

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO
CERRADO CONTRA FUNGOS XILÓFAGOS**

FERNANDO CÉSAR MAGALHÃES DE MEDEIROS

**ORIENTADOR: CLÁUDIO HENRIQUE SOARES DEL
MENEZZI**

COORIENTADOR: ROBERTO FONTES VIEIRA

Dissertação de mestrado em Ciências Florestais

PÚBLICAÇÃO: PPGEFL.DM-238/2014

BRASÍLIA/DF: MAIO/2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do
Cerrado contra fungos xilófagos

FERNANDO CÉSAR MAGALHÃES DE MEDEIROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

APROVADO POR:

Orientador

Prof. Dr. Cláudio Henrique Soares Del Menezzi (Departamento de Engenharia Florestal / UnB);

Examinador Interno

Prof. Dr. Joaquim Carlos Gonzalez (Departamento de Engenharia Florestal / UnB);

Examinador Externo

Dr. Humberto Ribeiro Bizzo (Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos / Embrapa);

Examinador Suplente

Dr. Fernando Nunes Gouveia (Laboratório de Produtos Florestais / SFB);

Brasília, 12 de maio de 2014.

FICHA CATALOGRÁFICA

MEDEIROS, FERNADO CÉSAR MAGALHÃES DE

Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos

xvii, 108p., 210 x 297 mm (EFL/FT/UnB, Mestre, Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.)

Departamento de Engenharia Florestal

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1. Óleos essenciais | 2. Plantas do Cerrado |
| 3. Atividade biológica | 4. Fungos xilófagos |
| I. EFL/FT/UnB | II. Título (série) |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MEDEIROS, F. C. M. (2014). Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos. Dissertação de Mestrado. Publicação PPGEFL.DM-238/2014. Departamento de Engenharia Florestal. Universidade de Brasília, Brasília DF, 108p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Fernando César Magalhães de Medeiros

TÍTULO: Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos

GRAU: Mestre

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

AGRADECIMENTOS

A minha família por ter me dado todo o suporte para ter chegado até aqui.

À Valéria não só pelo carinho e apoio nos momentos difíceis, mas também pelas discussões e sugestões técnica e por ter escutado tantas histórias de óleos essenciais por mais de dois anos.

Aos meus muitos orientadores, Cláudio, Roberto, Fernando, Humberto e Alexandre, que, de várias formas diferentes, me guiaram nesta jornada.

Aos meus amigos e colegas pelo suporte dos mais variados tipos em especial à Clarine por todas as “aulas” sobre Cerrado.

Ao pessoal da EMBRAPA CENARGEN, Rosa, Ismael e Márcio, por todo o suporte técnico e paciência.

Aos técnicos do Laboratório de Biodegradação do LPF, Fernando e Augusto pela ajuda nos experimentos em especial ao Getúlio pela grande boa vontade e experiência no assunto.

Ao Pedro e ao Chiquinho do Departamento de Pós-graduação pela boa vontade em me ajudar quando era preciso.

A Deus, não só por tornar tudo isso possível, mas também por colocar todas essas pessoas em meu caminho.

RESUMO

Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos

Autor: Fernando César Magalhães de Medeiros

Orientador: Cláudio Henrique Soares Del Menezzi

Coorientador: Roberto Fontes Vieira

Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais

Brasília, maio de 2014

Os componentes voláteis de seis plantas do Cerrado foram investigados. Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, por duas horas, e o rendimento dos óleos foi: 0,14% (*Psidium myrsinites* Mart. ex DC.), 0,75% (*Hyptis* sp.), 0% (*Hyptis saxatilis* A.St.-Hil. ex Benth.), 0,33% (*Psidium laruotteanum* Cambess.), 0,46% (*Lippia lacunosa* Mart. & Schauer) e 2,92% (*Lippia organoides* Kunth). Os principais componentes dos óleos são: óxido de cariofileno (26,1%), epóxido de humuleno II (8,8%) e β -cariofileno (7,4%) (*P. myrsinites*); β -pineno (17,6%), espatulenol (11,3%) e α -pineno (10,0%) (*Hyptis* sp.); *p*-cimeno (34,8%), 1,8-cineol (11,9%) e α -pineno (11,4%) (*P. laruotteanum*); linalol (38,7%), β -elemeno (18,3%) e β -cariofileno (5,4%) (*L. lacunosa*) e timol (71,1%), *p*-cimeno (9,6%) e β -cariofileno (4,8%) (*L. organoides*). Este é o primeiro trabalho em que a composição química dos óleos de *P. myrsinites*, *Hyptis* sp. e *P. laruotteanum* é descrita e a primeira descrição do óleo de *L. lacunosa* coletado de indivíduos nativos do Cerrado. Todos os óleos foram utilizados em testes de inibição de fungos apodrecedores de madeira, *Trametes versicolor* (podridão branca) e *Gloeophyllum trabeum* (podridão parda), pelo método da difusão em ágar com algumas modificações. O óleo de cravo também foi utilizado nos ensaios com fungos. Como esperado os óleos de *L. organoides* e de cravo foram bastante efetivos contra ambos os fungos. O óleo de *L. lacunosa* também apresentou boa atividade, porém, os demais óleos não demonstraram efeito significativo. Esse resultado pode ser explicado pela dificuldade de difusão desses óleos, visto que são compostos por monoterpenos não oxigenados ou sesquiterpenos. A metodologia usada mostrou algumas vantagens quando comparada às técnicas tradicionais.

Palavras-chave: Óleos essenciais, Cerrado, linalol, timol, atividade biológica, fungos apodrecedores de madeira.

ABSTRACT

Chemical characterization and biological activity of essential oils of plants from Brazilian Cerrado against wood decay fungi

Author: Fernando César Magalhães de Medeiros

Supervisor: Cláudio Henrique Soares Del Menezzi

Co-supervisor: Roberto Fontes Vieira

Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais

Brasília, may of 2014

The volatiles components of six plants from Brazilian Cerrado were investigated. The essential oils were extracted by hydrodistillation during two hours and the oil yields were: 0.14% (*Psidium myrsinites* Mart. ex DC.), 0.75% (*Hyptis* sp.), 0% (*Hyptis saxatilis* A.St.-Hil. ex Benth.), 0.33% (*Psidium laruotteanum* Cambess.), 0.46% (*Lippia lacunosa* Mart. & Schauer) and 2.92% (*Lippia organoides* Kunth). The principal chemical components were caryophyllene oxide (26.1%), humulene epoxide II (8.8%) and β -caryophyllene (7.4%) (*P. myrsinites*); β -pinene (17.6%), spathulenol (11.3%) and α -pinene (10.0%) (*Hyptis* sp.); p-cymene (34.8%), 1,8-cineole (11.9%) and α -pinene (11.4%) (*P. cambess*); linalool (38.7%), β -elemene (18.3%) and β -caryophyllene (5.4%) (*L. lacunose*) and thymol (71.1%), p-cimene (9.6%) and β -caryophyllene (4.8%) (*L. organoides*). It's the first time the oils from *P. myrsinites*, *Hyptis* sp. and *P. laruotteanum* are chemically characterized and it's the first description of the oil of *L. lacunosa* collected from specimens belonging to the Brazilian Cerrado. All these oils were used to inhibit the development of some wood decay fungi, *Trametes versicolor* (white rot) and *Gloeophyllum trabeum* (brown rot), by the well-diffusion method with some modifications. Clove oil was also used in the fungi essay. As expected the oils from *L. organoides* and clove were very effective against both rot fungi. The oil from *L. lacunosa* also showed a good activity, but the others didn't demonstrate any significant effect. This might be due to the difficulty of the oils to diffuse into the culture medium as the chemical components of those oils with low activity show monoterpenes without oxygen or sesquiterpenes. The methodology used showed some advantages when compared to the current methods.

Keywords: Essential oil, Brazilian Cerrado, linalool, thymol, biological activity, wood decay fungi.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - HIPÓTESE.....	3
4 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
4.1 - ÓLEOS ESSENCIAIS.....	3
4.2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	4
4.2.1 - Variabilidade na composição dos óleos.....	5
4.2.2 - Análise química da composição dos óleos.....	7
4.3 - BIOATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	12
4.3.1 - Óleos essenciais e a preservação de madeiras.....	13
4.4 - ÓLEOS ESSENCIAIS NO CERRADO.....	15
5 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO CERRADO.....	17
5.1 - INTRODUÇÃO.....	17
5.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.2.1 - Coleta das espécies.....	25
5.2.2 - Extração dos óleos essenciais e cálculo do rendimento.....	26
5.2.3 - Análise da composição química dos óleos.....	28
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.3.1 - Extração dos óleos essenciais.....	28
5.3.2 - Caracterização química dos óleos essenciais.....	30
5.3.2.1 - <i>Lippia origanoides</i>	37
5.3.2.2 - <i>Syzygium aromaticum</i>	38
5.3.2.3 - <i>Psidium myrsinites e Psidium laruotteanum</i>	38
5.3.2.4 - <i>Hyptis sp.</i>	40
5.3.2.5 - <i>Lippia lacunosa</i>	42
5.4 - CONCLUSÃO.....	44
6 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA.....	46
6.1 - INTRODUÇÃO.....	46
6.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
6.2.1 - Testes antifúngicos.....	52
6.2.2 - Avaliação do efeito antifúngico dos óleos essenciais.....	53
6.2.3 - Análise estatística.....	55
6.3 - RESULTADOS.....	56
6.3.1 - Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	56

6.4 - DISCUSSÃO	58
6.4.1 - Atividade biológica.....	58
6.4.1.1 - <i>Lippia origanoides</i>	58
6.4.1.2 - <i>Syzigium aromaticum</i>	59
6.4.1.3 - <i>Psidium myrsinites</i>	62
6.4.1.4 - <i>Hyptis sp.</i>	62
6.4.1.5 - <i>Psidium laruotteanum</i>	63
6.4.1.6 - <i>Lippia lacunosa</i>	64
6.4.2 - Mecanismo de ação.....	66
6.4.3 - Avaliação da metodologia.....	70
6.5 - CONCLUSÃO.....	71
7 - CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
APÊNDICES.....	99
A. CROMATOGRAMAS	100
B. ANÁLISE ESTATÍSTICA	103
C. MACROS EMPREGADAS NO TRATAMENTO DAS IMAGENS.....	106
D. ROTINAS DE PROGRAMAÇÃO	107

Lista de tabelas

Tabela 5.1 – Plantas do Cerrado produtoras de óleo essencial e seus principais constituintes químicos relacionadas na literatura.	19
Tabela 5.2 – Informações sobre as amostras.	26
Tabela 5.3 – Teor de umidade das espécies coletadas.....	29
Tabela 5.4 – Rendimento das extrações dos óleos essenciais	30
Tabela 5.5 – Composição química dos óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> e <i>S. aromaticum</i> . ..	30
Tabela 5.6 – Composição química dos óleos essenciais de <i>P. myrcinites</i> , <i>Hyptis sp.</i> , <i>P. laruotteanum</i> e <i>L. lacunosa</i>	31
Tabela 6.1 – Normas internacionais sobre ensaios de campo.	48
Tabela 6.2 – Normas internacionais sobre ensaios acelerados em laboratórios.....	49
Tabela 6.3 – Índices de inibição dos óleos essenciais contra <i>G. trabeum</i>	57
Tabela 6.4 – Índices de inibição dos óleos essenciais contra <i>T. versicolor</i>	57
Tabela B. 1 - ANOVA da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 2 - Qualidade da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 3 - Coeficientes da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 4 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 5 - Qualidade da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 6 - Coeficientes da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>S. aromaticum</i>	103
Tabela B. 7 - ANOVA da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	103
Tabela B. 8 - Qualidade da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	103
Tabela B. 9 - Coeficientes da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	103
Tabela B. 10 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	103
Tabela B. 11 - Qualidade da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	104
Tabela B. 12 - Coeficientes da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. origanoides</i>	104
Tabela B. 13 - ANOVA da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 14 - Qualidade da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 15 - Coeficientes da regressão linear – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 16 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 17 - Qualidade da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 18 - Coeficientes da regressão logarítmica – <i>T. versicolor</i> X <i>L. lacunosa</i>	104
Tabela B. 19 - ANOVA da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	104
Tabela B. 20 - Qualidade da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	104

Tabela B. 21 - Coeficientes da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	104
Tabela B. 22 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	105
Tabela B. 23 - Qualidade da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	105
Tabela B. 24 - Coeficientes da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>S. aromaticum</i>	105
Tabela B. 25 - ANOVA da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 26 - Qualidade da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 27 - Coeficientes da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 28 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 29 - Qualidade da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 30 - Coeficientes da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>Hyptis sp.</i>	105
Tabela B. 31 - ANOVA da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	105
Tabela B. 32 - Qualidade da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	105
Tabela B. 33 - Coeficientes da regressão linear – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	106
Tabela B. 34 - ANOVA da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	106
Tabela B. 35 - Qualidade da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	106
Tabela B. 36 - Coeficientes da regressão logarítmica – <i>G. trabeum</i> X <i>L. lacunosa</i>	106
Tabela D. 1 – Processamento de imagens com distinção inadequada do fungo.....	107

Lista de figuras

Figura 4.1 – Espectros de massa de δ -2-carenenos (a), canfeno (b) e terpinoleno (c) e suas respectivas estruturas.....	8
Figura 4.2 – Relação linear entre o logaritmo do tempo de retenção ajustado e os índices de retenção.....	9
Figura 4.3 – Determinação do índice de retenção de uma substância desconhecida (X) através da interpolação dos tempos de retenção.....	10
Figura 4.4 – Estrutura química do cinamaldeído (a) e eugenol (b).....	14
Figura 4.5 – Estrutura química do carvacrol (a) e timol (b).....	14
Figura 5.1 – Montagem do experimento de extração. Detalhe do aparelho de Clevenger modificado.....	26
Figura 5.2 – Aparência do óleo essencial após o término da extração.....	27
Figura 5.3 – Fórmulas estruturais do (a) timol e do (b) eugenol.....	37
Figura 5.4 – Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo de <i>P. myrsinites</i> . Óxido de cariofileno (a), epóxido de humuleno II (b) e β -cariofileno (c).....	38

Figura 5.5 – Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo de <i>P. laruotteanum</i> : <i>p</i> -cimeno (a), 1,8-cineol (b), α -pineno (c), limoneno (d) e γ -terpineno (e).....	39
Figura 6.1 – Mapa de posicionamento utilizado para posicionar os micélios de fungos e o produto a ser testado.	53
Figura 6.2 – local utilizado para a obtenção das fotografias	54
Figura 6.3 – Processo de tratamento das imagens: (a) imagem colorida, (b) imagem em escala de cinza e (c) imagem limiarizada.	55
Figura 6.4 – Imagens do crescimento dos fungos ao término do experimento: (a) <i>G. trabeum</i> e (b) <i>T. versicolor</i>	56
Figura 6.5 – Resultado do experimento com fungo <i>T. versicolor</i> com óleo de <i>L. origanoides</i> , no qual o fungo foi totalmente inibido.	57
Figura 6.6 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>T. versicolor</i> em função da concentração de óleo de <i>L. origanoides</i>	59
Figura 6.7 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>G. trabeum</i> em função da concentração de óleo de <i>S. aromaticum</i>	60
Figura 6.8 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>G. trabeum</i> em função da concentração de óleo de <i>S. aromaticum</i>	60
Figura 6.9 – Fórmula estrutural do isoeugenol.....	62
Figura 6.10 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>G. trabeum</i> em função da concentração de óleo de <i>Hyptis sp.</i>	63
Figura 6.11 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>G. trabeum</i> em função da concentração de óleo de <i>L. lacunosa</i>	64
Figura 6.12 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo <i>T. versicolor</i> em função da concentração de óleo de <i>L. lacunosa</i>	65
Figura 6.13 – Exemplo de (a) flavonoide (2-phenil-1,4-benzopirona) e (b) tanino hidrolisável (ácido tânico).	67
Figura 6.14 – Mecanismo de deslocalização dos elétrons na captura de radicais livres de um composto fenólico	69
Figura A. 1 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>P. myrsinites</i>	100
Figura A. 2 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>Hyptis sp.</i>	100
Figura A. 3 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>P. laruotteanum</i>	101
Figura A. 4 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>L. lacunosa</i>	101
Figura A. 5 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>L. origanoides</i>	102
Figura A. 6 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de <i>S. aromaticum</i>	102

Figura C. 1 – Macro empregada nas fotos com <i>G. trabeum</i>	106
Figura C. 2 – Macro empregada nas fotos com <i>T. versicolor</i>	107
Figura D. 1 – Foto com reflexos nas bordas (a), imagem binária obtida pelo procedimento convencional (b) e imagem binária obtida pelo processamento da tabela D.1 (c).	107

Lista de Símbolos, Nomenclatura e Abreviações

A_a	– Área ocupada pelo fungo no experimento com produto fungicida
A_b	– Área ocupada pelo fungo no experimento controle (solvente)
ACA	– Arseniato de cobre amoniacal
ASTM	– <i>American Society for Testing Methods</i>
AWPA	– <i>American Wood Protection Association</i>
CCA	– Arseniato de cobre cromatado
CEN	– <i>Comitée Européen de Normalisation</i>
CG	– Cromatografia gasosa
CG-EM	– Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas
CI_{50}	– Menor concentração capaz de inibir 50% dos micélios de fungos
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
HDF	– <i>High density fiberboard</i>
$I(\%)$	– Índices de inibição percentual
IK	– Índice de retenção de Kovats
IRL	– Índice de retenção linear
MDF	– <i>Medium density fiberboard</i>
$M_{\text{óleo}}$	– Massa de óleo obtida na hidrodestilação (em g)
M_{planta}	– Massa das partes aéreas, flores e folhas, submetidas à hidrodestilação (em g)
OSB	– <i>Oriented Strand Board</i>
$R(\%)$	– Rendimento da produção de óleo essencial
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
$t_{R(i)}$	– Tempo de retenção do composto desconhecido
$t'_{R(i)}$	– Tempo de retenção ajustado do composto desconhecido
$t_{R(n)}$	– Tempo de retenção do n-alceno eluído antes do composto desconhecido
$t'_{R(n)}$	– Tempo de retenção ajustado do n-alceno eluído antes do composto desconhecido
$t_{R(n+1)}$	– Tempo de retenção do n-alceno eluído depois do composto desconhecido
$t'_{R(n+1)}$	– Tempo de retenção ajustado do n-alceno eluído depois do composto desconhecido

1 - INTRODUÇÃO

A fascinação do ser humano por substâncias aromáticas e por odores agradáveis remonta há milhares de anos. No Egito, há relatos da utilização de plantas medicinais na mumificação de corpos a fim evitar o apodrecimento (EDRIS, 2007). Na Roma antiga, eram bastante conhecidas as casas de banho, locais em que se realizavam negócios e política. A higiene dos banhos ficava a cargo de extratos e essências vegetais que perfumavam as pessoas. Na Bíblia, a mirra, uma goma resinosa e odorífera, é tratada como um produto muito importante e até hoje é utilizada em cerimônias religiosas por todo o mundo.

A história dos óleos essenciais inicia-se antes de 3.500 a.C., data da mais antiga destilaria conhecida utilizada para extração de óleos essenciais (BRUD, 2010). Percebe-se, portanto, que, apesar de não possuir nenhum conhecimento de química ou biologia, o homem, desde a Antiguidade, já buscava formas de utilizar substâncias de aromas agradáveis. Com o passar do tempo e a sistematização do conhecimento nas mais diversas áreas, identificou-se que os odores e as fragrâncias, tão apreciados, eram resultado de metabólitos secundários produzidos por certas plantas. Convencionou-se, então, o termo óleo essencial.

Hoje os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, possuem atuação significativa nos ramos de alimentação, perfumaria e medicamentos, porém, sua utilização pode ser bem diversificada, sobretudo em razão de sua composição bastante complexa. Embora haja óleos de baixo custo como os de frutas cítricas (obtidos como subproduto da indústria de sucos), os óleos essenciais estão geralmente associados a produtos de alto valor agregado, pois sua obtenção ainda é dispendiosa em virtude das baixas quantidades de óleo existentes nas plantas.

Ao contrário do que se pensava no início dos estudos dos metabólitos secundários, os óleos essenciais apresentam uma grande variedade de funções na planta que o produz. Situações que envolvem desde a atração de animais polinizadores até a regulação hormonal. A principal função, entretanto, parece ser a proteção do indivíduo contra ataques externos como de herbívoros ou de micro-organismos patogênicos ou mesmo da radiação solar.

A capacidade dos óleos essenciais de repelir e até eliminar os predadores naturais da planta suscitou a hipótese de que tais substâncias pudessem possuir atividade biológica também *ex situ*. Efetivamente muitos estudos já comprovaram

diversas atividades contra fungos, bactérias, vírus e insetos. Apesar disso, os óleos voláteis apresentam baixa toxicidade aos mamíferos em geral.

As crescentes preocupações ambientais e as descobertas das consequências à saúde de vários compostos sintéticos têm levado cada vez mais pesquisadores a investigar a possibilidade dos óleos essenciais substituírem, pelo menos em parte, pesticidas e defensivos agrícolas à base de organoclorados ou metais pesados. É nesse contexto que os óleos etéreos surgem como uma solução para o controle biológico de pragas tanto na lavoura como nos animais e até mesmo nas madeiras.

Atualmente os produtos utilizados para evitar o apodrecimento da madeira são substâncias tóxicas compostas por metais pesados como arsênio e cromo ou compostos orgânicos como o creosoto. Apesar de sua toxicidade, não é tarefa simples substituir os preservantes de madeira atualmente em uso. Já existem, todavia, vários estudos que avaliam o potencial e a eficiência de alguns produtos naturais nesse sentido. Substâncias como resinas ou extrativos de madeiras são exemplos de produtos que foram identificados como promissores caminhos para substituir os preservantes oleosos e hidrossolúveis.

Embora já existam inúmeras aplicações para os óleos essenciais e haja muito potencial de uso, há poucas informações sobre esses óleos e espécies brasileiras capazes de produzi-los. A ausência de informações é notória, especialmente quando se trata do Cerrado, um bioma extremamente heterogêneo e bastante diverso. Além da grande diversidade, o Cerrado é hoje considerado um *hot spot* e está cada vez mais ameaçado com o aumento das fronteiras agrícolas brasileiras. A literatura já descreve a existência e a composição de óleos de algumas plantas nativas do Cerrado, demonstrando o efetivo potencial desse bioma, porém, restam ainda muitas espécies e até famílias cuja capacidade de produzir óleos voláteis ainda é desconhecida, assim como, as possíveis atividades biológicas que tais substâncias podem apresentar.

O presente trabalho se justifica devido à ausência de informações sobre óleos essenciais do Cerrado. O conhecimento da existência, da composição e da atividade biológica de óleos voláteis do Cerrado pode trazer novas fontes para compostos relevantes e razões para incentivar a manutenção de áreas nativas de Cerrado.

Além disso, a possível descoberta de princípios ativos contra fungos apodrecedores de madeiras pode ser o início de pesquisas mais profundas no sentido de reduzir ou eliminar os tóxicos preservantes de madeira utilizados hoje em dia.

Por fim, ressalta-se que os capítulos 5 e 6 foram redigidos no formato de artigos científicos a fim de facilitar futuras publicações.

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral: O objetivo deste trabalho é extrair óleos essenciais de plantas nativas do Cerrado e avaliar a ação fungicida desses óleos em fungos xilófagos.

Objetivos específicos: Estabelecer um banco de dados com informações cromatográficas sobre a composição química de alguns óleos de plantas nativas do Cerrado. Avaliar a ação fungicida de alguns óleos essenciais a fim de subsidiar novas pesquisas no campo da conservação da madeira com produtos naturais.

3 - HIPÓTESE

Os óleos essenciais de plantas do Cerrado apresentam atividade fungicida contra fungos apodrecedores de madeira.

4 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 - ÓLEOS ESSENCIAIS

Durante muito tempo, a comunidade científica acreditou que os metabólitos secundários produzidos pelas plantas simplesmente não possuíam nenhuma utilidade para seus produtores. Muitos estudos, entretanto, demonstraram que essas substâncias não só têm uma função como sua presença é muitas vezes fundamental para o desenvolvimento do indivíduo (KUTCHAN, 2001). Um bom exemplo desse fato são os óleos essenciais.

Estes óleos podem ser definidos como um mistura de compostos voláteis originados do metabolismo secundário de plantas (BASER e DEMIRCI, 2007 e BURT, 2004). Tais substâncias são encontradas em diferentes partes do indivíduo tais como casca, folhas, flores e frutos (BURT, 2004), e podem apresentar odores agradáveis (IBRAHIM *et al.*, 2001). Formalmente apenas é considerado óleo essencial o produto obtido a partir de matéria-prima vegetal por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de frutas cítricas por processo mecânico ou por destilação a seco (ISO 9235, 1997). Quando se utiliza solventes orgânicos ou fluídos supercríticos, os produtos obtidos são comumente conhecidos como absolutos ou espíritos (SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013 e BASER e DEMIRCI, 2007).

4.2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química é talvez a mais complexa variável nos trabalhos com os óleos essenciais. Embora a pequena quantidade comumente obtida nas extrações de plantas (os rendimentos médios estão em torno de 0,2 a 0,7%), quando comparados à massa inicial úmida (CASTRO *et al.*, 2004), os óleos apresentam diversidade muito grande de constituintes. São comuns óleos nos quais são identificados mais de 60 compostos distintos (BURT, 2004 e CASTELO, DEL MENEZZI e RESCK, 2010). As classes mais encontradas são os fenilpropanoides, terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) e seus derivados oxigenados (ISMAN *et al.*, 2011 e SANGWAN *et al.*, 2001). Uma característica comum entre essas moléculas é o baixo peso molecular e a pouca variedade de átomos (basicamente hidrogênio, carbono e oxigênio). Também são conhecidos alguns compostos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre que conferem aos óleos odores característicos e geralmente desagradáveis ao homem (CARSON e HAMMER, 2011).

Os terpenoides, entendidos como os terpenos e seus análogos oxigenados, representam uma classe bastante variada e extensa de compostos. Eles são formados por várias unidades de isoprenos (C_5H_8) unidas, isso implica que os terpenoides seguem a razão de cinco átomos de carbono para oito, de hidrogênio quando não há insaturações (duplas ligações ou anéis). Esses compostos são subdivididos em algumas classes de acordo com o número de unidades de isopreno existentes. Os monoterpenos, espécie mais comum nos óleos essenciais, são isômeros compostos por duas unidades de isopreno, isto é, possuem 10 átomos de carbono. Os sesquiterpenos, por sua vez, são formados por três unidades, ou seja, 15 carbonos, enquanto, os diterpenos, os triterpenos e os tetraterpenos (carotenoides) são formados, respectivamente, por quatro, seis e oito unidades (CARSON e HAMMER, 2011). Existem ainda os norterpenos que são oriundos de uma clivagem específica de carotenos, resultando em compostos de 13 carbonos, mas que não são muito comuns nos óleos (BASER e DEMIRCI, 2007).

Tanto os triterpenos como os carotenoides são compostos muito pesados (elevado peso molecular) e, por essa razão, não são encontrados em óleos essenciais (CARSON e HAMMER, 2011). Apesar de não fazerem parte do escopo dos óleos essenciais, os triterpenos têm função relevante no metabolismo das plantas, pois fazem parte dessa classe os esteroides (CLAYDEN *et al.*, 2005).

Os fenilpropanoides, por outro lado, são consideravelmente menos variados do que os terpenos, porém, não menos importantes. Os fenilpropanoides são caracterizados

por um anel aromático ligado a uma hidroxila e a uma cadeia de três átomos de carbonos (BASER e DEMIRCI, 2007; CARSON e HAMMER, 2011). Geralmente, quando os fenilpropanoides estão presentes, eles ocorrem em quantidades significativas e tendem a ser os compostos majoritários (CARSON e HAMMER, 2011).

4.2.1 - Variabilidade na composição dos óleos

A composição química de cada óleo depende de uma grande variedade de fatores que vão desde as especificidades edafoclimáticas do local onde a planta se encontra até o método utilizado para a obtenção do produto. A literatura considera os tipos e as características do solo (macro e micro nutrientes), a disponibilidade hídrica e a intensidade luminosa como importantes fatores na determinação tanto da quantidade de óleo essencial produzida como de sua composição (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Outros fatores como clima, época do ano, localização geográfica do espécime, ataque de patógenos e fatores genéticos também influenciam no tipo de material obtido (CASTELO, DEL MENEZZI e RESCK, 2012 e FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Os fatores genéticos são especialmente importantes, Paula *et al.* (2011) estudaram diversos indivíduos de *Pimenta pseudocaryophyllus* em condições semelhantes e concluíram que as diferenças significativas na composição dos óleos (polimorfismo químico) só poderiam ser atribuídas a fatores genéticos (PAULA *et al.*, 2011). Conquanto o fator genético seja muito importante, essa conclusão deve ser avaliada com cuidado, visto que já foi comprovado que fatores ambientais exercem influência significativa na composição e quantidade dos óleos.

O estágio em que se encontra o indivíduo é outro fator que modifica de forma significativa o conteúdo dos metabólitos secundários. Provavelmente isso ocorre em virtude das necessidades da planta se modificar conforme a etapa de seu desenvolvimento (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Do ponto de vista prático, é consenso na literatura, a influência da forma de extração na composição química obtida (JALALI-HERAVI e PARASTAR, 2011). A hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor, os métodos mais comuns, são baseados em um princípio físico. Após a quebra das paredes celulares da planta pelo vapor e a liberação do óleo, este forma uma mistura heterogênea com a água. A pressão de vapor desse sistema é dada pela soma das pressões parciais de cada componente. Associado a isso, sabe-se que um líquido entra em ebulição na temperatura em que sua pressão de vapor se iguala à pressão externa (a atmosférica na maioria dos casos). O

vapor d'água, então, atua aumentando a pressão de vapor do sistema, permitindo que o óleo ebulir a uma temperatura abaixo daquela normalmente observada para a substância pura (TANDON, 2008). Essa peculiaridade traz consequências marcantes para os produtos obtidos por essa rota: 1) substâncias pouco voláteis como triterpenoides ($C_{30}H_{48}$), carotenoides ($C_{40}H_{64}$), flavonoides, alcaloides entre outros não são encontradas (SCHMIDT, 2010); 2) compostos com pressões de vapor menores são destilados mais rapidamente; 3) a temperatura adequada para gerar o vapor d'água é, às vezes, suficiente para degradar algumas moléculas mais sensíveis (DONELIAN *et al.*, 2009).

Embora tanto a hidrodestilação como a destilação por arraste de vapor sejam técnicas que utilizem água existem algumas diferenças entre elas. Na hidrodestilação, as folhas entram em contato direto com a água, enquanto, na destilação por arraste de vapor, o material da planta é colocado em um compartimento acima da água e apenas o vapor passa pelas folhas. Ao analisar os trabalhos científicos, observa-se que a hidrodestilação é a técnica mais comumente empregada nas investigações de composição química.

Adotando uma concepção mais ampla de óleos essenciais, é possível considerar também as extrações realizadas com solventes e fluidos supercríticos. Há uma série de referências que demonstram que as extrações com fluidos supercríticos ou solventes (extração acelerada, com auxílio de micro-ondas entre outras) geram resultados diferentes entre si ou quando comparadas com a destilação por arraste de vapor ou a hidrodestilação (TAM *et al.*, 2007; DONELIAN *et al.*, 2009 e ISSATIER *et al.*, 2013). A variação na solubilidade dos componentes do óleo em solventes orgânicos de polaridades distintas faz com que suas concentrações sejam diferentes em cada solvente, incluindo-se a água (SCHANEBERG e KHAN, 2002).

O tempo empregado em um determinado processo também é um fator que influencia a quantidade de óleo obtido e a sua composição. Cannon *et al.* (2013) mostraram que a porcentagem dos componentes principais de alguns óleos é modificada a medida que o tempo de destilação aumenta. Mimica-Dukic *et al.* (2003) também demonstraram a influência do tempo de destilação, tanto na quantidade de óleo obtida, quanto na sua composição. Ambos os trabalhos concluem que ocorrem mudanças na composição dos óleos devido a perdas de elementos mais voláteis durante longas extrações. Sabe-se ainda que terpenos com maior peso molecular como sesquiterpenos e diterpenos levam mais tempo para serem destilados, pois possuem menor pressão de

vapor e, por isso, a composição desses elementos na fase de vapor, durante a destilação, será sempre menor do que outros compostos mais voláteis (SCHMIDT, 2010).

Acredita-se que a influência do tempo seja reflexo principalmente do mecanismo de liberação dos óleos dos tricomas (glândulas de armazenamento) (MILOJEVIC *et al.*, 2013). Navarrete *et al.* (2011) mostraram que um pré-tratamento com micro-ondas é capaz de aumentar a eficiência de destilações de vapor, pois a radiação quebra as paredes dos tricomas liberando mais facilmente os óleos.

4.2.2 - Análise química da composição dos óleos

Como já mencionado, os óleos essenciais constituem uma mistura extremamente complexa. O conhecimento sobre a composição desses óleos avançou muito nos últimos anos em virtude do desenvolvimento e popularização das técnicas de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (DUDAREVA, PICHERSKY e GERSHENZON, 2004).

A metodologia para determinação dos compostos existentes em cada óleo e suas respectivas quantidades baseia-se na utilização de técnicas cromatográficas, ou seja, emprega-se uma coluna para separar os diversos compostos que são em seguida analisados quantitativamente por um detector.

Atualmente a caracterização química dos óleos essenciais emprega principalmente a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) embora sejam cada vez mais importantes técnicas de cromatografia bidimensionais (MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001; BROCHINI e LAGO, 2007 e JALALI-HERAVI e PARASTAR, 2011).

A CG-EM é uma ferramenta de análise poderosa, pois, além de fornecer o tempo de retenção dos diferentes constituintes da amostra, ainda provê informações sobre suas estruturas através dos espectros de massas gerados em cada pico. Espectros obtidos por ionização eletrônica apresentam elevado número de picos e reprodutibilidade bastante grande em razão da alta energia transferida pelos elétrons, da ordem de 70 eV, e em virtude a reduzida quantidade de variáveis envolvidas no processo (apenas temperatura e energia fornecida) (HÜBSCHMANN, 2009). A reprodutibilidade desses espectros permitiu a construção de bibliotecas comerciais de compostos como NIST/WPA/NIH e Wiley Registry of Mass Spectral Data (HÜBSCHMANN, 2009 e SHELLIE *et al.*, 2002). Com o advento das bibliotecas espectrais foram desenvolvidos procedimentos de busca que utilizam ferramentas estatísticas e computacionais para identificar os

compostos da amostra através da comparação do espectro de massas obtido experimentalmente com espectros de referência (SPARKMAN, PENTON e KITSON, 2011; HÜBSCHMANN, 2009 e STEIN, 1995).

Embora muito útil, a CG-EM não é suficiente para identificar inequivocamente os componentes de uma amostra, pois existem moléculas distintas com padrões de fragmentação bastante semelhantes como pode ser observado na Figura 4.1. Considerando que os óleos essenciais são constituídos de muitos isômeros, identificações inadequadas podem ser comuns.

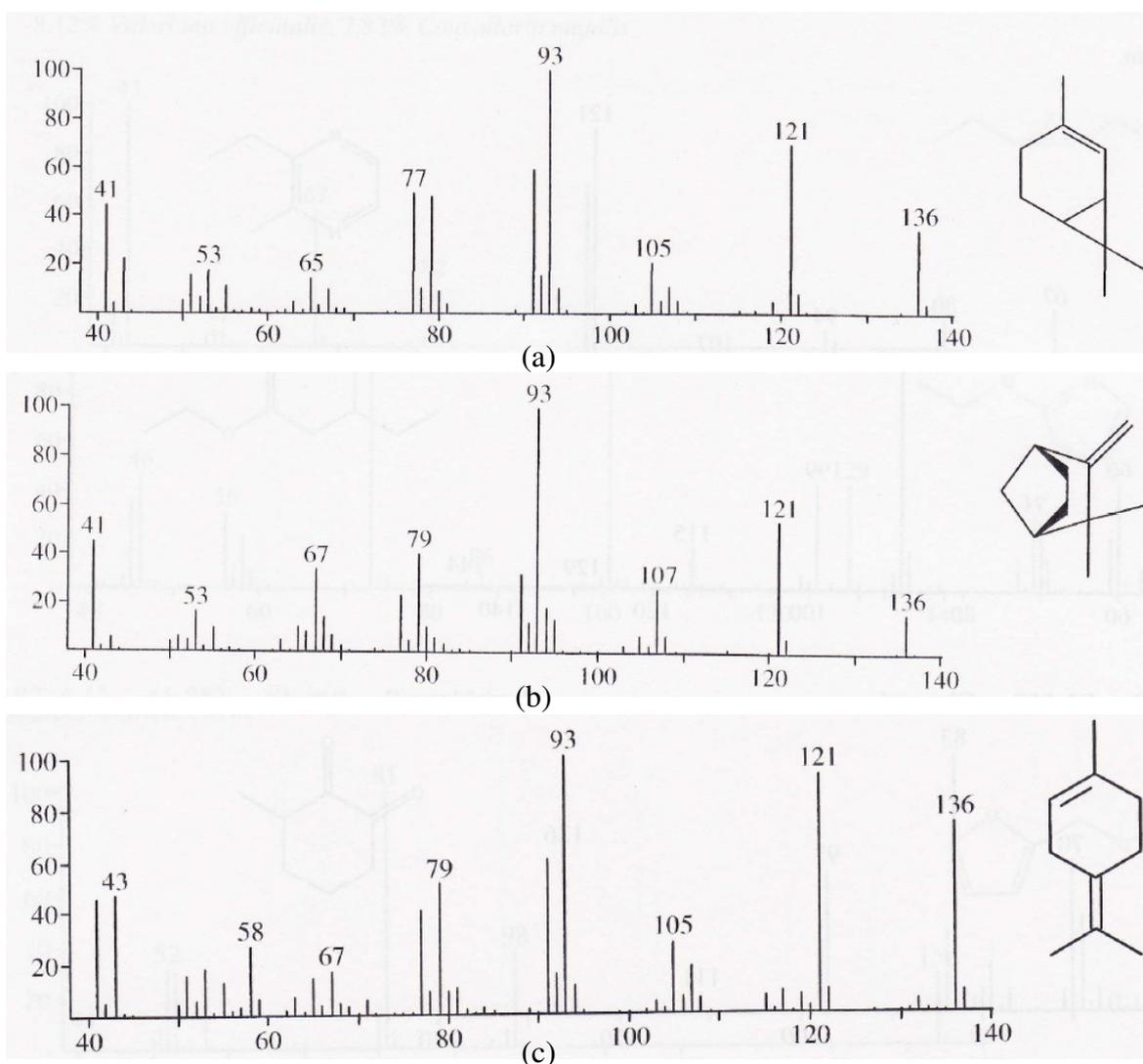


Figura 4.1 – Espectros de massa de δ -2-careno (a), canfeno (b) e terpinoleno (c) e suas respectivas estruturas. Fonte: Adams (2007)

No intuito de melhorar a confiança na identificação de compostos, os dados estruturais são analisados em conjunto com os índices de retenção. Com o

desenvolvimento da cromatografia, percebeu-se que as variações instrumentais impediam uma reprodutibilidade confiável dos tempos de retenção de um mesmo composto, isto é, dois laboratórios com cromatógrafos idênticos, utilizando a mesma metodologia e os mesmos reagentes obteriam tempos de retenção distintos. O tempo de retenção varia com o comprimento da coluna, a composição química e a espessura da fase estacionária, as temperaturas de operação, o fluxo e o tipo de gás carreador (CASTELLO, 1999).

Para contornar esse problema, vislumbrou-se a possibilidade de se medir o tempo de retenção de um composto em relação a uma substância padrão. Gera-se, então, uma grandeza cujo valor pode ser comparado entre instrumentos diferentes. Tal grandeza são os chamados índices de retenção. Em 1958, Kovats percebeu que, em eluições isotérmicas, existia uma relação linear entre o número de átomos de carbono de uma série homóloga de n-alcenos e o logaritmo do tempo de retenção ajustado (tempo de retenção real menos o tempo de retenção do gás carreador) conforme observado na Figura 4.2 (SPARKMAN, PENTON e KITSON, 2011).

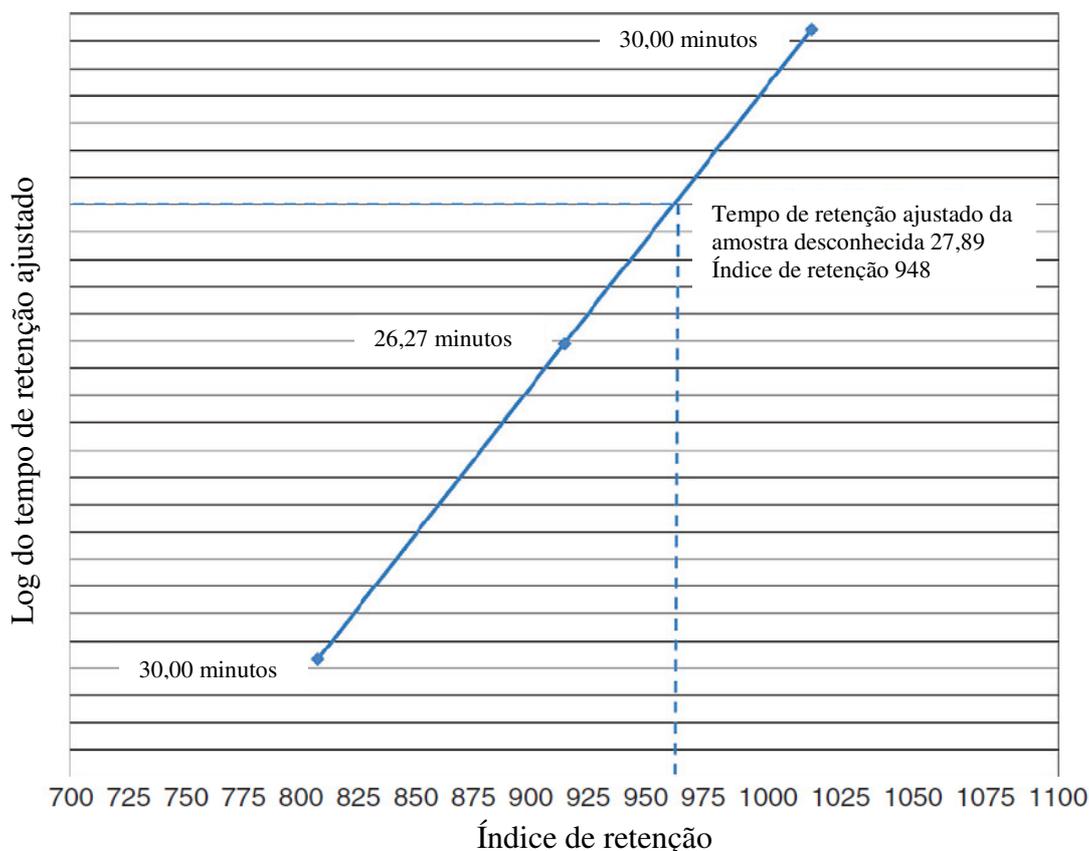


Figura 4.2 – Relação linear entre o logaritmo do tempo de retenção ajustado e os índices de retenção. Fonte: Sparkman, Penton e Kitson (2011) com modificações.

Kovats definiu, então, os índices para os n-alcenos como o número de átomos de carbono multiplicados por 100 (MUHLEN e MARRIOTT, 2011). Dessa forma, a partir da eluição de dois n-alcenos, n-octano (c) e n-nonano (c+1), por exemplo, era possível determinar um índice para uma substância qualquer, através da equação 4.1, desde que um dos padrões fosse eluído antes e o outro, depois, conforme observado na Figura 4.3.

$$IK = 100n + 100 \frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \quad (4.1)$$

Onde:

IK = índice de retenção de Kovats;

$t'_{R(i)}$ = tempo de retenção ajustado do composto desconhecido;

$t'_{R(n)}$ = tempo de retenção ajustado do n-alceno eluído antes do composto desconhecido;

$t'_{R(n+1)}$ = tempo de retenção ajustado do n-alceno eluído depois do composto desconhecido;

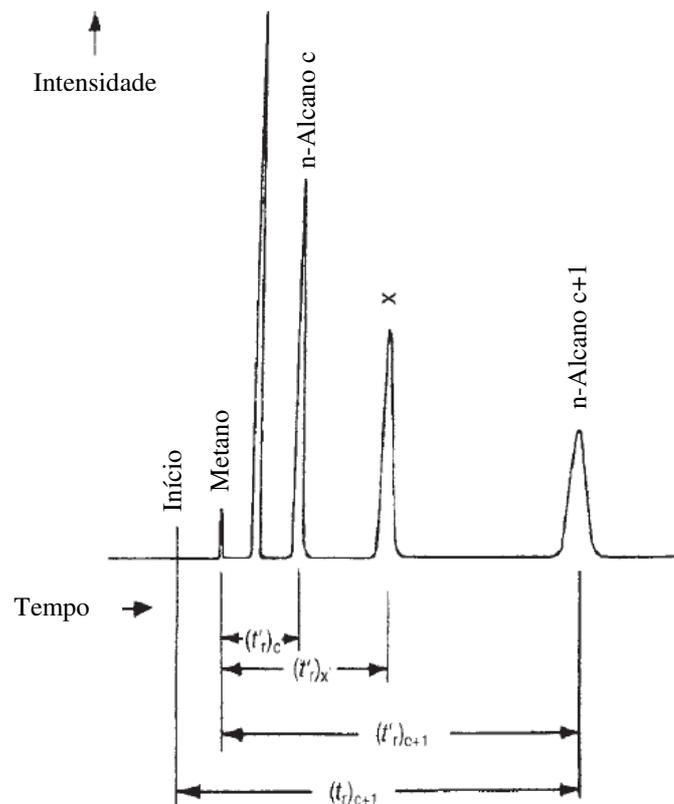


Figura 4.3 – Determinação do índice de retenção de uma substância desconhecida (X) através da interpolação dos tempos de retenção. Fonte: Hübschmann (2009) com modificações.

No caso de óleos essenciais, são empregadas eluições com gradiente de temperatura. Nesse caso, os índices de Kovats não podem ser utilizados, pois a relação de linearidade não é observada. Van den Dool e Kratz (1963) constataram, no entanto, que o tempo de retenção (e não o logaritmo) podia ser diretamente empregado no cálculo dos índices de retenção quando houvesse um gradiente de temperatura. Define-se, assim, índice de retenção como o tempo de retenção de um composto normalizado pelo tempo de retenção de dois n-alcenos eluídos adjacientemente através da equação 4.2 (MUHLEN e MARRIOTT, 2011 e CASTELLO, 1999):

$$IRL = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \quad (4.2)$$

Onde:

IRL = índice de retenção linear;

$t_{R(i)}$ = tempo de retenção do composto desconhecido;

$t_{R(n)}$ = tempo de retenção do n-alceno eluído antes do composto desconhecido;

$t_{R(n+1)}$ = tempo de retenção do n-alceno eluído depois do composto desconhecido;

Os índices de retenção, após determinados, são comparados com valores de tabelas de referência (HÜBSCHMANN, 2009). Esses índices estão fortemente ligados à polaridade da coluna, ou seja, um composto eluído em uma coluna do tipo DB-5 necessariamente apresentará um índice de retenção diferente se eluído em uma coluna DB-Wax (BIANCHI *et al.*, 2007). Ao contrário dos índices de Kovats, os índices de retenção linear podem variar com as condições operacionais como o fluxo do gás carreador ou a programação de temperatura, assim, é importante que as condições experimentais sejam sempre as mesmas e iguais àquelas empregadas na referência utilizada para comparações (ZHAO *et al.*, 2005).

Além da cromatografia, outras técnicas de análise instrumental também podem ser utilizadas para a identificação da composição dos óleos essenciais. A ressonância magnética nuclear (RMN) é especialmente útil para atribuição da estrutura e da configuração espacial de moléculas ainda não conhecidas, situação muito corriqueira quando se trabalha com a família dos sesquiterpenos (BROCHINI e LAGO, 2007 e KONIG, BÜLOW e SARITAS, 1999). Infelizmente o emprego de RMN exige a realização de corridas cromatográficas preparativas, que demandam equipamentos

sofisticados, e uma série de cuidados ao isolar as amostras, ou seja, é um procedimento complexo e dispendioso.

As especificidades das técnicas de CG-EM não permitem, no entanto, a quantificação dos componentes nos óleos essenciais (BICCHI *et al.*, 2008). Para tal são necessários detectores com amplo intervalo de resposta linear e alta sensibilidade, em razão da necessidade de quantificação de elementos traços. Atualmente os detectores de ionização de chama são os mais utilizados na análise quantitativa de óleos essenciais (BICCHI *et al.*, 2008).

4.3 - BIOATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Devido à imensa variedade de compostos, os óleos essenciais, e os metabólitos secundários como um todo, têm uma extensa gama de efeitos e atividades tanto para as plantas que os originam como para os animais e seres humanos que entram em contato com essas substâncias. A função dos óleos essenciais nas plantas já é conhecida e acredita-se que essas moléculas sejam responsáveis pelas interações da planta com outros seres vivos (CHOU, 2006), pela regulação hormonal e da expressão gênica e principalmente pela proteção do indivíduo contra ataques externos (KUTCHAN, 2001 e FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Um belo exemplo da interação benéfica entre plantas e insetos é observado durante a reprodução daquelas. Durante a etapa de floração muitas espécies liberam substâncias voláteis capazes de simular o aroma de alimentos ou do parceiro do inseto atraindo o polinizador que carrega o pólen de uma planta para outra e permite a reprodução sexuada dos vegetais (KLIEBENSTEIN, 2004 e DUDAREVA e PICHERSKY, 2000). Alguns compostos originados do metabolismo secundário já foram identificados como responsáveis pela transdução de genes (KUTCHAN, 2001), regulação da produção de vitaminas e enzimas (STWEART, 2006) e longevidade e dormência de sementes (BEDNAREK e OSBOURN, 2009).

As plantas, ao contrário dos animais, não podem se deslocar ou modificar sua posição tornando-se assim muito suscetíveis às intempéries do ambiente e ao ataque de patógenos e herbívoros. Com o intuito de se proteger, as plantas desenvolveram grande quantidade de compostos dentre eles os óleos essenciais. Estes podem bloquear e absorver a radiação ultravioleta (KLIEBENSTEIN, 2004), inibir o crescimento de outros indivíduos reduzindo a competição local (KNAAK e FUIZA, 2010), repelir e matar herbívoros (ISMAN, 2000). Turlings, Tumlinson e Lewis (1990) demonstraram

uma situação bastante interessante: espécies de milho, quando atacadas por lagartas, liberam grande quantidade de terpenos que atraem uma determinada espécie de vespa, sendo esta a predadora natural da lagarta. A literatura é muito rica na descrição de óleos essenciais com atividade biológica contra insetos (ISMAN, MIRESMAILLI e MACHIAL, 2011), bactérias (BURT, 2004) e fungos (NAGHETINI, 2006; SINGH e SINGH, 2012; GRAIKOU *et al.*, 2012 e BOULOGNE *et al.*, 2012), seja de forma direta ou indireta (BALDWIN *et al.*, 2001). Em virtude dessa característica é cada vez maior o emprego de óleos essenciais como substitutos de pesticidas sintéticos principalmente nas culturas orgânicas (ISMAN, 2006).

4.3.1 - Óleos essenciais e a preservação de madeiras

No contexto atual de poluição do meio ambiente por elementos de origem antrópica, o combate a fungos e outras pragas com óleos essenciais é bastante promissor devido a sua baixa toxicidade ao homem e aos animais (ISMAN, 2008). Além disso, os princípios ativos serão biodegradáveis e, portanto, não permanecerão no meio ambiente por longos períodos (HÜTER, 2011). O combate a fungos xilófagos, especialmente, enquadra-se nessa situação, pois os preservantes hoje utilizados em madeiras, tanto inorgânicos (arseniato de cobre cromatado, CCA, ou arseniato de cobre amoniacal, ACA, por exemplo) como orgânicos (creosoto ou pentaclorofenol entre outros), possuem toxicidade elevada (BRAND, ANZALDO e MORESCHI, 2006). Alguns preservantes de madeira como o CCA já são proibidos nos Estados Unidos e na Europa para alguns usos mais restritivos (IBACH, 2005).

A preservação de madeiras com produtos naturais ainda é muito incipiente esbarrando, sobretudo, na falta de estudos a respeito da viabilidade econômica (BRAND, ANZALDO e MORESCHI, 2006). Observa-se que os principais esforços estão concentrados nos extrativos de madeira, todavia, existem alguns resultados com óleos essenciais que podem ser considerados promissores (SINGH e SINGH, 2012).

CHENG *et al.* (2006) avaliaram a atividade contra fungos apodrecedores dos óleos essenciais de nove linhagens de *Cinnamomum osmopholeum* existentes em Taiwan. Os pesquisadores observaram que as linhagens com maiores concentrações de cinamaldeído e acetato de cinamila apresentaram excelente atividade fungicida (CHENG *et al.*, 2006).

Cheng *et al.* (2008) analisaram o efeito do cinamaldeído, eugenol (figura 4.4) e seus congêneres e identificaram que, além dos dois compostos originais, α -metil-

cinamaldeído, ácido (E)-metilcinâmico, e isoeugenol também exibiram significativa capacidade de inibir o crescimento de fungos xilófagos (*Lenzites betulina* e *Laetiporus sulphureus*). O estudo conseguiu mostrar ainda que a lipofilicidade, a presença de grupos aldeído e ácido, duplas ligações conjugadas e o tamanho da cadeia carbônica fora do anel aromático influenciavam na atividade dos compostos (CHENG *et al.*, 2008). O ácido cinâmico, o ácido ferúlico e o cinamaldeído também foram identificados por Kartal *et al.* (2006) como eficientes na prevenção da degradação de madeira. Os dois primeiros, no entanto, só se mostraram eficazes contra o fungo da podridão branca, *Trametes versicolor*.



Figura 4.4 – Estrutura química do cinamaldeído (a) e eugenol (b)

Yang e Clausen (2007) constataram que os óleos essenciais de algumas plantas como tomilho, gerânio do Egito e alecrim possuíam poder fungicida contra algumas espécies de mofos. O mais eficaz foi o óleo de tomilho cujo componente principal é o timol, um monoterpene com grupo fenol (YANG e CLAUSEN, 2007). Oliveira *et al* (2007) já identificaram que o óleo de *Lippia origanoides* tem ação contra fungos. Tal óleo apresenta em sua composição principalmente carvacrol e timol cujas estruturas químicas podem ser observadas na figura 4.5 (OLIVEIRA *et al.*, 2007).



Figura 4.5 – Estrutura química do carvacrol (a) e timol (b).

Em uma abordagem mais prática, Chittenden e Singh (2011) realizaram testes de durabilidade com blocos de madeira utilizando cinamaldeído e eugenol. Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que esses fenilpropanoides previnem a ação dos

fungos, porém, notou-se grande lixiviação demonstrando que ainda são necessárias soluções técnicas para permitir testes de campo (CHITTENDEN e SINGH, 2011)

Além dos compostos citados, há indícios que uma classe de sesquiterpenoides, os cadinanos, apresenta atividade biológica contra fungos apodrecedores de madeira. Chang *et al.* (2000) mostraram que α -cadinol, T-cadinol e T-muurolol extraídos da *Taiwania cryptomerioides* (Hayata) inibiram o crescimento de *Trametes versicolor* e *L. sulphureus*. Corroborando esses resultados, Cheng *et al.* (2004) também observaram que os sesquiterpenos α -cadinol e T-muurolol se mostraram eficientes no combate a fungos xilófagos (*Lenzites betulina*, *Pycnoporus coccineus*, *T. versicolor* e *Laetiporus sulphureus*), porém, os autores relataram que muitos outros compostos (limoneno, α -pineno, β -pineno, β -mirceno e β -cariofileno) não apresentaram nenhuma atividade.

4.4 - ÓLEOS ESSENCIAIS NO CERRADO

Apesar da importância dos óleos essenciais, estes recursos ainda permanecem desconhecidos em muitos biomas, entre eles o Bioma Cerrado. Embora a savana brasileira seja considerada um *hot spot* e um bioma megadiverso, pouco ainda se têm estudado sobre os óleos obtidos das folhas, frutos, flores das muitas espécies do Cerrado (CASTELO, DEL MENEZZI e RESCK, 2010).

A exploração comercial de OE seria uma ótima maneira de incentivar o extrativismo vegetal sustentável, pois, na maioria dos casos, não é necessário o abate do indivíduo vegetal para retirar os elementos dos quais serão extraídos os óleos (folhas, flores, frutos, casca).

Uma das grandes discussões em voga atualmente diz respeito à manutenção e à recuperação das áreas de reserva legal no país. De acordo com o Código Florestal Brasileiro, a reserva legal é definida como a “área localizada no interior de uma propriedade ou posse rural (...) com a função de assegurar o uso econômico de modo sustentável dos recursos naturais do imóvel rural, auxiliar a conservação e a reabilitação dos processos ecológicos e promover a conservação da biodiversidade, bem como o abrigo e a proteção de fauna silvestre e da flora nativa” (BRASIL, 2012). A lei informa ainda que, no bioma Cerrado, 20% da propriedade rural não podem ser suprimidas, a título de reserva legal.

Dados levantados pelo Instituto de Economia Agrícola do estado de São Paulo (IEA) mostram que a recuperação de todas as áreas de reserva legal desse ente da federação representaria, em 2006, um montante de R\$ 14,8 bilhões (equivalente a 3,7

milhões de hectares) e perdas da ordem de R\$ 5,6 bilhões em terras que deixariam de ser produtivas à agricultura ou à pecuária (GONÇALVES, 2006). Esses números evidenciam um dilema vivido pela sociedade brasileira: de um lado estão os ambientalistas e a própria sociedade que se beneficia dos serviços ambientais prestados pela preservação de áreas nativas; enquanto que, do outro lado, encontram-se os produtores rurais que têm que arcar com custos de manutenção e de opção sem poder repassar isso aos preços de seus produtos.

Segundo Aquino *et al.* (2007), apesar de várias espécies da flora do Cerrado se destacarem como medicinais ou alimentícias, faltam ainda estudos profundos que permitam a utilização dessas plantas em todo seu potencial. Associada a isso, observa-se que a expansão da agropecuária e a desordenada coleta de frutas e sementes na região do Cerrado causam perdas na variabilidade genética de muitas espécies (POTZERNHEIM *et al.*, 2012). Conseqüentemente, têm-se um cenário pouco propício para a conservação das plantas aromáticas do Cerrado.

5 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO CERRADO

5.1 - INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando mais de 2.000.000 km², ou seja, aproximadamente 22% do território brasileiro (BRASIL, 2013). O Cerrado recobre vários estados na região central do Brasil principalmente Goiás, Distrito Federal, Tocantins e Minas Gerais, além da existência de algumas regiões disjuntas incrustadas no interior de outros biomas como a Floresta Amazônica (RIBEIRO e WALTER, 2008).

Embora seja classificado como uma savana tropical, o Cerrado apresenta 11 fitofisionomias diferentes que incluem formações florestais, savânicas propriamente ditas e campestres (RIBEIRO e WALTER, 2008).

A existência de diversas fitofisionomias proporciona um intrincado mosaico de ecossistemas e permite um grande endemismo das espécies do Cerrado (AGUIAR, MACHADO e MARINHO-FILHO, 2004). Estima-se que haja 12.356 espécies da flora nativas do Cerrado (MENDONÇA *et al.*, 2008). Segundo Klink e Machado (2005), 44% da flora aqui existente é endêmica, o que torna o Cerrado a savana tropical mais biodiversa do planeta. Aguiar *et al.* (2004) apontam que essa grande diversidade biológica deve-se também ao fato de, em épocas remotas, o Cerrado ter ocupado áreas distintas daquela que ocupa hoje, às vezes invadindo áreas das Florestas Amazônica e Atlântica, às vezes sendo invadido por esses biomas. Essa interação resultou em um intenso fluxo gênico.

Apesar de toda essa riqueza e dos benefícios econômicos e sociais que isso pode trazer, o Cerrado é hoje considerado um dos *hot spots* da biodiversidade em virtude sobretudo da agropecuária que, atraída por baixos custos e políticas públicas de incentivo, já consumiu mais da metade das terras do Cerrado (KLINK e MACHADO, 2005 e KLINK *et al.*, 2008).

O avanço indiscriminado da agropecuária negligencia os benefícios que a manutenção de parte da vegetação original pode proporcionar. Além de permitir a continuidade dos serviços ambientais, a preservação da fauna e da flora nativas possibilita a utilização de plantas de usos múltiplos que podem agregar renda à propriedade como a comercialização de pequi, gueroba e baru (AQUINO *et al.*, 2008).

Dentre as várias utilizações para a flora destaca-se no cenário mundial o emprego de plantas na produção de óleos essenciais.

Óleo essencial é definido como o produto obtido a partir de matéria-prima vegetal por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de frutas cítricas por processo mecânico ou por destilação a seco (ISO 9235, 1997). Embora a definição formal esteja atrelada ao modo de obtenção do óleo, existem outros métodos de extração das substâncias aromáticas de plantas tais como extração por solvente, por fluídos supercríticos e com o auxílio de micro-ondas (ISSATIER *et al.*, 2013 e BASER e DEMIRCI, 2007).

Segundo Aquino *et al.* (2007), apesar de várias espécies da flora do Cerrado se destacarem como medicinais ou alimentícias, faltam ainda estudos profundos que permitam a utilização dessas plantas em todo seu potencial. Os óleos essenciais não fogem a essa regra. Apesar de crescente, o conhecimento sobre plantas aromáticas do Cerrado ainda é incipiente.

Ao pesquisar trabalhos recentes sobre plantas aromáticas no Cerrado (2003-2014), identificou-se o estudo de 52 espécies diferentes conforme mostrado na Tabela 5.1.

Observou-se que a maior parte dos estudos se concentra nas famílias Lamiaceae e Myrtaceae envolvendo vários gêneros como *Hyptis*, *Hypenia*, *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium*. Outras famílias como Asteraceae, Piperaceae e Verbenaceae também aparecem como importantes produtoras de óleo. Pode-se destacar os gêneros *Lychonopohora* e *Baccharis* (Asteraceae), *Piper* (Piperaceae) e *Lippia* (Verbenaceae).

As plantas aromáticas do Cerrado geralmente apresentam porte herbáceo ou arbustivo, no entanto, também existem algumas espécies arbóreas principalmente na família Myrtaceae como a *Blepharocalyx salicifolius* e *Eugenia dysenterica*. De forma geral, o rendimento de plantas nativas é baixo, porém, em alguns casos, o rendimento pode ser maior que 2% como nos óleos de *Hyptis passerina* (ZELLNER *et al.*, 2009) e de frutos de *Pterodon emarginatus* (ALVES *et al.*, 2013).

Tabela 5.1 – Plantas do Cerrado produtoras de óleo essencial e seus principais constituintes químicos relacionadas na literatura.

Espécie	Principais constituintes	Referência
<i>Baccharis reticularia</i> A.DC.	α -pineno, β -felandreno, e biciclogermacreno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2012a)
<i>Bidens graveolens</i> Mart.	α -pineno, sabineno, β -pineno, δ -3-careno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2012b)
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	<i>p</i> -cimeno, γ -terpineno α -pineno, aromadendrene, globulol e óxido de cariofileno	(COSTA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg	Cariofileno e limoneno	(VALLILO <i>et al.</i> , 2006)
<i>Caryocar brasiliensis</i> Cambess.	Hexanoato de etila, hexanoato de isopropila e 2-metil-butanoato de isopentila	(GEÖCZE <i>et al.</i> , 2013)
<i>Duguetia furfuracea</i> (A.St.-Hil.) Benth. & Hook.f.	Sabineno, β -felandreno, biciclogermacreno e espatulenol	(VALTER <i>et al.</i> , 2008)
<i>Eugenia dysenterica</i> Mart. Ex DC	β -pineno, α -pineno, δ -cadineno, γ -cadineno, limoneno e β -cariofileno	(DUARTE <i>et al.</i> , 2009) e (DUARTE <i>et al.</i> , 2010)
<i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg	epi-longipinanol, γ -eudesmol, 10-epi- γ -eudesmol e 1,10-di-epi-cubenol	(MORAES <i>et al.</i> , 2012)
<i>Hesperozygis myrtoides</i> (A.St.Hil.) Epling	Limoneno, isomentona, pulegona e acetato de isomentila	(CASTILHO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Hypenia aristulata</i> (Epling) R.Harley	Espatulenol e selin-11-4 α -ol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia brachystachys</i> (Pohl ex Benth.) R.Harley	Citronelol, espatulenol e selin-11-4 α -ol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)

<i>Hypenia crispata</i> (Pohl ex Benth.) R.Harley	Germacreno D e espatulenol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia durifolia</i> (Epling) R.Harley	Germacreno D, espatulenol e óxido de cariofileno	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia glauca</i> (St.-Hill. ex Benth.) R.Harley	Germacreno D e espatulenol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia macrantha</i> (St.-Hil. ex Benth.) R.Harley	Germacreno D, espatulenol e selin-11-4 α -ol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia macrosiphon</i> (Briquet) R.Harley	β -cariofileno, germacreno D, espatulenol e óxido de cariofileno	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia marifolia</i> (Benth. In DC) R.Haley	Neo-isopulegol, citronelol e óxido de cariofileno	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia niquelandiense</i> R.Atkinson	Citronelol, geraniol e germacreno D	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia paradisi</i> (R.Harley) R.Harley	Espatulenol e óxido de cariofileno	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia reticulata</i> (Mart. Ex Benth.) R.Harley	Espatulenol, óxido de cariofileno e selin-11-4 α -ol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia sphaerocephala</i> (R. Atkinson) R.Harley	β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hypenia subrosea</i> (R.Harley) R.Harley	Espatulenol, óxido de cariofileno e selin-11-4 α -ol	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)

<i>Hyptidendron canum</i> (Pohl ex Benth.) R.Harley	β -cariofileno, amorfa-4,7(11)-dieno e biciclogermacreno	(FIUZA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Hyptis conferta</i> Pohl ex Benth.	T-cadinol, α -bisabolol, germacreno D e β -pineno	(FERREIRA, E. C., <i>et al.</i> , 2005)
<i>Hyptis lythroides</i> Pohl ex Benth.	Espatulenol, β -pineno, biciclogermacreno e hidrato de (<i>E</i>)-sesquisabineno	(SILVA, R. F., <i>et al.</i> , 2013a)
<i>Hyptis marrubioides</i> Epling	Cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, epi-longipinanol e β -cariofileno	(SALES <i>et al.</i> , 2007)
<i>Hyptis ovalifolia</i> Benth.	(R)-6-[(z)-1-heptenila]-5,6-diidro-2H-piranona, viridiflorol, γ -cadineno	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004)
<i>Hyptis passerina</i> Mart. Ex Benth.	β -epi-acorenol, espatulenol e biciclogermacreno	(ZELLNER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Hyptis spicigera</i> Lam.	α -pineno, 1,8-cineol e β -pineno	(TAKAYAMA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Hyptis suaveolens</i>	Sabineno, limoneno, 1,8-cineol, β -cariofileno e espatulenol	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005)
<i>Hyptis velutina</i> Pohl ex Benth	β -cariofileno, biciclogermacreno, γ -muuroleno	(BATISTA <i>et al.</i> , 2003)
<i>Hyptis villosa</i> Pohl ex Benth.	espatulenol, kessano, epi- α -cadinol e biciclogermacreno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	α -selineno, α -humuleno, biciclogermacreno e germacreno D	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013c)
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	Linalol, germacreno D e biciclogermacreno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013d)
<i>Lippia stachyoides</i> var. <i>martiana</i> (Schauer) Salimena & Múlgura	(<i>E</i>)-nerolidol, δ -cadineno, espatulenol e óxido de cariofileno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013e)
<i>Lychnophora ericoides</i> Mart.	α -bisabolol; <i>o</i> -cimeno; óxido de cariofileno e δ -elemeno	(LYRA <i>et al.</i> , 2008)
<i>Memora nodosa</i> (Manso) Miers	benzaldeído e 1-octen-3-ol	(TRESVENZOL <i>et al.</i> , 2010)
<i>Myrcia linearifolia</i> Cambess.	β -pineno, α -pineno e <i>p</i> -menta-2,4(8)-diene	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013f)
<i>Myrcia tomentosa</i> (Aubl.) DC.	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-metil fanesoato, ácido hexadecanóico e biciclogermacreno	(SÁ <i>et al.</i> , 2012)

<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Allemão)	β -mirceno, β -cariofileno e linalol	(COSTA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	Geranial; neral; (<i>E</i>)-asarona, eugenol, (<i>E</i>)-metil isoeugenol e chavibetol	(PAULA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Piper aduncum</i> L.	4-terpineol; piperitona e dilapiol	(POTZERNHEIM <i>et al.</i> , 2012)
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	Biciclogermacreno; 10-epi- γ -eudesmol e óxido de cariofileno	(POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA 2006)
<i>Piper dilatatum</i> L.C.Rich	<i>cis</i> - β -ocimeno e β -cariofileno	(POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA 2006)
<i>Piper hispidum</i> Sw.	β -pineno e α -pineno	(POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA 2006)
<i>Piper xylosteoides</i> (Kunth) Steudel	Mirceno e γ -terpineno	(POTZERNHEIM <i>et al.</i> , 2006)
<i>Porophyllum angustissimum</i> Gardner	Mirceno, dodecanal e limoneno	(FERREIRA, R. <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (Spreng.) R.M.King & H.Rob.	Terpinen-4-ol, γ -terpineno e α -terpineno	(SILVA, R. F. <i>et al.</i> , 2013g)
<i>Psidium myrsinites</i> DC	Mirceno, óxido de carifileno, β -cariofileno, β -guaiano, α -humuleno e viridiflorol	(CASTELO; DEL MENEZZI; RESCK, 2012)
<i>Psidium myrsinoides</i> O. Berg	β -cariofileno e óxido de cariofileno	(FREITAS <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	γ -muuroleno, biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e β -elemeno	(SANTOS <i>et al.</i> , 2010) e (ALVES <i>et al.</i> , 2013)
<i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hil.	β -cariofileno, γ -muuroleno, biciclogermacreno e δ -cadineno	(GALDINO <i>et al.</i> , 2012) e (CHAIBUB <i>et al.</i> , 2013)

Ao analisar a composição dos óleos essenciais listados acima, observa-se que predominam terpenos e terpenoides. Estes, por sua vez, compostos principalmente por alcoóis e epóxidos, pois não foram encontrados muitos componentes com grupos cetona ou aldeído. Como exceção nota-se os óleos de: *Hesperozygis myrtooides* que apresenta elevadas concentrações de pulegona e isomentona na época seca (CASTILHO *et al.*, 2013); *Porophyllum angustissimum* com dodecanal (FERREIRA, R. *et al.*, 2012); *Piper aduncum* com piperitona (POTZERNHEIM *et al.*, 2012); *Memora nodosa* com benzaldeído (TRESVENZOL *et al.*, 2010) e *Hyptis ovalifolia* com (R)-6-[(z)-1-heptenila]-5,6-diidro-2H-piranona (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais de plantas de uma mesma família ou até de um mesmo gênero não mostraram semelhanças significativas na maioria dos casos, corroborando as conclusões de Imatomi *et al.* (2013) de que a produção de metabólitos secundários não segue padrões por gênero ou família.

Percebe-se, através da tabela 5.1, que as espécies estudadas demonstraram uma preferência pelas rotas metabólicas do ácido mevalônico e da deoxi-xilulose em detrimento daquela do ácido chiquímico. Apenas as espécies *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Piper aduncum* apresentaram concentrações significativas de fenilpropanoides em seus óleos. Ambas as espécies, no entanto, possuem grande variabilidade, visto que Paula *et al.* (2011) e Potzernheim *et al.* (2012) mostraram que tanto a *P. pseudocaryophyllus* como a *P. aduncum*, respectivamente, possuem populações, no Cerrado, com quimiotipos distintos em que há predomínio de fenilpropanoides em alguns e de terpenos em outros.

A análise da composição de todos os óleos citados permite inferir que os sesquiterpenos são mais frequente que os monoterpenos em especial os isômeros de cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol e germacreno. Tal característica torna a identificação dos componentes desses óleos essenciais bastante difíceis em alguns casos, em razão da inexistência de padrões (produzidos comercialmente) de vários sesquiterpenos. Além disso, há grande quantidade de isômeros (muito maior do que nos monoterpenos) que muitas vezes coeluem e apresentam espectros de massa e índices de retenção praticamente idênticos tornando impossível a correta identificação sem a utilização de técnicas de ressonância magnética ou de separações cromatográficas em colunas especiais (por exemplo separações enantioméricas) (KONIG, BÜLOW e SARITAS, 1999) e (ZELLNER *et al.*, 2010).

Apesar de o Cerrado ser um bioma com grande endemismo, existem muitas espécies nativas que possuem dispersão em vários outros biomas brasileiros e até em outros locais do mundo. Potzhernheim, Bizzo e Vieira (2006) mostraram, em um estudo com o gênero *Piper*, que espécies iguais, existentes tanto no bioma Cerrado como na Floresta Atlântica, fornecem óleos essenciais com características diferentes. Tais diferenças originam-se tanto de fatores ambientais como genéticos (POTZHERNHEIM, BIZZO e VIEIRA, 2006). Dessa forma, seria interessante caracterizar adequadamente a região de onde os indivíduos foram coletados, pois existem estados como Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, entre outros que estão inseridos em áreas de fronteiras entre biomas (IBGE, 2004) e, como já explicado, uma espécie em uma bioma pode não ter as mesmas características em outro. Considerando ainda a grande quantidade de fitofisionomias presentes no Cerrado e os efeitos que os fatores ambientais podem exercer nos óleos (SANGWAN *et al.*, 2001), julga-se importante inclusive a descrição da fitofisionomia dominante na área de forma a caracterizar todos os elementos que podem influenciar quantitativa e qualitativamente os óleos. Futuramente pode-se avaliar o efeito que a fitofisionomia tem sobre as plantas, visto que há espécies que ocupam diferentes *habitats*.

O Cerrado como um todo é uma fonte rica em metabólitos bioativos. Existem muitas espécies identificadas como inseticidas, bactericidas, fungicidas e até moluscicidas (NOVAES *et al.*, 2013). Embora as pesquisas concentrem-se na avaliação de extratos aquosos ou alcoólicos, alguns óleos essenciais já são conhecidos por suas atividades biológicas. O óleo da *Hyptis passerina* apresentou ação contra bactérias (tanto Gram-positivas como Gram-negativas) e fungos (ZELLNER *et al.*, 2009). Santos *et al.* (2010) mostraram que o óleo extraído das folhas de *Pterodon emarginatus* era capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O óleo da *Spiranthera odoratissima* demonstrou um efeito semelhante a ansiolíticos em camundongos (GALDINO *et al.*, 2012). A Arnica do Cerrado (*L. ericoides*) é talvez a espécie mais comumente conhecida em virtude de suas propriedades medicinais (LYRA *et al.*, 2008).

O presente trabalho pretende continuar os estudos de bioprospecção de plantas aromáticas no Cerrado com o intuito de agregar valor e ampliar o conhecimento sobre essas espécies. Assim futuramente será possível tanto a utilização comercial como a melhor preservação desse bioma tão rico e tão ameaçado.

5.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 - Coleta das espécies

Foram utilizadas duas espécies para treinar a metodologia de extração: alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth) e craveiro (ou cravo) (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry).

Folhas de alecrim-pimenta foram coletadas em maio de 2013 nas dependências da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) localizada em Brasília, Distrito Federal.

Para a obtenção do óleo de cravo foram utilizados botões secos de suas flores adquiridos no mercado local.

Após devidamente conhecida a metodologia, foram coletadas folhas e inflorescências de cinco espécies nativas do Cerrado: *Psidium myrsinites* Mart. ex DC. (Araçá-bravo), *Hyptis* sp., *Hyptis saxatilis* A.St.-Hil. ex Benth., *Psidium laruotteanum* Cambess. (Araçá-cascudo) e *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer. Embora não tenha sido possível identificar inequivocamente a segunda espécie, acredita-se tratar-se de *Hyptis viscaria* Harley & J.F.B. Pastore ou *Hyptis foliosa* A.St.-Hil. ex Benth. Assim a espécie será tratada apenas como *Hyptis* sp.. Buscou-se amostras representativas, folhas e flores em bom estado de conservação, visto que partes murchas ou muito danificadas não contêm óleo como as sadias. As coletas foram realizadas na Fazenda Água Limpa (FAL) em áreas de Cerrado sentido restrito denso e típico (RIBEIRO e WALTER, 2008) com baixo grau de antropização, visto que há estudos que mostram que a quantidade e a composição dos óleos essenciais altera-se em razão da pressão antrópica sofrida pela planta (MORAIS *et al.*, 2012). Foram apanhadas as plantas com odor mais pronunciado no campo. As coletas foram realizadas em 11 de junho de 2013 no período de seca. A Tabela 5.2 traz algumas informações sobre os pontos de coleta e as características dos indivíduos coletados.

Espécimes das cinco espécies coletadas foram depositados no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Folhas e flores de cada espécie foram secas em estufa a 38 °C com ventilação até atingirem peso constante (exceto os botões de cravo). Uma amostra do material foi segregada e pesada antes da secagem para posterior avaliação do teor de umidade de cada espécie.

Tabela 5.2 – Informações sobre as amostras.

Espécie	Altitude (m)	Hábito	Substrato
<i>P. myrsinites</i>	1096	Arvoreta com 2,5 m de altura	Latossolo vermelho amarelo
<i>Hyptis sp.</i>	1096	Subarbusto com 1 m de altura	Latossolo vermelho amarelo
<i>H. saxatilis</i>	1096	Erva com 1 m de altura	Latossolo vermelho amarelo
<i>P. laruotteanum</i>	1113	Arvoreta com 2 m de altura	Latossolo vermelho amarelo
<i>L. lacunosa</i>	1113	Arbusto entre 2,5 a 3 m de altura	Arenoso

5.2.2 - Extração dos óleos essenciais e cálculo do rendimento

O material biológico coletado foi submetido ao processo de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado (Figura 5.1) para extração de óleos essenciais na Embrapa Recurso Genéticos e Biotecnologia.



Figura 5.1 – Montagem do experimento de extração. Detalhe do aparelho de Clevenger modificado

Após a secagem, todo o material vegetal foi colocado em um balão de 12 L e preenchido com 3,5 a 4 L de água destilada para proceder à destilação. A extração foi realizada em apenas uma etapa para reduzir as perdas no processo experimental e garantir o máximo de óleo possível.

A extração foi realizada pelo período de três horas, pois se trata da investigação de espécies ainda não estudadas ou com poucas informações a respeito dos óleos produzidos, e com folhas em geral rígidas, típicas do cerrado.

Os óleos essenciais das plantas estudadas são menos densos que a água e foram retirados pela parte superior do aparato Clevenger utilizando uma pipeta de vidro (Figura 5.2). Antes da pesagem dos óleos, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) com o intuito de remover toda a umidade do produto. Os óleos foram pesados em balança analítica.



Figura 5.2 – Aparência do óleo essencial após o término da extração

O cálculo do rendimento foi realizado através da equação 5.1:

$$R(\%) = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{planta}}} \times 100 \quad (5.1)$$

Onde:

$R(\%)$ = rendimento da produção de óleo essencial;

$M_{\text{óleo}}$ = massa de óleo obtida (em g);

M_{planta} = massa das partes aéreas, flores e folhas (em g).

Depois da pesagem, as amostras de óleo foram mantidas em refrigerador e ao abrigo da luz para posterior análise cromatográfica.

5.2.3 - Análise da composição química dos óleos

Os óleos de plantas do Cerrado foram analisados nas dependências da Embrapa Agroindústria de Alimentos no Rio de Janeiro, enquanto, os óleos de alecrim-pimenta e cravo foram analisados na Embrapa Recurso Genéticos e Biotecnologia. Ambas as caracterizações, no entanto, utilizaram um cromatógrafo a gás Agilent 7890A, com coluna capilar de 5%-fenil-95%-metilsilicone (HP-5, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), programação de temperatura de 60 a 240°C (variação de 3°C/min), hidrogênio como gás carreador (1,5 mL/min) e injetor operando no modo com divisão de fluxo (split 1:20) a 280°C. O óleo analisado foi diluído a 1% (V/V) em diclorometano e 1 µL de solução foi injetada no cromatógrafo. A quantificação dos compostos foi realizada pela normalização da área dos picos obtida com detector de ionização por chama calculada como a média de três injeções sem a utilização de fatores de resposta.

Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo Agilent 5973N acoplado a espectrômetro de massas operando nas mesmas condições acima, porém, empregando o gás hélio como carreador (1,5 mL/min).

Os índices de retenção linear foram obtidos por meio da injeção da série homóloga de n-alcanos (C₉-C₂₈) nas condições já relatadas e na mesma coluna (ADAMS, 2007). Utilizou-se a equação proposta por van den DOOL e KRATZ (1963) para calcular os índices de retenção linear.

A identificação dos componentes de cada óleo foi realizada através da comparação com a biblioteca espectral NIST08 (NIST/EPA/NIH Spectral Data base 2008) e com os índices de retenção linear encontrados na literatura em especial aqueles disponibilizados por Adams (2007).

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 - Extração dos óleos essenciais

A secagem do material vegetal das cinco espécies coletadas resultou nos teores de umidade mostrados na Tabela 5.3. O objetivo foi tão somente eliminar a umidade de maneira a possibilitar a comparação dos rendimentos obtidos com os valores da

literatura. Como os botões de cravo foram adquiridos já secos não foi possível determinar seu teor de umidade.

Tabela 5.3 – Teor de umidade das espécies coletadas

Espécie	Teor de umidade (%)
<i>P. myrsinites</i>	48,4
<i>Hyptis sp.</i>	66,8
<i>H. saxatilis</i>	66,3
<i>P. laruotteanum</i>	20,0
<i>L. lacunosa</i>	61,0
<i>L. origanoides</i>	66,6

A hidrodestilação das sete espécies estudadas resultou em rendimentos de até 2,92% conforme pode ser observado na Tabela 5.4. A hidrodestilação de *Hyptis saxatilis* não resultou em quantidades detectáveis de óleo essencial, embora o material vegetal apresentasse aroma no campo. Não foi possível calcular o rendimento da extração do óleo de cravo, pois, após as três horas de extração, ainda havia muito óleo sendo destilado e, portanto, o valor do rendimento não seria correto.

Compostos com maior peso molecular e, conseqüentemente com menor pressão de vapor, como sesquiterpenos e diterpenos levam mais tempo para serem destilados, pois a quantidade do composto na fase vapor é menor (SCHMIDT, 2010). Em razão disso, acredita-se ser melhor a utilização de tempos de destilação maiores para assegurar uma composição mais fidedigna do óleo. Assim haverá a destilação da maior parte dos componentes e a obtenção de quantidades maiores de produto, embora tempos mais elevados acarretem a perda de alguns compostos por degradação (principalmente) ou volatilização (CANNON *et al.*, 2013 e ISSATIER *et al.*, 2013).

O fato de as extrações terem sido realizadas em apenas uma etapa (sem repetições) e não ser possível calcular um desvio padrão nos dados de rendimento não traz problemas ao estudo, pois o objetivo não era comparar os valores entre as diferentes espécies. Quanto a comparações com dados da literatura da mesma planta (quando eles existirem) também não são muito significativos, porque as variáveis (genéticas e edafoclimáticas) que influenciam na quantidade de óleo são muitas e de difícil controle quando se trata de indivíduos em seu habitat natural (PAULA *et al.*, 2011). Por essas razões não foi realizado nenhum tratamento estatístico com o rendimento dos óleos.

Tabela 5.4 – Rendimento das extrações dos óleos essenciais

Espécie	Massa de folhas secas (g)	Massa de óleo essencial (g)	Rendimento (%)
<i>P. myrsinites</i>	353,93	0,5092	0,14
<i>Hyptis sp.</i>	213,41	1,5979	0,75
<i>H. saxatilis</i>	162,13	-	0,00
<i>P. laruotteanum</i>	156,9	0,5121	0,33
<i>L. lacunosa</i>	299,10	1,3830	0,46
<i>L. organoides</i>	229,44	6,6949	2,92

5.3.2 - Caracterização química dos óleos essenciais

Os vários constituintes dos óleos obtidos são mostrados na Tabela 5.5 e 5.6. Os componentes estão dispostos na ordem de eluição em coluna HP-5. Foram identificados 9, 5 (tabela 5.5), 44, 61, 36 e 38 (tabela 5.6) compostos nos óleos das espécies *L. organoides*, *S. aromaticum*, *P. myrsinites*, *Hyptis sp.*, *P. laruotteanum* e *L. lacunosa* respectivamente, o que representa 98,5; 100; 80,9; 95,7; 95,1 e 97,5% dos óleos essenciais. Os cromatogramas de íons totais (TIC) são apresentados no Apêndice A.

Tabela 5.5 – Composição química dos óleos essenciais de *L. organoides* e *S. aromaticum*.

Composto	IRL ^a	IRL ^b	Concentração (%) ^c	
			<i>L. organoides</i>	<i>S. aromaticum</i>
α -terpineno	1014	1016	1,7	-
<i>p</i> -cimeno	1026	1023	9,6	-
1,8-cineol	1026	1031	1,8	-
γ -terpineno	1054	1056	5,9	-
NI ^d		1141	1,6	-
terpinen-4-ol	1174	1179	0,9	-
salicilato de metila	1189	1190	-	1,3
metil-timol éter	1232	1228	1,8	-
timol	1289	1289	71,1	-
eugenol	1356	1350	-	81,6
α -copaneno	1374	1372	0,9	-
β -cariofileno	1417	1415	4,8	7,3
α -humuleno	1452	1451	-	1,7
acetato de eugenol	1521	1511	-	8,1

^a Índice de retenção linear obtido na literatura (Adams, 2007).

^b Índice de retenção linear obtido através da equação de van den Dool e Kratz (1963).

^c A quantificação dos compostos foi realizada pela normalização da área dos picos obtida com detector de ionização por chama calculada como a média de três injeções. Não foram usados fatores de resposta.

^d NI = composto não identificado.

Tabela 5.6 – Composição química dos óleos essenciais de *P. myrsinites*, *Hyptis sp.*, *P. laruotteanum* e *L. lacunosa*.

Composto	IRL ^a	IRL ^b	Concentração (%) ^c			
			<i>P. myrsinites</i>	<i>Hyptis sp.</i>	<i>P. laruotteanum</i>	<i>L. lacunosa</i>
3-hexen-1-ol	850	- ^e				0,3
triciclono	921	919	0,6			
α -tujeno	924	925		4,7		
α -pineno	932	932	0,8	10,0	11,4	2,2
canfeno	946	947		0,4		
α -fencheno + Canfeno	951 e 953	947			0,8	
tuja-2,4(10)-dieno	953	952		0,2		
sabineno	969	972		4,3		0,3
β -pineno	974	975	0,3	17,6		2,5
mirreno	988	990	5,4	0,9		0,3
3-octanol	988	994		0,3		
α -felandreno	1005	1005			0,2	
δ -3-careno	1011	1010			1,5	
α -terpineno	1014	1016		0,3	0,2	
<i>p</i> -cimeno	1020	1023	0,2	0,8	34,8	
limoneno	1024	1026	1,5		7,9	0,2
limoneno + β -felandreno	1024 e 1025	1027		1,6		
1,8-cineol	1026	1029		2,5	11,9	
<i>E</i> - β -ocimeno	1044	1045				0,3
γ -terpineno	1054	1056		0,8	7,0	
<i>cis</i> -hidrato-sabineno	1065	1064		0,1		
óxido de <i>cis</i> linalol	1067	1070			0,2	
terpinoleno + NI ^d	1086	1087		0,4		
terpinoleno + <i>p</i> -cimeno	1086 e 1089	1087			0,9	

linalol + NI	1095	1099	2,5			
linalol	1095	1099		0,6	2,0	38,7
endo-fencol	1114	1111			0,5	
α -canfolenal	1122	1124		0,2	0,3	
<i>trans</i> -pinocarveol	1135	1135		0,7	0,2	
<i>cis</i> -verbenol	1137	1138		0,2		
<i>trans</i> -verbenol	1140	1141		0,7		
óxido de β -pineno	1154	1154	0,5			
pinocarvona	1160	1159		0,4		0,2
borneol + <i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1165 e 1166	1162		1,2		
borneol	1165	1162			1,2	
isopinocanfona	1173	1171		0,2		0,5
4-terpineol	1174	1174	0,2	1,7		
NI + 4-terpineol	1174	1174			2,6	
<i>p</i> -8-cimenol	1179	1182			0,4	
α -terpineol	1186	1188	0,3	0,2	5,3	
mirtenal	1193	1193		1,2		0,5
mirtenol	1194	1193			0,3	
NI		1199				0,2
verbenona	1204	1206		0,3		
2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	1207	1207				0,4
<i>trans</i> -carveol + acetato de endo-fenchila	1215 e 1218	1216			0,3	
acetato de isobornila	1283	1282			1,1	
timol	1289	1284			0,2	
<i>p</i> -7-cimenol	1289	1290			0,6	
acetato de mirtenila	1324	1322				0,4

δ -elemeno	1335	1333		0,5		0,4
α -cubebeno	1345	1345		0,3		
NI		1371			0,2	
α -copaeno	1374	1371	0,4	0,3		0,1
NI		1381				1,0
β -bourboneno	1384	1379		1,7		
β -cubebeno	1390	1385		0,2		
β -elemeno	1389	1387		0,4		18,3
α -gurjuneno	1409	1404		0,3		0,1
β -cariofileno	1417	1413	7,4	1,3		5,4
β -copaeno	1430	1423		0,3		
aromadendreno	1439	1432	1,0	0,5		
NI		1444		0,3		
α -cariofileno	1452	1447	5,4	1,0		
α -humuleno	1452	1447				0,6
allo-aromadendreno	1458	1454	0,2			
NI		1457	0,2			
9-epi- <i>E</i> -cariofileno + cis-muurola-4(14),5-dieno	1464 e 1465	1454			2,8	
NI		1468			0,2	
γ -muuroleno + NI	1478	1471	0,7			
γ -muuroleno	1478	1471		0,5		0,5
germacreno D	1484	1475		5,5		5,3
β -selineno	1489	1479	1,3			0,6
metil-isoeugenol	1491	1481	0,7			
<i>cis</i> - β -guaieno	1492	1479		0,4		
δ -selineno + biciclogermacreno	1492 e 1500	1490				3,5

α -selineno	1498	1488	1,0	
α -muuroleno	1500	1495		0,9
biciclogermacreno + epizonareno	1500 e 1501	1490		7,2
NI		1505		0,2
germacreno A	1508	1498		2,4
γ -cadineno	1513	1508	0,4	1,3
γ -cadineno + cubebol	1513 e 1514	1508		1,0
NI		1513	0,3	
δ -cadineno	1522	1518		1,4
NI		1518		0,2
NI		1528	0,2	
α -cadineno	1537	1531		0,2
NI		1545	1,3	
NI		1552	0,6	
NI		1552		0,5
germacreno B	1559	1549		0,7
palustrol	1567	1559		0,3
álcool cariofileno	1570	1562	0,4	
NI		1568	0,5	
NI		1576		1,8
NI		1576		2,5
germacreno D-4-ol + espatulenol	1574 e 1577	1570		1,9
espatulenol	1577	1571		11,3
óxido de cariofileno + NI	1582 e NI	1577	26,1	
óxido de cariofileno	1582	1575		0,8
globulol	1590	1584		3,3

globulol e 11-cubebanol	1590 e 1595	1584	4,3		
viridiflorol	1592	1583			0,3
NI		1591	1,5		
NI		1594	0,8		
NI		1595		0,4	
11-cubebanol	1595	1586			0,7
rosifoliol	1600	1594			0,6
epoxido de humuleno II	1608	1602	8,8	0,4	
NI		1609	0,4		
1,10-di-epi-cubenol	1618	1607		0,3	
NI		1615			1,8
NI		1621	2,4		
NI		1621			0,4
NI		1625	5,4		
NI		1622			0,6
1-epi-cubenol	1627	1621		0,4	
caria-4(12),8(13)-dien-5-ol	1639	1629	4,7		
epi- α -cadinol e epi- α -muurolol	1638 e 1640	1634			0,7
epi- α -muurolol	1640	1635			2,3
α -muurolol e 6-acetil-2,2-dimetilcromeno	1644 e 1646	1635	2,5		
NI		1635		0,4	
α -muurulol	1644	1639			0,7
NI		1640	0,5		0,5
β -eudesmol	1649	1641		0,7	
β -eudesmol e NI	1649 e NI	1644	1,5		
α -cadinol	1652	1647	1,7	0,5	2,3

NI		1650	2,0		
NI		1664	2,3		
NI		1678		0,4	
NI		1687	0,3		
NI		1716	0,3		
óxido de 13-epi-manool	2009	1999		0,5	
manool	2056	2045		0,2	
NI					0,3
Monoterpenos totais			12,0	52,5	92,1
Sesquiterpenos totais			88,0	47,6	7,7
Monoterpenos (hidrocarbonetos)			9,0	42,0	64,8
Monoterpenos oxigenados			3,5	10,5	27,3
Sesquiterpenos (hidrocarbonetos)			19,0	25,3	-
Sesquiterpenos oxigenados			68,2	21,2	7,7

^a Índice de retenção linear obtido na literatura (ADAMS, 2007 e PHEROBASE).

^b Índice de retenção linear obtido através da equação de van den DOOL e KRATZ (1963).

^c A quantificação dos compostos foi realizada pela normalização da área dos picos obtida com detector de ionização por chama (FID) calculada como a média de três injeções. Não foram usados fatores de resposta.

^d NI = composto não identificado.

^e Não foi possível calcular o IRL do composto, pois ele foi eluído antes do primeiro n-alceno (nonano). Assim não foi possível identificar a estereoquímica do composto.

Os óleos de *L. origanoides* e *S. aromaticum* são bastante conhecidos e muito utilizados pela população ou pela indústria em geral. Os óleos aqui estudados demonstraram predominância de timol (*L. origanoides*) e eugenol (*S. aromaticum*) cujas fórmulas estruturais podem ser vistas na figura 5.3.

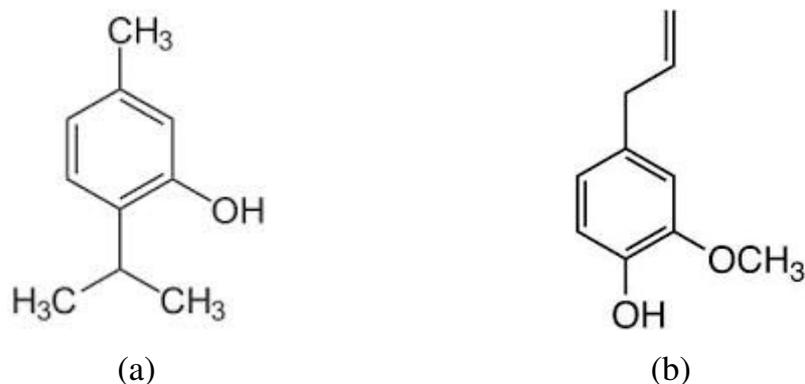


Figura 5.3 – Fórmulas estruturais do (a) timol e do (b) eugenol.

5.3.2.1 - *Lippia origanoides*

A espécie *L. origanoides* também é conhecida como *Lippia sidoides* Cham. Embora alguns estudos julguem tratar-se de espécies diferentes, este trabalho adota o entendimento de Forzza *et al.* (2010) e os nomes serão tratados como sinônimos. O óleo de *L. origanoides* apresenta tradicionalmente, na literatura, três quimiotipos distintos (STASHENKO *et al.*, 2010 e GALVIS *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2007) relataram a existência de um quimiotipo, rico em carvacrol, diferentemente daquele mais comum existente na literatura (com alto teor de timol) originado de plantas cultivadas no Pará. Stashenko *et al.* (2010) identificaram o terceiro tipo em que os compostos majoritários eram *p*-cimeno e β -cariofileno. Morais *et al.* (2012) identificaram ainda indivíduos pertencentes a um possível quarto tipo no estado de Goiás cujo óleo essencial possui perfil químico bem diferente daqueles relatados acima com 1,8-cineol, isoborneol e acetato de bornila como compostos mais abundantes. Os autores, no entanto, não puderam determinar se as diferenças observadas originaram-se em virtude de variações genéticas ou das condições ambientais (MORAIS *et al.*, 2012). Silva *et al.* (2013c) identificaram recentemente um quinto quimiotipo totalmente diferente dos demais em áreas de cerrado nativo em que predominaram sesquiterpenos (69,5%) como α -selineno (27,8%), α -humuleno (18,3%), biciclogermacreno (15,9%) e germacreno D (7,5%).

O óleo estudado no presente trabalho pertence ao quimiotipo timol, visto o elevado teor deste composto (71,1%). É interessante notar a presença de certa quantidade de *p*-cimeno (9,6%), um precursor tanto do timol quanto do carvacrol. Os

estudos com esses quimiotipos mostram esse composto sempre presente em quantidades razoáveis (5 – 34%) semelhante ao observado no presente trabalho (OLIVEIRA *et al.*, 2007; GALVIS *et al.*, 2011; STASHENKO *et al.*, 2010; VERAS *et al.*, 2012 e FARIAS-JUNIOR *et al.*, 2012).

5.3.2.2 - *Syzygium aromaticum*

O óleo de *S. aromaticum*, ao contrário do óleo de *L. origanoides*, apresenta variações bem menores em sua composição sendo o eugenol o composto majoritário (47 – 88%) e o β -cariofileno, o acetato de eugenol e o álcool benzílico outros constituintes importantes (CHAIEB *et al.*, 2007). O óleo estudado mostrou-se bem semelhantes ao relatado na literatura: eugenol (81,6%), acetato de eugenol (7,3%) e β -cariofileno (8,1%)

5.3.2.3 - *Psidium myrsinites* e *Psidium laruotteanum*

O óleo essencial de *P. myrsinites* apresenta principalmente compostos oxigenados e sesquiterpenos como o óxido de cariofileno (26,1%), epóxido de humuleno II (8,8%) e β -cariofileno (7,4%). Pode-se observar pela Figura 5.4 que os compostos principais guardam grande semelhança entre si indicando uma possível interconversão conforme a necessidade da planta ou as exigências do meio (SILVA *et al.*, 2007).

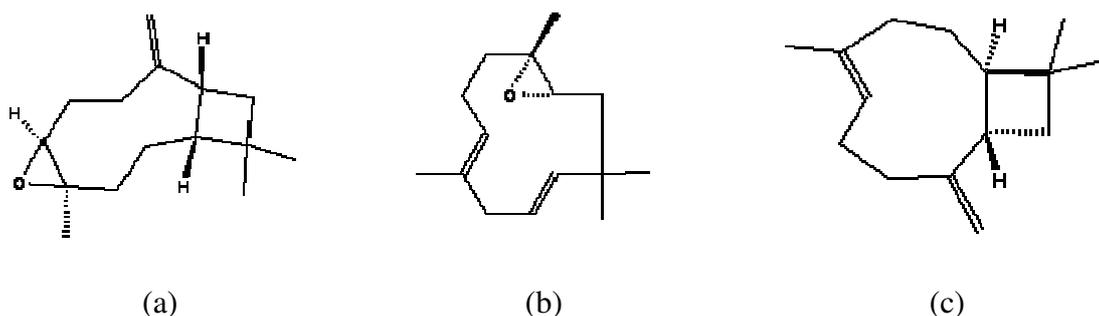


Figura 5.4 – Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo de *P. myrsinites*. Óxido de cariofileno (a), epóxido de humuleno II (b) e β -cariofileno (c). Imagens retiradas de NIST (2013).

Castelo, Menezzi e Resck (2012) relataram a extração do óleo essencial da *P. myrsinites*, porém, os componentes não foram quantificados. Esse estudo identificou que o óxido de cariofileno, o β -cariofileno, o α -humuleno e o viridiflorol eram os compostos majoritários do óleo, o que é condizente com os resultados aqui obtidos.

Os compostos do óleo de *P. laruotteanum*, por outro lado, são basicamente monoterpenos. Observou-se que os compostos majoritários possuem estrutura química muito semelhante, conforme pode ser observado na Figura 5.5. Nota-se nitidamente a existência de um anel de seis carbonos com grupos metila e iso-propila em posição oposta. Acredita-se novamente que haja uma possível plasticidade química da espécie para produzir os compostos mais necessários (SILVA *et al.*, 2007). Essa é a primeira caracterização química do óleo essencial de *P. laruotteanum*.

O gênero *Psidium* é bastante comum no Cerrado. De acordo com Mendonça *et al.* (2008) existem 35 espécies distintas nativas desse bioma, embora muitas não sejam endêmicas.

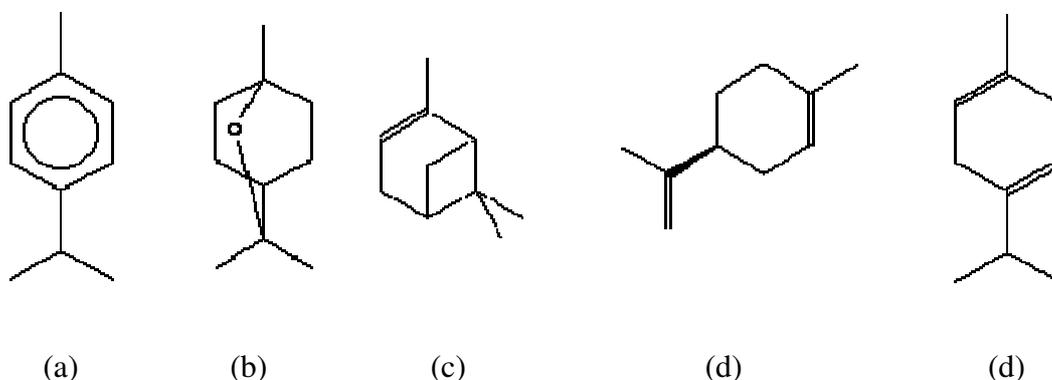


Figura 5.5 – Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo de *P. laruotteanum*: p-cimeno (a), 1,8-cineol (b), α -pineno (c), limoneno (d) e γ -terpineno (e).
Imagens retiradas de NIST (2013)

A espécie mais conhecida do gênero *Psidium* é seguramente a goiabeira (*Psidium guajava* L.), espécie nativa das Américas Central e do Sul. Em razão disso, seu óleo essencial é ricamente descrito. O 1,8-cineol e o β -cariofileno são os componentes mais abundantes, porém, existem outros tais como α -terpineol e o selin-11-en-4- α -ol em quantidades significativas (LIMA *et al.*, 2010).

No bioma Cerrado, Freitas, Morais e Silveira (2003) estudaram a espécie *P. myrsinoides*. Esse trabalho mostrou que o óleo de *P. myrsinoides* é bastante semelhante ao da *P. myrsinites*, sendo o β -cariofileno e o óxido de cariofileno os compostos majoritários (FREITAS, MORAIS e SILVEIRA, 2002).

A Floresta Amazônica também apresenta algumas espécies de *Psidium* produtoras de óleo essenciais. Silva *et al.* (2003) descreveram a composição química dos óleos de *Psidium acutangulum* DC, *Psidium striatulum* DC, *Psidium guineense* Sw e *Psidium guajava*. Os resultados indicaram como compostos principais α -pineno, 1,8-

cineol (*P. acutangulum*); β -cariofieno, α -selineno (*P. striatulum*); β -bisabolol, limoneno (*P. guineense*); α -pineno e 1,8-cineol (*P. guajava*) (SILVA *et al.*, 2003).

Também foram identificadas algumas espécies de *Psidium* pertencentes ao bioma Caatinga. Andrade Neto *et al.* (1994) avaliaram os óleos de *Psidium pohlianum* Berg e *Psidium guyanensis* Pers. Observou-se que a composição dos óleos era muito similar com o 1,8-cineol sendo o componente majoritário em ambas as plantas e também a presença de α -pineno, β -eudesmol e γ -eudesmol (ANDRADE-NETO *et al.*, 1994).

Na Floresta Atlântica, Marques *et al.* (2008) identificaram que o α -tujeno, o 1,8-cineol e o β -cariofileno eram os compostos principais no óleo de *Psidium cattleyanum* Sabine.

É possível perceber que a produção de terpenos é preferencial no gênero, visto que praticamente não são relatados fenilpropanoides. Embora não haja um padrão definido, as moléculas majoritárias frequentemente se repetem como é o caso do 1,8-cineol, do β -cariofileno e do α -pineno. Observa-se também uma tendência na produção de moléculas menos oxidadas como hidrocarbonetos, alcoóis e óxidos com baixa presença de grupos cetona, aldeídos e fenóis.

Percebe-se que algumas espécies de distribuição mais ampla, que também são nativas do Cerrado, como *P. acutangulum*, *P. guineense* e *P. cattleyanum*, já foram estudadas, porém, coletadas em outros biomas. Não foram identificados trabalhos descrevendo a composição química dos óleos dessas plantas quando coletadas no Cerrado demonstrando uma área em potencial para estudos futuros a fim de comparar a influência do meio sobre a produção dos metabólitos secundários.

5.3.2.4 - *Hyptis* sp.

O óleo de *Hyptis* sp. tem composição bastante variada que inclui tanto monoterpenos como sesquiterpenos sejam oxigenados (alcoóis ou epóxidos) ou não. Os principais compostos são β -pineno (17,6%), espatulenol (11,3%) e α -pineno (10,0%). Acredita-se que o óleo essencial dessa espécie ainda não tenha sido descrito na literatura, pois, embora não tenha havido a identificação precisa, ambas as espécies possíveis (*H. viscaria* e *H. foliosa*) ainda não tiveram seus óleos essenciais caracterizados.

O gênero *Hyptis* é um dos mais vastos existentes no Cerrado. Segundo Mendonça *et al.* (2008), há mais de 130 espécies diferentes do gênero nativos no bioma.

Como já citado, conhece-se a característica dos óleos de oito espécies de *Hyptis* nativas do Cerrado: *H. conferta*, *H. lythorides*, *H. marrubioides*, *H. ovalifolia*, *H. passerina*, *H. spicigera*, *H. suaveolens*, *H. velutina* e *H. villosa*. Essas plantas, a exceção da *H. spicigera*, mostraram tendência na produção de sesquiterpenos (principalmente espatulenol e biciclogermacreno), enquanto que na espécie estudada houve equilíbrio (52% de monoterpenos e 48% de sesquiterpenos). Assim como nas demais espécies, identificou-se a presença do espatulenol como um composto majoritário.

Aguiar *et al.* (2003) estudaram o óleo de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. na Floresta Amazônica e identificaram os principais componentes como sendo timol, *p*-cimeno, δ -3-careno, terpinoleno, β -cariofileno e (*E*)-cinamato de metila. Zoghbi *et al.* (2002) estudaram o óleo de *Hyptis crenata* Pohl ex Benth na Amazônia e identificaram terpinoleno, 1,8-cineol, borneol, α -pineno e β -cariofileno como compostos majoritários. O óleo de *H. crenata* também foi avaliado por Rebelo *et al.* (2009) que encontraram compostos semelhantes como α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e cânfora.

Na Caatinga, o gênero *Hyptis* também é abundante. Caldas *et al.* (2013) estudaram o óleo de *Hyptis martiusii* Benth. Os autores identificaram 1,8-cineol, δ -3-careno e cânfora como os compostos principais (CALDAS *et al.*, 2013). Franco *et al.* (2011) investigaram a espécie *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. em área de Caatinga e detectaram o 1,8-cineol, espatulenol, α -pineno e β -pineno como os componentes majoritários do óleo essencial. A planta *Hyptis pectinata* (L.) Poit também é comum no nordeste brasileiro e estudos recentes indicam que seu óleo essencial é composto basicamente por β -cariofileno e óxido de cariofileno (RAYMUNDO *et al.*, 2011).

Além de produtores de óleos essenciais, as espécies desse gênero são bastante utilizadas na medicina tradicional em razão de suas propriedades farmacológicas (FALCÃO e MENEZES, 2003). A *H. suaveolens* é seguramente a espécie mais estudada do gênero (FALCÃO e MENEZES, 2003 e ZELLNER *et al.*, 2009) e possui diversas atividades biológicas (MOREIRA *et al.*, 2010; JAYA *et al.*, 2012; CONTI *et al.*, 2011 e OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O óleo de *H. ovalifolia* também demonstrou atividade biológica ao inibir o crescimento dos fungos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum* (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Oliva *et al.* (2006) mostraram que o óleo de *H. mutabilis* é capaz de inibir a atividade de fungos *Mucor sp.* Os autores atribuem o efeito à presença do β -cariofileno,

espatulenol e germacreno D (compostos majoritários). Ressalta-se que a composição do óleo testado era diferente daquela obtida por Aguiar *et al* (2003).

5.3.2.5 - *Lippia lacunosa*

O óleo de *Lippia lacunosa* apresentou quantidade significativa de linalol (38,7%) além de outros compostos como β -elemeno (18,3%), β -cariofileno (5,4%) e germacreno D (5,3%).

O gênero *Lippia* possui mais de 90 espécies distintas no Cerrado de características arbustivas ou subarbustivas (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Em 2001, Pascual *et al.* revisaram as informações existentes sobre 52 espécies do gênero e constataram que *p*-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno, β -cariofileno e timol são as moléculas que mais frequentemente aparecem na composição dos óleos essenciais.

Como já descrito na introdução, foram identificadas algumas espécies de *Lippia* no Cerrado produtoras de óleos voláteis. Percebe-se que o óleo de *L. lacunosa* guarda certa semelhança com as demais espécies do Cerrado já estudadas, visto a presença do β -cariofileno e o germacreno D, embora em pequenas quantidades. Deve-se destacar a semelhança com o óleo de *L. rotundifolia* que também apresentou teores elevados de linalol (62,6%) e a existência de germacreno D (6,8%) e biciclogermacreno (6,8%) (SILVA *et al.*, 2013e). Leitão *et al.* (2008) inclusive mencionam que ambas as plantas costumam ser tratadas com sinônimos em muitos herbários.

Leitão *et al.* (2008) também analisaram a composição do óleo essencial de *L. lacunosa*. Diferentemente do presente trabalho, as plantas utilizadas foram cultivadas a partir de clones originados em Diamantina (MG). A composição dos óleos obtidos em Minas Gerais (a partir das folhas e flores) apresentou diferenças significativas quando comparado ao óleo estudado nesse trabalho. Inicialmente destaca-se o rendimento aqui obtido de 0,46% contra 0,33%. Quanto à composição, os óleos obtidos por Leitão *et al.* (2008) apresentaram o limoneno e o mirtenal como compostos majoritários, enquanto, no presente estudo o linalol e o β -elemeno responderam por quase 60% do óleo. Embora as diferenças pareçam grandes, não é possível determinar se as diferenças observadas são em razão de fatores genéticos (quimiotipos diferentes) ou fatores edafoclimáticos (quantidade de nutrientes no solo, disponibilidade hídrica, competição). Essa é a primeira caracterização do óleo de *L. lacunosa* no Cerrado.

Além do Cerrado, muitas espécies de *Lippia* foram estudadas em outros biomas. Na Floresta Amazônica, Sarrazin *et al.* (2012) avaliaram a produção de óleos essenciais da espécie *Lippia grandis* Schauer e observaram que os principais constituintes foram carvacrol, *p*-cimeno e timol. No caso da *Lippia glandulosa* Schauer, foram identificados dois quimiotipos: um com timol e outro com β -cariofileno como os componentes majoritários (MAIA *et al.*, 2005). O óleo de *L. organoides*, como já comentado, possui vários quimiotipos sendo carvacrol, timol, *p*-cimeno, 1,8-cineol, isoborneol, β -cariofileno, α -selineno e α -humuleno algumas das moléculas majoritárias (OLIVEIRA *et al.*, 2007; GALVIS *et al.*, 2011; STASHENKO *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2012 e Silva, R. F. *et al.*, 2013c).

A espécie *Lippia triplinervis* Gardner é uma planta nativa da Floresta Atlântica cujo óleo apresenta carvacrol, timol e *p*-cimeno como componentes majoritários (LAGE *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2010) investigaram quatro espécies de *Lippia* na Serra do Cipó (bioma Floresta Atlântica) e identificaram os constituintes do óleo de *Lippia microphylla* Cham. (α -pineno, α -humuleno, biciclogermacreno e germacreno D), *Lippia aristata* Schauer (β -cariofileno e germacreno D), *Lippia martiana* Schau (α -pineno e β -cariofileno) e *Lippia salviifolia* Cham. (nerolidol e germacreno D). Nota-se que as plantas descritas por Silva *et al.* (2010) não seguem o padrão percebido por Pascual *et al.* (2001).

A Caatinga também mostra várias espécies de *Lippia* produtoras de óleos essenciais. Vale destacar a *Lippia gracilis* Schauer com timol, *p*-cimeno e timol metil éster (FERRAZ *et al.*, 2013), a *Lippia alnifolia* Schau. com limoneno e piperitona (MATES *et al.*, 2000) e a *Lippia microphylla* Cham. com 1,8-cineol, timol e α -pineno (COSTA *et al.*, 2005).

Em razão da vasta gama de efeitos biológicos apresentados por muitas espécies de *Lippia* (PASCUAL *et al.*, 2001), percebe-se que esse gênero é bastante estudado inclusive em experimentos agrônômicos com destaque para a *L. organoides* e *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. (SILVA, VICCINI, *et al.*, 2010) que apresentam principalmente timol, carvacrol, 1,8-cineol, β -cariofileno e *p*-cimeno no caso da primeira (LIMA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2012 e VERAS *et al.*, 2012) e linalol, citral, mirceno, limoneno e carvona na segunda (JANNUZZI *et al.*, 2010 e FORERO-PEÑULA *et al.*, 2013).

Nota-se, portanto, a presença significativa de compostos oxigenados, sejam terpenoides ou fenilpropanoides, o que demonstra que ambas as rotas metabólicas são empregadas pelo gênero.

Assim como observado no gênero *Hyptis*, muitas das espécies descritas acima, como *L. alba*, *L. gracilis*, *L. microphylla*, *L. martiana*, *L. aristata*, *L. saviifolia*, *L. grandulosa* e *L. alnifolia*, ocorrem no bioma Cerrado, porém, somente foram estudadas em outros *habitats*.

Pascual *et al.* (2001) identificaram que o uso mais comuns das espécies do gênero é o tratamento de problemas respiratórios, mas vários outros efeitos biológicos são observados. A atividade biológica demonstrada pela *L. origanoides* (*L. sidoides*) frente a bactérias (VERAS *et al.*, 2012) e protozoários (MEDEIROS *et al.*, 2011) deve-se sobretudo em virtude dos isômeros timol e carvacrol. O óleo de *L. gracilis*, também rico em timol, apresentou efeitos citotóxicos em cobaias (FERRAZ *et al.*, 2013) e bactérias (BITU *et al.*, 2012). A espécie *L. triplinervis* mostrou efeito bastante pronunciado na mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* (LAGE *et al.*, 2013), enquanto a *L. grandis* foi efetiva na inibição de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *escherichia coli* (SARRAZIN *et al.*, 2012).

É importante destacar que o linalol, principal componente do óleo de *L. lacunosa*, é um monoterpene oxigenado muito utilizado como aditivo de comidas e na indústria de perfumaria além de apresentar atividades biológicas em uma série de casos (CHENG *et al.*, 2012). As principais fontes tradicionais de linalol natural são os óleos do Pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) e da lavanda (*Lavendula angustifolia*), porém, sua obtenção traz problemas ambientais ou baixos rendimentos (CHENG *et al.*, 2012). Embora já exista produção de linalol sintético a preços competitivos, os setores de perfumaria fina exigem o linalol de fontes naturais (OHASHI *et al.*, 1997). Dessa forma existe a necessidade se encontrar novas fontes de produção de linalol. Considerando o razoável rendimento apresentado pela *L. lacunosa* (0,46%), seria interessante a realização de futuros estudos sobre a variabilidade química, a composição enantiomérica do linalol e a domesticação da espécie no intuito de avaliar a possibilidade de produção industrial de seu óleo essencial.

5.4 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Foi possível identificar a composição química dos óleos essenciais de quatro plantas nativas do Cerrado, das quais os óleos de *P. laruotteanum* (0,33%) e *Hyptis sp.*

(0,75%) ainda não haviam sido descritos e o óleo de *P. myrsinites* (0,14%) não havia sido caracterizado quantitativamente. Especial atenção deve ser dada ao óleo de *L. lacunosa* (0,46%), pois foi identificada a presença de linalol em quantidades significativas. A espécie *H. saxatilis*, embora apresentasse odor no campo, não produziu quantidades significativas de óleo essencial pelo método da hidrodestilação. É possível que a utilização de técnicas de *headspace* permitam a identificação de alguns dos componentes voláteis emitidos pela planta, porém, acredita-se que a espécie não seja produtora de óleos essenciais. A *L. origanoides* é uma espécie de ampla distribuição e, portanto, já bastante estudada. O estudo em questão, porém, mostra a existência no Cerrado do quimiotipo rico em timol.

6 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA

6.1 - INTRODUÇÃO

A utilização da madeira pelo ser humano começa nos primórdios da humanidade quando o homem descobriu o fogo e passou a usá-lo para melhorar sua forma de vida. O combustível mais disponível obviamente era a madeira (RISBRUDT, 2005). Com o tempo e a evolução do conhecimento, a madeira recebeu destinações mais nobres e mais importantes como a construção de estruturas móveis, ferramentas, embarcações entre outros (WIEMANN, 2010).

Essa diversidade de usos apenas é possível em virtude da ampla faixa de variação das propriedades macroscópicas das madeiras. Existem espécies leves ou pesadas (densidade), flexíveis ou rígidas, duras ou macias que podem ser empregadas sozinhas ou em combinações para atingir uma característica específica (WIEMANN, 2010).

As propriedades macroscópicas das madeiras são resultado do complexo arranjo biológico (células) e químico (moléculas) que compõe a parede celular das árvores. O lenho de uma árvore é composto por um intrincado conjunto de células ligadas e as propriedades observadas são resultado da interação entre suas paredes celulares. Nestas há três regiões distintas: a lamela média, a parede primária e a parede secundária. Cada uma dessas camadas possui uma composição química específica com diferentes quantidades de lignina, hemicelulose e celulose (cristalina ou amorfa) (WIEDENHOEFT e MILLER, 2005).

Atualmente o mundo enfrenta uma série de problemas ambientais como a intensificação do efeito estufa, os desastres naturais e a perda da biodiversidade. É nesse cenário que a madeira e seus derivados (MDF, HDF, compensado, OSB) passaram a ocupar um lugar de destaque principalmente na construção civil. Enquanto materiais mais tradicionais como concreto ou o aço consomem muita energia na sua produção e são obtidos a partir de recursos naturais finitos (minérios), a madeira é um recurso renovável de baixo custo, contribui com o sequestro de carbono da atmosfera reduzindo o efeito estufa e, se manejado corretamente, pode fornecer matéria-prima indefinidamente (FALK, 2010 e SCHULTZ, NICHOLAS e PRESTON, 2007).

Embora haja muitas vantagens na utilização da madeira para fins estruturais, a durabilidade ao longo do tempo desse material ainda é um problema. Espécies de lenho

naturalmente resistente ao ataque de micro-organismos e insetos como o mogno (*Swietenia macrophylla* King), o jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.) e o cedro (*Cedrela odorata* L.) levam muitos anos para atingir a maturidade necessária para o corte e muitas delas estão na lista de espécies ameaçadas de extinção. A alternativa viável desenvolvida foi a utilização de madeiras de menor resistência, porém, de crescimento mais acelerado associadas a um tratamento químico para artificialmente evitar o seu apodrecimento. Surgiram, então, os preservantes ou preservativos de madeira (SCHULTZ, NICHOLAS e PRESTON, 2007).

Os preservantes de madeira são classificados em oleossolúveis e hidrossolúveis dependendo do solvente empregado na sua formulação (hidrocarbonetos ou água respectivamente). Como exemplo dos primeiros, destacam-se os vários tipos de creosoto e o pentaclorofenol, enquanto, o arseniato de cobre cromatado (CCA) e os boratos pertencem à segunda classe (LEPAGE, 1986).

Apesar de eficientes, os preservativos são substâncias tóxicas ao homem e ao meio ambiente (IBACH, 2005). Além dos possíveis impactos na saúde dos trabalhadores da área de preservação de madeiras, peças expostas ao ar livre estão sujeitas à lixiviação, que pode carrear compostos tóxicos para o solo ou para os corpos hídricos. Essas substâncias geralmente apresentam baixa solubilidade em água e alta lipofilicidade e, portanto, sua concentração no ambiente tende a aumentar gradualmente com o tempo (LEBOW, 2010). Há inclusive alguns preservativos, como o CCA e o pentaclorofenol, que são proibidos nos Estados Unidos, no Japão e na Europa para usos mais restritivos (SCHULTZ, NICHOLAS e PRESTON, 2007).

Os riscos associados à utilização dos preservantes têm levado os pesquisadores a buscarem novos produtos capazes de proteger a madeira sem acarretar em danos ou riscos tão significativos (BRAND, ANZALDO e MORESCHI, 2006). Uma das alternativas mais interessantes é o emprego de produtos naturais obtidos de plantas ou micro-organismos (SINGH e SINGH, 2012).

O desenvolvimento de um novo preservante, no entanto, requer uma série de testes, tanto em laboratório, quanto em campo para verificar a eficiência e a eficácia do produto. De acordo com Singh e Singh (2012) uma das principais barreiras ao desenvolvimento de novos preservativos, especialmente os naturais, é a discrepância observada entre os resultados obtidos nos diferentes tipos de teste.

Atualmente para determinar a eficácia de um composto na proteção de madeiras são adotados três procedimentos de maneira encadeada. Inicialmente são realizados

testes em meio de cultura nos quais é avaliada a toxicidade da substância contra alguns agentes xilófagos em um ambiente altamente controlado e de resposta rápida. Encontrando-se resultados promissores, procede-se a uma segunda etapa na qual são realizados ensaios com blocos de madeira. Nesse momento, empregam-se condições mais parecidas com a realidade como o uso de madeira e solo, avaliação da lixiviação e a resposta do teste é mais demorada. Por fim, antes de um preservativo ser colocado no mercado, são necessários ensaios de campo no qual estacas ou outros objetos tratados são expostos às intempéries e à ação de toda a sorte de agentes deterioradores no solo, no ar ou na água. Esse último ensaio é longo e consome vários anos.

A avaliação em campo, embora demorada, possui regulamentação bastante avançada. A tabela 6.1 traz algumas normas internacionais de entidades como a *American Society for Testing Methods (ASTM)*, *American Wood Protection Association (AWPA)* e *Comitée Européen de Normalisation (CEN)* que estabelecem os procedimentos de testes de campo para avaliação de preservantes de madeira.

Tabela 6.1 – Normas internacionais sobre ensaios de campo.

Entidade	Norma	Aplicação
ASTM	D1758-06	Ensaio de campo com estacas
ASTM	D2278-06	Ensaio de campo com postes
ASTM	D2481-05	Ensaio de campo contra brocas marinhas
AWPA	E3	Ensaio de campo com estacas e postes
AWPA	E5	Ensaio de campo contra brocas marinhas
AWPA	E8	Ensaio de campo com postes
AWPA	E9	Ensaio de campo para usos sem contato com solo
CEN	EN 252	ensaio de campo em contato com o solo
CEN	EN 275	Ensaio de campo contra brocas marinhas
CEN	EN 330	Ensaio de campo para usos internos e sem contato com o solo

Assim como os ensaio de campo, também existe grande normatização sobre os chamados ensaio acelerados em laboratório. A tabela 6.2 mostra algumas normas internacionais que regulamentam essa etapa. Embora haja variações, os experimentos consistem basicamente em colocar um bloco de madeira pouco resistente, após ser submetido ao tratamento, em um recipiente contendo solo e um fungo xilófago. Após algumas semanas o bloco é retirado e sua massa é medida, sendo avaliada a eficiência do preservativo com base na perda de massa do corpo de prova (ASTM D1417, 2007).

Tabela 6.2 – Normas internacionais sobre ensaios acelerados em laboratórios.

Entidade	Norma	Aplicação
ASTM	D1417-07	Ensaio com solo e bloco de madeira
ASTM	D3345-08	Ensaio contra cupins
AWPA	E1	Ensaio contra cupins
AWPA	E10	Ensaio com solo e bloco de madeira
AWPA	E14	Ensaio de eficiência de preservativos em contato com solo
CEN	EN 113	Ensaio contra fungos <i>Basidiomycetes</i>
CEN	EN 599	Ensaio biológicos específicos para cada tipo de uso

Constata-se, entretanto, que os passos iniciais não possuem a regulamentação observada nos demais casos. Não existe norma que estabeleça os procedimentos para os testes *in vitro* (em meio de cultura), o que resultada em uma vasta gama de metodologias distintas.

No caso específico de novos produtos fungicidas, existem duas metodologias comumente utilizadas: o método da difusão em ágar e método da diluição (PAULI e SCHILCHER, 2010; LANG e BUCHBAUER, 2012 e SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013).

No método da difusão, emprega-se placas de petri preenchidas com meio de cultura sólido no qual é realizado um pequeno furo no centro onde se insere uma gota do produto a ser testado. Alternativamente utiliza-se também um pequeno disco de papel embebido no produto colocado no centro da placa. A substância, então, forma um gradiente pelo ágar de tal forma que a concentração no meio é inversamente proporcional à distância do centro (WHITE *et al.*, 2001). O meio de cultura, por sua vez, deve estar previamente inoculado com os micro-organismos (HAMMER e CARSON, 2011; PAULI e SCHILCHER, 2010 e WHITE *et al.*, 2001).

O método da diluição pode ser executado tanto em meio líquido como em sólido (SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013). A técnica consiste em diluir o produto alvo no meio de cultura em diferentes concentrações de acordo com uma progressão geométrica e, em seguida, inocular o micro-organismo a ser avaliado (WHITE *et al.*, 2001). Determina-se, então, a concentração de inibição mínima (CIM) como sendo a menor concentração na qual não há crescimento do micro-organismo (PAULI e SCHILCHER, 2010). O meio sólido é geralmente mais utilizado sendo mais conhecido como método de diluição em ágar.

Assim a identificação de um produto realmente efetivo envolve várias etapas. Muitos produtos naturais capazes de inibir o desenvolvimento de agentes xilófagos já

foram estudados como extrativos de madeira, óleos essenciais, ceras, resinas, taninos, quitosana (SINGH e SINGH, 2012) e até exudações de microorganismos (BRAND, ANZALDO e MORESCHI, 2006).

Recentemente os óleos essenciais vêm despertando crescente interesse nas pesquisas em virtude de sua baixa toxicidade ao homem e da existência de vasta informação sobre as atividades antimicrobianas nas áreas médicas e alimentícias (ISMAN, 2008; KARTAL *et al.*, 2006 e CHITTENDEN e SINGH, 2011).

Os óleos essenciais, compostos voláteis produzidos a partir do metabolismo secundário de algumas plantas (BASER e DEMIRCI, 2007), são formados por várias moléculas com atividades biológicas já conhecidas como limoneno (IBRAHIM *et al.*, 2001), ácido cinâmico (SOVA, 2012), cinamaldeído, eugenol (CHENG *et al.*, 2008), timol (CLAUSEN *et al.*, 2010), carvacrol (LIMA *et al.*, 2013), linalol (LOPEZ *et al.*, 2012). Além da bioatividade de alguns componentes, a grande variedade de moléculas nos óleos dificulta o desenvolvimento de resistência nos organismos a serem combatidos e permite o surgimento de efeitos sinérgicos (RATTAN, 2010).

No estudo da ação biológica de óleos essenciais contra fungos xilófagos e quaisquer outros micro-organismos a principal metodologia empregada na literatura é o método da diluição em ágar (VARELA *et al.*, 2008; SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013; PAULI e SCHILCHER, 2010; JUSOH *et al.*, 2013; AMUSANT *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 1999; CARILLO *et al.*, 2010; SINGH e CHITTENDEN, 2008 e YEN e CHANG, 2008).

A ausência de uma norma sobre o assunto, no entanto, resulta em trabalhos com metodologias semelhantes, porém, com vários pontos diferentes. Inicialmente observou-se a utilização de repetições distintas: três (BOUCHRA *et al.*, 2003; JUSOH *et al.*, 2012 e PEREIRA *et al.*, 2006); quatro (TAVARES e SOUZA, 2005 e ZACARONI *et al.*, 2009) e cinco (SINGH e CHITTENDEN, 2008 e CARILLO *et al.*, 2010). O tipo de solvente também é constantemente alterado: etanol 95% (CLAUSEN *et al.*, 2010), acetona (JUSOH *et al.*, 2012), acetona com água (CARILLO *et al.*, 2010), água com emulsificante (MOHAMMADI e AMINIFARD, 2013), água e dissolução através de ultrassom (BOUCHRA *et al.*, 2003) e éter etílico (ZACARONI *et al.*, 2009). Independentemente do solvente, a dispersão uniforme do óleo no meio é fundamental, portanto, geralmente faz-se necessária a adição de emulsificantes devido ao caráter lipofílico dos óleos essenciais (SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013 e PAULI e SCHILCHER, 2010). Outros aspectos menos relevantes também são modificados como

o tamanho do micélio do fungo inoculado e a quantidade de meio de cultura em cada placa.

A principal variável do experimento é a concentração do produto a ser avaliado. Essa concentração é calculada considerando-se o meio de cultura como o solvente. Dessa forma, os trabalhos encontrados na literatura empregam concentrações bastante variadas. Há desde valores máximos baixos como 100 ppm (CHANG *et al.*, 1999 e CHANG *et al.*, 2000) ou 250 ppm (BOUCHRA *et al.*, 2003) até valores mais elevados como 1000 ppm (JUSOH *et al.*, 2012 e TAVARES e SOUZA, 2005) e 10.000 ppm (CARILLO *et al.*, 2010; SINGH e CHITTENDEN, 2008 e AMUSANT *et al.*, 2009).

Embora pouco empregado nos ensaios com fungos xilófagos, o método da difusão é bastante aceito nos trabalhos com outros micro-organismos. Obviamente essa metodologia não é capaz de fornecer a CIM com a validade observada no método de diluição, porém, informações qualitativas importantes podem ser obtidas.

Ambas as técnicas possuem pontos fortes e fracos na avaliação da atividade biológica de óleos essenciais. O principal aspecto negativo do método de difusão é a dificuldade de dispersão de compostos hidrofóbicos no meio de cultura que pode induzir a resultados incorretos em virtude da baixa solubilidade dos compostos na água (SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013 e BAGAMBOULA, UYTTENDAELE e DEBEVERE, 2004). Como óleos essenciais são misturas de vários compostos, isso pode resultar numa dispersão heterogênea dos componentes do óleo. Além disso, a forma de inocular os fungos no meio de cultura pode não ser homogênea, pois envolve pulverização ou diluição no meio de uma solução com uma concentração de esporos conhecida, o que, por si só, já acarreta dificuldades (MARIN *et al.*, 2012 e SCORA e SCORA, 1998).

Por outro lado, a metodologia da diluição em ágar também apresenta desvantagens. A principal é a grande quantidade de trabalho dispendida para sua execução, além de requerer extenso treinamento daqueles que executarão o ensaio e apresentar valores elevados para sua execução quando o teste envolve muitos micro-organismos (VARELA *et al.*, 2008 e WHITE *et al.*, 2001). Percebe-se também que a quantidade de produto necessária para os ensaios é maior do que no método da difusão, o que o torna mais oneroso.

Considerando-se que a extração de óleos essenciais ainda é, em geral, um procedimento dispendioso e com baixo rendimento (FIGUEIREDO *et al.*, 2008 e SCHMIDT, 2010), identificou-se a necessidade de alterações na metodologia mais

comum para investigar a ação desses óleos contra fungos xilófagos de maneira a consumir uma quantidade menor de produto sem prejudicar as informações suficientes às próximas etapas e de modo a tornar o ensaio mais adequado à realidade dos óleos essenciais.

6.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 - Testes antifúngicos

Para a realização dos testes antifúngicos foram escolhidos um fungo de podridão branca (*Trametes versicolor*) e outro de podridão parda (*Gloeophyllum trabeum*). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes era composto por uma mistura de 30 g de extrato de malte e 18 g de ágar em 1 L de água deionizada. Após a esterilização do material (120°C por 20 min), cada placa de petri (9 cm) foi preenchida com 15 mL do meio de cultura ainda líquido. Após a solidificação do meio, as placas foram seladas e colocadas em repouso por duas semanas a fim de garantir a inexistência de contaminação.

A inoculação dos fungos e a aplicação do produto a ser testado foram realizadas com o auxílio de um mapa de posicionamento (figura 6.1). A utilização do mapa garantiu que o micélio de fungo e o produto fossem colocados sempre na mesma posição.

Utilizando-se de um furador cilíndrico de 5 cm, foram abertos orifícios no centro do meio de cultura (posição A) no qual foram adicionados 20 µL da solução a ser testada. As placas foram inoculadas na posição B com discos de 6 cm de diâmetro retirados de meio de cultura contendo micélio dos fungos com cinco semanas (*G. trabeum*) e quatro semanas (*T. versicolor*).

Foram utilizados ao todo seis óleos essenciais (*L. origanoides*, *S. aromaticum*, *P. myrsinites*, *Hyptis sp.*, *P. laruotteanum* e *L. lacunosa*) em quatro concentrações distintas: 100, 50, 25 e 12,5% (volume/volume). Os óleos foram dissolvidos com etanol até as concentrações de interesse. As soluções foram preparadas com metodologia semelhantes àquela descrita na norma ASTM D 4445 (2003) em que se prepara inicialmente a solução com maior concentração e utiliza-se metade desta solução para, através de diluições em série, obter as demais.

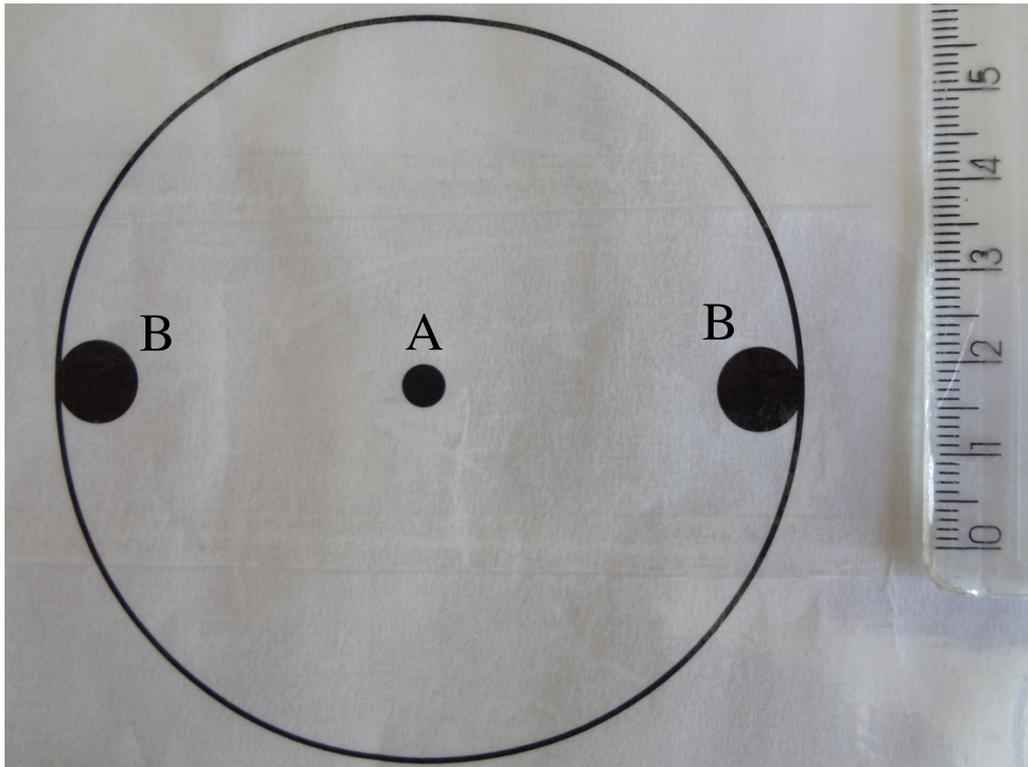


Figura 6.1 – Mapa de posicionamento utilizado para posicionar os micélios de fungos e o produto a ser testado (as letras A e B são apenas ilustrativas).

Empregou-se um branco negativo no qual foram adicionados apenas 20 μ L de etanol no ponto A. Com o intuito de comparar a ação dos óleos testados com produtos comerciais, foi usado um produto a base de tribromofenol (Jimo TBF Export 64) como referência, o qual foi diluído conforme recomendação do fabricante (4% em água deionizada).

As placas foram incubadas à temperatura de 27°C e com umidade relativa de 70% até os dois micélios nas posições B do grupo controle (aplicação apenas de solvente) encontrarem-se, o que levou, em média, cinco dias, no caso do *T. versicolor*, e 10 dias, para o *G. trabeum*. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições.

6.2.2 - Avaliação do efeito antifúngico dos óleos essenciais

A avaliação do efeito das concentrações dos óleos foi realizada através do cálculo dos índices de inibição conforme a equação 6.1. Esta foi modificada da literatura para se adequar a situação em questão (CHANG *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2006 e CARILLO *et al.*, 2010):

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_a}{A_b}\right) \times 100 \quad (6.1)$$

Onde:

$I(\%)$ = índices de inibição percentual

A_a = área ocupada pelo fungo no experimento com produto a ser testado

A_b = área ocupada pelo fungo no experimento controle (solvente)

A área ocupada pelos fungos foi medida através de fotografias e posterior tratamento de imagens. As fotografias foram feitas com uma câmera digital Sony Cyber-shot modelo DSC-WX7 de 16,2 Megapixels. A câmera estava ajustada para não utilizar flash e sem zoom. O equipamento foi posicionado a uma distância vertical de 12 cm das placas que seriam fotografadas conforme observado na figura 6.2. O ambiente foi controlado de forma que as placas fossem posicionadas em cima de um material escuro e apenas com luz difusa com o objetivo de realçar o contraste.



Figura 6.2 – local utilizado para a obtenção das fotografias

As imagens obtidas do tipo RGB color no formato JPEG foram analisadas no software ImageJ pelo processo de limiarização (GONZALEZ e WOODS, 2007 e MARQUES FILHO e VIEIRA NETO, 1999). A imagem colorida foi transformada em uma imagem em escala de cinza (8-bit) e em seguida foi limiarizada obtendo-se uma

imagem binária na qual a área em branco corresponde à área ocupada pelo fungo. O processo pode ser visualizado na figura 6.3. O tratamento das imagens foi realizado através de programação macro. Em razão das diferenças de coloração entre os dois fungos, foram necessárias macros distintas para cada fungo (mostradas no Apêndice C). Com o intuito de obter uma melhor imagem para o cálculo da área foram utilizadas algumas técnicas de morfologia matemática (FERREIRA e RASBAND, 2012).

A partir da imagem binária, o software foi capaz de calcular a área ocupada pelo fungo (FERREIRA e RASBAND, 2012).

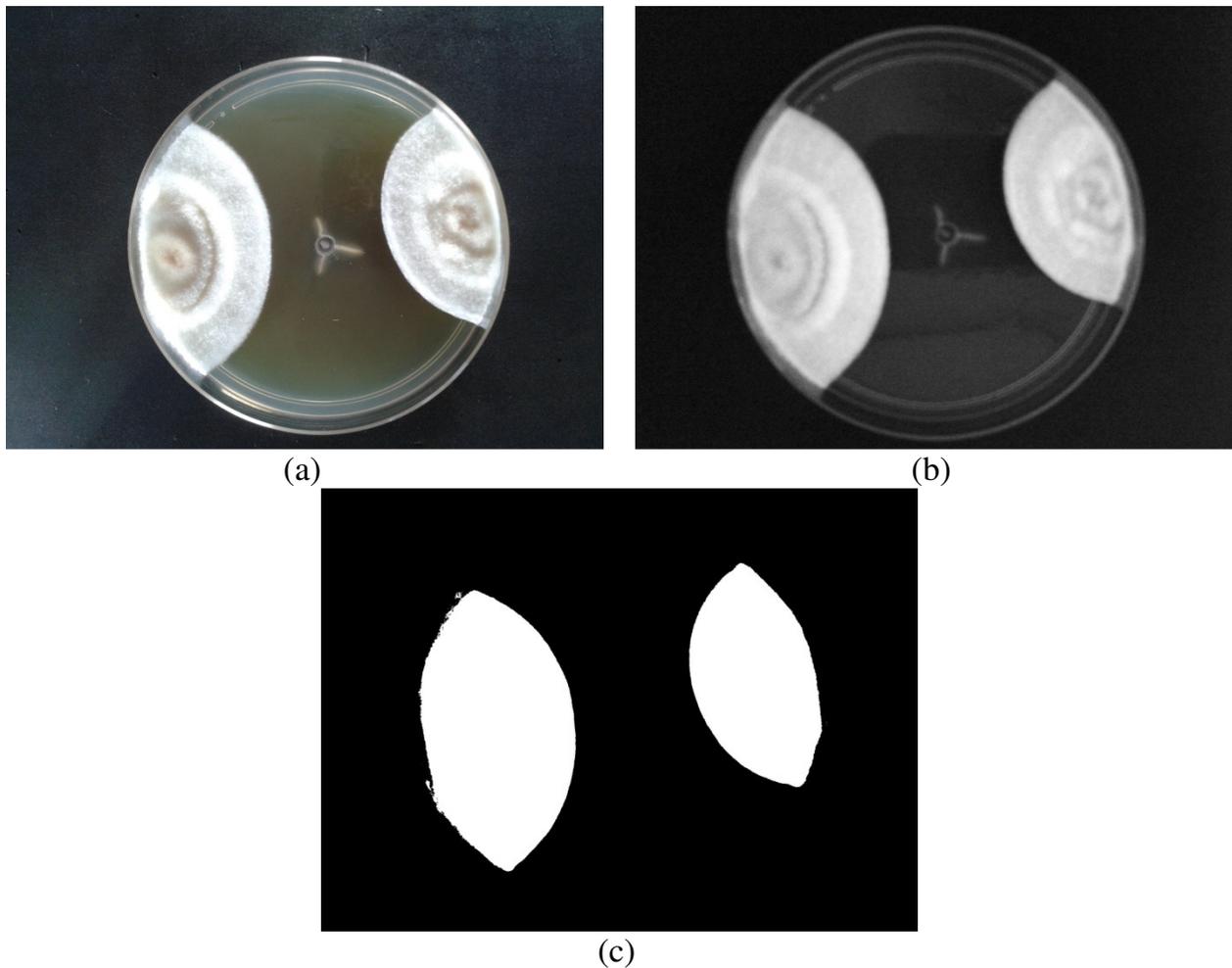


Figura 6.3 – Processo de tratamento das imagens: (a) imagem colorida, (b) imagem em escala de cinza e (c) imagem limiarizada.

6.2.3 - Análise estatística

O trabalho desenvolvido pode ser entendido como o conjunto de experimentos distintos compostos por um óleo e um fungo. Dessa forma têm-se vários delineamentos inteiramente casualizados com quatro tratamentos e 10 repetições.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio dos softwares SPSS e Microsoft Excel®. Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey e buscou-se a melhor regressão para as situações em questão (linear ou logarítmica). O teste de Tukey foi realizado através de uma macro para Excel disponibilizada pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) disponível em <http://www.cca.ufscar.br/servicos/teste-de-tukey/>.

6.3 - RESULTADOS

6.3.1 - Atividade antifúngica dos óleos essenciais

A figura 6.4 mostra a aparência de uma típica placa de petri após o término dos experimentos. As tabelas 6.3 e 6.4 mostram os índices de inibição do crescimento fúngico de *G. trabeum* e *T. versicolor* respectivamente para os óleos nas diversas concentrações avaliadas enquanto que o fungicida comercial apresentou índices de inibição de 96,81% (*G. trabeum*) e 59,99% (*T. versicolor*). As informações sobre o tratamento estatístico das regressões estão descritas no Apêndice B.

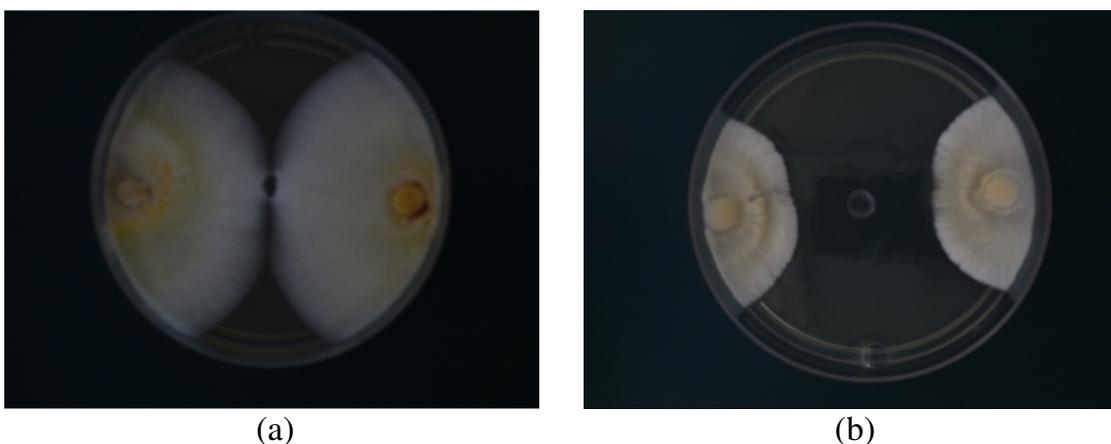


Figura 6.4 – Imagens do crescimento dos fungos ao término do experimento: (a) *G. trabeum* e (b) *T. versicolor*.

Quando não havia o desenvolvimento do fungo, como na figura 6.5, definiu-se o índice de inibição igual a 100% e não foi realizado nenhum tratamento na imagem. Houve também placas em que o fungo cresceu mais do que o valor controle (placas tratadas com etanol). Nesse caso atribuiu-se o valor de 0% de inibição.

Os óleos de *P. myrsinites* e *P. laruotteanum* mostraram atividade biológica muito baixa já com a concentração de 100% contra *G. trabeum* (índices de inibição de 18,76 e 9,42% respectivamente, ver tabela 6.3) e, por essa razão, não foram avaliadas

em concentrações menores. Além disso, não houve material suficiente dos óleos de *P. myrsinites*, *Hyptis sp.* e *P. laruotteanum* para a realização dos ensaios com o fungo *T. versicolor*.

Tabela 6.3 – Índices de inibição dos óleos essenciais contra *G. trabeum*.

Óleo Essencial	Concentração (%)			
	100	50	25	12,5
<i>L. origanoides</i>	100,00 a*	100,00 a	100,00 a	100,00 a
<i>S. aromaticum</i>	100,00 a	94,78 a	76,81 b	26,04 c
<i>P. myrsinites</i>	18,76	-	-	-
<i>Hyptis sp.</i>	34,06 a	21,93 ab	11,57 bc	0,00 c
<i>P. laruotteanum</i>	9,42	-	-	-
<i>L. lacunosa</i>	83,16 a	32,71 b	29,87 bc	14,55 c

*valores com as mesmas letras na linha indicam que, ao nível de significância de 5%, não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey.

Tabela 6.4 – Índices de inibição dos óleos essenciais contra *T. versicolor*.

Óleo Essencial	Concentração (%)			
	100	50	25	12,5
<i>L. origanoides</i>	100,00 a*	98,85 a	94,50 a	65,38 b
<i>S. aromaticum</i>	70,49 a	67,06 ab	54,58 c	57,08 bc
<i>L. lacunosa</i>	100,00 a	75,09 b	26,84 c	1,19 d

*valores com as mesmas letras na linha indicam que, ao nível de significância de 5%, não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey.

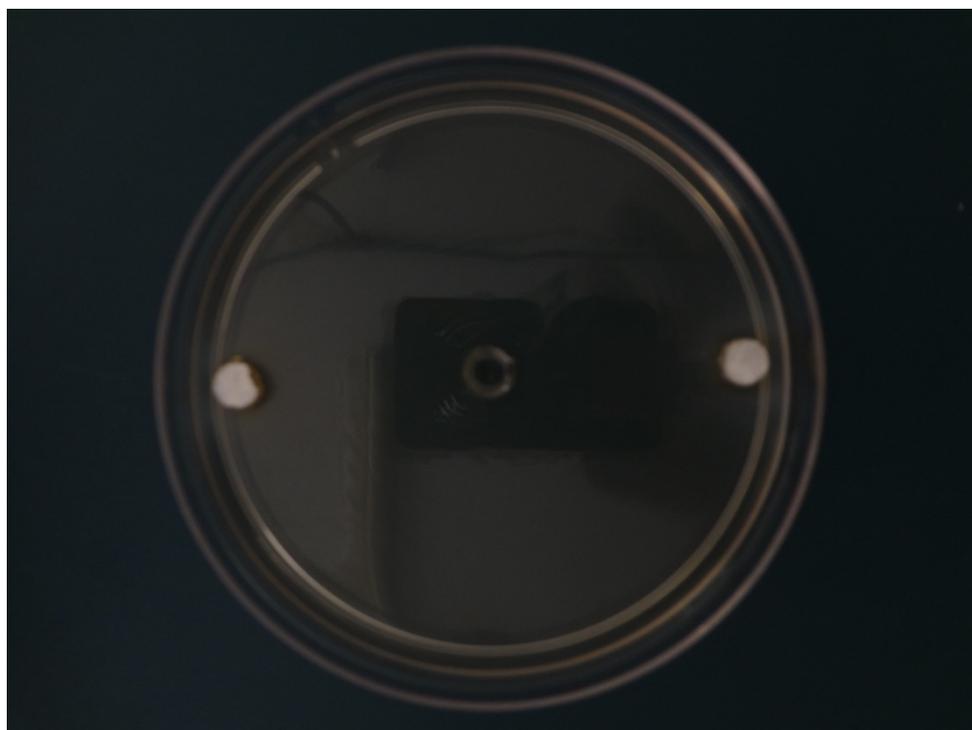


Figura 6.5 – Resultado do experimento com fungo *T. versicolor* com óleo de *L. origanoides*, no qual o fungo foi totalmente inibido.

6.4 - DISCUSSÃO

6.4.1 - Atividade biológica

6.4.1.1 - *Lippia origanoides*

Observa-se claramente que o óleo de *L. origanoides* apresenta atividade antifúngica bastante elevada. Esse resultado corrobora as pesquisas de que esse óleo possui atividade biológica, porém, esta é a primeira vez que o óleo de *L. origanoides* é testado contra fungos apodrecedores de madeira.

Oliveira *et al.* (2007) avaliaram o efeito do óleo essencial em questão contra diversos fungos e algumas bactérias. Os resultados foram interessantes, entretanto, ao contrário deste trabalho, o óleo testado era rico em carvacrol. Galvis *et al.* (2011) também mostraram que o óleo de *L. origanoides* é ativo contra fungos do gênero *Aspergillus* e *Candida*.

Há vários outros estudos que comprovam a atividade biológica do óleo de *L. origanoides* contra protozoários (FARIAS-JUNIOR *et al.*, 2012), insetos (LIMA *et al.*, 2011) e bactérias (VERAS *et al.*, 2012), além de efeitos antígenotóxicos (VICUÑA, STASHENKO e FUENTES, 2010). Todos esses artigos relatam que os efeitos observados dependem dos isômeros timol e carvacrol.

A completa inibição do *G. trabeum* em todas as concentrações testadas evidencia a sensibilidade desse fungo ao óleo. Contra o *T. versicolor* a inibição foi menor, porém, ainda bastante significativa principalmente considerando que não houve diferença significativa entre as três primeiras concentrações (ver tabela 6.4).

A aproximação logarítmica dos índices de inibição do óleo de *L. origanoides* contra o fungo *T. versicolor* em função da concentração ($r^2 = 0,511$) foi mais representativa do que a regressão linear ($r^2 = 0,331$), embora ambas tenham sido significativas (figura 6.6).

Embora ainda não tivesse sido avaliado contra fungos xilófagos, o principal composto do óleo de *L. origanoides*, o timol, já foi estudado contra *T. versicolor* e *Coniophora puteana* e demonstrou elevada capacidade de inibir o crescimento fúngico (VODA *et al.*, 2003).

Considerando a baixa toxicidade do timol ao ser humano (EPA, 2009), tanto o timol como o óleo de *L. origanoides* são potenciais candidatos a constituírem princípios ativos de preservativos de madeira menos agressivos e, para tanto, serão necessários estudos mais aprofundados como os ensaios acelerados em laboratório com blocos de madeira.

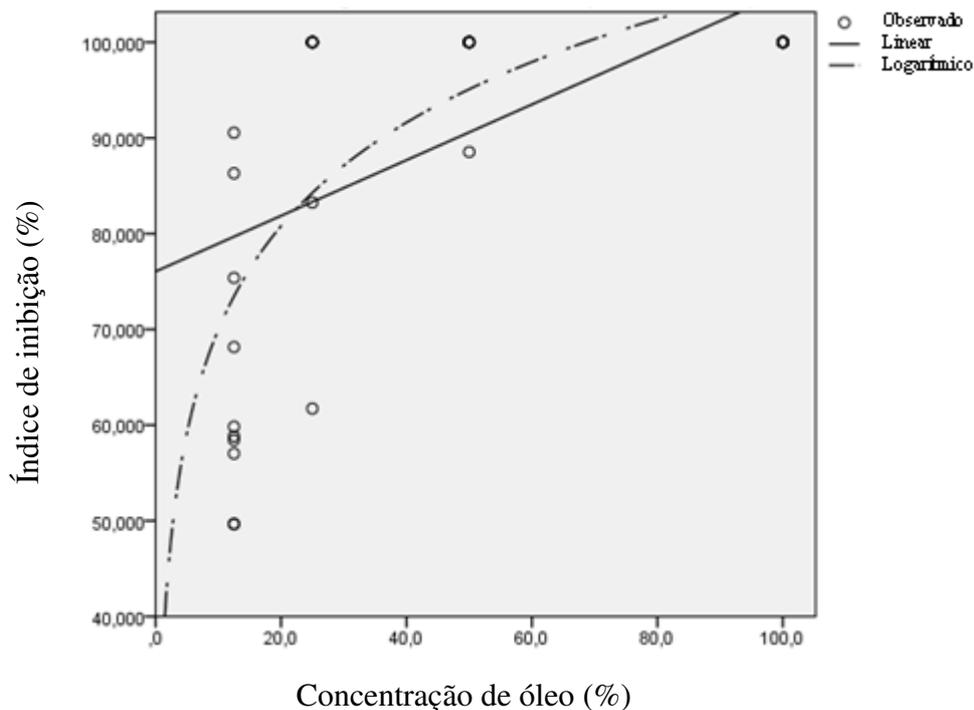


Figura 6.6 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *T. versicolor* em função da concentração de óleo de *L. origanoides*.

6.4.1.2 - *Syzigium aromaticum*

O óleo de *S. aromaticum* também apresentou atividade interessante, embora não tão eficiente quanto a *L. origanoides*. Contra o fungo *G. trabeum*, observou-se que não houve diferença estatística entre as concentrações mais altas (100 e 50%), todavia, a inibição decresceu acentuadamente nas demais concentrações (ver tabela 6.3). Novamente observou-se que a regressão logarítmica é mais adequada para representar os dados conforme observado na figura 6.7 ($r^2 = 0,714$ e $r^2 = 0,508$ respectivamente).

O óleo de *S. aromaticum* demonstrou certa atividade contra o fungo *T. versicolor*. Ambas as regressões (linear e logarítmica) foram significativas, porém, não foram capazes de explicar grande parte das variações dos dados observadas ($r^2 = 0,308$ e $r^2 = 0,302$ respectivamente). A figura 6.8 mostra que há grande variação nos dados principalmente naqueles relacionados à concentração de 12,5% cuja média do índice de inibição foi maior do que a média relativa à concentração de 25%. Isso sugere a existência de algum erro sistêmico, pois em todos os resultados com os demais óleos o índice de inibição sempre foi diretamente proporcional à concentração embora essa relação não tenha se mostrado linear.

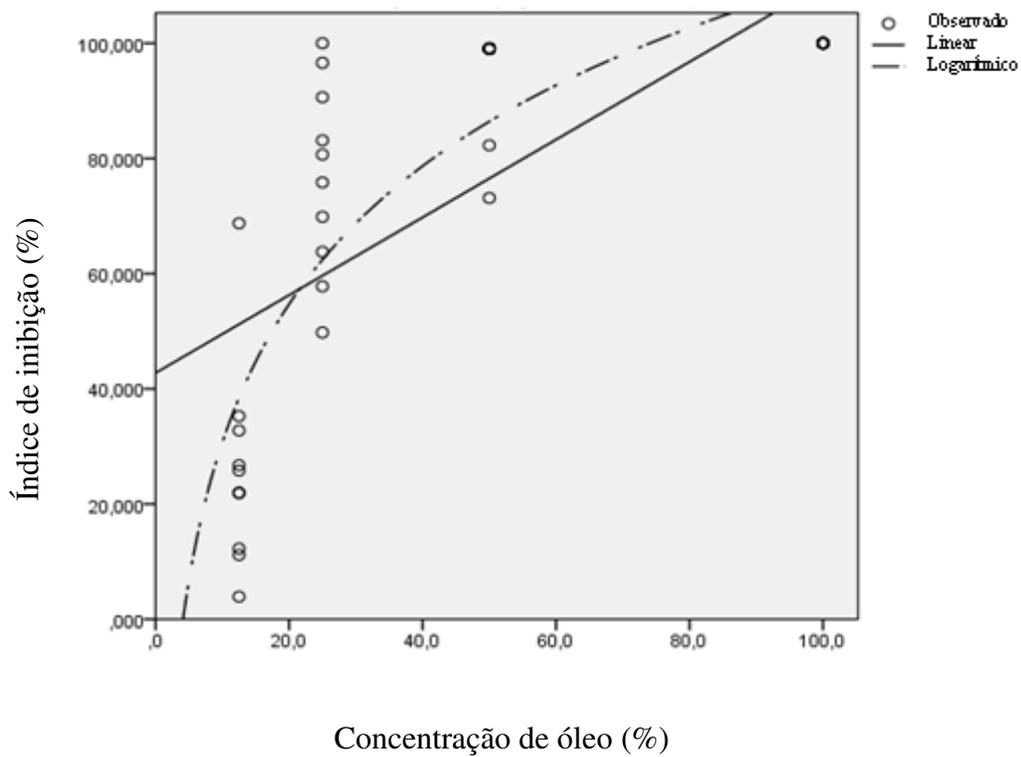


Figura 6.7 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *G. trabeum* em função da concentração de óleo de *S. aromaticum*.

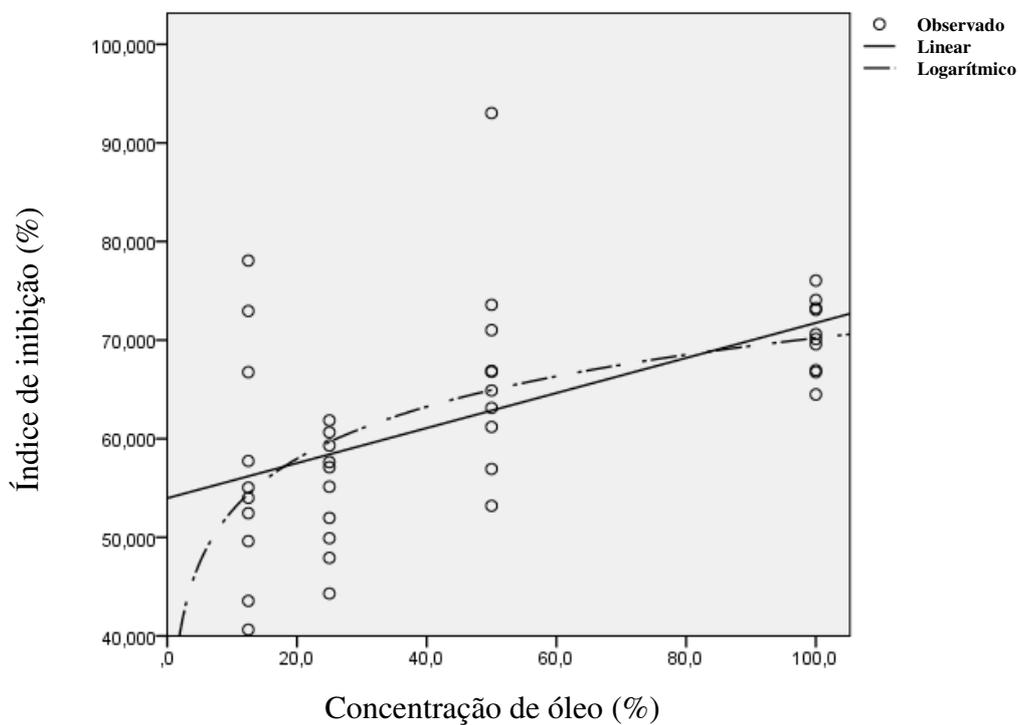


Figura 6.8 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *G. trabeum* em função da concentração de óleo de *S. aromaticum*.

Existem muitas informações sobre a atividade biológica do óleo de *S. aromaticum* contra insetos, bactérias e fungos (CHAIEB *et al.*, 2007). Matan e Matan (2007) investigaram o efeito do óleo de cravo contra fungos emboloradores de madeira (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium* sp.) tanto em testes *in vitro* como em ensaios acelerados de laboratório. Os pesquisadores mostraram que o óleo foi capaz de inibir o crescimento do bolor na madeira de *Hevea brasiliensis* por pelo menos 12 semanas.

Mais recentemente Ma-in, Kittikun e Phongpaichit (2014) estudaram o efeito do óleo de *S. aromaticum* contra fungos semelhantes (*Penicillium* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus versicolor*). Conquanto os resultados *in vitro* tenham sido promissores, o óleo não foi capaz de inibir o crescimento desses fungos quando testado em madeira (*H. brasiliensis*) (MA-IN, KITTIKUN e PHONGPAICHIT, 2014).

Rana, Rana e Rajak (2011) avaliaram os efeitos do óleo de *S. aromaticum* contra fungos patógenos e obtiveram resultados interessantes. Mostrou-se ainda que a atividade antifúngica é devida ao eugenol presente em grande quantidade nesse óleo (RANA, RANA e RAJAK, 2011).

Cheng *et al.* (2006) avaliaram a capacidade do eugenol de inibir o desenvolvimento de fungos de podridão parda (*Laetiporus sulphureus*) e podridão branca (*T. versicolor* e *Lenzites betulina*). O estudo identificou que o eugenol possui boa atividade em especial contra o fungo de podridão parda de forma semelhante ao observado neste trabalho (CHENG *et al.*, 2006).

Yen e Chang (2008) também mostraram a efetividade do eugenol contra fungos xilófagos e novamente houve maior inibição do fungo de podridão parda. É interessante notar que o eugenol apresentou efeito sinérgico quando combinado com o cinamaldeído (YEN e CHANG, 2008).

Cheng *et al.* (2008) estudaram o efeito de alguns congêneres do eugenol contra fungos xilófagos (*L. sulphureus* e *L. betulina*). Os autores identificaram que a modificação do grupo hidroxila (-OH) por grupos menos polares ou apolares (acetil e metil) reduz drasticamente a atividade do composto (CHENG *et al.*, 2008). Por outro lado, a mudança de posição da dupla ligação tornou o composto mais efetivo. O isoeugenol (figura 6.9) apresenta maior deslocalização dos elétrons, em razão da conjugação das ligações duplas, o que se reflete, por exemplo, em um maior potencial antioxidante (MARTEAU *et al.*, 2013).

A atividade do eugenol é bem conhecida e, por isso, já está sendo utilizado nas próximas etapas dos testes de preservação de madeira. Chittenden e Singh (2011) avaliaram a eficiência desse composto em ensaios acelerados de laboratório de acordo com a norma EN113. Foi comprovada a capacidade do eugenol de evitar a perda de massa em madeira de pinho, porém, ficou evidente a facilidade de lixiviação do composto (CHITTENDEN e SINGH, 2011).

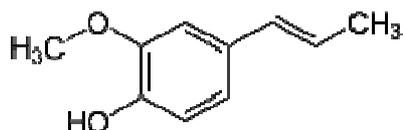


Figura 6.9 – Fórmula estrutural do isoeugenol

6.4.1.3 - *Psidium myrsinites*

O óleo de *P. myrsinites* era muito viscoso, portanto, acredita-se que isso tenha dificultado sua difusão para o meio de cultura, o que poderia explicar sua baixa atividade. Esse óleo é muito rico em sesquiterpenos (88% dos compostos), porém, ao contrário dos óleos de *P. laruotteanum* e *Hyptis sp.*, predominam os terpenos oxigenados (68%) como óxido de cariofileno (26,1%) e epóxido de humuleno II (8,8%). Embora a presença do oxigênio permita ligações de hidrogênio e outras interações com a água, as grandes cadeias orgânicas (15 carbonos) devem ser preponderantes na determinação da solubilidade desses compostos em água. Taherpour *et al.* (2011) calcularam a solubilidade teórica de alguns terpenos em água e mostraram, como esperado, que sesquiterpenos são bem menos solúveis do que monoterpenos (TAHERPOUR *et al.*, 2011).

6.4.1.4 - *Hyptis sp.*

Embora a inibição causada pelo óleo de *Hyptis sp.* tenha sido pequena (inibição máxima de 34,06%), é possível observar que tanto a regressão logarítmica como a linear foram capazes de explicar razoavelmente as variações dos dados, porém, a logarítmica foi ligeiramente superior à linear ($r^2 = 0,568$ e $r^2 = 0,527$ respectivamente). As curvas são mostradas na figura 6.10.

Em razão dos baixos valores de inibição de *Hyptis sp.* obtidos contra o *G. trabeum*, esse óleo não foi testado contra o fungo *T. versicolor*.

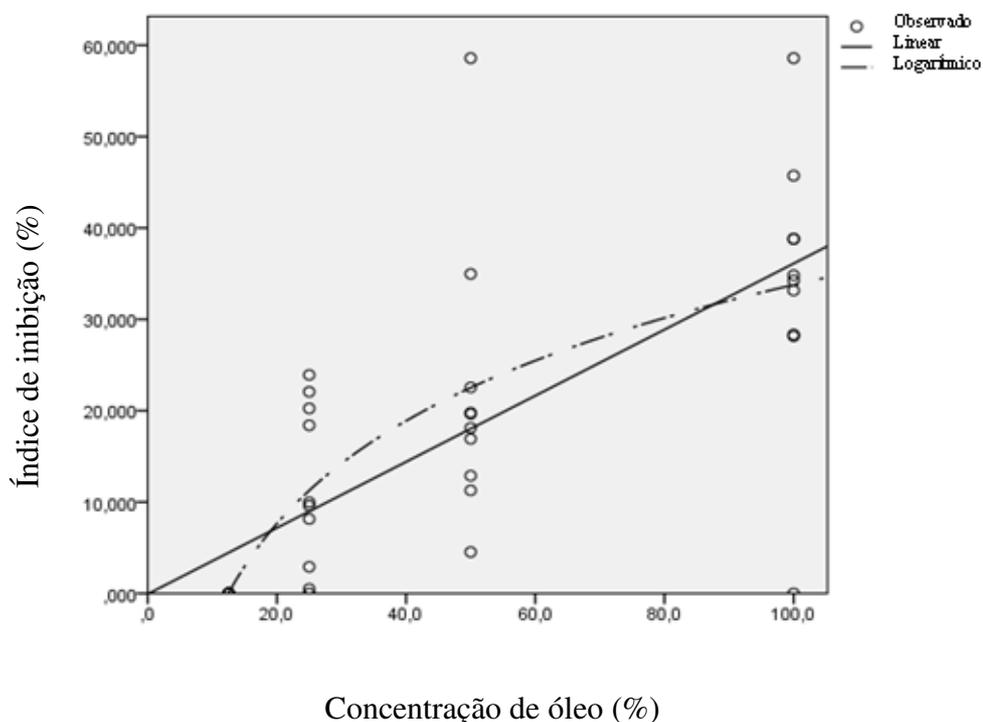


Figura 6.10 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *G. trabeum* em função da concentração de óleo de *Hyptis sp.*.

6.4.1.5 - *Psidium laruotteanum*

O óleo de *P. laruotteanum* apresentou a menor atividade de todos os óleos testados.

É possível que a baixa atividade observada para os óleos de *Hyptis sp.* e *P. laruotteanum* se deva ao elevado teor de terpenos não oxigenados (67 e 65% respectivamente) que possuem baixa solubilidade em água, o que pode dificultar sua difusão no meio de cultura. O β -pineno, um dos principais compostos do óleo de *Hyptis sp.* (17,6%), possui solubilidade em água de 1,9 ppm e o α -pineno (10,0%) de apenas 0,9 ppm (GRIFFIN *et al.*, 1999). No óleo de *P. laruotteanum*, ocorre fato semelhante em que os principais componentes, α -pineno (11,4%) e *p*-cimeno (34,8%), possuem baixa solubilidade (0,9 e 6,2 ppm respectivamente) (GRIFFIN *et al.*, 1999). De forma geral, Griffin *et al.* (1999) mostraram que terpenos, sem grupos funcionais (hidroxilas ou carbonilas por exemplo), não apresentam atividade biológica significativa em razão de sua baixa solubilidade em água. Lang *et al.* (2011), todavia, relatam que tanto o α -pineno como o *p*-cimeno possuem alguma atividade contra fungos.

6.4.1.6 - *Lippia lacunosa*

O óleo de *L. lacunosa* foi mais eficiente no combate aos fungos testados. A atividade desse óleo contra o fungo *G. trabeum* mostrou-se razoavelmente eficiente, enquanto, a inibição do *T. versicolor* foi boa (Tabelas 6.3 e 6.4). O índice de inibição do fungo de podridão parda decresceu rapidamente. O modelo linear foi capaz de explicar melhor a variação ($r^2 = 0,823$), embora a regressão logarítmica também tenha elevado coeficiente de determinação ($r^2 = 0,730$). Ambas as curvas podem ser observadas na figura 6.11.

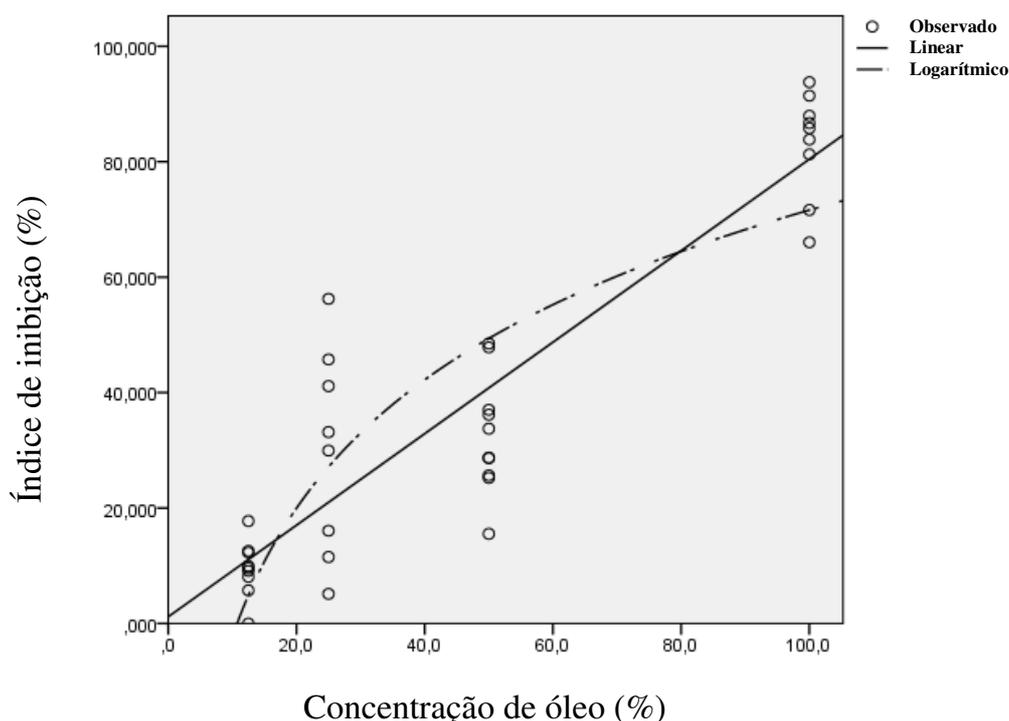


Figura 6.11 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *G. trabeum* em função da concentração de óleo de *L. lacunosa*.

Contra o fungo de podridão branca, o índice de inibição ajustou-se muito bem ao modelo logarítmico ($r^2 = 0,950$), porém, o modelo linear também foi capaz de explicar grande parte dos dados ($r^2 = 0,862$) (Figura 6.12).

O óleo de *L. lacunosa* é rico em linalol (38,7%), um álcool monoterpênico. O linalol é uma substância com bioatividade já conhecida (CHENG *et al.*, 2012). Lang *et al.* (2011) apontam que óleos essenciais contendo linalol são ativos contra microorganismos inclusive contra fungos. Cheng *et al.* (2006), mostraram, entretanto, que a atividade do óleo essencial de *Cinnamomum osmophloeum* rico em linalol é menos intensa contra fungos xilófagos do que os óleos de outros quimiotipos com eugenol ou cinamaldeído.

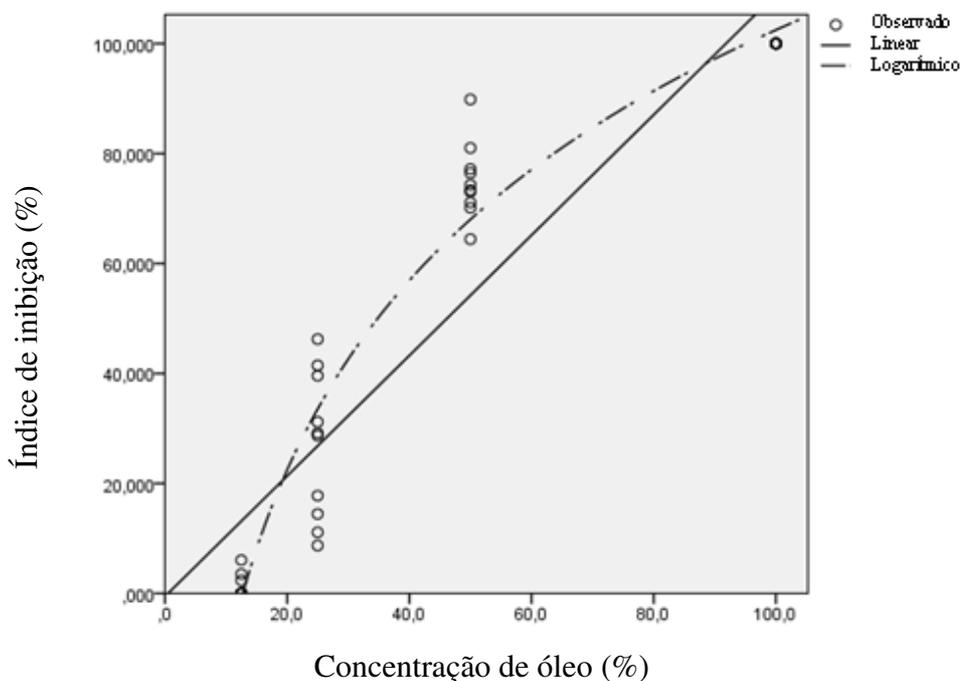


Figura 6.12 – Regressões linear e logarítmica do índice de inibição do fungo *T. versicolor* em função da concentração de óleo de *L. lacunosa*.

Há na literatura certo entendimento de que os óleos essenciais atuam por vários mecanismos em virtude da diversidade de compostos existentes (LANG e BUCHBAUER, 2012 e CARSON, MEE e RILEY, 2002). Embora o linalol possua razoável solubilidade em água (754 ppm) se comparado a outros terpenos (GRIFFIN *et al.*, 1999), mais de 50% do óleo de *L. lacunosa* é composto por sesquiterpenos, grande parte não oxigenados, que possivelmente têm baixa solubilidade (TAHERPOUR *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, difusão heterogênea no meio de cultura. Não foram encontradas, entretanto, muitas informações sobre a solubilidade em água ou sobre o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) de sesquiterpenos para corroborar esse raciocínio. Isto mostra um interessante campo para pesquisas, visto que alguns estudos (GRIFFIN *et al.*, 1999 e SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013) demonstram a existência de forte correlação entre a atividade de monoterpênicos e fenilpropanóides com sua hidrofobicidade.

Conquanto tenha sido identificado apenas um trabalho em que um óleo com quantidades consideráveis de linalol foi avaliado contra fungos xilófagos, existem alguns trabalhos que investigaram a ação de outros terpenos não fenólicos na inibição de tais micro-organismos.

Yang e Clausen (2007) mostraram que óleos contendo citronelol e carvona são efetivos contra fungos emboloradores. Cheng *et al.* (2004) testaram alguns terpenos

contra alguns fungos apodrecedores e observaram que o α -cadinol e o T-muurolol apresentaram elevados índices de inibição. Outros terpenos como limoneno, α -terpineno, β -mirceno, β -cariofileno e óxido de cariofileno não demonstraram qualquer atividade (CHENG *et al.*, 2004).

A literatura mostra que terpenos oxigenados são mais ativos contra bactérias do que hidrocarbonetos. Enquanto isso os fenóis possuem maior atividade do que os alcoóis que, por sua vez, são mais eficientes do que aquelas substâncias com grupo carbonila (cetonas e aldeídos) (GALLUCCI *et al.*, 2009 e GRIFFIN *et al.*, 1999). Segundo Gallucci *et al.* (2009) e Griffin *et al.* (1999), a principal característica atrelada à bioatividade é a capacidade de formar ligações de hidrogênio.

A posição dos grupos funcionais também aparenta ser importante. O α -cadinol e o T-muurolol, não obstante serem isômeros de posição, demonstraram índices de inibição elevados, porém, o α -cadinol foi significativamente mais eficiente do que o T-muurolol (CHENG *et al.*, 2004).

Os estudos com componentes isolados de óleos essenciais concentram-se em estudos com monoterpenos ou fenilpropanoides, provavelmente devido a maior facilidade para obtenção da matéria prima, visto que poucos sesquiterpenos são disponíveis comercialmente. Ao estudar a atividade biológica de óleos de plantas do Cerrado, encontram-se algumas dificuldades nesse sentido, pois os sesquiterpenos geralmente estão presentes em grandes quantidades.

6.4.2 - Mecanismo de ação

Muitas referências na literatura destacam que dentre os componentes de óleos essenciais, os fenóis, principalmente timol, carvacrol e eugenol, possuem ação antimicrobiana muito elevada em especial contra fungos (SAAD, MULLER e LOBSTEIN, 2013; BURT, 2004; LANG e BUCHBAUER, 2012; LIMA *et al.*, 2013; SCORA e SCORA, 1998 e PAULI e SCHILCHER, 2010).

A madeira, que é atacada pelos fungos apodrecedores, é formada por uma intrincada rede de polímeros naturais: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é constituída apenas de D-glicose e forma microfibrilas as quais são envolvidas por misturas de hemicelulose e lignina (PÉREZ *et al.*, 2002). Macroscopicamente a madeira é constituída pela medula (centro), cerne, alburno, região cambial, casca interna e casca externa (CHIMELO, 1986).

Muitos autores atribuem a durabilidade da madeira à presença dos extrativos existentes no cerne principalmente nas regiões mais afastadas da medula (OLIVEIRA *et al.*, 1986 e ROWELL *et al.*, 2005). Alguns estudos com madeiras duráveis mostraram que seus extrativos têm pouca atividade fungicida, porém, ainda sim são capazes de proteger a madeira da deterioração por fungos xilófagos (SCHULTZ e NICHOLAS, 2000). A explicação mais plausível seria que os extrativos agem de várias maneiras diferentes. Além da atividade fungicida, a propriedade de preservar a madeira exibida pelos extrativos é atribuída ao poder antioxidante e à capacidade de complexação com metais (SCHULTZ e NICHOLAS, 2000 e SCHULTZ e NICHOLAS, 2002). Os extratos de madeiras duráveis têm em sua composição polifenóis como flavonoides e taninos condensados e hidrolisáveis (figura 6.13) (ROWELL *et al.*, 2005). A essas substâncias é atribuída a alta durabilidade das madeiras.

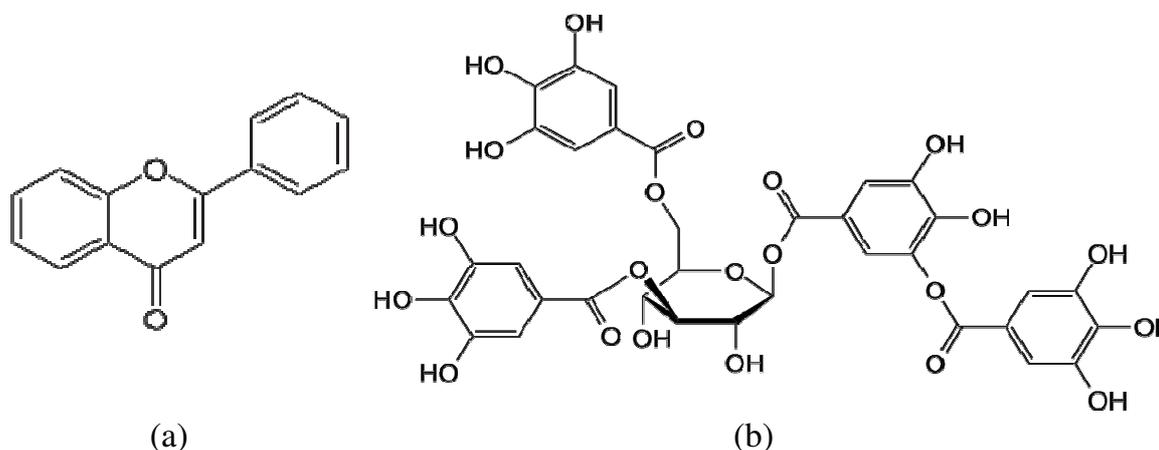


Figura 6.13 – Exemplo de (a) flavonoide (2-fenil-1,4-benzopirona) e (b) tanino hidrolisável (ácido tânico).

Há duas categorias básicas de fungos xilófagos. Micro-organismos que não causam a degradação da parede celular como os fungos emboloradores e os manchadores que se utilizam das substâncias presentes no lúmen das células da madeira. Micro-organismos, por outro lado, que degradam a parede celular como os fungos de podridão branca e parda são capazes de atacar a celulose, a hemicelulose (podridão branca e parda) e a lignina (apenas podridão branca).

De acordo com Martínez *et al.* (2005), a ação dos fungos de podridão branca, ao consumir a madeira, inicia-se com a degradação da lignina através de processos de oxirredução. Estes processos envolvem várias enzimas extracelulares que utilizam alguns metais e compostos (H_2O_2 e $\bullet OH$) para iniciar a oxidação da lignina. As enzimas em si são muito grandes e, por isso, não são capazes de penetrar na estrutura compacta

da madeira (HAMMEL *et al.*, 2002 e MARTÍNEZ *et al.*, 2005). Dessa forma, a alternativa encontrada é a liberação de pequenos compostos como Mn^{3+} , H_2O_2 e $\bullet OH$ a fim de iniciar a fragmentação da lignina (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Assim como no caso da lignina, a celulose e a hemicelulose também são degradadas por mecanismos de oxirredução (HAMMEL *et al.*, 2002 e OLIVEIRA *et al.*, 1986). Segundo Pérez *et al.* (2002), as enzimas que atacam a celulose o fazem na sua porção amorfa onde existe mais espaço para sua penetração, ou seja, é possível que seja necessário também o lançamento de pequenos compostos nas primeiras etapas de consumo da celulose.

Hammel *et al.* (2002) sugerem que a geração de espécies com oxigênio reativo são produzidas por reações que envolvem a oxidação de metais como o Fe^{2+} , mostrando novamente o papel de alguns metais no processo.

Observa-se, portanto, que, assim como sugerido por Schultz e Nicholas (2002), o poder antioxidante e a capacidade de complexação influenciam na eficácia de um preservativo de madeira, pois essas propriedades interferem nos mecanismos de obtenção de alimento pelos fungos através da degradação da madeira.

Os compostos fenólicos podem inibir o apodrecimento da madeira em razão de sua capacidade de reagir com radicais livres e oxidantes (devido ao efeito da deslocalização dos elétrons em duplas ligações conjugadas, conforme observado na figura 6.14) e também pela presença de hidroxilas (-OH) disponíveis para interagir com metais (efeito quelante) (SOVA, 2012). Essas conclusões vão ao encontro daquelas obtidas por Cheng *et al.* (2008) ao estudar a atividade dos congêneres do cinamaldeído e do eugenol. A atividade dos congêneres aumenta quando há duplas ligações conjugadas, grupos ácidos ou aldeídos, pois se aumenta o efeito da deslocalização dos elétrons e assim a capacidade de reagir com radicais livres e oxidantes.

Em estudo recente, Teixeira *et al.* (2013) avaliaram o potencial antioxidante de 17 óleos essenciais comerciais e identificaram que quase todos os óleos com fenilpropanoides ou terpenos fenólicos em suas composições apresentaram boa atividade antioxidante (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

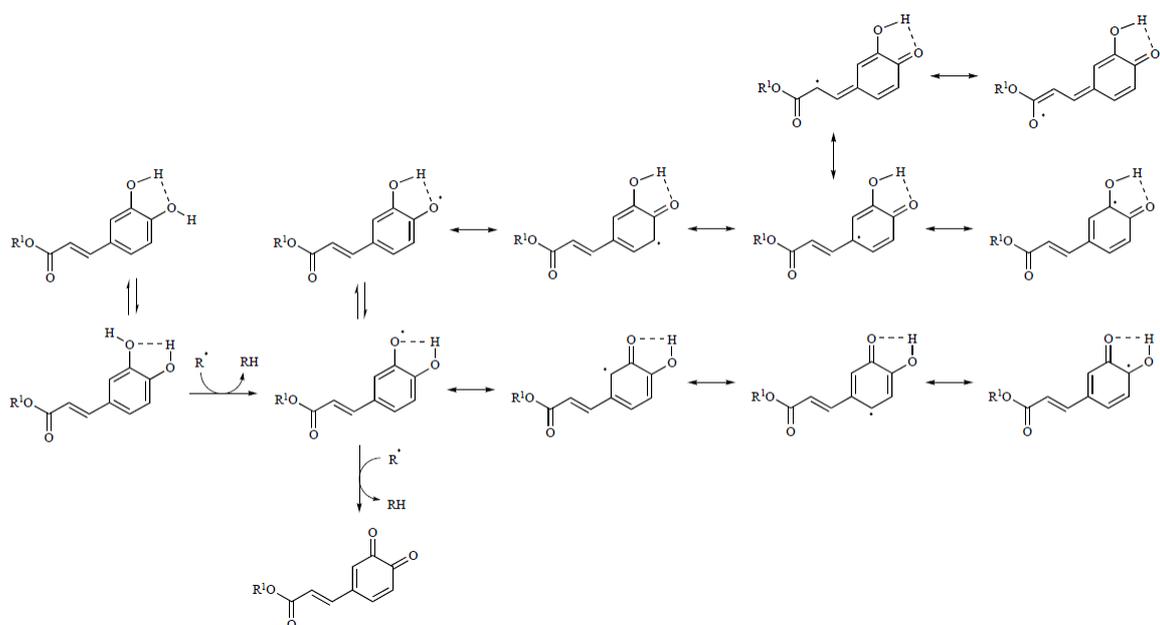


Figura 6.14 – Mecanismo de deslocalização dos elétrons na captura de radicais livres de um composto fenólico. Fonte: Sova (2012).

Voda *et al* (2003) avaliaram o crescimento dos fungos *T. versicolor* e *Coniophora puteana* em meios contendo compostos fenólicos ou derivados e perceberam que o timol, *trans*-anetol, cuminaldeído, carvacrol e metil-chavicol inibiam o desenvolvimento dos organismos xilófagos. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que os fenóis menos oxidados apresentavam maior atividade corroborando o fato de a atividade antioxidante influenciar na inibição, pois a capacidade de capturar elétrons torna-se maior (VODA *et al.*, 2003).

Apesar da importância da atividade antioxidante, ela não é determinante para a inibição dos micro-organismos xilófagos. Assim como comprovado no presente estudo, Voda *et al.* (2003) mostraram que o timol é mais eficiente do que o eugenol embora este tenha maior poder antioxidante do que aquele (MARTEAU *et al.*, 2013), ou seja, não será apenas um fator que determinará a bioatividade de um composto. É importante ressaltar que óleos contendo timol ou seu isômero carvacrol exibem elevado poder antioxidante, porém, menor do que aqueles óleos com eugenol (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Saad, Muller e Lobstein (2013) relataram que a ação do carvacrol resulta na alteração do gradiente de íons e atribuem tal efeito à capacidade do composto, quando desprotonado, de se ligar a cátions e transportá-los através da membrana celular. Lima *et al.* (2013) mostraram que o mecanismo de ação tóxica do carvacrol contra fungos não envolve a quelação de cátions, mas o aumento da permeabilidade da célula através de

alterações na sua parede. Embora a despolarização da célula não seja por meio de quebração, a princípio nada impede a interação dessa molécula com os metais liberados pelos fungos conforme a proposição de Martinez *et al.* (2005). Dada a semelhança entre carvacrol e timol, acredita-se que o timol atue pelos mesmos mecanismos.

Além de eficientes contra fungos apodrecedores, muitos óleos essenciais também são tóxicos a cupins (VERMA, SHARMA e PRASAD, 2009; KARTAL *et al.*, 2006 e CHENG *et al.*, 2004). No que concerne aos óleos estudados aqui, Park e Shin (2005) identificaram que o óleo de cravo foi bastante eficiente no combate a cupins atribuindo sua atividade ao eugenol.

Por essas razões e pelos vários compostos citados acima, acredita-se que os fenilpropanoides e os terpenos fenólicos, bem como os óleos essenciais que os contenham, sejam uma classe interessante de composto a serem avaliados quanto as suas propriedades como preservativo de madeiras.

6.4.3 - Avaliação da metodologia

Apesar de o método da diluição em ágar ser reconhecidamente o mais empregado na literatura com óleos essenciais, como já mencionado, existem algumas situações em que o método da difusão pode ser uma alternativa interessante.

O método da diluição tem custos mais elevados, demanda mais trabalho laboratorial e os resultados não são absolutos. Pauli e Schilcher (2010) explicam que há muitas variáveis nesses ensaios biológicos (tipo do meio de cultura, tamanho do inóculo, pH do meio, tempo e temperatura de incubação) que podem dificultar a obtenção de resultados reprodutivos. Pode-se citar os trabalhos de Cheng *et al.* (2006) e Cheng *et al.* (2008), elaborados pela mesma equipe com exatamente a mesma metodologia, porém, no estudo mais antigo, o valor de CI₅₀ (a menor concentração capaz de inibir 50% dos micélios de fungos) para o eugenol foi de aproximadamente 71 µg/mL (*L. sulphureus*) e 95 µg/mL (*L. betulina*), enquanto que, no trabalho mais recente, os valores de CI₅₀ obtidos foram 62,9 µg/mL (*L. sulphureus*) e 36,9 µg/mL (*L. betulina*). Considerando a qualidade das pesquisas, não é provável que tenham ocorrido erros de manipulação dos materiais, então, a diferença pode ser atribuída realmente às incertezas da metodologia.

A informação importante retirada dos trabalhos citados acima é que o eugenol é um bom produto para testes futuros contra fungos xilófagos. É possível, todavia, obter informação semelhante através do método da difusão. Na presente pesquisa, os valores

do índice de inibição foram comparáveis a um produto comercial utilizado contra fungos apodrecedores indicando a existência de atividade no eugenol.

A dificuldade de trabalhar com compostos hidrofóbicos não impede a obtenção de resultados válidos. Neste trabalho, o timol demonstrou maior poder inibidor do que o eugenol, embora este seja mais solúvel na água (2406 ppm) do que aquele (846 ppm) (GRIFFIN *et al.*, 1999).

A seu favor, a metodologia de difusão mostra-se muito mais simples, mais barata e demanda menos trabalho para sua execução, características ideais para um procedimento de avaliação preliminar.

O emprego de técnicas de processamento imagens permitiu a utilização de procedimentos de inoculação mais reprodutivos e menos complexos. Não há a necessidade de produzir soluções com quantidade conhecida de esporos tampouco o risco de a inoculação ser heterogênea, pois podem ser utilizados micélios como no método da diluição, visto que o cálculo da área através de imagens permite qualquer tipo de crescimento e não mais requer uma forma circular. Tal abordagem pode inclusive ser incorporada à técnica de diluição em ágar, visto que é sabido que nem sempre o crescimento dos micélios de fungos é homogêneo e perfeitamente circular.

A utilização de fotos e um software para a medição da inibição oferecem a possibilidade de automatização dos procedimentos, visto que, após a obtenção das imagens, todo o processo pode ser realizado automaticamente, por meio da função *batch* (*Process>Batch>Macro*).

6.5 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos permitem afirmar que o óleo de *L. origanoides* possui significativa atividade fungicida contra os fungos apodrecedores *G. trabeum* e *T. versicolor*. O óleo de *S. aromaticum*, embora menos eficiente, também se mostrou bastante ativo contra os fungos xilófagos testados. Associado a outras informações sobre a atividade desses óleos ou de seus componentes majoritários contra insetos em especial cupins, acredita-se que os óleos de cravo e alecrim-pimenta sejam substâncias interessantes para futuros estudos na área de preservação de madeira.

O óleo de *L. lacunosa* exibiu resultados de inibição significativos, porém, os demais óleos de plantas do Cerrado não demonstraram atividade biológica muito elevada.

A avaliação dos modelos matemáticos mostrou que a regressão logarítmica é mais adequada para explicar as variâncias observadas nos experimentos.

A metodologia empregada, apesar de não ser a usual, mostrou-se capaz de fornecer resultados válidos. Em virtude da facilidade, praticidade e da baixa quantidade de material necessário, acredita-se que seja importante comparar os métodos da difusão e da diluição em ágar para vários óleos essenciais com o intuito de verificar, de forma mais precisa, as situações em que a metodologia da difusão pode substituir a de diluição em ágar.

A utilização de fotografias para acompanhar o crescimento dos fungos demonstrou que pode facilitar a avaliação de vários ensaios biológicos principalmente naqueles em que há crescimento sem forma geométrica definida, além de conferir maior sensibilidade e confiabilidade ao processo, pois se elimina a medição humana, sujeita a erros inerentes. Considerando ainda a possibilidade de analisar as imagens em batelada, haverá também significativa economia de tempo.

Fica evidente a ausência de informações sobre os sesquiterpenos, seja a falta de dados sobre propriedades físico-químicas (solubilidade em água, por exemplo), seja a ausência de estudos da atividade biológica de sesquiterpenos isoladamente.

7 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Durante este trabalho foram descritas as composições químicas dos óleos essenciais de cinco plantas nativas do Cerrado: *P. myrsinites* (0,14%), *Hyptis sp.* (0,75%), *P. laruotheanum* (0,33%), *L. lacunosa* (0,46%) e *L. origanoides* (2,92%). Embora esta última seja uma espécie de ampla dispersão e, portanto, já bastante estudada, acredita-se que os óleos das três primeiras nunca foram descritos anteriormente e o óleo de *L. lacunosa* não havia sido descrito de plantas presentes no bioma Cerrado.

Óleos com compostos fenólicos apresentaram atividade biológica bastante pronunciada (óleos de *L. origanoides* e *S. aromaticum*), enquanto apenas o óleo de *L. lacunosa* demonstrou boa atividade fungicida entre os óleos que não contêm moléculas fenólicas. O óleo essencial de *L. origanoides* indica ser um material interessante para investigações futuras com o intuito de identificar um bom preservativo natural de madeira. Deve-se realizar ensaios acelerados em laboratório com blocos de madeira e testar também os componentes do óleo em separado a fim de verificar a existência de efeitos sinérgicos.

A metodologia utilizada apresentou redução no tempo do experimento e aumento da confiabilidade das medições oriundas principalmente do emprego de fotografias e software para acompanhar o crescimento fúngico.

Identificou-se a necessidade de mais estudos com sesquiterpenos, pois, provavelmente devido à dificuldade de obtenção de padrão comerciais, são poucas as pesquisas que avaliam a atividade biológicas desses terpenos e suas propriedades físico-químicas. Acrescenta-se a isso que a ausência de materiais de referência, acarreta na baixa disponibilidade de dados sobre índices de retenção e de padrões para coinjeção, o que dificulta sobremaneira a identificação desses compostos nos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4^a. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGUIAR, E. H. A.; ZOGHI, M. D. G. B.; SILVA, M. H. L. Chemical variation in the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **J. Essen. Oil Res.**, v. 15, p. 130-132, 2003.
- AGUIAR, L. M. D. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. D. S.; CAMARGO, A. J. A. D. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: Embrapa Informação eTecnológica, 2004. Cap. 1, p. 17-40.
- ALVES, S. F. et al. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 26, n. 2, p. 224-229, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D1413-07**: Standard test method for wood preservatives bu laborator soil-block cultures. Pennsylvania, 2007. 8 p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D4445-03**: Standard test method for fungicides for controlling sapstain and mold on unseasoned lumber (laboratory method). Pennsylvania, 2003. 4 p.
- AMUSANT, N. et al. Potencial of antifungal and antitermitic activity of several essential oils. In: THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION, 40, 2009, Beijing. **Proceedings...** Stockholm: IRG/WP, 2009. IRG/WP 09-30515. p. 1-16.
- ANDRADE-NETO, M. et al. Volatile constituents of *Psidium pohlianum* Berg and *Psidium guyanensis* Pers. **J. Essen. Oil Res.**, v. 6, n. 3, p. 299-300, 1994.

- AQUINO, F. D. G. et al. Uso sustentável das plantas nativas do Cerrado: oportunidades e desafios. In: PARRON, L. M., et al. **Cerrado: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. Cap. 4, p. 95-123.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiol.**, v. 21, p. 33-42, 2004.
- BALDWIN, I. T. et al. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 351-358, 2001.
- BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. In: BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Hannover: Springer, 2007. Cap. 4, p. 43-86.
- BATISTA, F. L. et al. Essential oils of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley and *Hyptis velutina* Pohl ex Benth. from Brazilian Cerrado. **J. Essen. Oil Res.**, v. 15, n. 2, p. 88-89, 2003.
- BEDNAREK, P.; OSBOURN, A. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. **Plant-Microbe Interactions**, v. 324, p. 746-748, 2009.
- BIANCHI, F. et al. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Data base creation and evaluation of precision and robustness. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 563-572, 2007.
- BICCHI, C. et al. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. **Flavour Frag. J.**, v. 23, p. 382-391, 2008.
- BITU, V. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracillii*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 1, p. 69-75, Jan./Feb. 2012.

- BOUCHRA, C. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven moroccan labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 165-169, 2003.
- BOULOGNE, I. et al. Insecticida and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environ. Chem. Lett.**, v. 10, p. 325-347, 2012.
- BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira. "Perspectivas da pesquisa e utilização". **Floresta**, v. 26, n. 1, p. 129-138, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 25 de novembro 2013.
- BRASIL. Lei 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis n^{os} 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis n^{os} 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória n^o 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.
- BROCHINI, C. B.; LAGO, J. H. G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p. 266-270, 2007.
- BRUD, W. S. Industrial uses of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 16, p. 843-854.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223-253, 2004.

- CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses toxicity study of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae) in swiss mice. **Evid-Based Compl. Alt.**, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- CANNON, J. B. et al. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. **Ind. Crop. Prod.**, v. 41, p. 214-220, 2013.
- CARRILLO, A. et al. Antifungal effect of bark and wood extracts of *Condalia hookerii* (Rhamnaceae), *Ebenopsis ebano* (Fabaceae) and *Helietta parvifolia* (Rutaceae) on *Trametes versicolor*. In: THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION, 41, 2010, Biarritz. **Proceedings...** Stockholm: IRG/WP, 2010. IRG/WP 10-30532. p. 1-6.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: THORMAR, H. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. Cap. 9, p. 203-238.
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, Jun. 2002.
- CASTELLO, G. Retention index system: alternatives to the n-alkanes as calibration standards. **J. Chromatogr. A**, v. 842, p. 51-64, 1999.
- CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C, IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do Cerrado. **CERNE**, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.
- CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. **J. Applied Sci**, v. 12, n. 8, p. 753-760, 2012.

- CASTILHO, C. V. V. et al. Composição química do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, VII, 2013, Santarém. **Resumos...** Santarém: SBOE, 2013.
- CASTRO, H. G. D. et al. Teor e Composição do Óleo Essencial de Cinco Acessos de Mentrasto. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.
- CHAIBUB, B. A. et al. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissim* A. St.-Hill. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 2, p. 225-229, 2013.
- CHAIIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 501-506, 2007.
- CHANG, S. T. et al. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 53, n. 5, p. 487-490, 1999.
- CHANG, S. T. et al. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 54, p. 241-245, 2000.
- CHENG, B. H. et al. Potential source of S-(+)-Linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaf: essential oil profile and enantiomeric purity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 7623-7628, 2012.
- CHENG, S. S. et al. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **J. Chem. Ecol.**, v. 10, p. 1957-1967, 2004.
- CHENG, S. S. et al. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). **Bioresource Technol.**, v. 97, p. 306-312, 2006.

- CHENG, S. S. et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood- rot fungi. **Bioresource Tecnol.**, v. 99, p. 5145-5149, 2008.
- CHIMELO, J. P. Anatomia da madeira. In: LEPAGE, E. S. **Manual de preservação de madeiras**. 1. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, v. 1, 1986. Cap. 3, p. 41-67.
- CHITTENDEN, C.; SINGH, T. Antifungal activity of essential oils against wood degrading fungi and their applications as wood preservatives. **International Wood Products Journal**, v. 2, n. 1, p. 44-48, 2011.
- CHOU, C. H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht: Springer, 2006. Cap. 1, p. 1-9.
- CLAUSEN, C. A.; WOODWARD, B. M.; YANG, V. W. Antifungal essential oil metabolites. In: THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION, 41, 2010, Biarritz. **Proceedings...** Stockholm: IRG/WP, 2010. IRG/WP 10-30531. p. 1-9.
- CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- CONTI, B. et al. Hyptis suaveolens and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (*Coleoptera: Dryophthoridae*). **J. Pest Sci**, v. 84, p. 219-228, 2011.
- COSTA, O. B. et al. Essential oil constituents and yields from leaves fo *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) collected during daytime. **International Journal of Forest Research**, 2014.
- COSTA, S. M. O. et al. Constituents of the essential oil of *Lippia microphylla* Cham. from Northeast Brazil. **J. Essen. Oil Res.**, v. 17, n. 4, p. 378-379, 2005.

- DONELIAN, A. et al. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. **J. Supercrit. Fluids**, v. 48, p. 15-20, 2009.
- DUARTE, A. R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia Dysenterica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010.
- DUARTE, A. R. et al. Influence of spatial, edaphic and genetic factors on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 737-746, 2012.
- DUARTE., A. R. et al. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2009.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Chemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Update on Biochemistry**, v. 122, p. 627-633, 2000.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol.**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 308-323, 2007.
- El-Sayed, A. M. **The Pherobase**: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: novembro 2013.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Thymol; Exemption from the Requirement of a Tolerance**, 2009. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/articles/2009/03/25/E9-6262/thymol-exemption-from-the-requirement-of-a-tolerance>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2013.
- FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

- FALK, R. H. Wood as a sustainable building material. In: FPL **Wood handbook - wood as an engineering material**. Madison: USDA Forest Service, 2010. Cap. 1, p. 1.1-1.6.
- FARIAS-JUNIOR, P. A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biol Res.**, v. 45, p. 399-402, 2012.
- FERRAZ, R. P. C. et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (*Verbenaceae*). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615-621, 2013.
- FERREIRA, E. C. et al. Essential oils of *Hyptis conferta* Pohl ex Benth. var. *conferta* and *Hyptis conferta* Pohl ex Benth. var. *angustata* (Briq) Pohl ex Harley from Brazilian Cerrado. **J. Essen. Oil Res.**, v. 17, n. 2, p. 145-146, 2005.
- FERREIRA, R. et al. Scents from Brazilian Cerrado: THE ESSENTIAL OIL FROM *Porophyllum angustissimum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 43, 2012, Lisbon. **Abstracts...** Lisbon: ISEO, 2012, p. 176.
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. ImageJ User Guide, 2012. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>>. Acesso em: 18 de setembro 2013.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag. J.**, v. 23, p. 213-226, 2008.
- FIUZA, T. S. et al. Composition and chemical variability in the essential oils of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth) Harley. **J. Essent. Oil Res.**, v. 22, n. 2, p. 159-163, 2010.
- FORERO-PENÚLA, L. Y. et al. Potencial of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & P. Wilson, as available source of linalool in southern Brazil. **J. Essen. Oil Res.**, v. 25, n. 6, p. 464-467, 2013.
- FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio e Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2 vols, 2010.

- FRANCO, C. R. P. et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 1, p. 24-32, Jan./Feb 2011.
- FREITAS, M. O.; MORAIS, S. M. D.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Psidium Myrsinoides* O. Berg. **J. Essen. Oil Res.**, v. 14, p. 364-365, 2002.
- GALDINO, P. M. et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Prog. Neuro-Psychoph.**, v. 38, p. 276-284, 2012.
- GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour Frag. J.**, v. 24, p. 348-354, 2009.
- GALVIS, L. B. et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H. B. K. in Colombia. **Salud Uis**, v. 43, n. 2, p. 141-148, 2011.
- GEÖCZE, K. C. et al. Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem. **Food Res. Int.**, v. 54, p. 1-8, 2013.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GONÇALVES, J. S. Reservas: incentivos a matas nativas em propriedades rurais. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v. 1, n. 8, 2006.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. 3. ed. Upper Saddle River, New Jersey: PrenticeHall, 2007.
- GRAIKOU, K. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil from the wood of *Pinus heldreichii* Christ. var. leucodermis. **Eur. J. Wood Prod.**, v. 70, n. 5, p. 615-620, 2012.

- GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour Frag. J.**, v. 14, p. 322-332, 1999.
- HAMMEL, K. E. et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 30, p. 445-453, 2002.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. Cap. 11, p. 255-306.
- HÜBSCHMANN, H.-J. **Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications**. 2^a. ed. Bremen: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- HÜTER, O. F. Use of natural products in the crop protection industry. **Phytochem. Rev.**, v. 10, p. 185-194, 2011.
- IBACH, R. E. Biological properties. In: ROWELL, R. M. **Wood Chemistry and Wood Composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 5, p. 99-120.
- IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agr. Food Sci. Finland**, v. 10, p. 243-259, 2001.
- IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 27, n. 1, p. 70-77, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas do Brasil**: primeira aproximação. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 02 março 2014. Escala: 1:5.000.000.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235**: Aromatic natural raw materials – Vocabulary. Genebra, 1997. 8p.

- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Prot.**, v. 19, p. 603-608, 2000.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p. 45-66, 2006.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Manag. Sci.**, v. 64, p. 8-11, 2008.
- ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Comercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem. Rev.**, v. 10, p. 197-204, 2011.
- ISSATIER, S. P. et al. A comparison of essential oils obtained from lavadin via different extraction process: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. **J. Chromatogr. A**, v. 1305, p. 41-47, 2013.
- JALALI-HERAVI, M.; PARASTAR, H. Recent trends in application of multivariate curve resolution approaches for improving gas chromatography-mass spectrometry analysis of essential oils. **Talanta**, v. 85, p. 835-849, 2011.
- JANNUZZI, H. et al. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Hortic. Bras.**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.
- JAYA et al. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. **J. Food Sci. Technol.**, 2012.
- JUSOH, I. et al. Antifungal activities of acetone-soluble *Eusideroxylon zwageri* and *Potoxylon melagangai* crude extracts against white rot. In: THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION, 43, 2012, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Stockholm: IRG/WP, 2012. IRG/WP 12-30591. p. 1-9.

- KARTAL, S. N. et al. Effect of essential oil compounds and plant extracts on decay and termite resistance of wood. **Holz Roh Werkst**, v. 64, p. 455-461, 2006.
- KLIEBENSTEIN, D. J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. **Plant, Cell and Environ.**, v. 27, p. 675-684, 2004.
- KLINK, C. A. et al. Conservação dos recursos naturais em terras privadas: o papel das reservas legais no arranjo funcional das paisagens produtivas do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. D.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2008. Cap. 14, p. 399-406.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conserv. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.
- KNAACK, N.; FUIZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microorganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.
- KONIG, W. A.; BÜLOW, N.; SARITAS, Y. Identification of sesquiterpene hydrocarbons by gas phase analytical methods. **Flavour Frag. J.**, v. 14, p. 367-378, 1999.
- KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 58-60, 2001.
- LAGE, T. C. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (*Verbenaceae*) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.**, v. 112, p. 863-869, 2013.
- LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour Frag. J.**, v. 27, p. 13-39, 2012.
- LEBOW, S. T. Wood Preservation. In: **FPL Wood handbook - wood as an engineering material**. Madison: USDA Forest Service, 2010. Cap. 15, p. 15.1-15.28.

- LEITÃO, S. G. et al. analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008.
- LEPAGE, E. S. Preservativos e sistemas preservativos. In: LEPAGE, E. S. **Manual de Preservação de Madeiras**. São Paulo: IPT, v. 1, 1986. Cap. 6, p. 279-342.
- LIMA, I. O. et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **J. Essen. Oil Res.**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.
- LIMA, R. K. D. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 20, n. 1, p. 41-44, 2010.
- LIMA, R. K. et al. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.
- LOPEZ, M. D. et al. Development of formulations to improve the controlled-release of linalool to be applied as an insecticide. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 1187-1192, 2012.
- LYRA, C. C. G. et al. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Lychnophora ericoides*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 5, p. 842-848, 2008.
- MAIA, J. G. S. et al. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **J. Essen. Oil Res.**, v. 17, n. 6, p. 676-680, 2005.
- MA-IN, K.; KITTIKUN, A. H.; PHONGPAICHIT, S. Application of plant essential oils in prevention of fungal growth on Para rubber wood. **Eur. J. Wood Prod.**, 2014.

- MARIN, M. et al. Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana* L. from Dalmatia, Croatia. **Flavour Frag. J.**, v. 27, p. 216-223, 2012.
- MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. **Processamento Digital de Imagens**. Rio de Janeiro: Brasport, 1999.
- MARQUES, F. A. et al. Volatile oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. **J. Essen. Oil Res.**, v. 20, n. 6, p. 519-520, 2008.
- MARRIOTT, P. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatography technologies for the analysis of essential oils. **J. Chromatogr. A**, v. 936, p. 1-22, 2001.
- MARTEAU, C. et al. Dual role of phenols as fragrances and antioxidants: mechanism, kinetics and drastic solvent effect. **Flavour Frag. J.**, v. 28, p. 30-38, 2013.
- MARTÍNEZ, Á. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int. Microbiol.**, v. 8, p. 195-204, 2005.
- MATAN, N.; MATAN, N. Effect of cinnamon oil and clove oil against major fungi identified from surface of rubberwood (*Hervea brasiliensis*). In: THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION, 38, 2007, Taipei. **Proceedings...** Stockholm: IRG/WP, 2007. IRG/WP 07-30446. p. 1-5.
- MATES, F. J. D. A. et al. Essential oils of *Lippia alnifolia* Schau. (Verbenaceae) and *Lippia* aff. *gracillis* H. B. K., two aromatic medicinal shrubs from northeast Brazil. **J. Essen. Oil Res.**, v. 12, n. 3, p. 295-297, 2000.
- MEDEIROS, M. D. G. F. D. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol. Int.**, v. 60, p. 237-241, 2011.

- MENDONÇA, R. C. et al. Flora vascular do bioma Cerrado: Checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. D.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2, 2008. p. 423-1279.
- MILOJEVIC, S. Z. et al. Modeling the kinetics of essential oil hydrodistillation from plant materials. **Hem. Ind.**, v. 67, n. 5, p. 843-859, 2013.
- MIMICA-DUKIC, N. et al. Essential oil composition and antifungal activity of *foeniculum vulgare* Mill. obtained by diferent distillation conditions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 368-371, 2003.
- MOHAMMADI, S.; AMINIFARD, M. H. Inhibition of grey mould in vitro and in vivo with essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* L.). **Journal of Central European Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 420-431, 2013.
- MORAES, M. M. D. et al. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: Relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 9, p. 1647-1656, 2012.
- MORAIS, S. R. D. et al. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-4, 2012.
- MOREIRA, A. C. P. et al. Chemcial composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus species*. **Braz. j. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 28-33, 2010.
- MUHLEN, C. V.; MARRIOTT, P. J. Retention indices in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.** , v. 401, p. 2351-2360, 2011.
- NAVARRETE, A. et al. Improvement of essential oil steam distillation by microwave pretreatment. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST Webbook:** Spectral Database fo Organic Compounds. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 15 de novembro 2013.
- NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochem. Rev.**, v. 12, p. 839-855, 2013.
- OHASHI, S. T. et al. Brazilian rosewood oil: sustainable production and quality management. **Perfum & Flavorist**, v. 22, p. 1-5, 1997.
- OLIVA, M. M. et al. Antimicrobial activity and composition of *Hyptis mutabilis* essential oils. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 11, n. 4, p. 57-63, 2006.
- OLIVEIRA, A. M. F. et al. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. **Manual de preservação de madeira**. 1. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo, v. 1, 1986. Cap. 5, p. 99-278.
- OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 5, p. 756-759, 2004.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H. B. K. **Food Chem.**, v. 101, p. 236-240, 2007.
- OLIVEIRA, M. J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 33, p. 275-285, 2005.
- PARK, I. K.; SHIN, S. C. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4388-4392, 2005.

- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PAULA, J. A. M. et al. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 39, p. 643-650, 2011.
- PAULI, A.; SCHILCHER, H. *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 12, p. 353-548.
- PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.**, v. 5, p. 53-63, 2002.
- POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 42, p. 25-31, 2012.
- POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.
- POTZERNHEIM, M. et al. Essential oil of *Piper xylosteoides* (Kunth) Steud. from Federal District, Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 18, p. 523-524, 2006.
- RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 1269-1277, 2011.

- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Prot.**, v. 29, p. 913-920, 2010.
- RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 134, p. 725-732, 2011.
- REBELO, M. M. et al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 1B, p. 230-235, 2009.
- REIS, É. S. et al. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **J. Essen. Oil Res.**, v. 22, n. 2, p. 147-149, 2010.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. D.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2008. Cap. 6, p. 151-212.
- RISBRUDT, C. D. Wood and society. In: ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 1, p. 1-5.
- ROWELL, R. M. et al. Cell wall chemistry. In: ROWELL, R. M. **Handbook of wood Chemistry and Wood Composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 3, p. 35-74.
- SÁ, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 6, p. 1233-1240, 2012.
- SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour Frag. J.**, v. 28, p. 269-279, 2013.
- SALES, J. F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **J. Essen. Oil Res.**, v. 19, n. 6, p. 552-556, 2007.

- SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v. 34, p. 3-21, 2001.
- SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel; Fabaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.
- SARRAZIN, S. L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chem.**, v. 134, p. 1474-1478, 2012.
- SCHANEBERG, B. T.; KHAN, I. A. comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1345-1349, 2002.
- SCHMIDT, E. Production of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 4, p. 83-120.
- SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extratives. **Phytochemistry**, v. 54, p. 47-52, 2000.
- SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. **Phytochemistry**, v. 61, p. 555-560, 2002.
- SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D.; PRESTON, A. F. A brief review of the past, present and future of wood preservation. **Pest Manag. Sci.**, v. 63, p. 784-788, 2007.
- SCORA, K.; SCORA, R. Effect of volatiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *P. ulaiense*. **J. Basic Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 405-412, 1998.
- SHELLIE, R. et al. Characterization of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with

comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 970, p. 225-234, 2002.

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

SILVA, J. G. et al. Chemotaxonomic significance of volatile constituents in *Hyptenia* (Mart. ex Benth) R. Harley (Lamiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 5, p. 955-960, 2011.

SILVA, P. S. et al. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 843-849, Dez. 2010.

SILVA, R. F. et al. Estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) extraído por destilação por arraste à vapor. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICA RELACIONADAS, XIV, 2012a, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: COLACRO, 2012, p. 528.

SILVA, R. F. et al. Composição do óleo essencial das folhas de *Bidens graveolens* Mart. (Asteraceae) In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICA RELACIONADAS, XIV, 2012b, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: COLACRO, 2012, p. 524.

SILVA, R. F. et al. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hyptis lythroides* Pohl ex Benth. (Lamiaceae). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 44, 2013a, Budapest. **Abstracts...** Budapest: ISEO, 2013a, p. 123.

SILVA, R. F. et al. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hyptis villosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae). **J. Essen. Oil Res.**, v. 25, n. 5, p. 415-418, 2013b.

- SILVA, R. F. et al. Aromas do Cerrado: composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, VII, 2013c, Santarém. **Resumos...** Santarém: SBOE, 2013c.
- SILVA, R. F. et al. Aromas do Cerrado: composição química do óleo essencial de *Lippia* aff. *rotundifolia* (Verbenaceae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, VII, 2013d, Santarém. **Resumos...** Santarém: SBOE, 2013d.
- SILVA, R. F. et al. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the flowers and leaves of *Lippia stachyoides* va. *Martiana* (Schauer) Salimena & Múlgura. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 44, 2013e, Budapest. **Abstracts...** Budapest: ISEO, 2013e, p. 97.
- SILVA, R. F. et al. Scents from Brazilian Cerrado: analysis or the chemical composition of essential oil from leaves of *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 44, 2013f, Budapest. **Abstracts...** Budapest: ISEO, 2013f, p. 124.
- SILVA, R. F. et al. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 44, 2013g, Budapest. **Abstracts...** Budapest: ISEO, 2013g, p. 34.
- SINGH, T.; CHITTENDEN, C. *In vitro* antifungal activity of chilli extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v. 62, p. 364-367, 2008.
- SINGH, T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant. **Wood Sci Technol**, v. 46, n. 5, p. 851-870, 2012.
- SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-rev. Med. Chem.**, v. 12, p. 749-767, 2012.

- SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. **Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide**. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- STASHENKO, E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p. 93-103, 2010.
- STEIN, S. E. Chemical substructure identification by mass spectral library searching. **J. Am. Mass Spectrom.**, v. 6, p. 644-655, 1995.
- STWEART, D. **The chemistry of essential oils made simple: God's love manifest in molecules**. 2. ed. Missouri: Care Publications, 2006.
- TAHERPOUR, A. et al. Chemical composition of the essential oil and calculation the biophysicochemical coefficients of the components of *Hymenocrater longiflorus* Benth. of Iran. **Natural Science**, v. 3, n. 2, p. 104-108, 2011.
- TAKAYAMA, C. et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 135, p. 147-155, 2011.
- TAM, C. U. et al. Optimization and comparison of three methods for extraction of volatile compounds from *Cyperus rotundus* evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Pharmaceut. Biomed.**, v. 44, p. 444-449, 2007.
- TANDON, S. Distillation technology for essential oils. In: HANDA, S. S., et al. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: International Centre of Science and High Technology, 2008. Cap. 7, p. 115-128.
- TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. D. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev. 2005.
- TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Ind. Crop. Prod.**, v. 43, p. 587-595, 2013.

- TRESVENZOL, L. M. F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil from leaves of *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers. **J. Essen. Oil Res.**, v. 22, n. 3, p. 237, 2010.
- TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. p. 1251-1253, 1990.
- VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; AGUIAR, O. T. D. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg - Myrtaceae. **Rev. Inst. Flor.**, v. 18, p. 15-22, 2006.
- VALTER, J. L. et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 373-378, 2008.
- van den DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 11, p. 463-471, 1963.
- VARELA, N. P. et al. Comparison of agar dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms. **Can. J. Vet. Res.**, v. 72, p. 168-174, 2008.
- VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508-512, 2012.
- VERMA, M.; SHARMA, S.; PRASAD, R. Biological alternatives for termite control: a review. **I Int. Biodeter. Biodegr.**, v. 63, p. 959-972, 2009.
- VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J.. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.

- VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- VODA, K. et al. Effects of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes vesticolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v. 51, p. 51-59, 2003.
- WHITE, D. G. et al. Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 20, n. 3, p. 849-858, 2001.
- WIEDENHOEFT, A. C.; MILLER, R. B. Structure and function of wood. In: ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 2, p. 9-33.
- WIEMANN, M. C. Characteristics and availability of commercially important woods. In: FPL **Wood handbook - wood as an engineering material**. Madison: USDA Forest Service, 2010. Cap. 2, p. 2.2-2.45.
- YANG, V. W.; CLAUSEN, C. A. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. **Int. Biodeter. biodegr.**, v. 59, p. 302-306, 2007.
- YEN, T. B.; CHANG, S. T. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 232-236, 2008.
- ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.
- ZELLNER, B. D. et al. Screening of the odour-activity and bioactivity of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis Passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 2, p. 322-332, 2009.

ZELLNER, B. D. et al. Analysis of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oil: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 6, p. 151-184.

ZHAO, C. X. et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. **J. Chromatogr. A**, v. 1096, p. 76-85, 2005.

ZOGHBI, M. D. G. B. et al. Chemical variation in the essential oils of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Flavur Fragr. J.**, v. 17, p. 5-8, 2002.

APÊNDICES

A. CROMATOGRAMAS

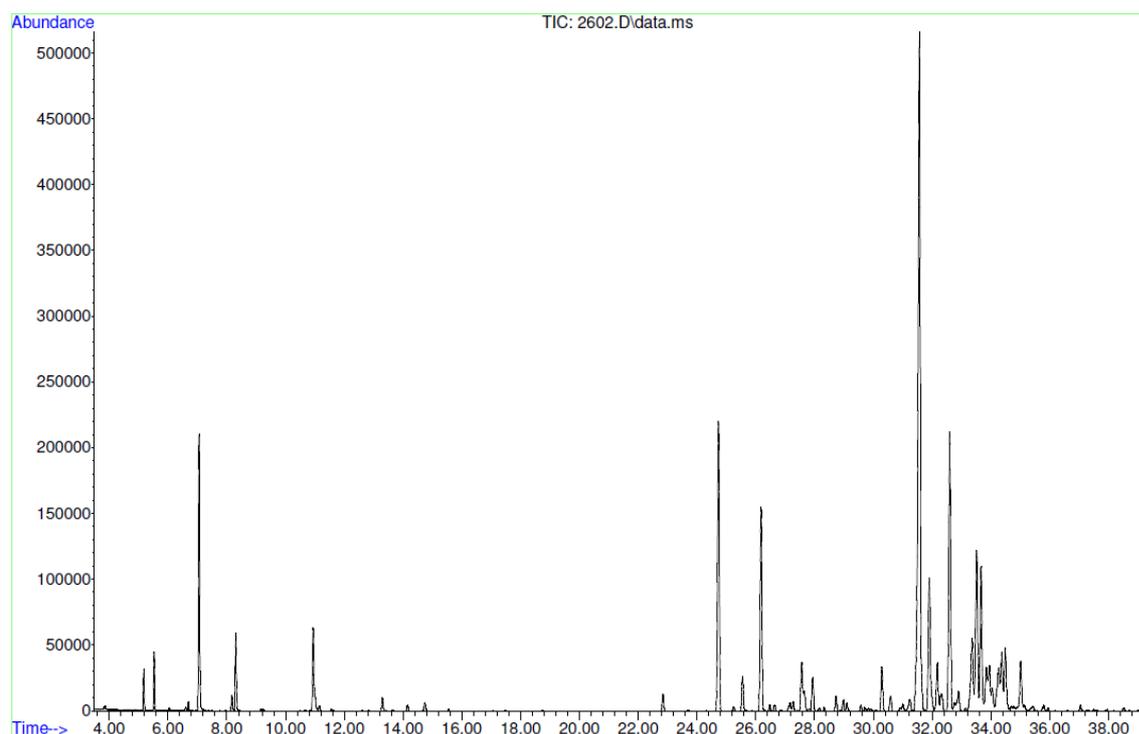


Figura A. 1 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *P. myrsinites*.

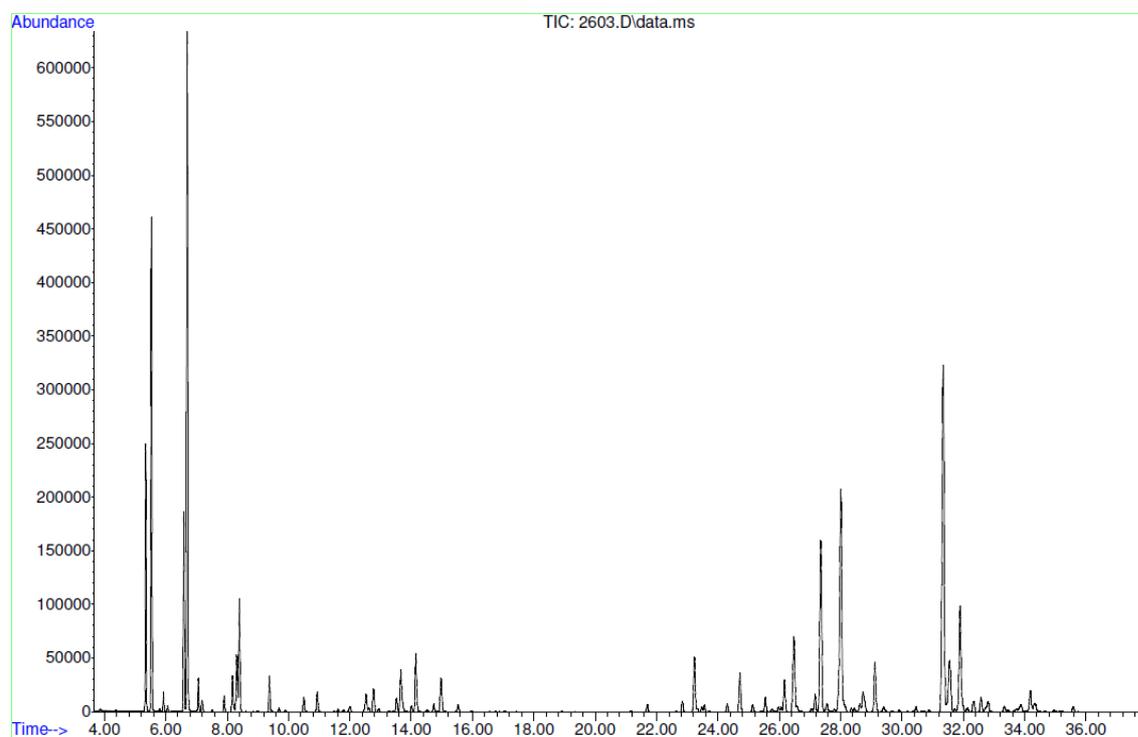


Figura A. 2 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *Hyptis sp.*.

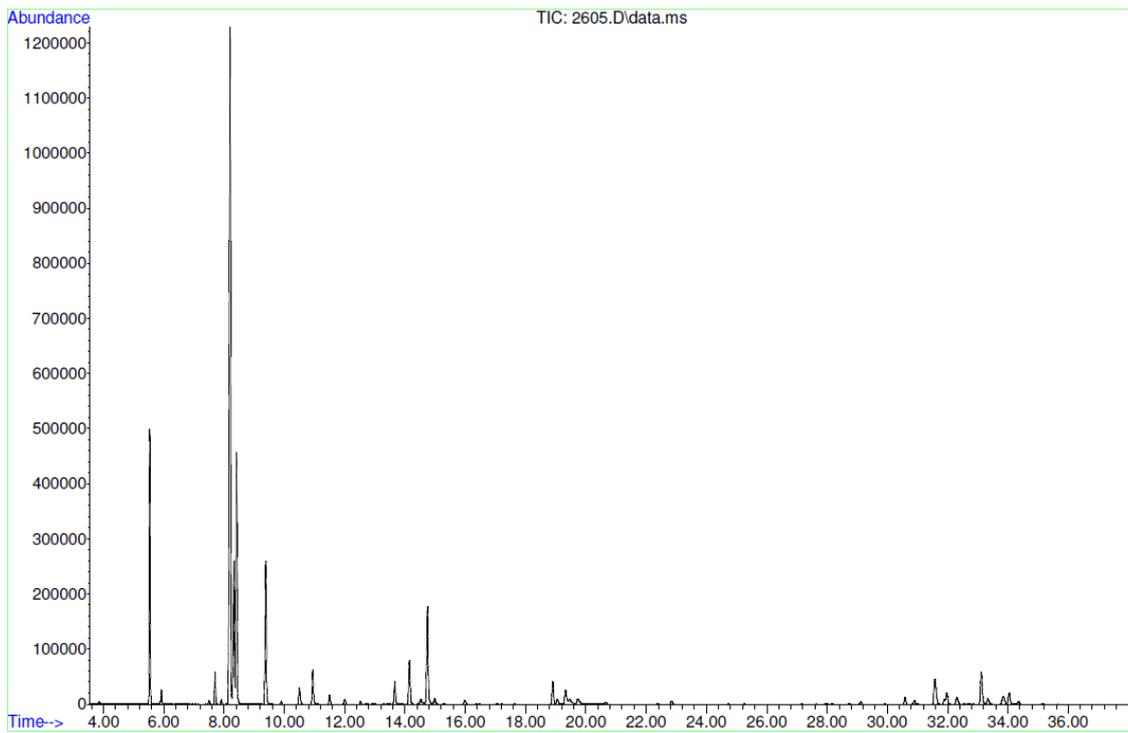


Figura A. 3 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *P. laruotteanum*.

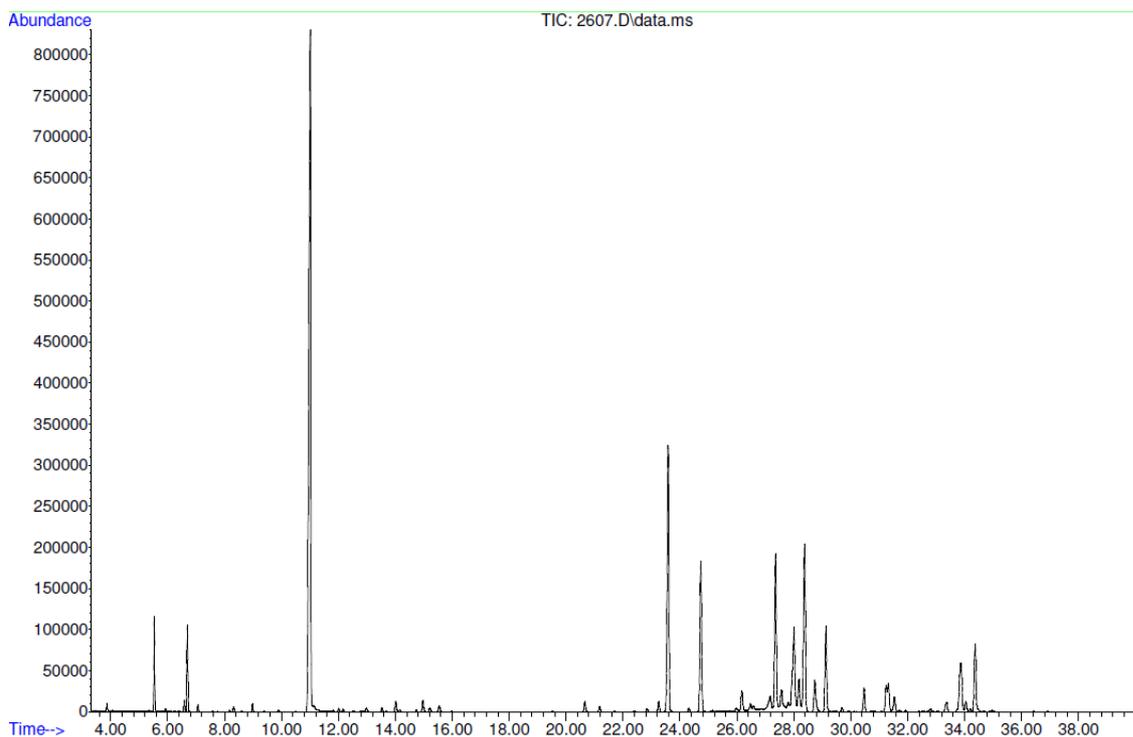


Figura A. 4 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *L. lacunosa*.

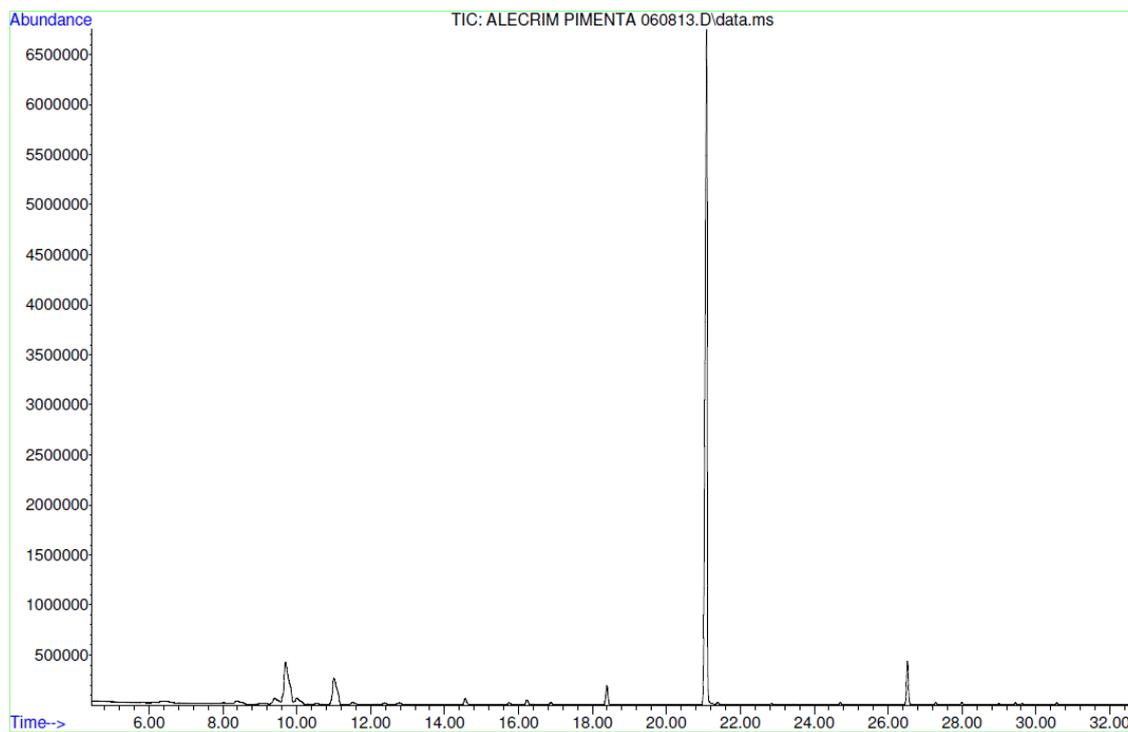


Figura A. 5 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *L. origanoides*.

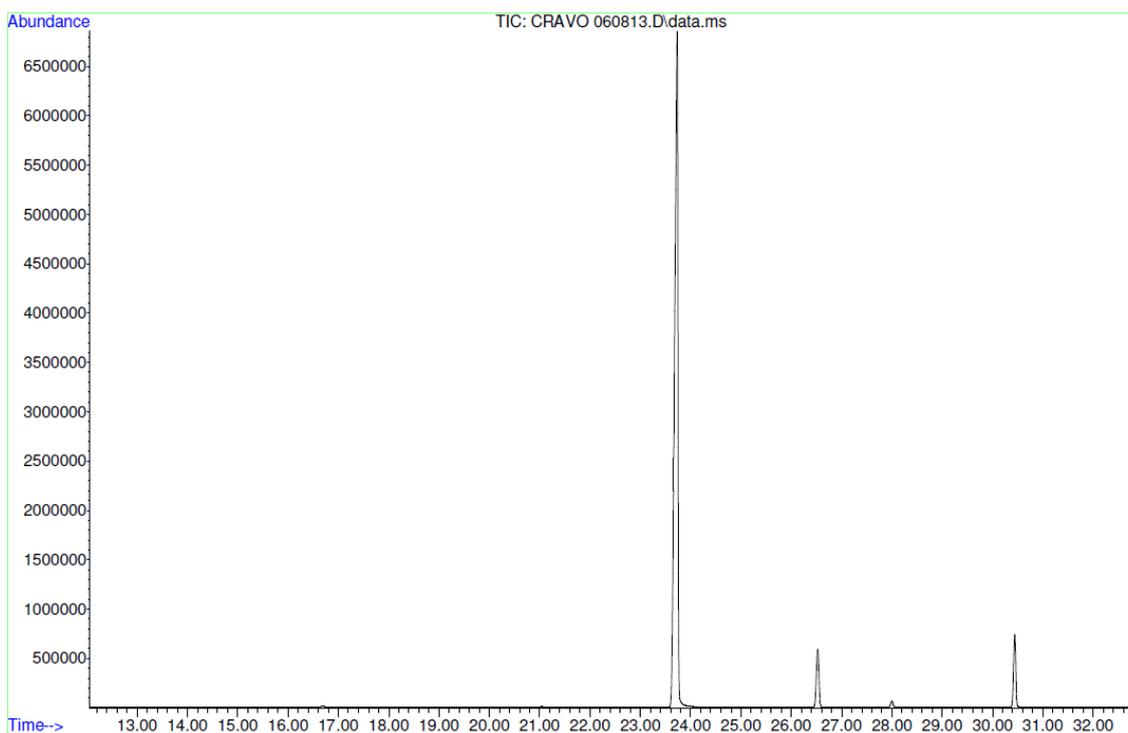


Figura A. 6 – Cromatograma (TIC) obtido para a amostra de *S. aromaticum*.

B. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela B. 1 - ANOVA da regressão linear – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	1418,625	1	1418,625	16,913	0,000
Resíduo	3187,328	38	83,877		
Total	4605,953	39			

Tabela B. 2 - Qualidade da regressão linear – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,555	0,308	0,290	9,158

Tabela B. 3 - Coeficientes da regressão linear – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	0,178	0,043	4,113	0,000
Constante	53,974	2,490	21,677	0,000

Tabela B. 4 - ANOVA da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	1389,172	1	1389,172	16,410	0,000
Resíduo	3216,781	38	84,652		
Total	4605,953	39			

Tabela B. 5 - Qualidade da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,549	0,302	0,283	9,201

Tabela B. 6 - Coeficientes da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *S. aromaticum*

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	7,604	1,877	4,051	0,000
Constante	35,191	6,849	5,138	0,000

Tabela B. 7 - ANOVA da regressão linear – *T. versicolor* X *L. origanoides*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	3801,474	1	3801,474	18,843	0,000
Resíduo	7666,448	38	201,749		
Total	11467,923	39			

Tabela B. 8 - Qualidade da regressão linear – *T. versicolor* X *L. origanoides*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,576	0,331	0,314	14,204

Tabela B. 9 - Coeficientes da regressão linear – *T. versicolor* X *L. origanoides*

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	0,291	0,067	4,341	0,000
Constante	76,047	3,862	19,693	0,000

Tabela B. 10 - ANOVA da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *L. origanoides*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	5854,702	1	5854,702	39,635	0,000
Resíduo	5613,221	38	147,716		
Total	11467,923	39			

Tabela B. 11 - Qualidade da regressão linear – *T. versicolor* X *L. origanoides*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,715	0,511	0,498	12,154

Tabela B. 12 - Coeficientes da regressão linear – *T. versicolor* X *L. origanoides*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	15,611	2,480	6,296	0,000
Constante	34,021	9,048	3,760	0,001

Tabela B. 13 - ANOVA da regressão linear – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	53864,402	1	53864,402	236,807	0,000
Resíduo	8643,510	38	227,461		
Total	62507,912	39			

Tabela B. 14 - Qualidade da regressão linear – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,928	0,862	0,858	15,082

Tabela B. 15 - Coeficientes da regressão linear – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	1,095	,071	15,389	0,000
Constante	-0,550	4,100	-0,134	0,894

Tabela B. 16 - ANOVA da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	59396,981	1	59396,981	725,534	0,000
Resíduo	3110,931	38	81,867		
Total	62507,912	39			

Tabela B. 17 - Qualidade da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,975	0,950	0,949	9,048

Tabela B. 18 - Coeficientes da regressão logarítmica – *T. versicolor* X *L. lacunosa*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	49,725	1,846	26,936	0,000
Constante	-126,512	6,736	-18,782	0,000

Tabela B. 19 - ANOVA da regressão linear – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	20482,487	1	20482,487	39,277	0,000
Resíduo	19816,739	38	521,493		
Total	40299,226	39			

Tabela B. 20 - Qualidade da regressão linear – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,713	0,508	0,495	22,836

Tabela B. 21 - Coeficientes da regressão linear – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	0,675	0,108	6,267	0,000
Constante	42,756	6,208	6,887	0,000

Tabela B. 22 - ANOVA da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	28763,771	1	28763,771	94,753	0,000
Resíduo	11535,455	38	303,565		
Total	40299,226	39			

Tabela B. 23 - Qualidade da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,845	0,714	0,706	17,423

Tabela B. 24 - Coeficientes da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *S. aromaticum*

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	34,603	3,555	9,734	0,000
Constante	-48,967	12,970	-3,775	0,001

Tabela B. 25 - ANOVA da regressão linear – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	5877,402	1	5877,402	42,404	0,000
Resíduo	5267,048	38	138,607		
Total	11144,449	39			

Tabela B. 26 - Qualidade da regressão linear – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,726	0,527	0,515	11,773

Tabela B. 27 - Coeficientes da regressão linear – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	0,362	,056	6,512	0,000
Constante	-0,065	3,201	-0,020	0,984

Tabela B. 28 - ANOVA da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	6332,401	1	6332,401	50,006	0,000
Resíduo	4812,049	38	126,633		
Total	11144,449	39			

Tabela B. 29 - Qualidade da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,754	0,568	0,557	11,253

Tabela B. 30 - Coeficientes da regressão logarítmica – *G. trabeum* X *Hyptis* sp.

	Coefficiente	Erro	t	Sig.
Coefficiente angular	16,236	2,296	7,071	0,000
Constante	-40,997	8,377	-4,894	0,000

Tabela B. 31 - ANOVA da regressão linear – *G. trabeum* X *L. lacunosa*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	25093,082	1	25093,082	158,291	0,000
Resíduo	5389,864	34	158,525		
Total	30482,946	35			

Tabela B. 32 - Qualidade da regressão linear – *G. trabeum* X *L. lacunosa*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,907	0,823	0,818	12,591

Tabela B. 33 - Coeficientes da regressão linear – *G. trabeum X L. lacunosa*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coeficiente angular	0,793	0,063	12,581	0,000
Constante	1,171	3,658	0,320	0,751

Tabela B. 34 - ANOVA da regressão logarítmica – *G. trabeum X L. lacunosa*

	SQ	GL	QM	F	Sig.
Regressão	22245,770	1	22245,770	91,822	0,000
Resíduo	8237,176	34	242,270		
Total	30482,946	35			

Tabela B. 35 - Qualidade da regressão logarítmica – *G. trabeum X L. lacunosa*

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
0,854	0,730	0,722	15,565

Tabela B. 36 - Coeficientes da regressão logarítmica – *G. trabeum X L. lacunosa*

	Coeficiente	Erro	t	Sig.
Coeficiente angular	32,087	3,349	9,582	0,000
Constante	-76,147	12,281	-6,201	0,000

C. MACROS EMPREGADAS NO TRATAMENTO DAS IMAGENS

O programa usado no experimento (ImageJ) é um software livre, bastante intuitivo, que pode ser manipulado por pessoas com conhecimento superficial sobre processamento de imagens. Para cada fungo foi desenvolvida uma macro distinta, em razão das diferenças visuais entre eles (figuras C.1 e C.2). Durante as etapas preliminares empregou-se a função AUTO THRESHOLDING (*Image>Adjust>Auto threshold...>Try all*) para determinar o melhor método para limiarizar as imagens. Isto mostra que o processo aqui descrito pode ser estendido para outros fungos ou micro-organismos. Todas as imagens de um mesmo fungo poderiam ter sido analisadas automaticamente em uma mesma batelada, entretanto, optou-se pela análise separada de cada tratamento para verificar com mais precisão a ocorrência de erros.

```
run("8-bit");
run("Auto Threshold...", "method=Otsu white");
run("Options...", "iterations=20 count=1 black edm=Overwrite do=Nothing");
run("Close-");
run("Open");
run("Analyze Particles...", "size=0.15-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display add");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
saveAs("Results", "PASTA DESTINO\NOME DO ARQUIVO");
```

Figura C. 1 – Macro empregada nas fotos com *G. trabeum*

```

run("8-bit");
run("Auto Threshold...", "method=Minimum white");
run("Options...", "iterations=20 count=1 black edm=Overwrite do=Nothing");
run("Close-");
run("Open");
run("Analyze Particles...", "size=0.15-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display add");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
saveAs("Results", "PASTA DESTINO\NOME DO ARQUIVO");

```

Figura C. 2 – Macro empregada nas fotos com *T. versicolor*

D. ROTINAS DE PROGRAMAÇÃO

Além da definição da macro ideal para cada situação, é importante garantir que o contraste, no momento da fotografia, seja adequado, pois o material translúcido da placa de petri gera reflexos, principalmente nas bordas, que podem fornecer valores incorretos da inibição ou até inviabilizar a mensuração da área na imagem binária (figura D.1). Nesses casos, no entanto, ainda é possível recuperar a informação com a execução de alguns passos específicos para a imagem como aqueles descritos na tabela D.1.

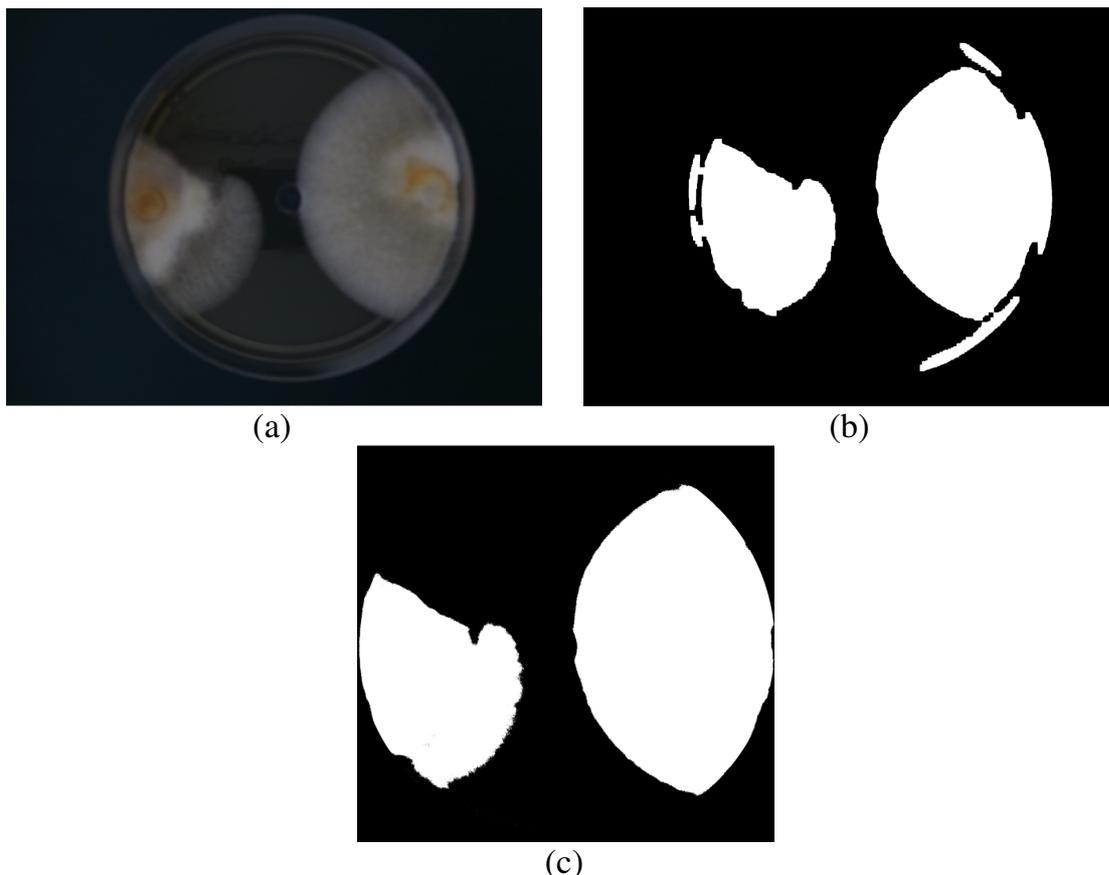


Figura D. 1 – Foto com reflexos nas bordas (a), imagem binária obtida pelo procedimento convencional (b) e imagem binária obtida pelo processamento da tabela D.1 (c).

Tabela D. 1 – Processamento de imagens com distinção inadequada do fungo.

Ação no ImageJ	Objetivo
<i>Oval Selection Tool</i>	Selecionar manualmente a seção circular que contenha apenas o meio de cultura sem a borda da placa de petri
<i>Image > Image crop</i>	Selecionar automaticamente o retângulo que contém o círculo obtido acima
<i>Edit > Clear Outside</i>	Eliminar o exterior do círculo selecionado, ou seja, a borda com reflexos
<i>Image > Type > 8-bit</i>	Transformar a imagem colorida selecionada em uma imagem em escala de cinza
<i>Image>Adjust>Auto threshold...>Otsu</i>	Limiarizar a imagem selecionada pelo método de Otsu transformando-a em uma imagem binária
<i>Analyse > Analyse Particles...</i>	Medir a área em branco

Após a execução dos procedimentos descritos na tabela D.1, obtém-se a imagem mostrada na figura D.1 (c). A área da figura D.1 (b) foi de 28,02 cm², enquanto que na figura D.1 (c), foi de 25,3 cm².

Os procedimentos descritos na tabela D.1 podem ser executados com imagens em pilhas (*Stacks*) ou em batelada (*batch*), porém, é necessário que as placas de petri sejam fotografadas exatamente na mesma posição (o que não aconteceu no experimento em questão), pois a primeira ação (*Oval Selection Tool*) deve ser executada manualmente e precisa ser replicada a todas as imagens automaticamente.