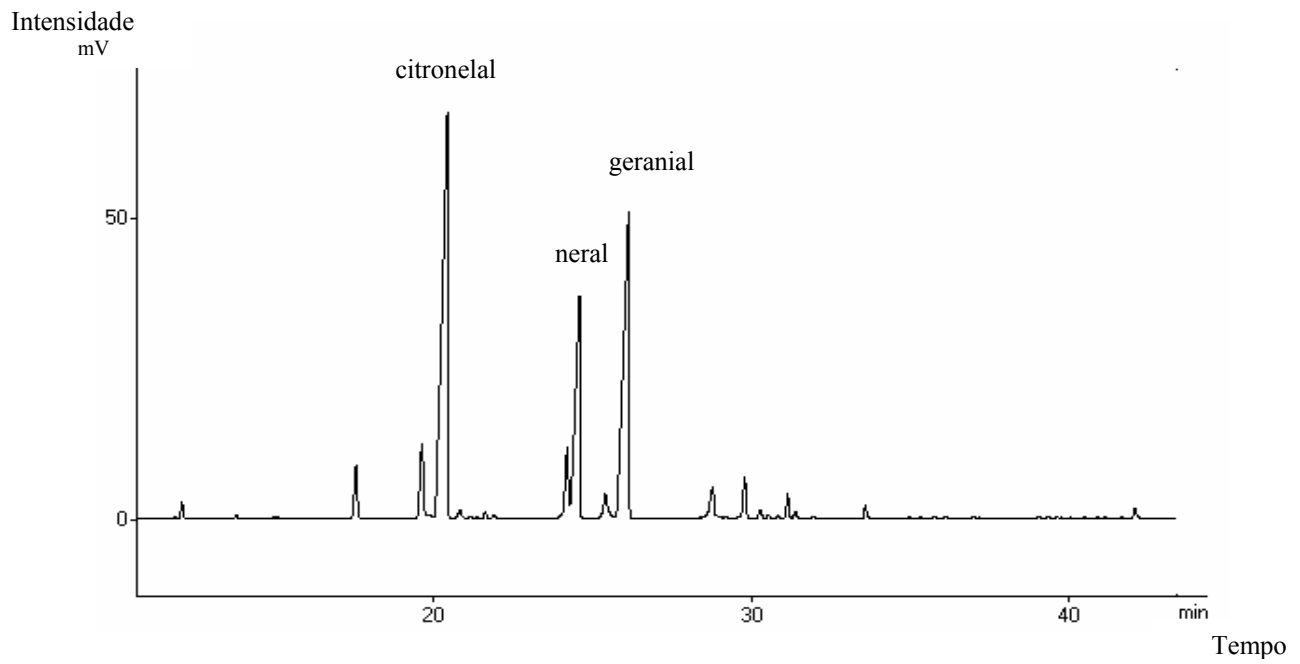


Figura 9- Cromatograma do óleo essencial das flores de *L. petersonii*

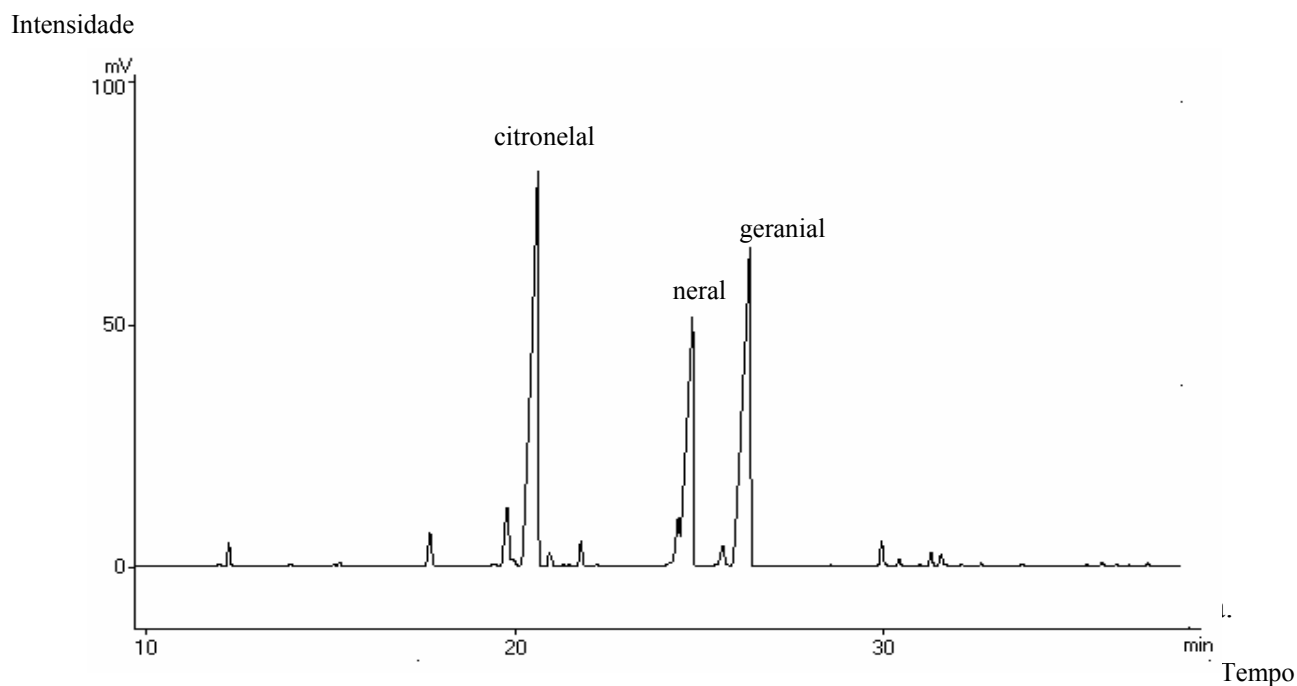


Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. petersonii* obtido na estação seca.

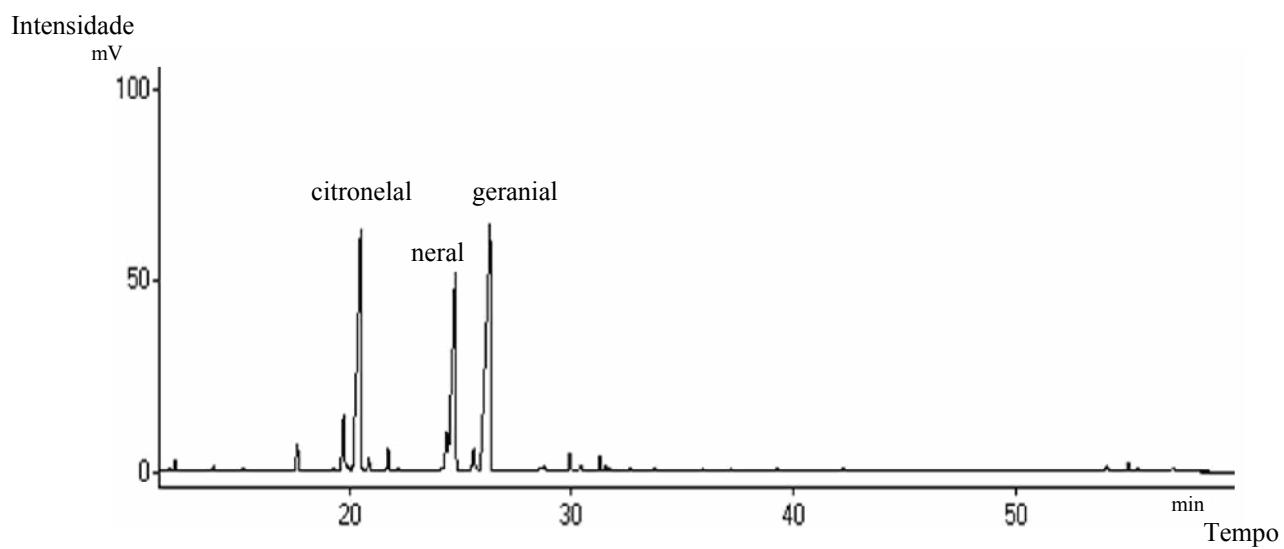


Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. petersonii* obtido na estação chuvosa.

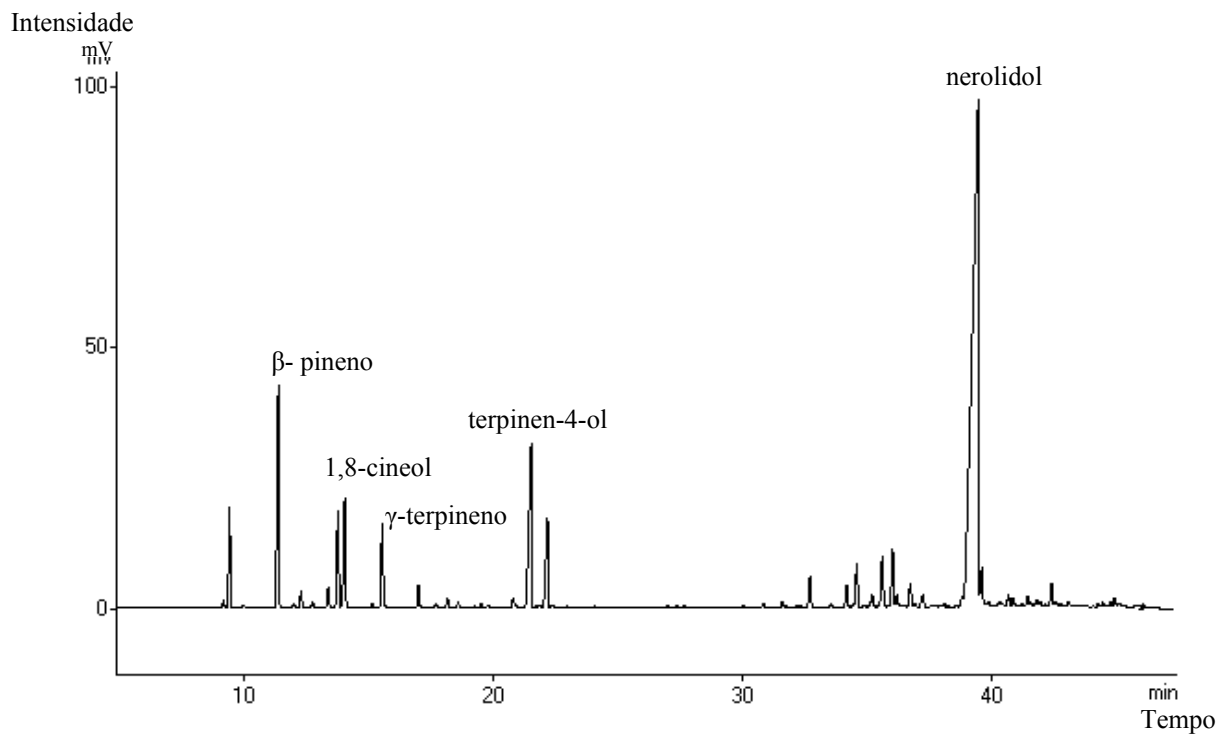


Figura 12- Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. flavescens* obtido na estação seca.

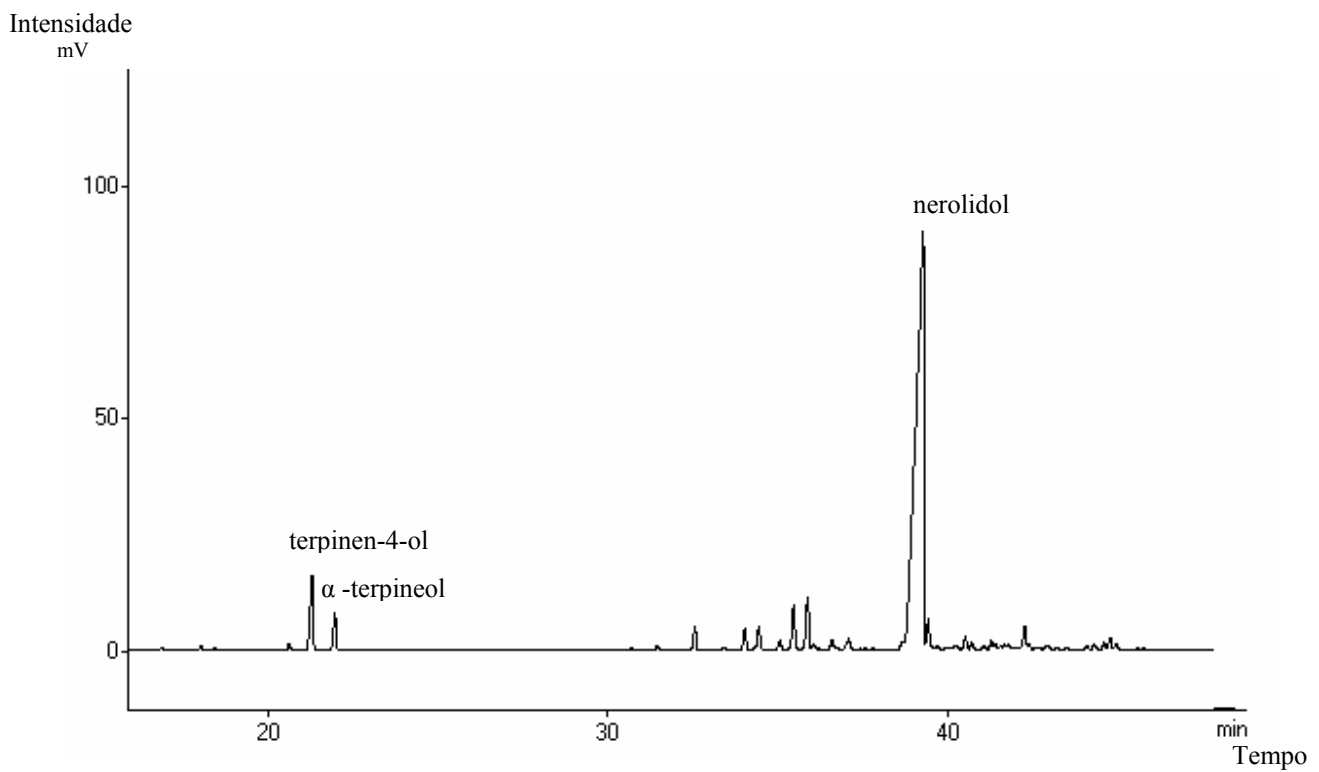


Figura 13- Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. flavescens* obtido na estação chuvosa.

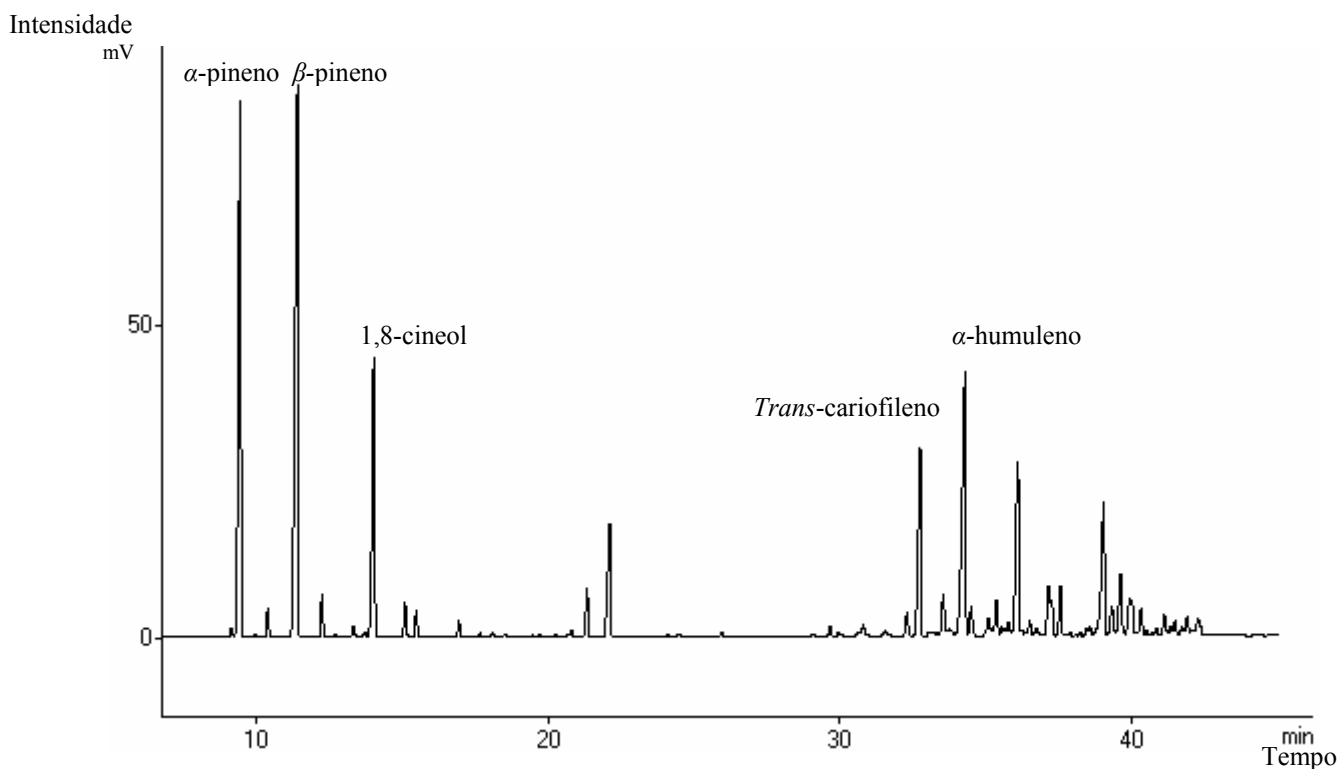


Figura 14- Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. madidum ssp sativum* obtido na estação seca.

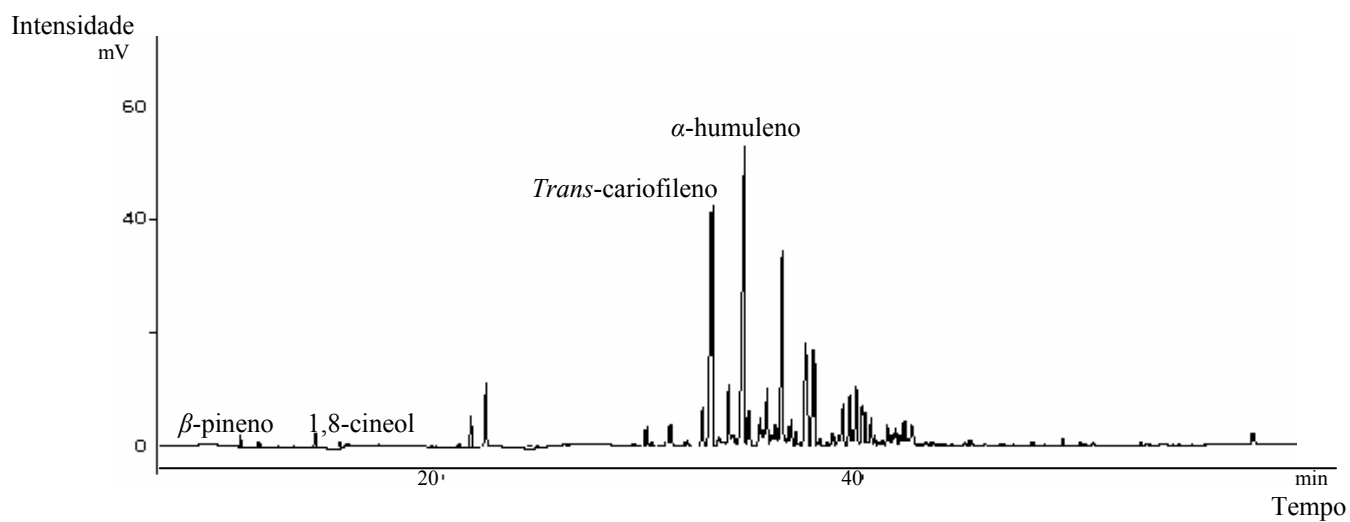
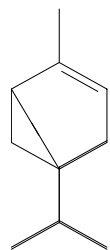
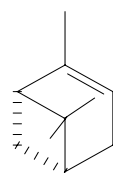


Figura 15- Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. madidum ssp sativum* obtido na estação chuvosa.

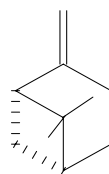
2. Fórmulas estruturais de alguns compostos identificados nos óleos essenciais das espécies de *Leptospermum*



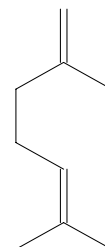
α -tujeno



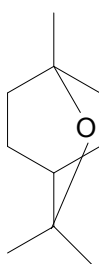
α -pineno



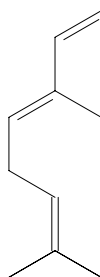
β -pineno



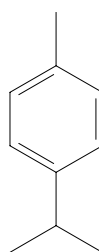
mirceno



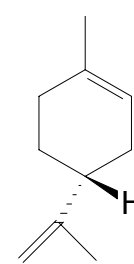
1,8-cineol



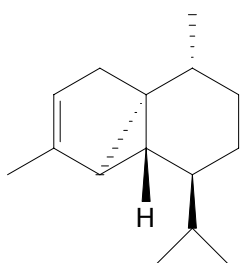
trans- β -ocimeno



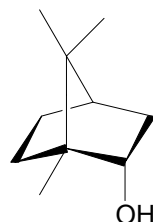
p-cimeno



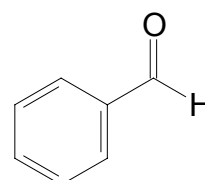
limoneno



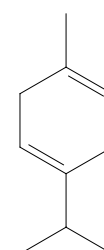
α -cubebeno



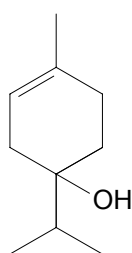
borneol



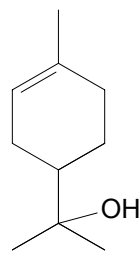
benzaldeído



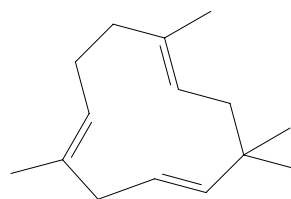
γ -terpineno



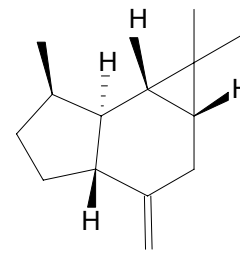
terpinen-4-ol



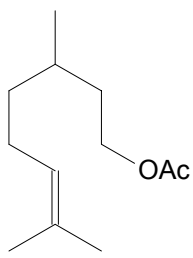
α -terpineol



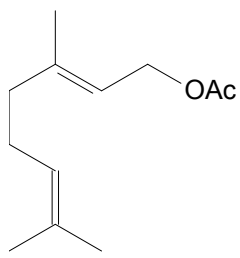
α -humuleno



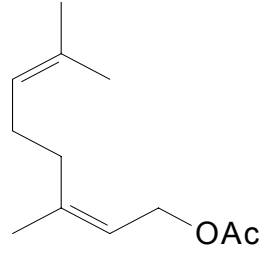
aromadendreno



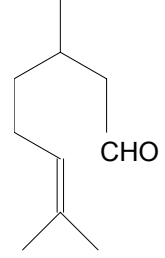
acetato de citronelila



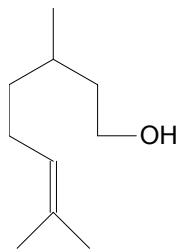
acetato de geranila



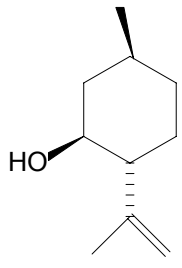
acetato de nerila



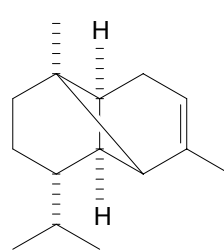
citronelal



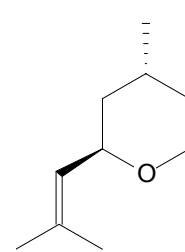
citronelol



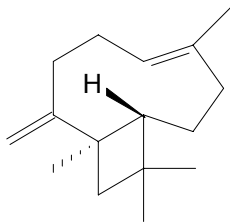
isopulegol



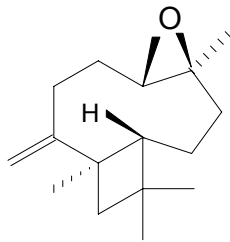
α -copaeno



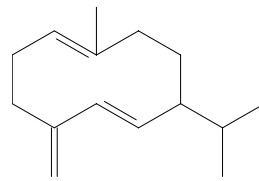
óxido de rosa



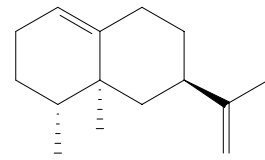
trans-cariofileno



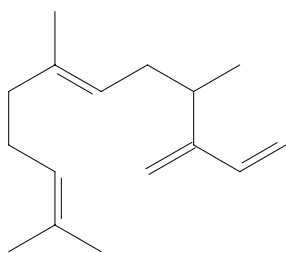
óxido de cariofileno



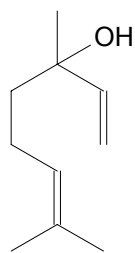
germacreno D



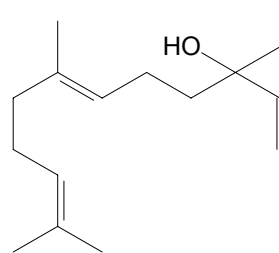
valenceno



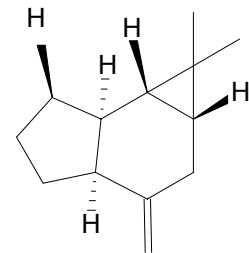
(*E*)- β -farneseno



linalol



nerolidol



aloaromadendreno