

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

CAROLINA DE OLIVEIRA BERNARDES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Psidium* spp.**

ALEGRE - ES

2017

CAROLINA DE OLIVEIRA BERNARDES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Psidium* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento, na área de concentração, Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadores: Prof. Dr. Adésio Ferreira, Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago, Prof. Dr. Luciano Menini e Prof. Dr. Tércio da Silva de Souza.

ALEGRE, ES

2017

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

Bernardes, Carolina de Oliveira, 1984-
B518d Diversidade genética, caracterização e atividade de óleos essenciais em
Psidium spp. / Carolina de Oliveira Bernardes. – 2017.
164 f. : il.

Orientador: Marcia Flores da Silva Ferreira.

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

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Myrtaceae. 2. Marcadores genéticos. 3. Estrutura genética. 4. Óleos
essenciais. 5. Cromatografia. 6. Pragas – controle biológico. I. Ferreira,
Marcia Flores da Silva. II. Ferreira, Adésio. III. Zago, Hugo Bolsoni. IV.
Menini, Luciano. V. Souza, Tércio da Silva de. VI. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. VII.
Título.

CDU: 575:631

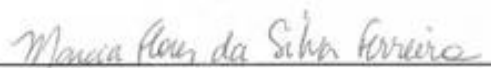
CAROLINA DE OLIVEIRA BERNARDES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS EM *Psidium* spp.**

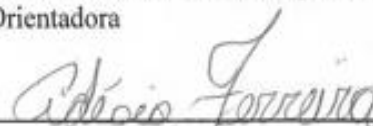
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 25 de Abril de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



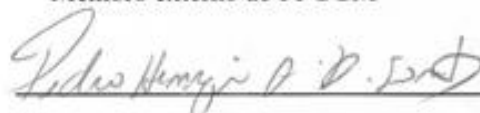
Prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Adésio Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador
Membro interno ao PPGGM



Prof.^a Dra. Patrícia Fontes Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro externo ao PPGGM



Dr. Pedro Henrique Araújo Diniz Santos
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro
Membro externo à Universidade Federal do
Espírito Santo

À minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda a força e abrigo que me concede para que eu sempre me fortaleça e consiga seguir em frente.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo - CCAE/UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento - PPGGM.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, pela disponibilização do Laboratório de Química para realização de extração e análise de óleo essencial; aos técnicos Jaqueline e Adriano, pela boa vontade em ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES, pelo apoio financeiro deste trabalho.

À prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira, pela orientação, dedicação, paciência, por estar sempre disponível a ajudar, por todos os ensinamentos que me passou e pela amizade.

Ao prof. Dr. Adésio Ferreira, pela oportunidade de realizar este doutorado, por estar sempre disponível a ajudar e pela coorientação.

Aos Professores Dr. Hugo Bolsoni Zago, Dr. Luciano Menini e Dr. Tércio da Silva de Souza, pela coorientação.

Aos professores Dr. Adésio Ferreira e Dra. Patrícia Fontes Pinheiro e ao Dr. Pedro Henrique Araújo Diniz Santos, por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa desta Tese, colaborando e enriquecendo este trabalho, ao compartilharem seus conhecimentos científicos.

Aos demais professores, técnicos e funcionários da Universidade Federal do Espírito Santo, que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À minha primeira professora, tia Ivete Gomes, que me alfabetizou e se tornou tão especial em minha vida, que hoje faz parte da minha família.

Às amigas Amélia Tuler e Drielli Canal por terem participado com tanto carinho da realização deste trabalho.

À Lorena e Laura Ribeiro por terem me recebido tão bem no Nudemafi e terem me fornecido material para meu teste biológico.

Aos amigos do laboratório Paula Mauri, Paula Vieira, Luiza Mendes, Marina Carvalho, Séphora Neves, José Henrique, Tiago Souza, Matheus Alves, Clemilton Alves, Luina Noia, Iana Quadros, Khetrin Maciel, Liziani, Rodrigo Lorenzoni, Stéfanie Oliveira, Luziane, Liana

Mengarda, Ana Beatriz Passos, Lidiane, Cíntia, Ramon e Soninha pela disponibilidade em sempre ajudar e por todos os momentos de alegria que dividimos.

Às minhas amigas de infância, Gisele Mezabarba e Luziani Bestete, por todo o amor, paciência, conselhos e por estarem sempre ao meu lado.

Às amigas do doutorado, Jéssica Pereira, Larissa Vianna e Alessandra Abreu.

Às amigas da graduação que sempre me incentivaram, Lidiane Gomes, Natiélia Nogueira e Camila Aparecida.

À minha família, em especial aos meus queridos pais, Roberto Bernardes e Sandra Bernardes, minha irmã Roberta Bernardes, meus avós Sebastião Bernardes e Marlene Bernardes, e ao meu namorado Samuel da Silva, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À todos que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

BERNARDES, Carolina de Oliveira. **Diversidade genética, caracterização e atividade de óleos essenciais de *Psidium* spp.** 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo. Orientadora: Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira. Coorientadores: Dr. Adésio Ferreira, Dr. Hugo Bolsoni Zago, Dr. Luciano Menini, Dr. Tércio da Silva de Souza.

A família Myrtaceae está entre as mais importantes dos ecossistemas brasileiros apresentando a característica marcante das plantas serem ricas em óleo essencial. O gênero *Psidium* é um dos mais explorados da família com aproximadamente 100 espécies, com destaque para *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*. Objetivou-se, com este trabalho estudar a diversidade genética de *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*, identificar o perfil terpênico de óleos essenciais de espécies de *Psidium* e utilizar as propriedades dos óleos essenciais de *P. guajava* como uma alternativa no controle de *Spodoptera frugiperda*. Para os estudos de diversidade, um mesmo grupo de microssatélites foi utilizado em populações das três espécies. O maior número de alelos foi detectado para populações de *P. guajava*, bem como elevados valores de H_e e H' , também detectados para as demais espécies. Entre 73 e 80% da variação ocorreu dentro de populações, refletindo em elevados valores de divergência genética (*P. guajava*, $F_{ST} = 0,1996$; *P. brownianum*, $\Phi_{ST} = 0,2636$; *P. guineense*, $\Phi_{ST} = 0,2034$). As populações das três espécies estudadas apresentaram-se moderadamente estruturadas, com a formação de dois grupos, representando a região sul e norte do Espírito Santo. Quanto a variabilidade de terpenos dos óleos essenciais de folhas, onze espécies foram analisadas por CG-DIC e CG-EM, bem como por análises de micromorfologia foliar e índice de herbivoria. Foram identificados 59 compostos, com predominância de sesquiterpenos. Dados da literatura foram obtidos e quatorze espécies foram incluídas no estudo. Observou-se grande diversidade de compostos e predominância de β -cariofileno e óxido de cariofileno. Adicionalmente, 1,8-cineol, α -pineno e (*E*)-nerolidol também foram responsáveis pela distinção de grupos de espécies em análise de agrupamento. O índice de herbivoria foi baixo para todas as espécies, sendo explicado pelo fato de que sesquiterpenos estão diretamente relacionados à defesa contra microrganismos e predadores. A presença de tricomas e folhas coriáceas, também contribuiu para a redução da herbivoria. Por fim o efeito de dois quimiotipos de óleo essencial de goiabeira foi estudado em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. A composição química dos óleos essenciais mostrou a presença de treze compostos em ambos os genótipos. Os

compostos majoritários encontrados em Paluma foram óxido de cariofileno (15,9%), β -cariofileno (12,1%) e selin-11-en-4- α -ol (10,3%) e em Cortibel VII, β -bisabolol (12,3%). Ambos os óleos essenciais apresentaram efeito de repelência, sob concentrações de 10 e 100 ppm às lagartas de *S. frugiperda*. Dessa forma, o conhecimento da diversidade genética se trata de importante ferramenta que pode mostrar a real situação das espécies em relação a sua conservação em determinados ambientes e além disso, com o conhecimento da composição dos óleos essenciais em espécies de *Psidium* spp. pode-se inferir a cerca dos quimiotipos presentes em determinadas espécies e assim, ser feita a indicação de seu uso.

Palavras-chave: Myrtaceae, marcadores SSR, estrutura genética, óleos voláteis, cromatografia, atividade biológica.

ABSTRACT

BERNARDES, Carolina de Oliveira. **Genetic diversity, characterization and activity of *Psidium* spp. essential oils.** 2017. Thesis (Doctorate in Genetics and Plant Breeding). Federal University of Espírito Santo. Advisor: Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira. Co-advisors: Dr. Adésio Ferreira, Dr. Hugo Bolsoni Zago, Dr. Luciano Menini and Dr. Tércio da Silva de Souza.

Myrtaceae is one of the most important families in the ecosystems of Brazil presenting as an important characteristic being rich in essential oil. The genus *Psidium* is one of the most explored in the family and it represents 100 species, approximately, where *P. guajava*, *P. brownianum* and *P. guineense* are detached. It was aimed with this work to study the genetic diversity of *P. guajava*, *P. brownianum* and *P. guineense*, to identify the terpenic profile of essential oils of *Psidium* species and to use the essential oils properties from *P. guajava* as an alternative to the control of *Spodoptera frugiperda*. For the diversity studies, the same group of microsatellite markers was used in populations from the three species. The higher number of alleles was detected for *P. guajava* populations and elevated values of H_e and H' were found for the populations of the three species. Among 73 and 80% of variation occurred within populations, reflecting elevated values of genetic divergence (*P. guajava*, $F_{ST} = 0.1996$; *P. brownianum*, $\Phi_{ST} = 0.2636$; *P. guineense*, $\Phi_{ST} = 0.2034$). Populations of the three studied species were moderately structured, with the formation of two main groups, representing the South and North regions of the state of Espírito Santo. Regarding the terpene variability of the leaves essential oils, eleven species were analyzed with GC-FID and GC-MS, as well as by leaf microbiology analysis and herbivory index. Fifty-nine components were identified, with the predominance of sesquiterpenes. Literature data was obtained and fourteen species were included in this study. Elevated diversity for the oil's components was observed, as well as the predominance of β -caryophyllene and caryophyllene oxide. Additionally, 1,8-cineole, α -pinene and (*E*)-nerolidol were also responsible for distinguishing groups of species in cluster analysis. The herbivory index was low for all the species; it is explained by the fact that sesquiterpenes are directly related to the defense against microorganisms and predators. The presence of trichomes and coriaceous leaves, also contributed for the herbivory reduction. At last, the effect of two chemotypes of guava essential oil was studied in *Spodoptera frugiperda* caterpillars. The chemical composition of the essential oils showed the presence of thirteen components in both genotypes. The major components identified in Paluma were

caryophyllene oxide (15.9%), β -caryophyllene (12.1%) and selin-11-en-4- α -ol (10.3%) and in Cortibel VII, β -bisabolol (12.3%). Both essential oils presented repellency effect, under the concentrations of 10 and 100 ppm to *S. frugiperda* caterpillars. This way, the knowledge of genetic diversity is an important tool that may show the real situation of species regarding their conservation status in determined environments. Besides, with the information about *Psidium* spp. essential oils composition, it is possible to understand what chemotypes may be present in such species and this way, indicate the correct use of the essential oil.

Keywords: Myrtaceae, SSR markers, genetic structure, volatile oils, chromatography, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - Diversidade genética de três espécies de <i>Psidium</i> na Floresta Atlântica com destaque para restingas	54
Figura 1. Distribuição geográfica das populações amostradas de <i>P. guajava</i> (Guarapari, Itaoca, Presidente Kennedy e Águia Branca), <i>P. brownianum</i> (Guarapari, Presidente Kennedy, Vale, Conceição da Barra e Itaúnas) e <i>P. guineense</i> (Guarapari, Itaoca, Águia Branca e Itaúnas). Código: verde: <i>P. guajava</i> ; azul: <i>P. brownianum</i> ; vermelho: <i>P. guineense</i>	58
Figura 2. Perfil de amplificação na eletroforese capilar: (A) locus mPgCIR 10, nos quatro locais de coleta (L1: GUA, L2: IOC, L3: AGU, L4: ITA); (B) locus mPgCIR 29. (C) Amplicons (250 pb, 280 pb, 303 pb, 349 pb) do microssatélite mPgCIR 253 em um genótipo de <i>Psidium guineense</i> de ITA. LM: Marcador menor; UM: Marcador maior.....	66
Figura 3. Gráfico obtido com os valores ΔK para visualização do melhor $K = 2$. A) <i>P. guajava</i> ; B) <i>P. brownianum</i> ; C) <i>P. guineense</i>	71
Figura 4. Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. A) <i>P. guajava</i> ; B) <i>P. brownianum</i> ; C) <i>P. guineense</i>	72
Figura 5. PCoA utilizando a distância de Nei para <i>P. guajava</i> e utilizando a distância de Bruvo para <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i> . A) <i>P. guajava</i> B) <i>P. brownianum</i> ; C) <i>P. guineense</i>	73
Figura 6. Dendograma baseado na distância de Gower para características morfológicas de indivíduos de <i>P. guajava</i> (1P_GUA = população GUA; 2P_GUA = população IOC; 3P_GUA = população PRK e 4P_GUA = população AGU), de <i>P. brownianum</i> (1P_BRO = população GUA; 2P_BRO = população PRK; 3P_BRO = população VAL; 4P_BRO = população ITV e 5P_BRO = população ITA) e de <i>P. guineense</i> (1P_GUI = população GUA; 2P_GUI = população IOC; 3P_GUI = população ITA e 4P_GUI = população AGU).....	74
 CAPÍTULO II - Variabilidade de terpenos em espécies de <i>Psidium</i> (Myrtaceae).....	 90
Figura 1. Comparação entre os teores de mono e sesquiterpenos nos óleos essenciais de 11 espécies de <i>Psidium</i> . Legenda: Bro = <i>P. brownianum</i> ; Lon = <i>P. longipetiolatum</i> ; Myr = <i>P. myrtoides</i> ; Gui = <i>P. guineense</i> ; Cat = <i>P. cattleianum</i> ; Gua = <i>P. guajava</i> ; Cau = <i>P. cauliflorum</i> ; Índ = <i>P. sp1</i> ; Acu = <i>P. acutangulum</i> ; Rox = <i>P. sp 2</i> ; Gra = <i>P. grazielae</i>	107
Figura 2. Heatmap dos indivíduos de <i>Psidium</i> e os constituintes do óleo essencial das respectivas plantas. As escalas representam a área relativa (%) dos compostos (quanto mais escuro, maior quantidade de composto).....	109
Figura 3. Heatmap de 60 plantas de <i>Psidium</i> (23 do presente trabalho mais 37 da literatura) e 80 compostos considerados majoritários. As escalas representam a área relativa (%) dos compostos (quanto mais escuro, maior quantidade de composto).....	112
Figura 4. Figura 4. Análise de correspondência entre sete características avaliadas de	

oito espécies de *Psidium*. Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*..... 114

Figura 5. Índice de Herbivoria e Índice glandular de espécies de *Psidium*. Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*..... 115

Figura 6. Secções paradérmicas (10 X) evidenciando estruturas secretoras em espécies de *Psidium*. A) *P. cattleianum* B) *P. guajava* C) *P. brownianum* D) *P. guineense* E) *P. myrtoides* F) *P. longipetiolatum* G) *P. cauliflorum* H) *P. brownianum* – estrutura secretora em detalhe I) *P. guajava* – tricomas em detalhe..... 115

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
Tabela 1 - Dispersores das sementes de duas espécies de <i>Psidium</i> no Brasil.....	31
CAPÍTULO I - Diversidade genética de três espécies de <i>Psidium</i> na Floresta Atlântica com destaque para restingas	54
Tabela 1. Populações coletadas das três espécies <i>Psidium</i> e respectivos tamanhos amostrais.....	59
Tabela 2. Informações sobre os <i>loci</i> microssatélites utilizados em <i>P. guajava</i> , <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i>	60
Tabela 3. Análise descritiva dos nove <i>loci</i> microssatélites utilizados nas populações de <i>P. guajava</i> , <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i> : número de alelos por <i>loci</i> (A); heterozigosidade esperada (H_e); heterozigosidade observada (H_o); coeficiente de endogamia (f), número total de fenótipos alélicos identificados (F), estatística de diversidade baseada em fenótipos alélicos (H'); e estatística de diferenciação baseada em fenótipos alélicos (F'_{ST}).....	65
Tabela 4. Diversidade genética a nível de população em <i>P. guajava</i> , <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i> , para nove <i>loci</i> polimórficos de microssatélites: número médio de alelos por <i>loci</i> (A); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_e); heterozigosidade observada (H_o); coeficiente de endogamia (f), número de alelos encontrados dentro das populações (A_e); estatística de diversidade baseada em fenótipos alélicos (H'); número de fenótipos alélicos identificados (N).....	67
Tabela 5. Índices de diversidade genética G_{ST} , R_{ST} , F_{ST} , F_{IS} e F_{IT} obtidos pelo FSTAT para as diferentes populações de <i>Psidium guajava</i>	68
Tabela 6. Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois níveis hierárquicos em <i>P. guajava</i> , <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i>	69
Tabela 7. Estimativas de F_{ST} (diagonal inferior) entre pares de populações de <i>P. guajava</i> . Estimativas de G'_{ST} (diagonal inferior) e F'_{ST} (diagonal superior) entre pares de populações de <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i>	70
CAPÍTULO II - Variabilidade de terpenos em espécies de <i>Psidium</i> (Myrtaceae).....	90
Tabela 1. Espécies de <i>Psidium</i> utilizadas no estudo do perfil cromatográfico e sua distribuição.....	96
Tabela 2. Classes de herbivoria segundo a porcentagem estimada de área foliar consumida (como proposto por Dirzo e Domínguez, 1995).....	100
Tabela 3. Média do rendimento de extração e propriedades físicas dos óleos essenciais de 11 espécies de <i>Psidium</i>	102
Tabela 4. Teor percentual de 59 compostos químicos encontrados nos óleos essenciais extraídos das folhas de plantas pertencentes ao gênero <i>Psidium</i> , considerando os	

compostos com Área Relativa > 0,5%.....	104
Tabela 5. Compostos majoritários do óleo essencial de 11 espécies de <i>Psidium</i> spp.....	106
Tabela 6. Características de micromorfologia foliar.....	114
CAPÍTULO III - Effects of two chemotypes of <i>Psidium guajava</i> essential oils in <i>Spodoptera frugiperda</i>.....	143
Table 1. Mean of the extraction yield and physical properties of Paluma and Cortibel VII essential oils.....	150
Table 2. Percentage content of twenty-one chemical components found in the essential oils extracted from leaves of two <i>Psidium guajava</i> genotypes, Paluma and Cortibel VII, considering the components with relative area $\geq 0.5\%$	151
Table 3. Mean number (\pm standard deviation) of <i>Spodoptera frugiperda</i> caterpillars upon leaves sections of maize treated with Paluma and Cortibel VII essential oil, with chance of choice.....	153
Table 4. Mean Mortality (\pm standard deviation) of <i>Spodoptera frugiperda</i> caterpillars treated with Paluma and Cortibel VII essential oils, without chance of choice.....	154

LISTA DE APÊNDICES

CAPÍTULO I - Diversidade genética de três espécies de <i>Psidium</i> na Floresta Atlântica com destaque para restingas	54
Apêndice 1- Número de alelos encontrados em cada <i>loci</i> nas diferentes populações de <i>P. brownianum</i> e <i>P. guineense</i>	87
Apêndice 2. Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em quatro populações de <i>P. guajava</i> com base em microssatélites.....	88
Apêndice 3. Dendograma baseado na distância genética de Nei (A- <i>P. guajava</i> – 42 indivíduos) e de Bruvo (B- <i>P. brownianum</i> - 85 indivíduos; C- <i>P. guineense</i> - 75 indivíduos).....	88
CAPÍTULO II - Variabilidade de terpenos em espécies de <i>Psidium</i> (Myrtaceae).....	90
Apêndice 1. Classificação das características de folhas, índice de herbivoria e rendimento de óleo essencial.....	138
Apêndice 2. Compostos majoritários (área relativa $\geq 10\%$) em óleos essenciais de espécies pertencentes ao gênero <i>Psidium</i>	139

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE E O GÊNERO <i>PSIDIUM</i>	23
3.2 ECOSSISTEMAS LITORÂNEOS E EFEITOS ANTRÓPICOS NA PAISAGEM	25
3.3 DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MICROSSATÉLITES	27
3.4 SISTEMA DE CRUZAMENTO E DISPERSÃO.....	29
3.5 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E OCORRÊNCIA EM MYRTACEAE	31
3.6 EFEITOS INSETICIDAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS	34
4 REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO I - DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Psidium</i> NA FLORESTA ATLÂNTICA COM DESTAQUE PARA RESTINGAS	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 POPULAÇÕES AMOSTRADAS	58
2.2 GENOTIPAGEM COM MICROSSATÉLITES	59
2.3 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE <i>PSIDIUM GUAJAVA</i>	60
2.4 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE <i>PSIDIUM BROWNIANUM</i> E <i>PSIDIUM GUINEENSE</i>	61
2.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	62
3 RESULTADOS	64
3.1 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE <i>P. GUAJAVA</i> , <i>P. BROWNIANUM</i> E <i>P. GUINEENSE</i>	64
3.2 ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>P. GUAJAVA</i> , <i>P. BROWNIANUM</i> E <i>P. GUINEENSE</i>	70
3.3 PADRÕES MORFOLÓGICOS.....	74
4. DISCUSSÃO	75
5 CONCLUSÕES.....	79
6	80
7 APÊNDICES	87
CAPÍTULO II - VARIABILIDADE DE TERPENOS EM ESPÉCIES DE <i>Psidium</i> (MYRTACEAE).....	90
1. INTRODUÇÃO.....	92

2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1 MATERIAL VEGETAL	95
2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	96
2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO E DA DENSIDADE RELATIVA	97
2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	97
2.5 LEVANTAMENTO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS EM ESPÉCIES DE <i>PSIDIUM</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	98
2.6 MORFOLOGIA EXTERNAR E MICROMORFOLOGIA FOLIAR.....	99
2.7 ÍNDICE DE HERBIVORIA.....	100
2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	100
3 RESULTADOS	102
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS DE 11 ESPÉCIES DE <i>PSIDIUM</i>	102
3.2 DIVERSIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM <i>PSIDIUM</i> SPP.....	108
3.3 MICROMORFOLOGIA FOLIAR E ÍNDICE DE HERBIVORIA	113
4. DISCUSSÃO	116
4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS DE 11 ESPÉCIES DE <i>PSIDIUM</i>	116
4.2 VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM <i>PSIDIUM</i> ...	117
4.3 AGRUPAMENTO DE ESPÉCIES DE ACORDO COM SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	120
4.4 DIVERSIDADE DE QUIMIOTIPOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PSIDIUM</i>	121
4.5 MICROMORFOLOGIA E ÍNDICE DE HERBIVORIA.....	123
5 COSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
6 REFERÊNCIAS.....	127
7 APÊNDICES	138
CAPÍTULO III - EFFECTS OF TWO CHEMOTYPES OF <i>Psidium guajava</i> ESSENTIAL OILS IN <i>Spodoptera frugiperda</i>.....	143
1. INTRODUCTION.....	143
2. EXPERIMENTAL.....	145
2.1 Plant Material	145
2.2 Essential oil extraction.....	145
2.3 Determination of the essential oil yield, refraction index and relative density.....	146
2.4 Identification of the essential oil constituents	146
2.5 Creation of <i>Spodoptera frugiperda</i>	147
2.6 Biological tests	148
2.7 Preference test with chance of choice.....	148

2.8 Preference test without chance of choice	149
2.9 Statistic analysis	150
3. RESULTS	150
3.1 Chromatographic profile of the essential oils	150
3.2 Biological tests	152
4 DISCUSSION	154
4.1 Chromatographic profile of the essential oils	154
4.2 Biological tests	156
5 CONCLUSION	158
6 DECLARATION OF INTEREST	158
7 ACKNOWLEDGEMENTS	158
8 REFERENCES.....	159

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Myrtaceae compreende cerca de 144 gêneros com mais de 5.000 espécies e 17 tribos (WILSON, 2001; WILSON et al., 2005; WCSP, 2016). Possui centros de diversidade na América do Sul, Austrália e Ásia tropical com ocorrências na África e na Europa. Apresenta as mais conhecidas fruteiras nativas do Brasil e caracteriza-se por apresentar espécies que produzem pequenos frutos (GOVAERTS et. al., 2008). As espécies desta família possuem folhas simples, com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero (CONTI et al., 1997).

Esta família é uma das mais citadas entre as mais importantes famílias dos ecossistemas brasileiros e sua representatividade nas restingas é bastante mencionada (PEREIRA; ASSIS, 2000; COLODETE; PEREIRA, 2007; GIARETTA; PEIXOTO, 2015). Assis et al. (2004) destacam a família Myrtaceae como uma das mais importantes em número de espécies ocorrendo no Parque Estadual Paulo César Vinha, no município de Guarapari ES. Sua importância também é salientada em outros estudos sobre vegetação na restinga e Mata Atlântica (ASSUMPTÃO; NASCIMENTO, 2000).

Dentro da família Myrtaceae, o gênero *Psidium* é um dos mais importantes e explorados, apresentando aproximadamente 100 espécies. Destas espécies tem destaque a goiabeira *Psidium guajava*, espécie de maior interesse econômico, além dos araçazeiros *Psidium cattleianum* e *Psidium guineense* devido às características de seus frutos que são muito apreciados pelas populações locais onde ocorrem de forma nativa (BEZERRA et. al., 2006).

Devido a importância de espécies do gênero aliado as constantes alterações que sofrem os ambientes de restinga, além de áreas de Florestas estacionais, que resultam em degradação de áreas, redução de populações, com a consequente alteração da estrutura genética destas, estudos que demonstrem a real situação de espécies situadas em distintas regiões se tornam necessários. Para esta finalidade, diversos trabalhos que relatam a diversidade genética vêm sendo realizados (RAO; HODGKIN et al., 2002; DILLON et al., 2014; HUDSON et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Dessa forma, ferramentas biotecnológicas como marcadores moleculares vem sendo amplamente utilizados afim de estimar a diversidade genética entre indivíduos e populações. Dentre estes, destacam-se os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat), altamente recomendados para a análise genética de plantas devido a sua disponibilidade e

abundância ao longo do genoma, por serem de natureza polimórfica, codominantes e detectados pelas condições de PCR (REDDY et al., 2001).

Espécies pertencentes ao gênero *Psidium* apresentam, ainda uma importante característica, são ricas em óleos essenciais, misturas complexas de substâncias voláteis extraídas de plantas aromáticas. No gênero *Psidium*, os óleos essenciais podem apresentar diversas funções como anti-inflamatória, anticonvulsivante, analgésica, além de propriedades inseticidas, larvicidas, antiparasitárias e antimicrobianas (FARIA, 2005; MANOSROI et al., 2006; MOURA, 2010; PINHO et al., 2014).

No entanto, a constituição do óleo essencial pode variar entre genótipos de uma espécie e entre espécies de um gênero. Isso ocorre em função da influência de fatores genéticos, fisiológicos, climáticos e agrônômicos (GOMES et al., 2009; YAPI et al., 2014; SOUZA et al., 2017). Além disso, a variação do teor e qualidade de óleo essencial pode ser atribuída ao grande número de cruzamentos visando à seleção de características como sabor e produtividade, por exemplo, possibilitando a descrição de muitos quimiotipos de óleos (KERROLA et al., 1994; GRAYER, et al., 1996; VITTI; BRITO, 2003). Estudos que identifiquem o perfil quimiotípico dos óleos essenciais se tornam imprescindíveis para que se possa fazer a recomendação adequada quanto ao seu uso.

Devido ao impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com plantas que apresentem potencial inseticida, com o objetivo de reduzir populações de insetos pragas de forma que não causem danos econômicos às culturas e que não acarretem prejuízos para o meio ambiente. Em uma variedade de insetos, os óleos essenciais podem exercer essa função apresentando efeitos repelente, inseticida e de redução de crescimento (REGNAULT-ROGER et al., 2012).

Dentre as pragas que merecem atenção por virem causando danos às culturas, encontra-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Esta pertence à Ordem Lepidoptera e a Família Noctuidae, sendo considerada uma das pragas mais importantes da cultura do milho. Alimenta-se em todas as fases de crescimento da cultura podendo causar perdas significativas à produção se não controlada, sendo que sua forma de controle mais comum é o uso de inseticidas e plantas transgênicas (milho Bt) (TAVARES et al., 2009; STORER et al., 2010). Este fato, faz com que o estudo do efeito de óleos essenciais nesta praga se torne importante, podendo ser uma alternativa para a diminuição do uso de agrotóxicos na cultura.

O óleo essencial de folhas da goiabeira *P. guajava* cv. Pedro Sato foi caracterizado e seus possíveis efeitos foram avaliados no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda* (LIMA et al., 2009). Os resultados mostraram que o óleo essencial de folhas de

goiabeira apresentou efeito repelente para a lagarta-do-cartucho, provavelmente pela presença de α -terpineol (0,9%), 1,8-cineol (7,0%), β -cariofileno (7,2%) e o óxido de cariofileno (13,8%).

Desta forma, objetivou-se com a realização deste trabalho, estudar a diversidade genética de espécies do gênero *Psidium* por um mesmo conjunto de microssatélites, identificar a composição química de óleos essenciais obtidos de espécies de *Psidium* e utilizar as propriedades dos óleos essenciais de *Psidium guajava* como uma alternativa para o controle de *S. frugiperda*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Com este trabalho objetivou-se realizar o estudo da diversidade e estrutura genética de *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense* no estado do Espírito Santo; obter o perfil cromatográfico dos óleos essenciais de *Psidium* spp.; utilizar óleos essenciais de genótipos de goiabeira, no controle de *S. frugiperda*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a diversidade genética de espécies de *Psidium* que ocorrem em diferentes regiões de restinga, além de um ambiente de Floresta estacional semidecidual, no estado do Espírito Santo, com um mesmo grupo de microssatélites;
- Estudar a estrutura genética das espécies nestes locais;
- Obter o perfil cromatográfico dos óleos essenciais de 11 espécies do gênero *Psidium*, coletadas no estado do Espírito Santo e Minas Gerais;
- Avaliar a importância dos compostos identificados, nas interações das espécies com o ambiente;
- Avaliar o efeito do óleo essencial presente em diferentes genótipos de goiabeiras, Paluma e Cortibel VII no controle biológico de *S. frugiperda*;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE E O GÊNERO *Psidium*

A família Myrtaceae compreende de 130 a 150 gêneros de importância econômica e ecológica e que englobam mais de 5000 espécies, tornando-a a maior família da ordem Myrtales (GOVAERTS et al., 2008; GRATTAPAGLIA et al., 2012), que apresenta centros de dispersão na Austrália, sudeste Asiático, América tropical e temperada, além de uma pequena representação na África (THORNHILL et al., 2015).

Está dividida em duas subfamílias, Myrtoideae (15 tribos) e Psiloxylloideae (2 tribos). A subfamília Myrtoideae inclui as tribos Syzygieae e Myrteae que apresentam espécies de frutos carnosos associadas com florestas tropicais ao longo dos trópicos. Alguns importantes gêneros estão incluídos nesta subfamília, como *Eugenia*, *Myrcia*, *Psidium* e *Syzygium*. A tribo Eucalypteae é outra importante tribo pertencente a subfamília Myrtoideae e apresenta os gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* (VASCONCELOS et al., 2017).

As plantas da família são caracterizadas como árvores ou arbustos, geralmente, com ritidoma que pode ou não esfoliar-se, glabras ou pilosas, com folhas opostas, simples, inteiras. Suas inflorescências podem ser terminais ou axilares, racemiformes, fasciculiformes, glomeruliformes ou paniculiformes, podendo ocorrer flores solitárias e axilares. As flores são bissexuais, com cálice 4-5-mero, abrindo-se em lobos irregulares, regulares ou sob a forma de caliptra; sépalas geralmente persistentes, 4-5 pétalas, raramente pétalas reduzidas ou ausentes, alvas, estames numerosos, livres; ovário ínfero, número variável de lóculos e óvulos; frutos tipo baga, com o embrião envolvido por polpa carnosa (BARROSO et al., 1984; SOBRAL, 2003).

Os mais diversos gêneros, em número de espécies, representados na flora Brasileira são *Eugenia* L., *Myrcia* S.L., *Campomanesia* Ruiz & Pav. e *Psidium* L. (SOBRAL et al., 2014). Dentre as várias espécies frutíferas destacam-se a goiabeira (*P. guajava* L.), jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (GRESSLER et al., 2006). Algumas das espécies são utilizadas também em ornamentação, como especiarias e na medicina popular (MAZZANTI et al., 2003; CRUZ; KAPLAN, 2004). Os botões florais do “cravo-da-índia” (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) e frutos da “pimenta-da-jamaica” (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) são utilizadas como condimentos. Na medicina popular destaca-se o “jambolão” (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), utilizado no

controle do diabetes (MAZZANTI et al., 2003). Folhas de *P. guajava* são utilizadas no tratamento de tosse, além de atuar como agentes antimicrobianos (JAIARJ et al., 1999).

Além da importância econômica, espécies da família Myrtaceae apresentam grande importância ecológica, pois seus frutos suculentos e carnosos são fontes de alimento à fauna silvestre. Muitos tipos de aves e macacos que se alimentam desses frutos acabam contribuindo com a dispersão das sementes, o que favorece a sobrevivência e permanência das espécies das quais se beneficiam (BEZERRA et al., 2006).

Espécies pertencentes a família Myrtaceae também constituem importantes modelos taxonômicos que podem ser usados para comparar a diversidade de *hotspots* de espécies dentro da Mata Atlântica e assim predizer seu nível de conservação. Estes modelos se tornam importantes devido ao fato de que recursos taxonômicos podem se encontrar muitas vezes limitados, fazendo com que espécies “modelos” se tornem mais atrativas para estimar as condições de um dado habitat (LUCAS; BÜNGER, 2015).

O gênero *Psidium* é um dos mais importantes e explorados dentro da família Myrtaceae e apresenta cerca de 100 espécies, sendo que destas, em torno de 60 ocorrem no Brasil e 40 ocorrem no Domínio Atlântico (SOBRAL et al., 2014). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, tem destaque *P. guajava*, com grande interesse econômico. Outras espécies, no entanto, apresentam frutos com características muito apreciadas pelas populações locais onde ocorrem de forma nativa possuindo grande potencial de exploração (BEZERRA et al., 2006).

Algumas espécies nativas vêm despertando a atenção da indústria farmacêutica por serem ricas em substâncias antioxidantes e óleos essenciais (FRANZON et al., 2009). Os óleos essenciais encontrados em espécies do gênero *Psidium* apresentam bom desempenho quanto as suas atividades larvicidas (DIAS et al., 2015); inseticidas (LIMA et al., 2009), antimicrobianas, anti-inflamatórias, entre outras (GUTIÉRREZ et al., 2008).

O gênero *Psidium* é variável cariologicamente sendo sugerido um número básico de $x=11$ cromossomos. A goiabeira, *P. guajava*, é de natureza diploide ($2n=2x=22$) (SOUZA et al., 2015), enquanto os araçazeiros *P. guineense* e *P. friedrichsthalianum* compreendem espécies tetraploides ($2n=44$) e os araçazeiros *P. myrtoides* e *P. cattleianum* espécies octaploides ($2n=88$) (MARQUES et al., 2016; NOIA et al., 2017), o que confirma uma tendência de poliploidia no gênero.

3.2 ECOSSISTEMAS LITORÂNEOS E EFEITOS ANTRÓPICOS NA PAISAGEM

A Floresta Atlântica consiste em um complexo de ecossistemas com variáveis geológicas e climáticas singulares, influenciada principalmente pelo regime de chuvas, pela variação na altitude e pela duração da estação seca (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; IBGE, 2012). Desde a colonização do Brasil, esse bioma vem sofrendo intensa deflorestação, estando atualmente entre um dos biomas mais ameaçados do mundo (MYERS et al., 2000).

As restingas são consideradas ecossistemas litorâneos, associados ao domínio Mata Atlântica, que se caracterizam por serem extremamente frágeis, suscetíveis a perturbações e por possuírem baixa capacidade de resiliência. Isto se deve ao fato de que sua vegetação se encontra sobre solos arenosos, imensamente lixiviados e carentes em nutrientes (GUEDES et al., 2006).

A família Myrtaceae é uma das mais importantes em número de espécies ocorrendo no Parque Estadual Paulo César Vinha, no município de Guarapari (ASSIS et al., 2004). Sua importância também é salientada em outros estudos sobre vegetação na restinga e Mata Atlântica (ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000). É uma das mais citadas entre as mais importantes famílias dos ecossistemas brasileiros e sua representatividade nas restingas é bastante mencionada (PEREIRA; ASSIS, 2000; COLODETE; PEREIRA, 2007; GIARETTA; PEIXOTO, 2015).

Apesar das restingas encontradas ao longo da costa brasileira representarem um ecossistema amplamente diversificado com relação a fisionomia, florística e estrutura, elas se apresentam ameaçadas, principalmente devido a acentuada especulação imobiliária ocorrente nestas localidades e à extração de areia que reduz a vegetação local, causando alterações no solo, podendo até mesmo repelir espécies de animais nativas do local e ocasionar contaminação do lençol freático (ASSIS et al., 2004).

No Brasil, os impactos sobre os ecossistemas costeiros se iniciaram há aproximadamente 500 anos, no período da colonização. A apropriação do território brasileiro se deu de forma desigual, onde geralmente as ocupações se iniciavam da zona costeira para o interior, o que culminou em uma considerável saturação populacional no litoral (CUNHA, 2005).

O fato de que o Espírito Santo tenha vivido uma situação de isolamento das demais regiões brasileiras, até o final da primeira metade do século XX, devido à ausência de infraestrutura que fornecesse condições para o crescimento do Estado, tornou o atraso de sua integração com o país fundamental para que houvesse um retardo na degradação dos

ecossistemas litorâneos. No entanto, o ciclo da economia cafeeira, que foi o responsável pela entrada do Espírito Santo no cenário nacional fez com que a conservação dos ecossistemas presentes no estado não durasse muito tempo, não impedindo, assim, sua degradação (SIQUEIRA, 2009).

Atualmente, a degradação de ambientes de restinga é um processo acelerado, podendo até mesmo, se tratar de um dos ecossistemas brasileiros mais impactados (SCHERER et al., 2005). A fronteira agrícola e a urbanização, também colaboram com o agravamento na evolução da fragmentação da cobertura vegetal, frequentemente impelidos pela pecuária, agricultura e silvicultura (MAGALHÃES, 2005). O Estado do Espírito Santo ainda possui importantes fragmentos de Mata Atlântica, apesar deste histórico de destruição e perda de cobertura vegetal.

Quando ocorre uma intensa fragmentação, uma alteração na estrutura, na composição e na abundância relativa de espécies na parte marginal de um fragmento pode ser observada, e isto é conhecido como efeito de borda. Os remanescentes de vegetação nativa ficam inseridos em uma matriz antrópica, onde as bordas são áreas de transição que diferem do interior dos fragmentos (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Fatores bióticos e abióticos quando modificados pelo efeito de borda podem afetar as fases vegetais, já que estas estão relacionadas com a fisiologia da planta (MORELLATO et al., 2000).

As populações podem estar se tornando inviáveis e sujeitas ao desaparecimento, em grande parte dos remanescentes, devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução (KAGEYAMA et al., 2003). Além disso, mesmo que esse ciclo se complete, o tamanho efetivo das populações será pequeno nos fragmentos tornando suas futuras gerações cada vez mais frágeis devido ao aumento da endogamia e perda de alelos pelo efeito da deriva genética.

Dessa forma, as consequências genéticas da fragmentação são alterações no fluxo gênico original, refletindo diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho das populações das espécies, ou indiretamente, por influenciar a abundância ou comportamento dos agentes polinizadores (KARRON et al., 1995).

As mudanças drásticas que ocorrem na geometria da paisagem tendem a afetar as interações entre plantas e animais (HOWE, 1984). A fragmentação pode afetar a densidade populacional de animais, as atividades dos polinizadores e o arranjo de forrageamento dos mesmos, atingindo potencialmente a polinização e o nível de produção de sementes nas plantas (PULLIAM, 1998; MENGES, 1991).

Os severos impactos que estes ambientes vêm sofrendo através da perda de habitat resultam no surgimento de pequenos trechos de terra biologicamente empobrecidos (NOGUEIRA et al., 2007; TABARELLI et al., 2010). A conversão de habitats contínuos em áreas fragmentadas pode alterar as características físicas e estruturais do ambiente, assim como a dinâmica dos processos ecológicos. Estes fatores afetam a riqueza e abundância das espécies, assim como, diversos processos ecológicos importantes, a exemplo de dispersão de sementes, polinização, movimento da fauna e conseqüentemente a variabilidade genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984; MARTINS, 1987; DIBATTISTA, 2008; BREITBACH et al., 2012; EYCOTT et al., 2012).

Dessa forma, a fragmentação desse bioma tem grande influência antrópica e múltiplos efeitos sobre a biota, podendo alterar a diversidade genética e a composição das comunidades nos fragmentos e mudar processos ecológicos (MAGNAGO et al., 2014).

3.3 DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES MICROSSATÉLITES

Devido as alterações que vem ocorrendo no meio ambiente, resultando em degradação de áreas, redução de populações de diversas espécies, com a conseqüente alteração da estrutura genética nestas populações, estudos que demonstrem a real situação de espécies situadas nestas regiões se tornam necessários. Vários trabalhos que relatam a diversidade genética vêm sendo realizados para esta finalidade (RAO; HODGKIN et al., 2002; DILLON et al., 2014; HUDSON et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A diversidade genética pode ser definida como a distância genética existente entre populações, indivíduos ou organismos, baseada em características morfo-agronômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (CRUZ; KAPLAN, 2004). A manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação de espécies e por isso seu conhecimento e entendimento são fundamentais (YEEH et al., 1996).

Para que a diversidade genética existente em populações naturais seja verificada, esta deve ser quantificada e avaliada quanto à sua distribuição entre e dentro de populações, devido à grande variação que sua distribuição pode apresentar. A diversidade genética pode ser influenciada pelo tamanho efetivo populacional, ocorrência geográfica das espécies, modo de reprodução e sistema de cruzamento, mecanismos de dispersão de sementes, entre outros (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Para a avaliação da diversidade genética em *Psidium*, características morfológicas e químicas vêm sendo estudadas (URDANETA et al., 2007). Além disso, marcadores moleculares são utilizados por detectarem o polimorfismo no genótipo e serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, além de reduzirem tempo de análise (REDDY et al., 2001; HOFFMAN, 2006; ISMAIL et al., 2016).

Dentre os marcadores existentes, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são amplamente utilizados para estudos de diversidade genética de populações, filogeografia, taxonomia e filogenia, mapeamento genético e análises forenses (SILVA et al., 2012; CHEN et al., 2012; ZHAO et al., 2014; ARBEITER et al., 2014; ZHAO et al., 2015; KHAJURIA et al., 2015). São considerados ideais para a análise genética em plantas devido a sua abundância ao longo do genoma, por serem codominantes, detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (REDDY et al., 2001; RAMU et al., 2013), bem como polimórficos. Desse modo, acredita-se que os microssatélites sejam um dos mais importantes marcadores para estudos de diversidade, pois podem acuradamente acessar o nível de diversidade genética dentro do germoplasma de qualquer cultivo (ISMAIL et al., 2016).

Para que a caracterização da variabilidade genética possa ser feita, existem estudos que envolvem medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, que poderão ser estimadas através de dados fornecidos por marcadores (CAVALLARI-NETO, 2004). A forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie é denominada de estrutura genética (BROWN, 1978).

Um dos principais objetivos da genética de populações seria descrever a diversidade genética existente nas populações naturais. A genética de populações é um subcampo da biologia evolucionária que busca representar matematicamente as mudanças nas variações genéticas de populações sobre o tempo. Esta ciência visa medir as influências da causa da evolução como, mutação, migração, seleção natural e deriva genética que acontecem ao acaso, através do entendimento de como estas causas podem modificar a genética de populações (MILLSTEIN; SKIPPER, 2007).

Assim, no estudo da estrutura genética das espécies seria imprescindível uma completa descrição dos genomas dos indivíduos, além do conhecimento da localização de cada um deles em cada instante no tempo. Como naturalmente pode ocorrer o nascimento e/ou morte de indivíduos, com seus genes sendo mutados e recombinados com os cruzamentos, se tornaria impossível para os geneticistas procederem com tais investigações científicas (GILLESPIE, 1998).

Dessa forma, com base no teorema de Hardy-Weinberg (HW), geneticistas podem obter sucesso ignorando complexidades de populações reais e focando na evolução de um ou poucos *loci* de cada vez em uma população em que se assume acasalamento aleatório, ou que se subdividida tenha um padrão de migração simples. O princípio de Hardy-Weinberg descreve o estado de equilíbrio de um único *locus* em uma população diploide que está livre de outras forças evolucionárias, como mutação, migração e deriva genética (GILLESPIE, 1998).

Com a lei de HW, as frequências genotípicas podem (sob as condições citadas acima) ser preditas a partir das frequências gênicas. Desta forma, é possível realizar análises em termos de frequências gênicas ao invés de frequências genotípicas. Outra observação é a de que a reprodução numa população que se acasala ao acaso seguindo as proporções mendelianas, não possui a tendência de favorecer a nenhum alelo (não tenderá a perder variabilidade genotípica) (FELSENSTEIN, 2005).

Assim, para se caracterizar a estrutura genética populacional, a partir de marcadores codominantes, geralmente são empregados a heterozigosidade esperada (H_e), número médio de alelos por loco (A) e heterozigosidade observada (H_o) como descritos por Wright (1951), Weir e Cockham (1984) e Nei (1973).

A distribuição de alelos e genótipos é referida como estrutura genética. Ela pode se manifestar entre populações geograficamente distintas. É influenciada por fatores como o modo de reprodução, distribuição espacial dos indivíduos e fatores evolutivos (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Uma forma clássica de se avaliar a estrutura genética de uma população é a utilização das estatísticas-F de Wright (1951), que tornam possível a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), além da caracterização dos níveis de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}).

3.4 SISTEMA DE CRUZAMENTO E DISPERSÃO

Os padrões de distribuição dos alelos e genótipos, no espaço e no tempo são gerados através de processos evolutivos como, seleção, mutação, fluxo gênico e deriva genética que atuam sobre as populações (VEKEMANS; HARDY, 2004). No entanto, existem alguns fatores que podem determinar a estrutura genética de uma população afetando o fluxo gênico (todos os mecanismos que resultam no movimento de genes de uma população para outra) (SLATKIN, 1985) como, as interações ambientais, a ecologia da espécie, a germinação

diferencial de sementes, o arranjo espacial dos indivíduos e o sistema reprodutivo (condições de compatibilidade, polinização, entre outros) (BARRETT, 2003).

O sistema de cruzamento representa a maneira como indivíduos, populações ou espécies recombina sua variabilidade genética a cada geração para formar sua descendência e o seu conhecimento é de suma importância para a manipulação de populações em programas de conservação e melhoramento genético (SEBBENN, 2005). Em *P. guajava* a forma de reprodução mais frequentemente vista é a polinização cruzada (ALVES; FREITAS, 2007). Devido a este mecanismo de reprodução, alguns pomares de goiaba apresentam grande heterozigosidade e variabilidade genética (LARA et al., 2004).

As taxas de cruzamento podem ser diretamente, ou indiretamente atingidas devido a alterações no fluxo gênico original. De forma direta, isto pode ocorrer devido à alteração no tamanho das populações das espécies. Indiretamente, pode ocorrer a mudança no tamanho das populações, pois alterações no fluxo gênico podem influenciar a abundância ou comportamento dos agentes polinizadores (KARRON et al., 1995).

O sistema de cruzamento apresenta um papel fundamental na sobrevivência das novas populações. Ele afeta profundamente a diversidade genética e a estrutura das populações colonizadoras e está associado à capacidade de resposta à pressão de seleção local (HAMRICK et al., 1979). Pode ser considerado como o fator que possui maior influência sobre a estrutura genética de espécies de plantas, pois determina como as informações genéticas serão transferidas de uma geração para a outra (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Contudo, Martins (1987) também ressalta a importância de estudos relacionados a dispersão de pólen e de sementes, pois estes também podem ser componentes determinantes da estrutura genética de uma população. Vale ressaltar que a maioria dos estudos sobre a polinização de espécies pertencentes à família Myrtaceae no Brasil enfoca alguns poucos aspectos como biologia floral e a relação de visitantes observados, sendo raros aqueles que comprovam se os visitantes são realmente polinizadores efetivos das espécies sob investigação. De modo geral, nas espécies pertencentes à família Myrtaceae no Brasil, as abelhas são o grupo mais comum de visitantes florais (LUGHADHA; PROENÇA, 1996; GRESSLER et al., 2006).

Nos casos em que as espécies polinizadoras são animais, o comportamento e o forrageamento também determinam as distâncias em que o pólen será disperso e interfere diretamente nesta distribuição (BARRETT; HARDER, 1996).

Para que o pólen efetivamente promova um fluxo de genes, ele precisa alcançar um estigma receptivo e fecundar a oosfera, entretanto o pólen possui um tempo limitado de

receptividade do estigma. O sucesso da polinização também é dado pela proximidade espacial dos indivíduos, pela ação de polinizadores (OUBORG et al., 1999).

O padrão de dispersão de sementes também pode interferir na distribuição e nos níveis de variação genética dentro da população (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Este padrão de dispersão, permite que as espécies vegetais ampliem sua área de ocorrência, diminuindo a competição intraespecífica e aumentando as taxas de sobrevivência dos indivíduos jovens. Além disso, pode unir o processo de polinização com o recrutamento que levará ao estabelecimento de novas plantas adultas, o que é importante pois a fecundidade de um indivíduo além de depender do sucesso da polinização, depende também do estabelecimento dos indivíduos adultos, que representam novos genótipos e maior diversidade genética (MARTINS, 1987).

O gênero *Psidium* produz muitas sementes por fruto, e apresenta uma ampla variedade de dispersores. Nesse gênero, algumas espécies produzem frutos grandes, os quais possuem várias sementes pequenas, normalmente até duzentos e cinquenta sementes por fruto. Para essas espécies, os dispersores são as aves que, ao ingerirem parte da polpa do fruto, ingerem também as sementes (GRESSLER et al., 2006). Na Tabela 1 estão listados os potenciais agentes dispersores de sementes de algumas espécies de *Psidium* aqui estudadas.

Tabela 1 - Dispersores das sementes de duas espécies de *Psidium* no Brasil

Espécies	Dispersores	Referências
<i>P. guajava</i>	aves; carnívoros; lagartos; marsupiais;	mamíferos morcegos; macacos;
<i>P. guineense</i>	mamíferos marsupiais	carnívoros; 6, 7

Referências: 1. Augusto (2004); 2. Brusius (2009); 3. Cantor (2010); 4. Cheida (2005); 5. Corrêa (2010); 6. Silva et al. (2013); 7. Facure e Giaretta (1996); 8. Gressler et al. (2006); 9. Leiva (2010); 10. Rosa (2004).

3.5 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E OCORRÊNCIA EM MYRTACEAE

Óleos essenciais podem ser descritos como elementos voláteis presentes nos órgãos das plantas que são extremamente complexos quanto a sua composição, podendo apresentar, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (componentes oriundos do metabolismo secundário das plantas). Estas substâncias contêm diferentes funções orgânicas como fenóis,

éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pelas várias atividades observadas na utilização dos óleos (LANGENHEIM, 1994; PICHERSKY; GERSHENZON, 2002).

As plantas que produzem óleos essenciais possuem uma variedade de estruturas celulares epidérmicas que os produzem e uma grande quantidade de combinações dos constituintes químicos (SANGWAN et al., 2001). Óleos essenciais se acumulam em todos os tipos de órgãos vegetativos como flores (árvores de bergamota), folhas (citronela, eucalipto), cascas (canela), madeiras (pau-rosa, madeira de sândalo), raízes (vetiver), rizomas (Cúrcuma, gengibre), frutos (pimenta da Jamaica, anis, anis estrelado) e sementes (noz-moscada) (ENAN, 2001).

Os óleos essenciais geralmente se concentram em uma região particular da planta, no entanto, quando ocorrem em vários órgãos da mesma planta apresentam, frequentemente, diversos perfis químicos (OUSSALAH et al., 2007). Quando frutos e folhas de *P. guajava* foram estudadas, diferentes composições de óleo essencial foram encontradas (EL-AHMADY et al., 2013). Nas folhas, por exemplo foi identificado o β -cariofileno (16,9%) e selin-7(11)-en-4 α -ol (8,3%) como componente majoritário, enquanto que nos frutos, além do β -cariofileno (17,6%), também encontraram limoneno (11,0%) como composto majoritário.

Nas espécies da família Myrtaceae, a composição majoritária dos óleos essenciais é dada por sesquiterpenos e monoterpenos (MOHAMED et al., 2013; TYAGI et al., 2014; SOLIMAN et al., 2016). Os terpenos fazem parte da classe mais diversa de compostos orgânicos voláteis nas plantas (DUDAREVA et al., 2013) e desempenham várias funções na interação entre a planta e o ambiente.

Na família Myrtaceae, terpenos são relatados com atuação na defesa contra herbívoros e patógenos (PADOVAN et al., 2014), apresentando-se deterrentes a insetos (SHINODA et al., 2002) e tóxicos a fungos (OSBOURN, 1996). Também atuam na atração de animais benéficos ou de mediação de interações de microrganismos das raízes das plantas no solo (STEFFEN et al., 2012). Assim, óleos essenciais em Myrtaceae são estudados por suas atividades biológicas, a exemplo, das espécies do gênero *Psidium* que apresentam bom desempenho quanto as suas atividades larvicidas (DIAS et al., 2015); inseticidas (LIMA et al., 2009), antimicrobianas e anti-inflamatórias (GUTIÉRREZ et al., 2008).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com plantas que apresentem potencial inseticida, devido ao impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, com o objetivo de reduzir populações de insetos pragas de forma que não causem danos econômicos às culturas e que não acarretem prejuízos para o meio ambiente. Em uma variedade de insetos, os óleos essenciais podem exercer essa função apresentando efeitos

repelente, inseticida e de redução de crescimento (REGNAULT-ROGER et al., 2012). No entanto, devido à natureza complexa dos óleos essenciais, não se pode determinar com exatidão qual ou quais compostos são realmente responsáveis pela atividade que o óleo exerce.

A composição de óleo essencial foi investigada nas tribos da família Myrtaceae e foi observado que existe um padrão quimiotípico de terpenos foliares, em que os compostos α -pineno e 1,8-cineol são os mais comuns e abundantes na maioria das tribos. Porém, também foram observadas diferenças neste padrão, pois nas tribos Myrteae, Kanieae, Syzygieae, Xanthostemoneae, Syncarpieae e Lindsayomyrteae o sesquiterpeno β -cariofileno apresenta-se como o mais abundante (PADOVAN et al., 2014).

Vinte e dois genótipos de *P. guajava* foram investigados e uma abundância de sesquiterpenos foi observada (SOUZA et al., 2017). O β -cariofileno foi um dos compostos que apresentou maiores valores médios nos genótipos avaliados, o que corrobora os resultados encontrados por Padovan et al. (2014). No entanto, o sesquiterpeno viridiflorol foi identificado como composto majoritário quando *P. guajava* foi estudado por Khadhri et al. (2014). Estes resultados indicam que existe variabilidade quimiotípica dentro de até mesmo uma mesma espécie e isso mostra a importância de estudos que investiguem a composição dos óleos essenciais.

Em Myrtaceae os óleos essenciais constituem uma característica importante da família (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984) e o número de genes relacionados à sua biossíntese presente em representantes da família é muito superior ao encontrado em várias espécies (KÜLHEIM et al., 2015; CANAL, 2016).

Dessa forma, a composição química dos óleos essenciais é variável e pode ser influenciada pela síntese de geranyl pirofosfato (GPP) e farnesil pirofosfato (FPP), os precursores de mono e sesquiterpenos, respectivamente. Embora a síntese de ambos ocorra através de enzimas únicas em diferentes compartimentos celulares (monoterpenos em cloroplastos, sesquiterpenos no citosol), ambos são sintetizados pelo mesmo precursor (DUDAREVA et al., 2013). A variação na eficiência destas enzimas, que são responsáveis por catalisar a conversão de alguns poucos substratos em milhares de estruturas de terpenos é o que irá influenciar na diversidade de monoterpenos e sesquiterpenos (DEGENHARDT et al., 2009).

No entanto, outros fatores também podem influenciar na composição final de óleos essenciais. Por possuírem uma interface química com as plantas e o ambiente, os metabólitos secundários podem ter sua rota metabólica redirecionada, caso ocorra alguma alteração nesta

interação, podendo ocorrer a biossíntese de compostos distintos (MORAIS, 2009, SOUZA et al., 2017).

Dentre os fatores que podem determinar alterações na composição química de óleos essenciais, podem-se ressaltar fatores intrínsecos como a variabilidade genética e a ontogenia, idade da planta; e fatores extrínsecos como, localização geográfica e tipo de solo, disponibilidade de água, temperatura e luminosidade, tratamento pós-colheita, horário de coleta, técnica de extração utilizada e sazonalidade. Além disso, estes fatores podem apresentar correlações entre si, ou seja, podem atuar em conjunto, exercendo influência concomitante no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

3.6 EFEITOS INSETICIDAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Estudos com relação ao uso de óleos essenciais derivados de plantas aromáticas como inseticidas de baixo risco, vem crescendo. Este fato se deve a sua apreciação por produtores orgânicos e consumidores ambientalmente conscientes. Os óleos essenciais apresentam importantes características podendo diretamente repelir (TRONGTOKIT et al., 2005), intoxicar (TORRES et al., 2014) e ainda reduzir o crescimento de uma gama de insetos (HALDER et al., 2012).

Os compostos presentes nos óleos essenciais exercem sua atividade nos insetos através de efeitos neurotóxicos que envolvem diversos mecanismos. Um dos fatos que torna a atividade dos óleos essenciais eficazes é a característica que apresentam de serem bons penetrantes que aumentam sua própria biodisponibilidade. Este fato está relacionado com a interrupção das bicamadas lipídicas das células (REGNAULT-ROGER et al., 2012).

Determinados compostos presentes nos óleos essenciais, por exemplo, são inibidores dos citocromos P450 em insetos (REGNAULT-ROGER et al., 2012). As enzimas codificadas por genes do citocromo P450 são encontradas em todos os tecidos dos insetos e apresentam atividades importantes, desde a síntese e degradação de ecdisteróides (classe de hormônios relacionados com os processos de muda em insetos) e hormônios juvenis, ao metabolismo de substâncias químicas externas de origem sintética ou natural (FEYEREISEN et al., 1999).

Vários terpenos contidos nos óleos essenciais são neurotóxicos para os insetos. Os monoterpenos de estrutura relativamente simples como o limoneno, o mirceno, e a 1,2-epóxipulegona exercem funções de proteção às plantas que os produzem. Supostamente, sua ação inseticida seria decorrente da inibição da acetilcolinesterase nos insetos (VIEGAS JÚNIOR,

2003). A acetilcolinesterase é uma enzima que age na interrupção da transmissão do impulso nervoso, através de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, no sistema nervoso (SARAIVA, 2009).

Além disso, muitos constituintes químicos dos óleos essenciais atuam nos receptores de octopamina dos insetos, sendo estes também um alvo para a atividade inseticida dos óleos essenciais. A toxicidade dos óleos essenciais ocorre devido sua ação sobre o sítio da octopamina, podendo acontecer a inibição ou estímulo do mesmo. Se o seu funcionamento for cessado, ocorrerá a interrupção do funcionamento do sistema nervoso do inseto (ENAN, 2001).

Os receptores ionotrópicos GABA, distribuídos ao longo do sistema nervoso de muitas espécies de insetos, também são alvo de inúmeros compostos presentes em óleos essenciais (HOSIE et al., 1997). O monoterpeneo timol, presente em óleos essenciais, pode se ligar a receptores GABA associados com canais de cloreto localizados na membrana de neurônios pós-sinápticos de insetos e atrapalhar o funcionamento das sinapses de GABA (PRIESTLEY et al., 2003).

Dessa forma, a atividade inseticida dos óleos essenciais ocorre devido a diversos mecanismos que afetam múltiplos alvos, alterando de maneira eficaz a atividade celular e os processos biológicos de insetos. No entanto, a eficácia dos óleos essenciais varia de acordo com o perfil químico de seus compostos e com o alvo entomológico (REGNAULT-ROGER, et al., 2012).

Lima et al. (2009), por exemplo, encontraram como compostos majoritários do óleo essencial de *P. guajava*, 1,8-cineol (16,73%), α -terpineol (14,85%), β -cariofileno (6,25%) e (*E*)-nerolidol (4,04%). Os autores testaram o óleo contra a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, e puderam mostrar que o óleo essencial conferiu efeito inseticida repelente/deterrente à lagarta.

Pinho et al. (2014) encontraram no óleo essencial de *P. guajava* var. pomifera cinco componentes majoritários: epiglobulol (19,20%); 1.8-cineol (13,31%), óxido isoaromadendreno (11,13%), álcool cariofileno (10,21%), e β -cariofileno (9,51%). Além disso, também sugeriram atividade bioinseticida dos compostos voláteis de *P. guajava* var. pomifera através de estresse oxidativo às espécies de *Drosophila melanogaster*.

O óleo essencial de *Psidium myrsinites* DC, apresentou os seguintes componentes majoritários: β -cariofileno (26,05%), α -humuleno (23,92%) e óxido de cariofileno (10,09%). Este óleo foi testado contra larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) e se mostrou efetivo. As larvas que foram submetidas a tratamento com este óleo ficaram agitadas durante

os primeiros 30 minutos de exposição e em seguida apresentaram movimentos anormais, incluindo tremores e convulsões. Posteriormente, sofreram uma paralisia e se moveram para o fundo dos recipientes em que estavam contidas antes de morrerem (DIAS et al., 2015).

Estes resultados mostram, como alguns dos componentes dos óleos essenciais podem ser efetivos contra insetos. Mais estudos devem ser gerados, buscando mostrar quais componentes são de fato eficazes e quais insetos são suscetíveis a estes. Estes tipos de estudos são um importante avanço no que diz respeito ao controle biológico de pragas, contribuindo com maneiras de se diminuir o uso demasiado de agrotóxicos, preservando o ambiente e a saúde humana.

4 REFERÊNCIAS

- ALVES, J. E.; FREITAS, B. M. Requerimentos de polinização da goiabeira. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.
- ARBEITER, A. B.; JAKŠE, J.; BANDELJ, D. Paternity Analysis of the Olive Variety “Istrska Belica” and Identification of Pollen Donors by Microsatellite Markers. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2014.
- ASSIS, A. D.; THOMAZ, L. D.; PEREIRA, O. J. Florística de um trecho de floresta de restinga no município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.18, n. 1, p. 191-201, 2004.
- ASSUMPCÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no Complexo Lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 14, n. 3, p. 301-315, 2000.
- AUGUSTO, E. L.; MS, P.; MITSUE, M. Morcegos do Parque Chico Mendes, Osasco, São Paulo, como Dispersores de Sementes. **Revista PIBIC**, p. 15-19, 2004.
- BARRETT, S. C.; HARDER, L. D. Ecology and evolution of plant mating. **Trends in ecology & evolution**, 1996.
- BARRETT, S. C. H. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 358, n. 1434, p. 991-1004, 2003.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 2, p. 376, 1984.
- BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F.; PROENÇA, C. E. B. Araçá. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília, DF: Embrapa. Informação Tecnológica: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 42-62, 2006.

BREED, M. F.; GARDNER, M. G.; OTTEWELL, K. M.; NAVARRO, C. M.; LOWE, A. J. Shifts in reproductive assurance strategies and inbreeding costs associated with habitat fragmentation in Central American mahogany. **Ecology Letters**, v. 15, n. 5, p. 444-452, 2012.

BREITBACH, N.; TILLMANN, S.; SCHLEUNING, M.; GRÜNEWALD, C.; LAUBE, I.; STEVAN-DEWENTER, I.; BÖHNING-GAESE, K. Influence of habitat complexity and landscape configuration on pollination and seed-dispersal interactions of wild cherry trees. **Oecologia**, v. 168, n. 2, p. 425-437, 2012.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, p. 145-157, 1978.

BRUSIUS, Luisa. **Efetividade de dispersão por antas (*Tapirus terrestris*): aspectos comportamentais de deposição de fezes e germinação de sementes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CANAL, Drielli. **Prospecção de genes envolvidos na biossíntese de óleos essenciais em *Psidium guajava* L.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de ciências exatas, naturais e da saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

CANTOR, M.; FERREIRA, L. A.; SILVA, W. R.; SETZ, E. Z. F. Potential seed dispersal by *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) in highly disturbed environment. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, 2010.

CAVALLARI-NETO, Mario. **Estrutura genética em populações de *Enchilium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

CHEIDA, Carolina Carvalho. **Dieta e dispersão de sementes pelo lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger 1815) em uma área com campo natural, Floresta Ombrófila Mista e**

silvicultura, Paraná, Brasil. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CHEN, S. Y.; ZHANG, Y. J.; WANG, X. L.; SUN, J. Y.; XUE, Y.; ZHANG, P.; ZHOU, H.; QU, L. H. Extremely Low Genetic Diversity Indicating the Endangered Status of *Ranodon sibiricus* (Amphibia: Caudata) and Implications for Phylogeography. **Plos One**, v. 7, 2012.

COLODETE, M. F.; PEREIRA, O. J. Levantamento Florístico da restinga de Regência, Linhares / ES. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 558-560, 2007.

CONTI, E. Interfamilial relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. **Systematic Botany**, v. 22, n. 4, p. 629-647, 1997.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.1, p. 47-52, 2004.

CORRÊA, Carolina. **Ecologia de sabiás (*Turdus spp.*) e sanhaços (*Thraupis spp.*) em área urbana com fragmentos florestais no campus da UNESP de Rio Claro**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

CUNHA, I. Desenvolvimento sustentável na costa brasileira. **Revista Galega de Economía**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2005.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-1637, 2009.

DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; RODRIGUES, K. A. F.; BRITO, M. C. A.; ROSA, C. S.; AMARAL, F. M. M.; MONTEIRO, O. S.; ANDRADE, E.H. A.; MAIA, J. G. S.; MORAES, D. F. C. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from

Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

DIBATTISTA, J. D. Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 1, p. 141-156, 2008.

DILLON, S.; MCEVOY, R.; BALDWIN, D. D.; REES, G. N.; PARSONS, Y.; SOUTHERTON, S. Characterisation of Adaptive Genetic Diversity in Environmentally Contrasted Populations of Eucalyptus. **Plos one**, v. 9, n. 8, 2014.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.

EL-AHMADY, S. H.; ASHOURA, M. L.; WINK, M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves. **Journal of Essential Oil Research**, 2013.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 130, p. 325-337, 2001.

EYCOTT, A. E.; STEWART, G. B.; BUYUNG-ALI, L. M.; BOWLER, D. E.; WATTS, K.; PULLIN, A. S. A meta-analysis on the impact of different matrix structures on species movement rates. **Landscape Ecology**, v. 27, n. 9, p. 1263-1278, 2012.

FACURE, K. G.; GIARETTA, A. A. Food habits of carnivores in a coastal Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 60, n. 3, p. 499-502, 1996.

FARIA, Lucimari Romana Dipe de. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) – atividades anti-inflamatória e analgésica**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UNIFENAS, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2005.

FELSENSTEIN, J. Theoretical evolutionary genetics. **Sciences New York**, v. 36, n. 2, p. 417-427, 2005.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 507-33, 1999.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, p.48, 2009.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. Myrtaceae da restinga no norte do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão Nova Série**, v. 134, p. 37-53, 2015.

GILLESPIE, J. H. **Population Genetics A concise Guide**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1998.

GOMES, P. A.; SOUZA, M. F.; SOUZA JÚNIOR, I. T.; CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). **Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 9-14, 2009.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E.J. **World checklist of Myrtaceae**. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, 2008. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2014.

GRAYER, R. J.; KITE, G. C.; GOLDSTONE, F. J.; BRYAN, S. E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B. R.; FOLEY, W.; KÜLHEIM, C.; POTTS, B. M.; MYBURG, A. A. Progress in Myrtaceae

genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p. 463-508, 2012.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUEDES, D.; BARBOSA, L. M.; MARTINS, S. E. Composição florística e estrutura fitossociológica de dois fragmentos de floresta de restinga no Município de Bertiooga, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 2, p. 299-311, 2006.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1-27, 2008.

HALDER, J.; SRIVASTAVA, C.; DHINGRA, S.; DUREJA, P. Effect of Essential Oils on Feeding, Survival, Growth and Development of Third Instar Larvae of *Helicoverpa armigera* Hubner. **National Academy Science Letters**, v. 35, n. 4, p. 271-276, 2012.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 10, p. 173-200, 1979.

HOFFMAN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão. Documentos**, v. 147, p. 35, 2006.

HOSIE, A. M.; ARONSTEIN, K.; SATTELLE, D. B.; FRENCH-CONSTANT, R. H. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. **Tins**, v. 20, n. 12, 1997.

HOWE, H. F. Implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation**, v. 30, n. 3, p. 261-281, 1984.

HUDSON, C. J.; FREEMAN, J. S.; MYBURG, A. A.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, p. 1378-1390, 2015.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/manuais_tecnicos/manual_tecnico_vegetacao_brasileira.pdf>. Acesso em 12 de Janeiro de 2014.

ISMAIL, N. A.; RAFII, M. Y.; MAHMUD, T. M. M.; HANAFAI, M. M.; MIAH, G. Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. **Molecular Biology Reports**, 2016.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, M. L. S.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 203-212, 1999.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KARRON, J. D.; THUMSER, N. N.; TUCKER, R.; HESSENAUER, A. J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, v. 75, n. 2, p. 175-180, 1995.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinales* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.

KHADHRI, A.; MOKNI, R.E.; ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M. E. M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KHAJURIA, Y. P.; SAXENA, M. S.; GAUR, R.; CHATTOPADHYAY, D.; JAIN, M.; PARIDA, S. K.; BHATIA, S. Development and Integration of GenomeWide Polymorphic

Microsatellite Markers onto a Reference Linkage Map for Constructing a High-Density Genetic Map of Chickpea. **Plos One**, 2015.

KÜLHEIM, C.; PADOVAN, A.; HEFER, C.; KRAUSE, S. T.; KÖLLNER, T. G.; MYBURG, A. The Eucalyptus terpene synthase gene family. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 450, 2015.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1223-1280, 1994.

LARA, M. J.; LARA, M. C. B.; DE ANDA, M. C. R.; DELGADO, S. H.; RAMIREZ, J. S. P.; PEREZ, N. M. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 27, p. 243-249, 2004.

LEIVA, Maristela. **Frugivoria E Germinação De Sementes Após Passagem Pelo Sistema Digestivo De Marsupiais Em Floresta Estacional Semidecidual**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1777-1781, 2009.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUCAS, E. J.; BÜNGER, M. O. Myrtaceae in the Atlantic forest: their role as a 'model' Group. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, p. 2165-2180, 2015.

LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, n. 4, p. 480-503, 1996.

MAGALHÃES, L. M. S. Complexidade e o manejo de fragmentos de florestas secundárias. In: **Anais do Encontro Brasileiro de Estudos da Complexidade**. Curitiba: PUC-Pr, v. 1, p. 1-11, 2005.

MAGNAGO, L. F.; EDWARDS, D. P.; EDWARDS, F. A.; MAGRACH, A.; MARTINS, S.V.; LAURANCE, W. F. Functional attributes change but functional richness is unchanged after fragmentation of Brazilian Atlantic forests. **Journal of Ecology**, v. 102, n. 2, p. 475-485, 2014.

MANOSROIA, J.; DHUMTANOMA, P.; MANOSROIA, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v. 235, p. 114-120, 2006.

MARQUES, A. M.; TULER, A. C.; CARVALHO, C. R.; CARRIJO, T. T.; FERREIRA, M. F. S.; CLARINDO, W. R. Refinement of the karyological aspects of *Psidium guineense* (Swartz, 1788): a comparison with *Psidium guajava* (Linnaeus, 1753). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 117-128, 2016.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Ipef**, v. 35, p. 71-78, 1987.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.

MENGES, E. S. Seed Germination Percentage Increases with Size in a Fragmented Population Prairie Species. **Conservation Biology**, v. 5, n. 2, p. 158-164, 1991.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1950.

MILLSTEIN, R. L.; SKIPPER, R. A. Population Genetics. In: HULL, D. L.; RUSE, M. (Org.). **The Cambridge Companion to the Philosophy of Biology**. Cambridge University Press, p. 22-48, 2007.

MOHAMED, A. A; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **Plos One**, v. 8, 2013.

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

MORELLATO, L. P. C.; TALORA, D. C.; TAKAHASI, A.; BENCKE, C. C.; ROMERA, E. C.; ZIPPARRO, V. B. Phenology of Atlantic rain forest trees: A comparative study. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 811-823, 2000.

MOURA, Waldileny Ribeiro de Araújo. **Ensaio farmacológico das atividades Anti-inflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, harm e *Sida santaremnensis*, monteiro**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2010.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NOGUEIRA, E. M.; FEARNSIDE, P. M.; NELSON, B. W.; FRANC, M. B. Wood density in forests of Brazil's "arc of deforestation": Implications for biomass and flux of carbon from land-use change in Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 248, n. 3, p. 119-135, 2007.

NOIA, L. R.; TULER, A. C.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Relationship between *Psidium* species (Myrtaceae) by resistance gene analog markers: focus on nematode resistance. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, 2015.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.

OSBOURN, A. Saponins and plant defence—a soap story. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 4-9, 1996.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 2007.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 695-716, 2014.

PEREIRA, O. J.; ASSIS, A. M. Florística da restinga de Camburi, Vitória, ES. **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 99-111, 2000.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237-243, 2002.

PINHO, A. I.; WALLAU, G. L.; NUNES, M. E. M.; LEITE, N. F.; TINTINO, S. R.; DA CRUZ, L. C.; DA CUNHA, F. A. B.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. *Pomifera* (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

PRIESTLEY, C. M.; WILLIAMSON, E. M.; WAFFORD, K. A.; SATTELLE, D. B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A

receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 1363-1372, 2003.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: Editora Planta, 2001.

PULLIAM, D. W. Sources, Sinks, and Population Regulation. **American Society of Naturalists**, v. 132, p. 652-661, 1998.

RAMU, P.; BILLOT, C.; RAMI, J. F.; VEL, S. S.; UPADHYAYA, H. D.; REDDY, L. A.; HASH, C. T. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 8, p. 2051-2064, 2013.

RAO, R. V.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2002.

REDDY, O. U. K.; PEPPER, A. E.; SAHA, I. A. S; JENKINS, J. N.; BOLEK, T. B. Y.; El-Zik, K. M. Molecular Biology: New Dinucleotide and Trinucleotide Microsatellite Marker Resources for Cotton Genome Research. **The Journal of Cotton Science**, v. 5, p. 103-113, 2001.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROSA, Simone Dala. **Morcegos (Chiroptera, Mammalia) de um remanescente de restinga, Estado do Paraná, Brasil: ecologia da comunidade e dispersão de sementes**. 2004. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

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

SARAIVA, Eduardo Rodrigo. **Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes**. 2009. Tese

(Doutorado em Toxicologia) - Programa de Pós Graduação em toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

SCHERER, A.; MARASCHI-SILVA, F.; BAPTISTA, L. R. M. Florística e estrutura do componente arbóreo de matas de Restinga arenosa no Parque Estadual de Itapuã, RS, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, p. 715-726, 2005.

SEBBENN, A. M. Método para a seleção de árvores superiores para forma do fuste e produção de resina em plantios de *Pinus* sp. **IF Série Registros**, v. 28, p. 1-11, 2005.

SHINODA, T.; NAGAO, T.; NAKAYAMA, M.; SERIZAWA, H.; KOSHIOKA, M.; OKABE, H.; KAWAI, A. Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 587-599, 2002.

SILVA, N. M.; PEREIRA, L.; POLONI, E. S.; CURRAT, M. Human Neutral Genetic Variation and Forensic STR Data. **Plos One**, v. 7, 2012.

SILVA, J. C. B.; CÂNDIDO JUNIOR, J. F.; VOGEL, H. F.; CAMPOS, J. B. Dispersão por aves de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) em ambiente ripário na bacia do rio Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 195-204, 2013.

SILVA, E. F.; DE ARAÚJO, R. F.; MARTINS, C. S. R.; MARTINS, L. S. S.; VEASEY, E. A. Diversity and genetic structure of natural populations of araçá (*Psidium guineense* Sw.). **Revista Caatinga**, v. 2125, p. 37-44, 2016.

SIQUEIRA, M. P. S. A questão regional e a dinâmica econômica do Espírito Santo – 1950/1990. **Fênix – Revista de História e Estudos Culturais**, v. 6, p. 1-16, 2009.

SLATKIN, M. Gene flow in natural Populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

SOBRAL, M. **A Família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul: Unisinos, 2003.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2014. Myrtaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2017.

SOLIMAN, F. M.; FATHY, M. M.; SALAMA, M. M.; SABER, F. R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University**, 2016.

SOUZA, A. G.; RESENDE, L. V.; LIMA, I. P.; MARTINS, L. S. S.; TECHIO, V. H. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and comercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 231-237, 2015.

SOUZA, T. S. FERREIRA, M. S. F.; MENINI, L.; SOUZA, J. L. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. B.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; SILVA, R. F. Essential oil of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in stimulating mycorrhizal sibipiruna seedlings (*Ceasalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 69-78, 2012.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TABARELLI, M.; AGUIAR, A. V.; RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; PERES, C. A. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, v. 143, n. 10, p. 2328-2340, 2010.

TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; JÚNIOR, S. L. A.; FREITAS, S. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 384-388, 2009.

THORNHILL, A. H.; HO, S. Y.; KÜLHEIM, C.; CRISP, M. D. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 93, p. 29-43, 2015.

TORRES, C.; SILVA, G.; TAPIA, M.; RODRÍGUEZ, J. C.; FIGUEROA, I.; LAGUNES, A.; SANTILLÁN, C.; ROBLES, A.; AGUILAR, S.; TUCUCH, I. Insecticidal activity of *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Chilean journal of agricultural research**, v. 74, n. 4, 2014.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. **Phytotherapy research**, v. 19, p. 303-309, 2005.

TYAGI, A. K.; BUKVICKI, D.; GOTTARDI, D.; TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. Eucalyptus Essential Oil as a Natural Food Preservative: In Vivo and In Vitro Antiyeast Potential. **BioMed Research International**, 2014.

URDANETA, A. B. S.; COLMENARES, C.; BRACHO, B.; ORTEGA, J.; RIVERO, G.; GUTIÉRREZ, G.; PAZ, J. Caracterización morfológica del fruto en variantes de guayabo (*Psidium guajava* L.) en una finca del municipio Mara, estado Zulia. **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**, v. 24, p. 282-302, 2007.

VASCONCELOS, T. N. C.; PROENÇA, C. E. B.; AHMAD, B.; AGUILAR, D. S.; AGUILAR, R.; AMORIM, B. S.; CAMPBELL, K.; COSTA, I. R.; DE-CARVALHO, P. S.; FARIA, J. E. Q.; GIARETTA, A.; KOOIJ, P. W.; LIMA, D. F.; MAZINE, F. F.; PEGUERO, B.; PRENNER, G.; SANTOS, M. F.; SOEWARTO, J.; WINGLER, A.; LUCAS, E. J. Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 109, p. 113-137, 2017.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921-935, 2004.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, p. 26, 2003.

WCSP (World Checklist of Selected Plant Families). 2011. **World checklist of selected plant families**. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp>>. Acesso em: 15 de março de 2013.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370. 1984.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Myrtaceae Revisited: A Reassessment Of Intrafamilial Groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

WRIGHT, S. **The genetical structure of populations**. Lecture material. London: University College, p. 325-354, 1951.

YAPI, T. A.; BOTI, J. B.; TONZIBO, Z. F.; AHIBO, C. A.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J.; TOMI, F. Chemical Variability of *Xylopi* *quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, 2014.

YEEH, Y.; KANG, S.; CHUNG, M. Evaluations of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p. 141-146, 1996.

ZHAO, D. W.; YANG, J. B.; YANG, S. X.; KATO, K.; LUO, J. P. Genetic diversity and domestication origin of tea plant *Camellia taliensis* (Theaceae) as revealed by microsatellite markers. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 14, 2014.

ZHAO, H.; YANG, L.; PENG, Z.; SUN, H.; YUE, X.; LOU, Y.; DONG, L.; WANG, L.; GAO, Z. Developing genome-wide microsatellite markers of bamboo and their applications on molecular marker assisted taxonomy for accessions in the genus *Phyllostachys*. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

CAPÍTULO I

Diversidade genética de três espécies de *Psidium* na Floresta Atlântica com destaque para restingas

Carolina de Oliveira Bernardes¹, Amélia Carlos Tuler², Drielli Canal³, Marina Santos Carvalho³, Adésio Ferreira³, Marcia Flores da Silva Ferreira¹

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

²Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IP/ JBRJ, RJ). Rua Jardim Botânico, 1008 Jardim Botânico - CEP 22470-180, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

³Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

RESUMO: A Floresta Atlântica, vem sofrendo intensa deflorestação e é atualmente, um dos biomas mais ameaçados do mundo. Estes ambientes frágeis e de baixa capacidade de resiliência, propiciam alterações da estrutura genética das populações naturais. Assim, objetivou-se com este trabalho estudar a diversidade e estrutura genética de três importantes espécies do gênero *Psidium* (*P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*) de ocorrência em ambientes antrópicamente afetados utilizando marcadores moleculares microssatélites. Para os estudos de diversidade, um mesmo grupo de nove marcadores microssatélites foi utilizado em quatro populações de *P. guajava* (42 indivíduos), cinco populações de *P. brownianum* (85 indivíduos) e quatro populações de *P. guineense* (75 indivíduos), em regiões do sul (Guarapari, Itaoca e Presidente Kennedy) e do norte (Itaúnas, Conceição da Barra, Vale e Águia Branca) do estado do Espírito Santo. O maior número de alelos foi detectado para populações de *P. guajava* (110 alelos), seguido por *P. guineense* e *P. brownianum* com 86 e 74 alelos, respectivamente. Foram obtidos elevados valores de heterozigosidade esperada para as populações estudadas (*P. guajava*, $H_e = 0,69$; *P. brownianum*, $H' = 0,64$; *P. guineense*, $H' = 0,71$). Com relação à AMOVA, em *P. guajava*, 80,03% da variação ocorreu dentro de populações e 19,96% entre populações; em *P. brownianum* 73,63% dentro e 26,36% entre e em *P. guineense*, 79,66% dentro e 20,33% entre populações refletindo em elevados valores de divergência genética (*P. guajava*, $F_{ST} = 0,1996$; *P. brownianum*, $\Phi_{ST} = 0,2636$; *P. guineense*,

\emptyset_{ST} : 0,2034). As populações das três espécies estudadas apresentaram-se moderadamente estruturadas, com a formação de dois grupos principais cada, representando a região sul e norte do Espírito Santo. Parâmetros morfológicos também foram avaliados e pode-se observar que *P. guajava* e *P. guineense* ficaram próximas umas das outras e que *P. brownianum* foi distinta das demais. Dentro das espécies foi possível verificar distinção de plantas coletadas na região norte em relação às plantas do sul para todas as espécies.

Palavras-chave: Myrtaceae, ecossistemas litorâneos, microssatélites, *Psidium guajava*.

ABSTRACT: The Atlantic Forest, has been suffering intense deforestation and it is nowadays one of the most threatened biomes in the world. These fragile environments of low resilient capacity, promote alterations on the genetic structures of natural populations. It was aimed with this work to study the genetic diversity of three important species from the genus *Psidium* (*P. guajava*, *P. brownianum* and *P. guineense*), which occur in antropically affected environments using microsatellite molecular markers. For the diversity studies, the same group of nine microsatellite markers were used in four populations of *P. guajava* (42 plants), five populations of *P. brownianum* (85 plants) and four populations of *P. guineense* (75 plants), in the South (Guarapari, Itaoca and Presidente Kennedy) and North (Itaúnas, Conceição da Barra, Vale and Águia Branca) regions of the state of Espírito Santo. The higher number of alleles was detected for *P. guajava* populations (110 alleles) followed by *P. guineense* (86 alleles) and *P. brownianum* (74 alleles). Elevated values of expected heterozygosity were obtained for the studied populations (*P. guajava*, $H_e = 0.69$; *P. brownianum*, $H' = 0.64$; *P. guineense*, $H' = 0.71$). In *P. guajava*, 80.03% of the variation occurred within the populations and 19.96% among populations; in *P. brownianum* 73.63% within and 26.36% among populations and in *P. guineense*, 79.66% within and 20.33% among populations reflecting elevated genetic diversity values (*P. guajava*, $F_{ST} = 0.1996$; *P. brownianum*, \emptyset_{ST} : 0.2636; *P. guineense*, \emptyset_{ST} : 0.2034). The populations of the studied species were considered moderately structured, with the formation of two main groups, representing the South and the North regions of Espírito Santo. Morphological parameters were also evaluated and through this result, it could be observed that *P. guajava* and *P. guineense* were near each other and that *P. brownianum* stayed distant from the others. Within the species, it was possible to distinguish plants collected in the North and in the South regions for all of the species.

Keywords: Myrtaceae, coastal ecosystems, microsatellites, *Psidium guajava*.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica consiste em um complexo de ecossistemas com variáveis geológicas e climáticas singulares, influenciada principalmente pelo regime de chuvas, pela variação na altitude e pela duração da estação seca (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; IBGE, 2012). Desde a colonização do Brasil, esse bioma vem sofrendo intensa deflorestação, estando entre um dos biomas mais ameaçados do mundo (MYERS et al., 2000).

Os ecossistemas litorâneos, denominados de restingas, apesar de sua grandeza são os que mais sofrem com ações antrópicas (CUNHA, 2005). Sua vegetação encontra-se sobre solos arenosos e imensamente lixiviados. Devido a constante retirada da vegetação desses locais, acontece uma interrupção na deposição de matéria orgânica e na adição de nutrientes, que acarreta na exposição de algumas áreas, o que caracteriza a fragilidade desses ecossistemas (GUEDES et al., 2006). Assim, uma intensa degradação nas áreas de restinga, com conseqüente redução de populações de diversas espécies é observada. Áreas de Florestas estacionais, que também fazem parte do bioma da Mata Atlântica, sendo caracterizadas por duas estações claramente separadas, chuvosas e secas, também sofrem intensa pressão tanto para atividades extrativistas, quanto para crescimento das áreas urbanas. Dessa forma, estes ambientes extremamente frágeis, suscetíveis a perturbações e de baixa capacidade de resiliência, propiciam alterações da estrutura genética das populações naturais (ASSIS et al., 2004; GUEDES et al., 2006).

Dentre as famílias de plantas mais importantes nos ecossistemas brasileiros e com grande representatividade nas restingas, destaca-se Myrtaceae (COLODETE; PEREIRA, 2007; GIARETTA; PEIXOTO, 2015). No Parque Estadual Paulo César Vinha, no município de Guarapari ES, esta família é apontada como uma das que apresentam maiores números de espécies (ASSIS et al., 2004a; ASSIS et al., 2004b). Sua importância também é salientada em outros estudos sobre vegetação na restinga (ASSUMPCÃO; NASCIMENTO, 2000; MAGNAGO et al., 2011). Em Myrtaceae, o gênero *Psidium* é um dos mais importantes e explorados com cerca de 100 espécies, das quais a goiabeira *Psidium guajava* apresenta valor comercial, enquanto araçazeiros como *P. brownianum* e *P. guineense*, embora ainda sem grande valor comercial apresentam frutos apreciados por populações locais onde essas espécies ocorrem de forma nativa (BEZERRA et al., 2006).

Espécies pertencentes a família Myrtaceae podem ainda ser utilizadas como importantes modelos taxonômicos, na comparação da diversidade de espécies dentro da Mata Atlântica predizendo seu nível de conservação. Estes modelos são importantes pois muitas

vezes recursos taxonômicos podem ser limitados, tornando as espécies “modelos” atrativas para estimar as condições de um dado habitat (LUCAS; BÜNGER, 2015).

Uma vez que a variabilidade genética é considerada a base da conservação de espécies (KAHILAINEN et al., 2014) é fundamental a compreensão dos seus níveis e distribuição. Assim, estudos visando o conhecimento sobre a estruturação genética de populações naturais são importantes tanto para a demonstração de fragmentação de ambientes naturais quanto para o planejamento de metas que visem o uso sustentável e conservação de espécies (FRANKHAM, 2003; FOREST et al., 2015).

Os marcadores microssatélites são amplamente utilizados em estudos de populações naturais. Entretanto, o uso do mesmo conjunto de microssatélites para avaliar a diversidade genética de diferentes espécies em um mesmo ambiente, não é comum. Este cenário pode auxiliar a melhor compreensão dos padrões de diversidade das espécies em um determinado local, que em conjunto com características morfológicas das populações naturais, podem indicar os tipos de alterações ocorridas. Nas espécies de *Psidium* grande quantidade de microssatélites conservados foram relatados, revelando padrões de distribuições entre grupos de espécies (TULER et al., 2015). Estes marcadores, abundantes no genoma, de natureza codominante e altamente polimórficos (RAMU et al., 2013), são intensamente indicados para investigar a respeito da diversidade genética entre e dentro de populações de diferentes espécies.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho estudar a diversidade e estrutura genética de populações de três espécies de *Psidium* (*P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*) utilizando um mesmo grupo de marcadores moleculares microssatélites e assim verificar a existência de mesmos padrões de diversidade nos ambientes; investigar se existe estruturação genética das espécies nestes locais e associar os resultados obtidos aos dados morfológicos das populações em cada ambiente amostrado visando identificar padrões morfológicos associados à diferenciação genética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÕES AMOSTRADAS

O estudo foi iniciado com a análise de espécies de *Psidium* listadas para o Espírito Santo (TULER et al., 2015), com ocorrência ampla em áreas de restinga, além de espécies que ocorreram em um ambiente de Floresta estacional semidecidual (Tabela 1). Excursões a campo foram realizadas, dando prioridade aos locais onde existia registro para as espécies. Em campo, ramos férteis foram coletados de indivíduos por população amostrada (*P. guajava* = 2 indivíduos GUA, 2 indivíduos IOC, 1 indivíduo PRK e 1 indivíduo AGU; *P. brownianum* = 4 indivíduos GUA, 2 indivíduos PRK, 2 indivíduos VAL, 1 indivíduo ITV e 1 indivíduo ITA; *P. guineense* = 6 indivíduos GUA, 2 indivíduos IOC, 2 indivíduos ITA e 2 indivíduos AGU). Eles foram prensados e posteriormente herborizados. Amostras de todas as espécies serão incluídas na coleção do herbário da Universidade Federal do Espírito Santo (VIES).

Foi avaliada a diversidade genética de populações das espécies mais abundantes de *Psidium* no estado do Espírito Santo: *P. guajava* L., *P. brownianum* DC. e *P. guineense* Sw., todos de ocorrência em áreas de restinga no estado (Figura 1, Tabela 1). Também foram realizadas coletas na localidade Águia Branca que corresponde a um ambiente de Floresta estacional semidecidual. Foram coletadas folhas dos indivíduos das populações para as três espécies. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e liofilizado, para posterior extração de DNA.

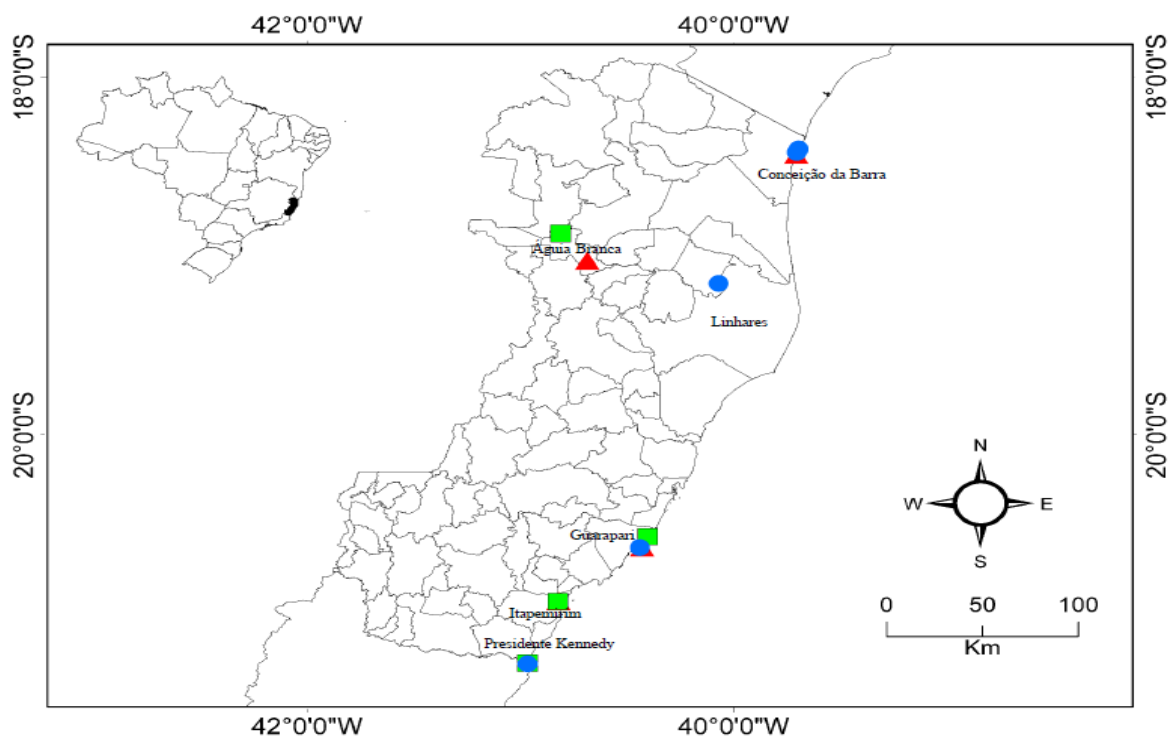


Figura 1. Distribuição geográfica das populações amostradas de *P. guajava* (Guarapari, Itaoca, Presidente Kennedy e Águia Branca), *P. brownianum* (Guarapari, Presidente Kennedy, Vale, Conceição da Barra e Itaúnas) e *P. guineense* (Guarapari, Itaoca, Águia Branca e Itaúnas). Código: verde: *P. guajava*; azul: *P. brownianum*; vermelho: *P. guineense*.

Tabela 1. Populações coletadas das três espécies *Psidium* e respectivos tamanhos amostrais

Espécie	População	Local	Tamanho amostral
<i>P. guajava</i>	GUA	Guarapari*	08
	IOC	Itaoca	15
	PRK	Presidente Kennedy	05
	AGU	Águia Branca	14
		Total	42
<i>P. brownianum</i>	GUA	Guarapari*	23
	VAL	Vale	12
	PRK	Presidente Kennedy	13
	ITV	Conceição da Barra	10
	ITA	Itaúnas	27
		Total	85
<i>P. guineense</i>	GUA	Guarapari*	16
	IOC	Itaoca	17
	AGU	Águia Branca	16
	ITA	Itaúnas	26
		Total	75

*Coleta realizada no Parque Estadual Paulo César Vinha (área de proteção ambiental).

2.2 GENOTIPAGEM COM MICROSSATÉLITES

Para extração de DNA, 200 mg de folhas jovens foram maceradas utilizando o equipamento MagnaLyser (Roche) e o DNA foi obtido pelo método CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1990). A quantificação e a verificação da integridade do DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 0,9% e por nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

Para a genotipagem foram utilizados *primers* microssatélites (Tabela 2) obtidos de *P. guajava* e utilizados em *P. brownianum* e *P. guineense*. As condições de amplificação foram: 60ng de DNA, 1X de tampão, 1 U Taq DNA polimerase, 0,2µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2mM de dNTP e 1,8mM de MgCl₂ completando com água para o volume final de 15 µL. Para a amplificação, a seguinte programação foi utilizada no termociclador (Thermo Scientific): quatro minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 4 minutos a 72°C (RISTERUCCI et al., 2005). Os produtos de PCR foram separados e visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose

1,5% e em seguida, sendo confirmada amplificação, seguiu a análise em eletroforese capilar com o equipamento *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies).

Tabela 2. Informações sobre os *loci* microssatélites utilizados em *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*

<i>locus</i> SSR	TA	TF	A	Motivo
mPgCIR 10	55	261	400–500	(CT) ₁₂
mPgCIR 29	55	162	100–200	(GA) ₈ /(GAA) ₅
mPgCIR 162	55	122	100-200	(GA) ₉ /(GCCG) ₃
mPgCIR 171	55	182	200-300	(GA) ₃₁
mPgCIR 231	55	177	100–400	(GT) ₉ /(GA) ₁₂
mPgCIR 235	55	204	300-500	(GA) ₂₈ /(GAGT) ₄
mPgCIR 242	55	178	250-300	(GA) ₁₂
mPgCIR 243	55	174	100-400	(GA) ₂₉
mPgCIR 253	55	197	200-400	(GA) ₂₉

Locus amplificado; TA: temperatura de anelamento (°C); TF: Tamanho do fragmento em pares de bases; A: amplitude alélica em pares de base (pb); Motivo.

2.3 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE *Psidium guajava*

Para as análises descritivas de diversidade genética em *P. guajava* foi utilizado o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001), para a obtenção das estimativas: número médio de alelos por *loci* (*A*); número de alelos privados (*A_{PRIV.}*); heterozigosidade esperada (*H_e*); heterozigosidade observada (*H_o*); coeficiente de endogamia (*f*) (WRIGHT, 1951); além do desvio de zero das proporções de genótipos em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), que foi avaliado através de permutações alélicas dentro das populações de acordo com o teste exato de Fisher descrito por Weir (1996).

O software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) foi utilizado para estimar os parâmetros de Weir e Cockerman (1984): índices de fixação dentro das populações (*F_{IS}*); índice de fixação total (*F_{IT}*) e divergência genética entre populações (*F_{ST}*); além do índice *G_{ST}* (NEI, 1973) e a estimativa *R_{ST}* (SLATKIN, 1995). Estes índices foram estimados para as quatro

populações e também para as populações da região sul. Para estas análises foi utilizado o método de reamostragem *bootstrap*, com 95% de intervalo de confiança, com 5000 permutações.

O software Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006) foi utilizado para realizar a análise de variância molecular (AMOVA), responsável por indicar a diferenciação das populações. Também foi utilizado para a obtenção de uma matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre as populações.

Foi realizada uma PCoA (Análise de Coordenadas Principais) através da distância de Nei (1973), pelo programa R. Além disso, foi feita uma análise de agrupamentos de indivíduos, pelo método hierárquico UPGMA utilizando a distância de Nei (1973), com auxílio do programa R (R, 2016).

Além disso, com o auxílio do software STRUCTURE versão 2.3.4 foi inferido o número de grupos genéticos formados entre os indivíduos das populações de *P. guajava*. O STRUCTURE é um software de inferência extensivamente utilizado para detectar a estrutura genética populacional (KAEUFFER et al., 2007), que utiliza uma abordagem Bayesiana *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC) (PRITCHARD et al., 2000). Foram realizadas 20 corridas, o *burn-in* consistiu de um conjunto de 250.000 replicações seguidas por 500.000 passos de MCMC para um número de $K=6$ (escolhido de acordo com o número de indivíduos nas populações). Para a obtenção do melhor K foi utilizado o critério ΔK (EVANNO et al., 2005).

2.4 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE *Psidium brownianum* E *Psidium guineense*

Devido à natureza poliploide observada pelos dados moleculares para as espécies *P. brownianum* e *P. guineense*, os dados genéticos das populações foram analisados com o auxílio do programa F-DASH (OBBARD et al., 2006) e do software POLYSAT (CLARK; JASIENIUK, 2011).

O programa FDASH, possui uma estatística de diferenciação genética denominada F'_{ST} , que se baseia na diversidade de fenótipos alélicos. Este programa é recomendado para espécies poliploides (alopoliploides ou autopoliploides) em que os alelos e *loci* podem ser contabilizados, mas que no entanto, não é possível obter o efeito de dosagem dos alelos e os respectivos genótipos (OBBARD et al., 2006). Com o auxílio deste programa foi possível verificar o número de fenótipos alélicos, número de alelos encontrados entre os *loci*, calcular

a estatística de diversidade H' (baseada em fenótipos alélicos análogo ao H_e) e a estatística de diferenciação F'_{ST} (baseada em fenótipos alélicos análogo ao F_{ST}).

O software POLYSAT é utilizado através da plataforma do programa R, que analisa dados de microssatélites de auto e aloploidos (CLARK; JASIENIUK, 2011). Com o auxílio de POLYSAT foram calculados os índices F'_{ST} e G'_{ST} entre pares de populações. (POLYSAT, 2017). Além disso, também foi calculada uma matriz de distância de Bruvo entre pares de amostras (BRUVO et al., 2004). Esta distância foi utilizada para os poliploides por levar em consideração distâncias entre alelos de microssatélites sem o conhecimento do número de cópias do alelo (CLARK; JASIENIUK, 2011). A matriz de distância foi utilizada como uma matriz de correlação necessária para visualizar os resultados da PCoA, também realizada pelo programa R. Além disso, foi feita uma análise de agrupamentos de indivíduos, pelo método hierárquico UPGMA utilizando a distância de Bruvo, com auxílio do programa R (R, 2016).

O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) também foi utilizado para a análise dos dados dos poliploides. Para cada conjunto de dados o software STRUCTURE foi utilizado considerando valores de K que variaram de acordo com o número de populações de cada espécie, K= 8 para *P. brownianum*, K= 6 para *P. guineense* (valores de K escolhidos de acordo com o número de indivíduos nas populações). Cada corrida consistiu de 250.000 *burn-in* e 500.000 interações das coleções de dados. Cada valor de K foi avaliado utilizando 20 repetições de MCMC independentes. O melhor K foi inferido seguindo o critério ΔK , sugerido por Evanno et al. (2005).

2.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para o estudo morfológico medidas foram tomadas de amostras secas adultas do terceiro ao quinto nó, apresentando-se os valores mínimos e máximos. Os verticilos protetores e reprodutores foram mensurados com auxílio de régua, papel milimetrado e paquímetro digital. As características morfológicas avaliadas foram: Altura das plantas; forma do ramo, pilosidade nos ramos, diâmetro; consistência das folhas, forma, pilosidade, cor, comprimento e largura das folhas; tamanho do pecíolo; número de nervuras secundárias; inflorescências, número de flores, tamanho do pedicelo, tamanho do botão, comprimento e largura do lobo; pilosidade do fruto, comprimento, diâmetro, formato e cor do fruto; número de sementes, forma, comprimento e largura de sementes.

Para verificar se houve concordância entre os resultados da diferenciação genética e os dados morfológicos foi realizado um agrupamento UPGMA com base na distância de Gower, com as características morfológicas avaliadas de 6 indivíduos de *P. guajava*, 10 de *P. brownianum* e 12 de *P. guineense*.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES EM POPULAÇÕES DE *P. guajava*, *P. brownianum* E *P. guineense*

O maior número de alelos foi detectado nas populações de *P. guajava* (110 alelos), no entanto esta espécie apresentou o menor número de indivíduos amostrados (42), com média de 12,2 alelos por *locus*. Os *loci* mPgCIR 10 e mPgCIR 253 elevaram a média de alelos por *locus* em *P. guajava*. Para *P. brownianum* foram identificados 74 alelos nos 85 indivíduos (média de 8,2 alelos por *locus*) e para *P. guineense* 86 alelos (média de 9,5 alelos) nos 75 indivíduos. O *locus* mPgCIR 10 apresentou o maior número de alelos para *P. guajava* e *P. brownianum* (23 e 11, respectivamente) e o mPgCIR 253 apresentou maior número de alelos para *P. guineense* (16). O *locus* mPgCIR 162 apresentou o menor número de alelos para *P. guajava* e *P. guineense* (8 e 5, respectivamente) e o mPgCIR 253 para *P. brownianum* (3) (Tabela 3).

A H_e dos *loci* em *P. guajava* variou de 0,78 a 0,94 (*loci* mPgCIR 243 e mPgCIR 10, respectivamente). A H_o , apresentou uma média de 0,67, variando de 0,24 a 0,98 (*loci* mPgCIR 231 e mPgCIR 162, respectivamente). O coeficiente de endogamia apresentou uma média de 0,19 (Tabela 3).

Psidium brownianum e *P. guineense* apresentaram frequentemente mais de dois alelos por *locus* (Figura 2) e, portanto, foram analisados como poliploides. Desta forma, por não ser possível identificar todos os possíveis genótipos encontrados, as análises levaram em consideração fenótipos alélicos. Ao todo foram identificados 154 fenótipos alélicos nas cinco populações de *P. brownianum* e 164 nas quatro populações de *P. guineense*.

Os valores de H' (análogos ao H_e) por *locus* variaram de 0,38 (mPgCIR 253) a 0,91 (mPgCIR 162), com uma média de 0,81 em *P. brownianum*. Para *P. guineense* variaram de 0,68 (mPgCIR 235) a 0,93 (mPgCIR 10) com uma média de 0,83. As estimativas de diferenciação genética (F'_{ST}) variaram de 0,07 (mPgCIR 253) a 0,29 (mPgCIR 29) e médias de 0,19 em *P. brownianum* e 0,15 em *P. guineense*, nesta espécie variando de 0,08 (mPgCIR 10) a 0,31 (mPgCIR 243) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise descritiva dos nove *loci* microssatélites utilizados nas populações de *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*: número de alelos por *loci* (*A*); heterozigosidade esperada (H_e); heterozigosidade observada (H_o); coeficiente de endogamia (*f*), número total de fenótipos alélicos identificados (*F*), estatística de diversidade baseada em fenótipos alélicos (H'); e estatística de diferenciação baseada em fenótipos alélicos (F'_{ST})

<i>Loci</i>	<i>P. guajava</i>				<i>P. brownianum</i>				<i>P. guineense</i>			
	<i>A</i>	H_e	H_o	<i>f</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	H'	F'_{ST}	<i>A</i>	<i>F</i>	H'	F'_{ST}
mPgCIR 10	23	0,94	0,87	0,07	11	16	0,840	0,176	10	28	0,927	0,083
mPgCIR 29	9	0,88	0,50	0,43	10	16	0,790	0,296	11	23	0,913	0,122
mPgCIR 162	8	0,80	0,98	-0,22	8	24	0,909	0,183	5	14	0,886	0,140
mPgCIR 171	9	0,80	0,64	0,20	7	14	0,858	0,254	8	16	0,829	0,107
mPgCIR 231	13	0,81	0,24	0,71	9	27	0,886	0,224	9	10	0,772	0,185
mPgCIR 235	13	0,83	0,90	-0,09	9	15	0,861	0,147	6	13	0,685	0,160
mPgCIR 242	9	0,79	0,83	-0,04	9	21	0,888	0,25	12	18	0,842	0,122
mPgCIR 243	9	0,78	0,27	0,66	8	18	0,882	0,128	9	11	0,694	0,308
mPgCIR 253	17	0,84	0,78	0,06	3	3	0,384	0,073	16	31	0,925	0,115
Média	12,22	0,83	0,67	0,19	8,18	16,99	0,807	0,193	9,55	18,22	0,830	0,149
Total	110	-	-	-	74	154	-	-	86	164	-	-

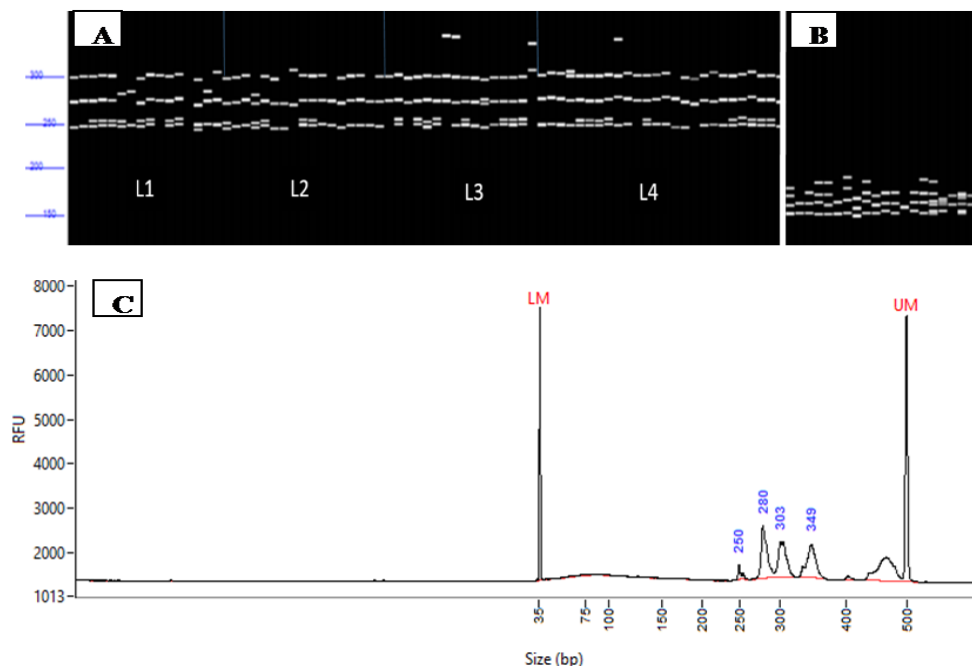


Figura 2. Perfil de amplificação na eletroforese capilar: (A) locus mPgCIR 10, nos quatro locais de coleta (L1: GUA, L2: IOC, L3: AGU, L4: ITA); (B) locus mPgCIR 29. (C) Amplicons (250 pb, 280 pb, 303 pb, 349 pb) do microssatélite mPgCIR 253 em um genótipo de *Psidium guineense* de ITA. LM: Marcador menor; UM: Marcador maior.

Considerando populações, na espécie *P. guajava* o número médio de alelos encontrados variou de 3,11 (PRK) à 5,44 (AGU) e grande quantidade de alelos privados (65) foi detectado nas populações, com destaque para a população IOC (31) (Tabela 4).

Nas populações de *P. brownianum*, uma média de 48,8 fenótipos alélicos foi observada, com a maior variação de fenótipos alélicos detectada em ITA (65), local que também apresentou o maior número total de alelos ($A_e = 49$). O menor número de fenótipos alélicos foi apresentado por ITV (33) que também apresentou o menor número de alelos (32) (Apêndice 1, Tabela 4). Um maior número médio de fenótipos alélicos foi detectado nas populações de *P. guineense* (64,25), com destaque para a população GUA que apresentou maior número de fenótipos alélicos (74), com maior número de alelos (63). O menor número médio de fenótipos alélicos foi observado na população AGU (49) (Tabela 4).

Em *P. guajava*, a H_e variou de 0,63 na população PRK a 0,79 na população ITA, enquanto a heterozigosidade observada variou de 0,61 (IOC) a 0,82 (PRK). Os coeficientes de endogamia (f) foram positivos para as populações GUA e IOC ($f=0,03$ e

$f=0,24$, respectivamente) indicando homozigotos nessas populações. No entanto, estes coeficientes foram negativos para a populações PRK e AGU ($f=-0,49$ e $f=-0,02$, respectivamente), indicando um favorecimento aos heterozigotos nestas duas populações (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética a nível de população em *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*, para nove *loci* polimórficos de microssatélites: número médio de alelos por *loci* (A); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_e); heterozigosidade observada (H_o); coeficiente de endogamia (f), número de alelos encontrados dentro das populações (A_e); estatística de diversidade baseada em fenótipos alélicos (H'); número de fenótipos alélicos identificados (N)

Populações		A	$A_{PRIV.}$	H_e	H_o	f
<i>P. guajava</i>	GUA	4,77	12	0,75	0,72	0,03
	IOC	7,22	31	0,79	0,61	0,24
	PRK	3,11	05	0,58	0,82	-0,49
	AGU	5,44	17	0,63	0,64	-0,02
	Média	5,14	16,25	0,69	0,75	-0,01
		A_e	H'		N	
<i>P. brownianum</i>	GUA	44	0,63		55	
	VAL	46	0,69		47	
	PRK	46	0,69		44	
	ITV	32	0,55		33	
	ITA	49	0,64		65	
	Média	43,4	0,64		48,8	
<i>P. guineense</i>	GUA	63	0,81		74	
	PRK	55	0,73		61	
	AGU	55	0,60		49	
	ITA	60	0,69		73	
	Média	58,25	0,71		64,25	

Legenda: GUA = Guarapari, IOC = Itaoca, PRK = Presidente Kennedy, AGU = Águia Branca, VAL = Vale, ITV = Conceição da Barra, ITA = Itaúnas.

Para as populações de *P. brownianum* a média do H' foi de 0,64 variando de 0,55 (ITV) a 0,69 (VAL). Para *P. guineense*, a média do H' foi igual a 0,71 com uma variação de 0,60 na população AGU a 0,81 na população GUA (Tabela 4).

Em *P. guajava*, a maioria dos *loci* não apresentou equilíbrio de HW nas populações de GUA, IOC e AGU. Nas populações GUA e IOC, apenas o *locus* mPgCIR 162 apresentou EHW. Na população PRK, apenas os *loci* mPgCIR 171 e mPgCIR 235 desviaram as proporções do equilíbrio e na população AGU, os *loci* mPgCIR 10, mPgCIR 161 e mPgCIR 253 apresentaram EHW (Apêndice 2). Assim, GUA e IOC foram as populações que apresentaram maior número de *loci* em desequilíbrio de HW (8 *loci*). A população que apresentou menor número foi PRK com apenas dois *loci* em desequilíbrio (*loci* mPgCIR 171 e mPgCIR 235). Os *loci* mPgCIR 171 e mPgCIR 235 apresentaram o maior desvio significativo do EHW (em todas as quatro populações), enquanto que o *locus* mPgCIR 162 apresentou EHW em todas as populações (Apêndice 2).

Com relação aos índices de diversidade, para *P. guajava* foi observada alta diferenciação genética entre quatro populações de estudo ($G_{ST}= 0,202$; $F_{ST}=0,197$; $R_{ST}=0,360$), bem como endogamia ($F_{IS} = 0,089$) (Tabela 5). Considerando apenas a região sul verificou-se diferenciação genética moderada ($G_{ST}= 0,165$; $F_{ST}=0,145$; $R_{ST}=0,285$) entre as três populações avaliadas (GUA, PRK e IOC) e coeficiente de endogamia menor ($F_{IS} = 0,055$) inferindo a ocorrência de um número de cruzamentos entre aparentados um pouco menor. Quando as quatro populações foram avaliadas em conjunto, pôde-se observar um R_{ST} maior ($R_{ST}=0,360$) que o F_{ST} ($F_{ST}=0,197$) mostrando que o modelo de mutação *stepwise* existente para microssatélites contribuiu para a diferenciação (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de diversidade genética G_{ST} , R_{ST} , F_{ST} , F_{IS} e F_{IT} obtidos pelo FSTAT para as diferentes populações de *Psidium guajava*

Grupo	G_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}
Região sul	0,165	0,285	0,145*	0,055	0,221*
Regiões sul e norte	0,202	0,360	0,197*	0,089	0,241*

Legenda: Estatisticamente significativo * $P < 0,01$, de acordo com o método de reamostragem *bootstrap*.

A AMOVA para as populações de *P. guajava* indicou 80,03% de variação dentro de populações ($F_{ST}=0,19$, $P > 0,01$) e 19,96% de variação entre populações. Para *P. brownianum* foi indicado 73,63% de variação dentro de populações ($\Phi_{ST}=0,26$, $P > 0,01$) e 26,36% entre populações e em *P. guineense*, 79,66% dentro de populações ($\Phi_{ST}=0,20$, $P > 0,01$) e 20,33% entre (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois níveis hierárquicos em *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*

	Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variação	Índice de fixação	Varição (%)
<i>P. guajava</i>	Entre populações	3	55,118	0,79182	F_{ST} : 0,1996*	19,96
	Dentro de populações	41	247,856	3,17486		80,03
	Total	44	396,250	5,02655		
<i>P. brownianum</i>	Entre populações	4	5,4968	0,0718	Φ_{ST} : 0,2636*	26,36
	Dentro de populações	84	16,0535	0,2007		73,63
	Total	88	21,5503	0,2725		
<i>P. guineense</i>	Entre populações	3	3,4481	0,0514	Φ_{ST} : 0,2034*	20,33
	Dentro de populações	74	14,2995	0,2014		79,66
	Total	77	17,7476	0,2528		

*Estatisticamente significativo ($P > 0,01$).

Os valores de F_{ST} entre pares de populações de *P. guajava* foram todos significativos, mostrando divergência entre todas as populações. A menor foi entre as populações IOC e GUA (0,11) e a maior entre AGU e PRK (0,29) (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativas de F_{ST} (diagonal superior) entre pares de populações de *P. guajava*, estimativas de F'_{ST} (diagonal superior) e G'_{ST} (diagonal inferior) entre pares de populações de *P. brownianum* e *P. guineense*

<i>P. guajava</i>		GUA	IOC	PRK	AGU	
	GUA	-	0,11396*	0,16638*	0,19906*	
	IOC	-	-	0,18772*	0,21013*	
	PRK	-	-	-	0,29044*	
	AGU	-	-	-	-	
<i>P. brownianum</i>		GUA	VAL	PRK	ITV	ITA
	GUA	-	0,2728*	0,0763*	0,2408*	0,0763*
	VAL	0,1427*	-	0,0723*	0,2351*	0,0700*
	PRK	0,0796*	0,0785*	-	0,0903*	0,0674*
	ITV	0,0933*	0,0911*	0,1063*	-	0,0647*
	ITA	0,0808*	0,0744*	0,0455	0,0566*	-
<i>P. guineense</i>		GUA	PRK	AGU	ITA	
	GUA	-	0,0249	0,0339	0,0356	
	PRK	0,0176	-	0,0267	0,0269	
	AGU	0,0262	0,0185	-	0,0214	
	ITA	0,0314	0,0218	0,0151	-	

*Estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

Foram feitas comparações de pares de F'_{ST} e G'_{ST} para as populações de *P. brownianum* e *P. guineense* (Tabela 7). Para as populações de *P. brownianum* todas as comparações de F'_{ST} entre populações foram significativas, com maior diversidade observada entre VAL e GUA (0,2728) e a menor entre ITA e ITV (0,0647). Para o índice G'_{ST} a maior diversidade foi observada entre VAL e GUA (0,1427) e a menor diversidade entre ITA e PRK (0,0455). Nas populações de *P. guineense* foram feitas comparações de F'_{ST} e G'_{ST} entre os pares de populações, entretanto não foram significativas (Tabela 7).

3.2 ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *P. guajava*, *P. brownianum* E *P. guineense*

Na análise da estrutura genética das populações de *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense* foi detectado $K=2$ e este foi considerado o modelo que pode melhor explicar a estrutura genética das populações das três espécies (Figuras 3 e 4).

Conforme observado na Figura 3 (A), em *P. guajava*, quando $K=2$ pode-se observar a formação de dois grupos (GUA, IOC e PRK = grupo 1; AGU = grupo 2),

porém quando o $K=3$ a população IOC constitui um grupo distinto. Quando $K=4$ foi observado que a população IOC foi dividida em dois grupos distintos. Em todos os valores de K , foi observado que a população AGU (norte do estado) se manteve mais homogênea que as demais populações (do sul do estado) (Figura 4).

Em *P. brownianum* com $K=2$ verificou-se as populações GUA, VAL e PRK em um grupo e as populações ITV e ITA em outro. Com $K=3$ a população de GUA formou um grupo distinto. Com $K=4$ as populações do norte do estado, ITV e ITA se diferenciaram em dois outros grupos e conforme K foi aumentado até $K=6$ observou-se que as populações partilham ainda mais alelos (Figura 4).

Em *P. guineense* também foram observados dois grupos principais, quando $K=2$, em que no primeiro grupo estão as populações GUA e IOC (região sul) e no segundo AGU e ITA (região norte). No entanto, quando $K=3$ a população GUA forma um grupo a parte (Figura 3 e Figura 4). Com $K=4$ observa-se que a população GUA ainda constitui um grupo separado de IOC, no entanto, estes partilham muitos alelos. E assim como para as demais espécies, à medida que o número de K aumentou, maior variabilidade dentro das populações foi encontrada (Figura 4).

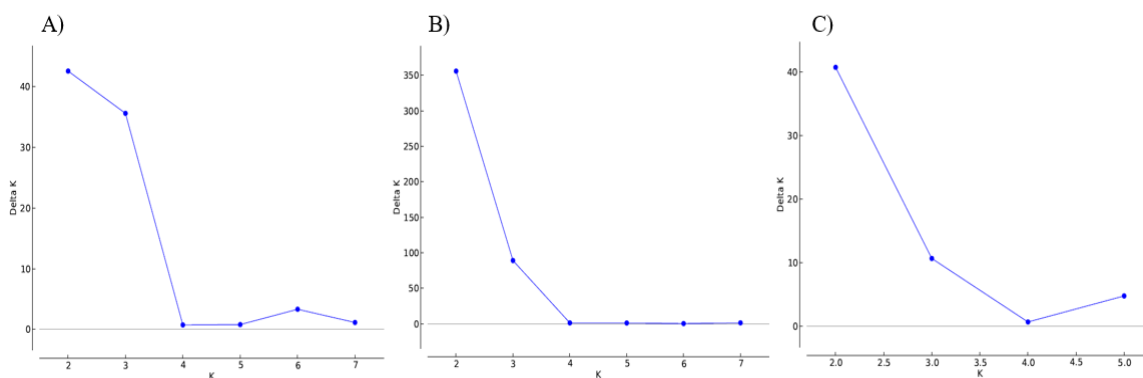


Figura 3. Gráfico obtido com os valores ΔK para visualização do melhor $K = 2$. A) *P. guajava*; B) *P. brownianum*; C) *P. guineense*.

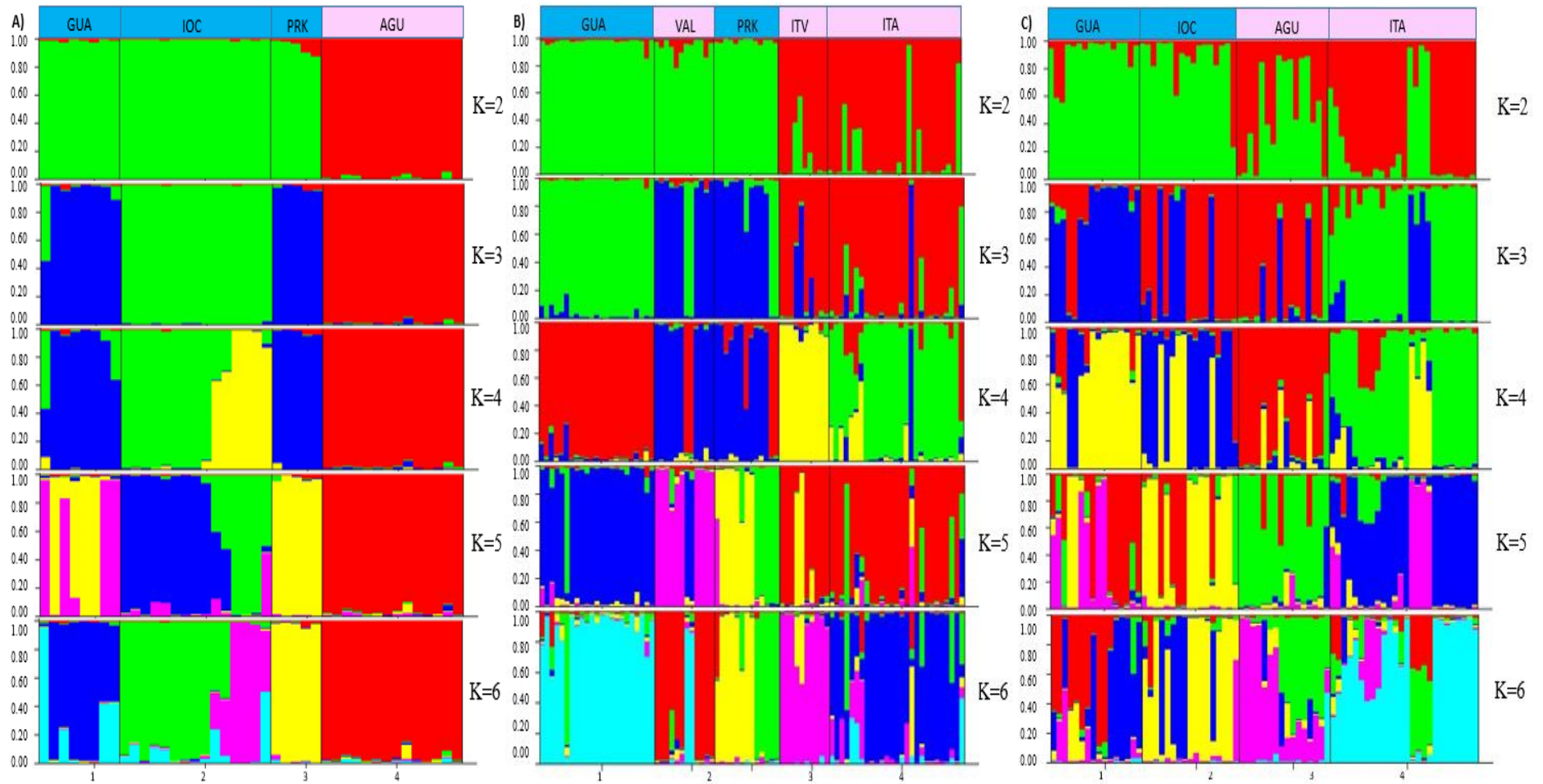


Figura 4. Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. A) *P. guajava*; B) *P. brownianum*; C) *P. guineense*.

Além do STRUCTURE, foi feito um agrupamento UPGMA utilizando a distância de Nei, para *P. guajava* e a distância de Bruvo (BRUVO, 2004), para *P. brownianum* e *P. guineense* e uma PCoA para *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense*.

A análise de PCoA mostrou a formação de dois grupos principais para *P. guajava*, *P. brownianum* e para *P. guineense* (Figura 5). Estas análises foram similares ao encontrado pelas análises do STRUCTURE que identificou dois grupos principais de indivíduos e ao que foi observado com o dendrograma baseado na distância de Bruvo entre populações (Apêndice 3).

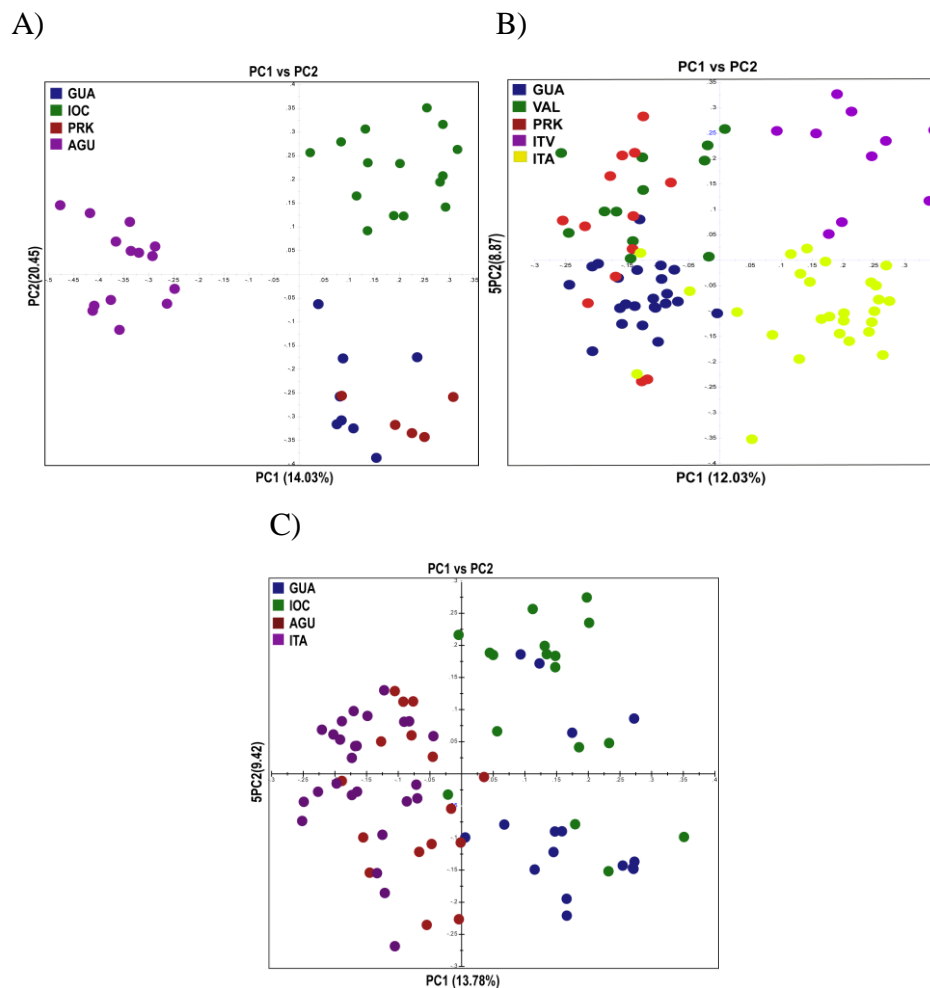


Figura 5. PCoA utilizando a distância de Nei para *P. guajava* e utilizando a distância de Bruvo para *P. brownianum* e *P. guineense*. A) *P. guajava* B) *P. brownianum*; C) *P. guineense*.

3.3 PADRÕES MORFOLÓGICOS

Quanto aos parâmetros morfológicos três espécies foram diferenciadas. *Psidium guajava* e *P. guineense* ficaram mais próximas e *P. brownianum* foi bem distinta das demais. Dentro das espécies foi possível verificar distinção de plantas coletadas na região norte em relação às plantas do Sul para todas as espécies (Figura 6).

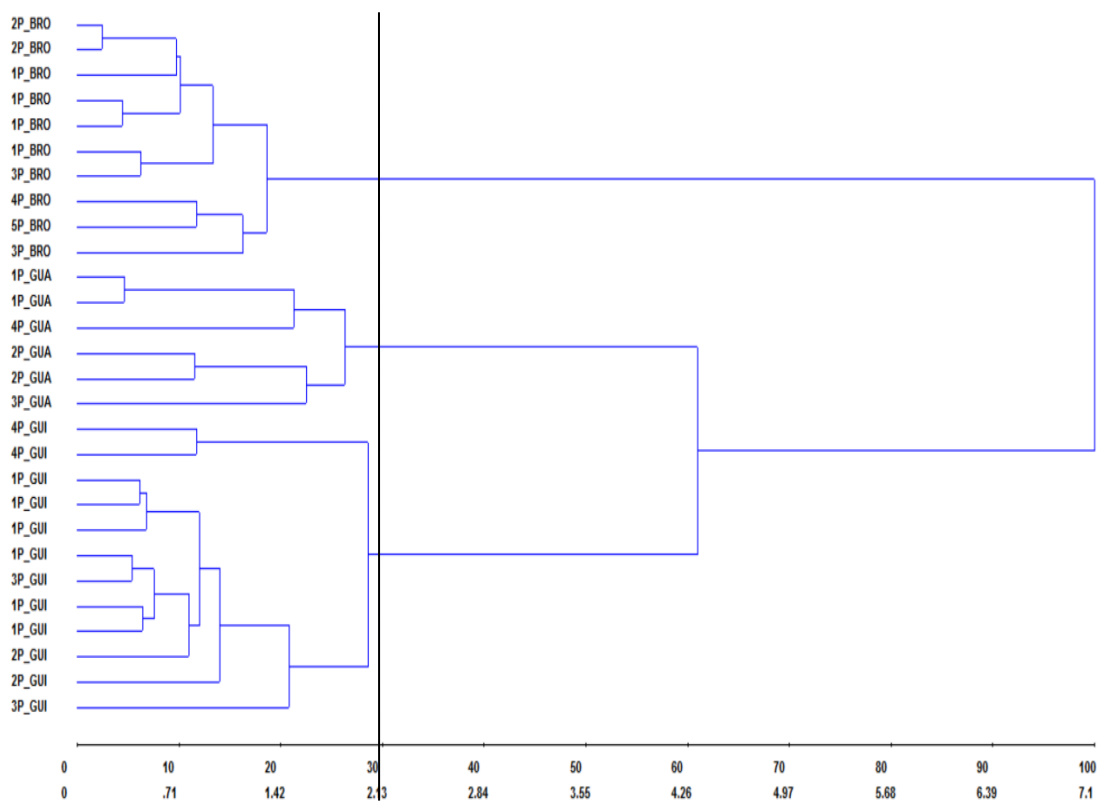


Figura 6. Dendrograma baseado na distância de Gower para características morfológicas de indivíduos de *P. guajava* (1P_GUA = população GUA; 2P_GUA = população IOC; 3P_GUA = população PRK e 4P_GUA = população AGU), de *P. brownianum* (1P_BRO = população GUA; 2P_BRO = população PRK; 3P_BRO = população VAL; 4P_BRO = população ITV e 5P_BRO = população ITA) e de *P. guineense* (1P_GUI = população GUA; 2P_GUI = população IOC; 3P_GUI = população ITA e 4P_GUI = população AGU).

4. DISCUSSÃO

Apesar das três espécies, terem sido avaliadas pelo mesmo grupo de microssatélites, um número maior de alelos foi encontrado nas populações de *P. guajava* (110), em comparação as populações de *P. brownianum* (74) e *P. guineense* (86), entretanto, as duas últimas espécies tiveram aproximadamente o dobro de indivíduos amostrados em relação a *P. guajava*. Evidências da origem poliploide de *Psidium guineense* a partir de *P. guajava*, foram relatadas recentemente (MARQUES et al., 2016), bem como a proximidade genética destas duas espécies por microssatélites (TULER et al., 2015). Assim a origem mais antiga de *P. guajava* pode ter contribuído para o acúmulo de maior quantidade de alelos nesta espécie em relação à *P. guineense*.

Quanto ao *P. brownianum*, a detecção frequente de genótipos com 3 a 4 alelos sugerem a poliploidia da espécie. Esta espécie ocorre no Espírito Santo em toda a região litorânea; predominando em áreas de restinga, mas com registros também em Florestas de Tabuleiro e Matas de encosta, diferente das duas outras espécies que tem ampla ocorrência em diversos ambientes (TULER et al., 2015). Assim a restrição de número de ambientes pode resultar em menor variabilidade genética de alelos por *locus* (LOVELESS; HAMRICK, 1984), o que pode ter ocorrido nesta espécie.

O grande número de alelos por *locus* encontrados para *P. guajava* tem sido demonstrado na literatura a exemplo de 9,56 alelos por *locus* detectados em 70 acessos (MEHMOOD et al., 2016); e 8,9 alelos por *locus* detectados em 35 acessos americanos de goiaba e três espécies relacionadas, *P. guineense*, *P. sartorianum* e *P. friedrichsthalianum* (SITTHER et al., 2014). Entretanto, na maioria das vezes estes estudos são restritos a genótipos utilizados no melhoramento desconsiderando populações naturais.

O *locus* mPgCIR 162 foi o único que apresentou EHW em todas as populações de *P. guajava*, evidenciando favorecimento de heterozigotos para este *locus*. Nenhum dos demais *loci* apresentou equilíbrio de HW nas populações do sul do estado do Espírito Santo (GUA e IOC), o que corrobora os dados de coeficiente de endogamia para estes locais indicando excesso de homozigotos. *Psidium guajava* é uma espécie cuja polinização cruzada é a forma reprodutiva mais frequente (ALVES; FREITAS, 2007), entretanto autofecundação tem sido relatada, o que pode favorecer o aparecimento de homozigotos (NIMISHA et al., 2013). Dessa forma, o desvio nas

proporções de HW pode indicar presença de seleção, mistura na população ou que o acasalamento não está ocorrendo ao acaso (ROUSSET; RAYMOND, 1995).

A diversidade dos indivíduos dentro das populações, nas três espécies, foi demonstrada tanto pela análise de dispersão dos indivíduos, quanto pela quantificação da variação genética dentro das populações (*P. guajava* = 80,03%, *P. brownianum* = 73,63% e *P. guineense* = 79,66%). A grande quantidade de alelos privados nas populações de *P. guajava*, pode estar relacionada à evidência de diversidade dentro das populações, com destaque para a população IOC que apresentou a maior quantidade de alelos privados e foi a mais divergente em relação ao sul do estado.

A H_e , apresentou média de 0,69 para *P. guajava*. Alguns resultados da literatura foram similares, como o $H_e = 0,70$ encontrado para acessos de *P. guajava* nos Estados Unidos (SITTHER et al., 2014). Valores semelhantes de diversidade gênica também foram encontrados para outras espécies da família Myrtaceae, como $H_e = 0,70$ para *Myrtus communis* (NORA et al., 2015) e $H_e = 0,71$ para *Eugenia francavilleana* (FERREIRA-RAMOS et al., 2014).

As estimativas de diversidade baseada em fenótipos alélicos nas populações de *P. brownianum* e *P. guineense* encontradas neste trabalho mostrou uma ampla diversidade gênica dentro das populações de cada uma das espécies (*P. brownianum* $H' = 0,64$ e *P. guineense* $H' = 0,71$). Números elevados de cromossomos podem estar associados com elevada variabilidade (HAMRICK, 1979). Isto, pode explicar o fato pelo qual *P. brownianum* e *P. guineense*, que possuem natureza poliploide, terem tido estimativas de diversidade elevadas. Resultados semelhantes aos deste trabalho encontrados em outras espécies da família Myrtaceae, mostram que a diversidade genética elevada, detectada por microssatélites, é característico em espécies de Myrtaceae (ROJAS et al., 2011; FERREIRA-RAMOS et al., 2014; SITTHER et al., 2014; NORA et al., 2015).

A diferenciação genética foi elevada entre as quatro populações de *P. guajava* ($F_{ST} = 0,197$; $G_{ST} = 0,202$), que podem ser classificadas como fortemente estruturadas, com aproximadamente 80,03 % da variação genética dentro das populações e 19,97 % entre as populações. Os valores de F_{ST} nas populações da região sul, evidenciaram moderada diferenciação genética entre as três populações ($F_{ST} = 0,145$), ao passo que com a agregação da população da região norte houve um aumento da diferenciação genética entre as populações, o que pode ter ocorrido devido ao fato da população da

região norte estar mais distante geograficamente das demais podendo haver barreiras que diminuam o fluxo gênico entre estas populações, além do fato da população norte (AGU) não ser proveniente de ambiente de restinga.

A estimativa de valores de Φ_{ST} para as populações de *P. brownianum* e *P. guineense* foi de 0,2636 e 0,2034, respectivamente. Estes valores indicam elevada diferenciação nas populações dessas espécies.

Os níveis de diferenciação elevados encontrados entre as populações do presente trabalho podem estar relacionados com a presença de fluxo gênico histórico entre populações, que podem ser de níveis elevados a moderados e que conseqüentemente podem estar associados à migração entre regiões (FUCHS; HAMRICK, 2010).

A estrutura genética das populações das três espécies revela existência de padrão definido de relações geográficas. A partir das análises de estrutura de populações corroborada pelas análises de agrupamento e da PCoA foi possível observar a formação de dois grupos principais para as três espécies (Figuras 3 e 4). Assim, os marcadores foram suficientes para diferenciar todos os indivíduos, e os métodos de agrupamento utilizados mantiveram o mesmo padrão.

Quando considerado $K=2$ foi observada uma forte tendência da separação das populações em dois grupos, de acordo com a sua localização geográfica. Geralmente houve um grupo formado pelas populações do sul do Estado e outro formado pelas populações do norte do Estado. A única exceção ocorreu para as populações de *P. brownianum*, em que houve a formação de um grupo com duas populações do sul (GUA e PRK) e uma do norte (VAL). A população VAL encontra-se em um ambiente cuja fisionomia se assemelha a uma restinga e além disso é um ambiente preservado, o que pode explicar o fato de ter ficado agrupado às populações da região do sul do Estado.

Quando foi considerado um $K=3$ através do STRUCTURE para as populações de *P. guajava*, pôde-se observar a formação de três grupos. O primeiro grupo foi constituído pelas populações GUA e PRK, o segundo grupo por IOC e o terceiro por AGU. A população GUA é proveniente de uma área de reserva ecológica (Parque Estadual Paulo César Vinha) apresentando-se provavelmente menos abalada antrópicamente. A população PRK apesar de um pouco mais distante de GUA, se encontrou no mesmo grupo que esta. Isto provavelmente ocorreu pois, apesar de sofrer intensas ações antrópicas ainda apresenta remanescentes florestais e formações arbustivas de restinga bem preservadas, assim como amplas áreas que possuem

vegetação em distintos estágios de reabilitação (BRAZ et al., 2013). A população IOC por estar presente em uma área mais próxima do litoral pode ter sofrido, assim como ocorre em diversos ambientes de restinga, uma extensiva especulação imobiliária, que desencadeou uma maior degradação ao longo dos anos na vegetação de restinga característica deste local. Devido a estas características de cada ambiente de restinga explica-se o fato de que GUA e PRK estejam em um mesmo grupo e IOC num grupo a parte quando considerado $K=3$. Quando considerado um $K=4$ foi observado que a população IOC foi dividida em dois grupos distintos, o que mostra a grande variabilidade dentro desta população, que também foi a que mostrou maior número de alelos privados e maior heterozigosidade esperada dentre as populações de *P. guajava*.

Para as populações de *P. brownianum* e *P. guineense*, quando considerado $K=3$ foi observado que a população GUA ficou separada em um distinto grupo. Devido ao fato desta ser pertencente a uma área de conservação ambiental, pôde-se observar que estas espécies, provavelmente, estão mais preservadas que as demais e por isso, apesar de serem pertencentes a região sul, com o aumento de K para três, se distinguiram com relação as demais.

Para as espécies *P. guajava* e *P. guineense*, que apresentaram a população AGU foi observado que em todos os valores de K , AGU (norte do estado) se manteve mais homogênea que as demais populações (do sul do estado) isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a população AGU foi a única coletada em um ambiente de floresta estacional semidecidual (Figura 4).

5 CONCLUSÕES

As populações estudadas de *P. guajava*, *P. brownianum* e *P. guineense* apresentaram, por meio de marcadores microssatélites, elevada diversidade genética intrapopulacional e baixa diversidade genética interpopulacional;

Foi observada uma moderada estruturação genética para as populações das três espécies estudadas, sendo sugerido um valor de $K=2$ para todas as espécies estudadas.

Quando foi considerado $K=2$ houve a formação de dois grupos que geralmente seguiu um padrão de distribuição de acordo com a localização geográfica das populações.

As populações de Guarapari e da Vale mostraram-se mais preservadas que as demais.

Quando parâmetros morfológicos foram avaliados, *P. guajava* e *P. guineense* ficaram próximas umas das outras e *P. brownianum* ficou distante das mesmas, além disso, dentro das espécies verificou-se distinção de plantas quanto a sua localização geográfica (região sul e região norte).

6 REFERÊNCIAS

ALVES, J. E.; FREITAS, B. M. Requerimentos de polinização da goiabeira. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.

ASSIS, A. M.; THOMAS, L. D.; PEREIRA, O. J. Florística de um trecho de floresta de restinga no município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 1, p. 191-201, 2004a.

ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J.; THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004b.

ASSUMPTÃO, J.; NASCIMENTO, M. T.; Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 14, n. 3, p. 301-315, 2000.

BRAZ, D. M.; JACQUES, E. L.; SOMNER, G. V.; SYLVESTRE, L. S.; ROSA, M. M. T.; PEREIRA-MOURA, M. V. L.; FILHO, P. G.; COUTO, A. V. S.; AMORIM, T. A. Restinga de Praia das Neves, ES, Brasil: caracterização fitofisionômica, florística e conservação. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, 2013.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F.; PROENÇA, C. E. B. Araçá. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 42-62, 2006.

BRUVO, R.; MICHIELS, N. K.; D'SOUZA, T. G.; SCHULENBURG, H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2101-2106, 2004.

CLARK, L.V.; JASIENIUK, M. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. **Molecular Ecology Research**, v. 11, p. 562-566, 2011.

COLODETE, M. F.; PEREIRA, O. J. Levantamento Florístico da restinga de Regência, Linhares/ES. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 558-560, 2007.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.1, p. 47-52, 2004.

CRUZ, C. D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CUNHA, I. Desenvolvimento sustentável na costa brasileira. **Revista Galega de Economía**, v. 14, n. 1-2, p. 1-14, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, p. 47-50, 2006.

FERREIRA-RAMOS, R.; ACCORONI, K. A. G.; ROSSI, A.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; MARTINEZ, C. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, p. 267-272, 2014.

FOREST, F.; CRANDALL, K. A.; CHASE, M. W.; FAITH, D. P. Phylogeny, extinction and conservation: embracing uncertainties in a time of urgency. **Philosophical transactions of the royal society B**, v. 370, 2015.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 22-29, 2003.

FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **American Journal of Botany**, v. 97, n. 7, p. 1200-1207, 2010.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. Myrtaceae da restinga no norte do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 37, p. 53-134, 2015.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GUEDES, D.; BARBOSA, L. M.; MARTINS, S. E. Composição florística e estrutura fitossociológica de dois fragmentos de floresta de restinga no Município de Bertioga, SP, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 20, n. 2, p. 299-311, 2006.

HAMRICK, J. L. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 10, p. 173-200, 1979.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/manuais_tecnicos/manual_tecnico_vegetacao_brasileira.pdf>.

Acesso em 12 de Janeiro de 2014.

KAEUFFER, R.; RÉALE, D.; COLTMAN, D.W.; PONTIER, D. Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. **Heredity**, v. 99, p. 374-80, 2007.

KAHILAINEN, A.; PUURTINEN, M.; KOTIAHO, J. S. Conservation implications of species–genetic diversity correlations. **Global Ecology and Conservation**, v. 2, p. 315-323, 2014.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA – **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. 2001. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2016.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUCAS, E. J.; BÜNGER, M. O. Myrtaceae in the Atlantic forest: their role as a ‘model’ Group. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, p. 2165-2180, 2015.

MAGNAGO, L. F. S.; PEREIRA, O. J.; MARTINS, S. V. Caracterização das formações ribeirinhas na restinga do Parque Natural Municipal de Jacarenema, Vila Velha, ES, Brasil. In: FELFILI, J. M.; EISENLOHR, P. V.; MELO, M. M. R. F.; ANDRADE, L. A. & MEIRA-NETO, J. A. A. (eds.). **Fitossociologia do Brasil: métodos e estudos de caso**. v. 1, p. 415-440, 2011.

MARQUES, A. M.; TULER, A. C.; CARVALHO, C. R.; CARRIJO, T. T.; FERREIRA, M. F. S.; CLARINDO, W. R. Refinement of the karyological aspects of *Psidium guineense* (Swartz, 1788): a comparison with *Psidium guajava* (Linnaeus, 1753). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 117-128, 2016.

MEHMOOD, A.; LUO, S.; AHMAD, N. M.; DONG, C.; MAHMOOD, T.; SAJJAD, Y.; JASKANI, M. J.; SHARP, P. Molecular variability and phylogenetic relationships of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using inter-primer binding site (iPBS) and microsatellite (SSR) markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, p. 1345-1361, 2016.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NIMISHA, S.; KHERWAR, D.; AJAY, K. M.; SINGH, B.; USHA, K. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 578-588, 2013.

NORA, S.; ALBALADEJO, R. G.; APARICIO, A. Genetic variation and structure in the Mediterranean shrubs *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* in different landscape contexts. **Plant Biology**, v. 17, p. 311-319, 2015.

OBBARD, D. J.; HARRIS, S. A.; PANNELL, J. R. Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. **Heredity**, v. 97, p. 296-303, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, 2015.

POLYSAT. Tools for polyploidy microsatellite analysis. **calcFst: Estimate Population Differentiation Statistics**. Disponível em: <<https://rdrr.io/cran/polysat/man/calcFst.html>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2017.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RAMU, P.; BILLOT, C.; RAMI, J. F.; VEL, S. S.; UPADHYAYA, H. D.; REDDY, L. A.; HASH, C. T. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 8, p. 2051-2064, 2013.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite *loci* from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 745-748, 2005.

ROJAS, S.; CH, Y. K. C.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dúbia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 12, n. 1, p. 51-64, 2011.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing Heterozygote Excess and Deficiency. **Genetics**, v. 140, p. 1413-1419, 1995.

SITHTER, V.; ZHANG, D.; HARRIS, D. L.; YADAV, A. K.; ZEE, F. T.; MEINHARDT, L. W.; DHEKNEY, S. A. Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, p. 829-839, 2014.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

TULER, A. C.; CARRIJO, T. T.; NÓIA, L. R.; FERREIRA, A.; PEIXOTO, A. L.; FERREIRA, M. F. S. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 11, 2015.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data.** Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.

WEIR, B. S.: HILL, W. G. Estimating F-statistics. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 721-750, 2002.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, v. 15, p. 223-354, 1951.

7 APÊNDICES

Apêndice 1- Número de alelos encontrados em cada *loci* nas diferentes populações de *P. brownianum* e *P. guineense*

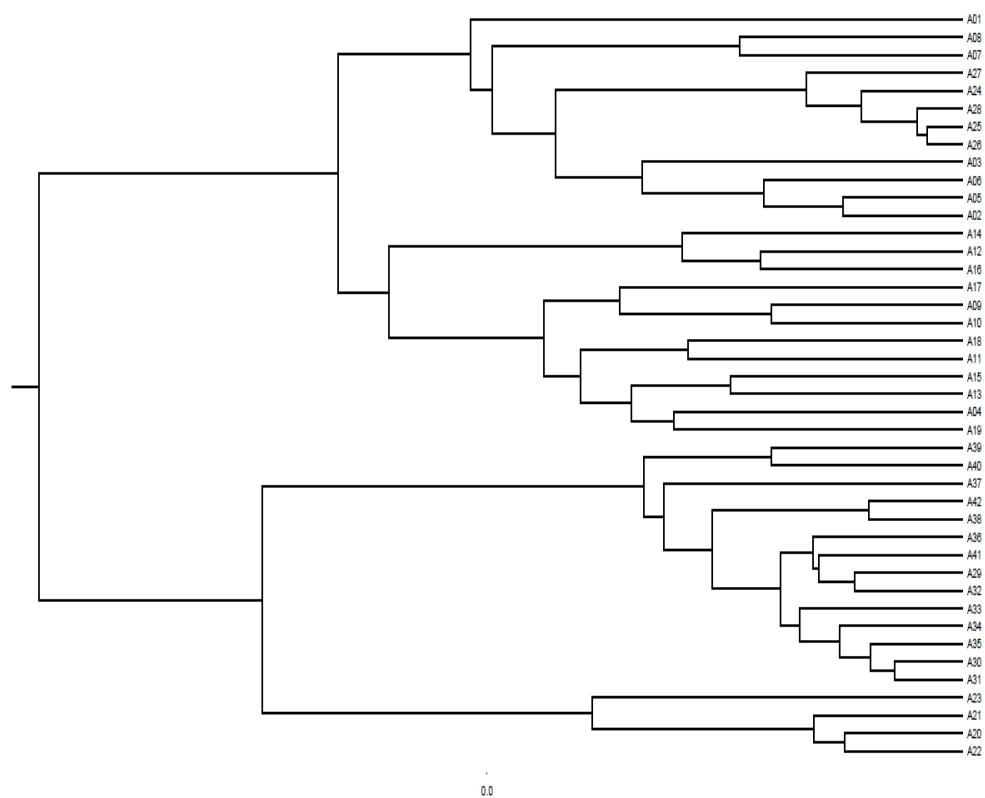
<i>P. brownianum</i>	<i>Loci</i>	GUA	VAL	PRK	ITV	ITA
	mPgCIR 10	3	3	7	6	7
	mPgCIR 29	6	7	5	2	4
	mPgCIR 162	4	6	4	5	7
	mPgCIR 171	5	5	3	3	4
	mPgCIR 231	5	8	6	4	7
	mPgCIR 235	6	4	7	4	4
	mPgCIR 242	8	7	7	2	6
	mPgCIR 243	5	4	5	4	7
	mPgCIR 253	2	2	2	2	3
	Média	4,94	5,20	5,08	3,54	5,39
<i>P. guineense</i>	<i>Loci</i>	GUA	PRK	AGU	ITA	
	mPgCIR 10	9	10	8	9	
	mPgCIR 29	10	5	7	9	
	mPgCIR 162	5	5	5	5	
	mPgCIR 171	6	3	4	7	
	mPgCIR 231	4	4	6	4	
	mPgCIR 235	6	5	6	6	
	mPgCIR 242	6	5	9	7	
	mPgCIR 243	6	8	3	3	
	mPgCIR 253	11	10	7	10	
	Média	7,00	6,11	6,11	6,67	

Apêndice 2. Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em quatro populações de *P. guajava* com base em microssatélites

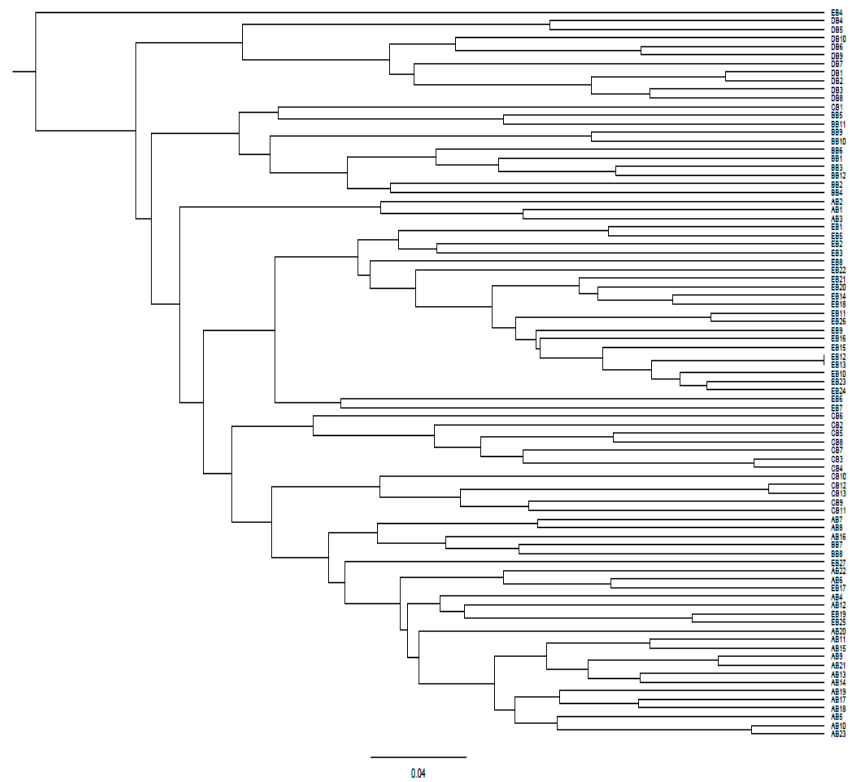
Populações	Loci								
	10	29	162	171	231	235	242	243	253
GUA	0,001*	0,000*	0,121	0,005*	0,000*	0,041*	0,022*	0,032*	0,009*
IOC	0,001*	0,000*	0,169	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,013*
PRK	0,437	0,131	0,120	0,034*	0,345	0,040*	1,000	0,774	0,131
AGU	0,132	0,001*	0,339	0,037*	0,000*	0,006*	0,006*	0,006*	0,154

* Significativo pelo teste de Fisher ($P > 0,05$)

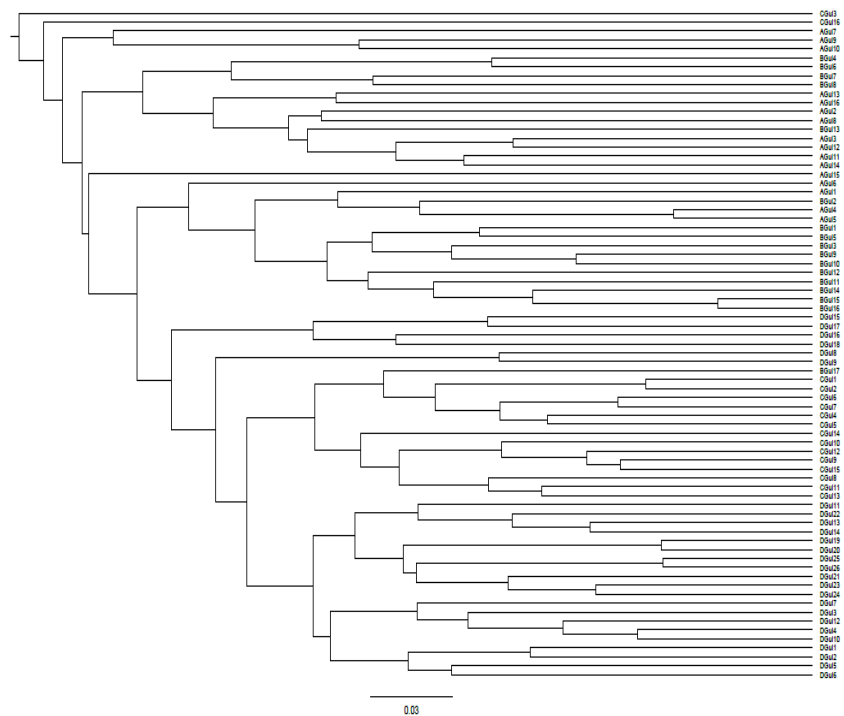
A)



B)



C)



Apêndice 3. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (A- *P. guajava* – 42 indivíduos) e de Bruvo (B- *P. brownianum* - 85 indivíduos; C- *P. guineense*- 75 indivíduos).

CAPÍTULO II

Variabilidade de terpenos em espécies de *Psidium* (Myrtaceae)

**Carolina de Oliveira Bernardes¹, Amélia Carlos Tuler², Tercio da Silva de Souza³,
Luciano Menini³, Adésio Ferreira⁴, Marcia Flores da Silva Ferreira¹**

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

²Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IP/ JBRJ, RJ). Rua Jardim Botânico, 1008 Jardim Botânico - CEP 22470-180, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

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

⁴Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-E-UFES, Alegre, ES). Alto Universitário, s/n, CEP: 29500-000, Alegre-ES, Brasil.

RESUMO: A presença de estruturas secretoras de óleos essenciais nos órgãos vegetativos e reprodutivos das plantas de Myrtaceae é uma característica marcante da família, bem como a presença de terpenos, uma importante classe de compostos orgânicos voláteis. Neste trabalho objetivou-se estudar a diversidade de terpenos em espécies de *Psidium* ocorrentes na Mata Atlântica, comparar com dados da literatura e avaliar a importância desses compostos nas interações das espécies com o ambiente. Óleos essenciais extraídos de folhas de 11 espécies de *Psidium* foram analisados utilizando CG-DIC e CG-EM, bem como análises de micromorfologia foliar e índice de herbivoria. No total 59 compostos foram identificados, com predominância de sesquiterpenos. Dados da literatura foram obtidos e outras 14 espécies foram incluídas no estudo, sendo que destas, doze foram diferentes das 11 investigadas no presente trabalho, sendo identificados mais de 200 compostos, o que caracteriza a grande diversidade no gênero *Psidium*. Os compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno foram os mais abundantes nas espécies. No entanto, 1,8-cineol, α -pineno e (*E*)-nerolidol foram responsáveis pela distinção de grupos de espécies. O índice de herbivoria baixo em todas as espécies e a maior proporção de sesquiterpenos na composição do óleo

essencial das espécies, bem como a presença de tricomas e folhas coriáceas sugere relação da composição com defesa a microrganismos e predadores.

Palavras-chave: Diversidade, óleos essenciais, *Psidium guajava*, Myrteae.

ABSTRACT: The presence secretory structures of essential oils in the vegetative and reproductive organs of Myrtaceae plants is a remarkable characteristic of the family, as well as the presence of terpenes, the most diverse class of volatile organic components. It was aimed with this work to study the terpene diversity in *Psidium* species that occur in the Atlantic Forest, to compare the obtained results with data from the literature and to evaluate the importance of these components on the interactions of plants with the environment. Essential oils extracted from 11 *Psidium* species were analyzed using GC-FID and GC-MS, as well as micromorphology analysis and herbivory index. Fifty-nine components were identified, with predominance of sesquiterpenes. Data from the literature was obtained and other 14 species were included in the study, where twelve were different from the eleven investigated in this study, with more than 200 components identified, what characterizes the great diversity in the genus *Psidium*. The components β -caryophyllene and caryophyllene oxide were the most abundant on the species. Nevertheless, 1,8-cineole, α -pinene and (*E*)-nerolidol were the ones responsible for distinguishing groups of species. The low herbivory index in all the species and the higher proportion of sesquiterpenes on the species essential oil composition, as well as the presence of trichomes and coriaceous leaves suggest relation of this composition with defense against microorganisms and predators.

Keywords: Diversity, essential oils, *Psidium guajava*, Myrteae.

1. INTRODUÇÃO

Myrtaceae é considerada a maior família da ordem Myrtales com cerca de 5500 espécies de plantas, 144 gêneros e 17 tribos (WILSON, 2001; WILSON et al., 2005; WCSP, 2016). Apresenta centros de diversidade na Austrália, sudeste Asiático e América do Sul (WILSON et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2017). Uma característica marcante da família é a presença de estruturas secretoras de óleos essenciais nos órgãos vegetativos e reprodutivos das plantas (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984) além de uma ampla diversidade de quimiotipos nas espécies (PADOVAN et al., 2014).

Óleos essenciais são constituintes voláteis presentes nos órgãos das plantas, extremamente complexos quanto a composição, podendo apresentar monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, componentes oriundos do metabolismo secundário (LANGENHEIM, 1994; PICHERSKY; GERSHENZON, 2002). Os terpenos fazem parte da classe mais diversa de compostos orgânicos voláteis nas plantas (DUDAREVA et al., 2013) e desempenham várias funções na interação entre a planta e o ambiente (PADOVAN et al., 2014).

A importância evolutiva dos óleos essenciais em Myrtaceae é evidenciada pela grande quantidade de genes de biossíntese de terpenos no gênero *Eucalyptus*, em comparação com espécies de diferentes famílias, bem como a diversificação dos genes que podem ser classificados em três classes e sete subfamílias. Além disto, o relato de 113 enzimas terpeno sintases (que catalisam a síntese de terpenos) em folhas jovens e adultas de eucalipto (KÜLHEIM et al., 2015), revelam a importância do óleo essencial neste órgão.

Adicionalmente, a ação dos terpenóides na interação entre planta e ambiente é também relatada na família, com atuação na atração de animais benéficos ou na mediação de interações de microrganismos das raízes das plantas no solo (STEFFEN et al., 2012); na defesa contra herbívoros e patógenos (PADOVAN et al., 2014), apresentando características como deterrentes a insetos (SHINODA et al., 2002) e tóxicos a fungos (OSBOURN, 1996); bem como no desempenho de atividades larvicidas (DIAS et al., 2015); inseticidas (LIMA et al., 2009), antimicrobianas e anti-inflamatórias (GUTIÉRREZ et al., 2008). Assim, óleos essenciais das plantas da família Myrtaceae também são estudados por suas atividades biológicas e interesse comercial.

Em Myrtaceae, os óleos essenciais são compostos majoritariamente por sesquiterpenos e monoterpenos (MOHAMED et al., 2013; TYAGI et al., 2014; SOLIMAN et al., 2016) e de acordo com Padovan et al. (2014), existe um padrão quimiotípico de terpenos foliares, em que os monoterpenos α -pineno e 1,8-cineol são os mais comuns e abundantes na maioria das espécies.

Entretanto, esse padrão não foi consistente para todos os clados na família. Nas tribos Myrteae, Kanieae, Syzygieae, Xanthostemoneae, Syncarpieae e Lindsayomyrteae, as espécies analisadas apresentaram alta concentração de α -pineno, entretanto o monoterpeno o 1,8-cineol foi principalmente substituído pelo sesquiterpeno β -cariofileno. Contudo, a baixa representatividade das espécies analisadas destas tribos neste estudo, sugere a necessidade de maior amostragem em espécies (PADOVAN et al., 2014).

Neste sentido, a tribo Myrteae é a única linhagem que representa toda a diversidade de Myrtaceae em ambientes neotropicais (a exceção de uma espécie da tribo Metrosidereae, *Metrosideros stipularis*, que ocorre exclusivamente no Chile) (WILSON et al., 2005). Myrteae engloba cerca de 2500 espécies e 51 gêneros que desempenham importante papel na composição dos ecossistemas e no fornecimento de alimentos para a fauna, tanto pelos frutos carnosos consumidos por aves e mamíferos quanto pela oferta de pólen e néctar aos polinizadores (MORI et al., 1983; NIC LUGHADHA; PROENÇA, 1996; GRESSLER et al., 2006).

Esta tribo embora apresente grande interesse por incluir gêneros de importância econômica como *Eugenia*, *Pimenta* e *Psidium*, é pouco conhecida quanto a diversidade e constituição de terpenos foliares (PADOVAN et al., 2014). Estudos que incluam gêneros representativos desta tribo podem auxiliar no entendimento dos padrões de diversidade de terpenos foliares em Myrtaceae.

Psidium é um dos principais gêneros da tribo Myrteae, inclui cerca de 100 espécies, distribuídas desde o México e Caribe até o Uruguai e norte da Argentina, estendendo-se até as Ilhas Galápagos, sendo que em território brasileiro ocorre desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (LANDRUM, 2003; LANDRUM; FUNCH, 2008; WCSP, 2016). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *P. guajava* é a de maior destaque devido a sua importância econômica. Entretanto, espécies nativas do gênero despertam a atenção do mercado tanto pela qualidade de seus frutos, quanto pela diversidade de substâncias antioxidantes e óleos essenciais (FRANZON et al., 2009).

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho estudar a diversidade dos terpenos em 11 espécies de *Psidium*, a maior parte nativas e inexploradas, comparar com dados da literatura para outras espécies de *Psidium* e avaliar a importância desses compostos nas interações das espécies com o ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram coletadas folhas completamente expandidas de uma a quatro diferentes plantas de cada uma das seguintes espécies pertencentes à família Myrtaceae: *P. brownianum* DC; *P. cattleianum* Sabine; *P. guajava* L.; *P. guineense* Sw.; *P. myrtoides* O.Berg; *P. cauliflorum* Landrum & Sobral; *P. longipetiolatum* D. Legrand; *Psidium* sp1 (Araçá da Índia); *P. acutangulum* (Araçá Pêra); *Psidium* sp2 (Araçá roxo) e *P. grazielae* (Tabela 1).

As coletas foram realizadas no período da manhã (entre 07:00 e 09:00 horas). Cerca de 100 g de folhas de cada uma das plantas foram coletadas ao redor do diâmetro da copa e na altura do peito (1,3 m). Em seguida o material foi embalado em sacos de papel e identificados. O material vegetal foi seco à sombra em temperatura ambiente, por cerca de uma semana para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático, com o intuito de evitar modificações nos princípios aromáticos originais (CERIMELE; RINGUELET, 2008). As folhas secas foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos fechados e armazenadas em freezer a -20 °C até a extração do óleo essencial, totalizando 23 amostras.

Tabela 1. Espécies de *Psidium* utilizadas no estudo do perfil cromatográfico e sua distribuição

Espécie	NI	Local de coleta	Data de coleta	Distribuição
<i>P. brownianum</i> (Bro)	04	Guarapari ES/Restinga	Jan/2014	Venezuela a Brasil
<i>P. longipetiolatum</i> (Lon)	02	Linhares ES/Mata de Tabuleiro	Jan/2014	Brasil
<i>P. myrtoides</i> (Myr)	03	Guarapari ES/Restinga	Fev/2014	Brasil
<i>P. guineense</i> (Gui)	03	Ind 1 e 2- Alegre ES/Áreas antropizadas Ind 3- Cachoeiro de Itapemirim ES/Mata de Encosta	Fev/2014 Jan/2016	México a América Tropical
<i>P. cattleianum</i> (Cat)	02	Guarapari ES/Restinga	Jan/2016	Brasil
<i>P. guajava</i> (Gua)	02	Mimoso do Sul ES/Áreas abertas	Ago/2015	América Tropical e Subtropical
<i>P. cauliflorum</i> (Cau)	01	Cachoeiro de Itapemirim ES/Mata de encosta	Jul/2016	Brasil
<i>P. sp1</i> (Índ)	02	Viçosa MG	Mai/2015	-
<i>P. sp2</i> (Rox)	01	Alegre ES	Jul/2015	-
<i>P. acutangulum</i> (Acu)	01	Viçosa MG	Mai/2015	Sul da América Tropical
<i>P. grazielae</i> (Gra)	02	Conceição da Barra ES/Mata de Tabuleiro	Jan/2014	Brasil

*NI- número de indivíduos.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em aparelho Clevenger. Cerca de 100 g das folhas foram inseridas juntamente com 1 L de água em um balão volumétrico de 2 L, onde permaneceram por quatro horas, contados do momento da condensação da primeira gota. O hidrolato foi coletado e submetido a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o óleo foi removido com auxílio de

uma micropipeta e armazenado em recipientes protegidos da luz a uma temperatura de -4 °C para posteriores análises (YAPI et al., 2014).

2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO E DA DENSIDADE RELATIVA

O rendimento da extração foi determinado em triplicata para cada planta através da relação entre a massa do óleo essencial, dividido pela massa seca da amostra (% m/m, base em biomassa seca).

O índice de refração dos óleos essenciais foi determinado no Laboratório de Química do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES. Com o auxílio de uma pipeta, duas gotas de óleo foram colocadas em um refratômetro (Quimis Q767B) com quatro casas decimais, equipado com termômetro. O equipamento foi ajustado às condições experimentais, com temperatura do ambiente igual a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A leitura foi realizada de acordo com as escalas mostradas pelo aparelho, após o fechamento dos prismas que o compõem.

A determinação da densidade dos óleos essenciais ocorreu no Laboratório de Preparo de Amostras Vegetais do CCAE-UFES, à temperatura de 20 °C, através de pesagem em triplicata de um volume fixo de óleo com o auxílio de uma micropipeta. A pesagem foi realizada em balança analítica com quatro casas decimais (Shimadzu AUY220).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras do óleo essencial foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) (Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE). As seguintes condições foram empregadas: o gás de arraste utilizado para os dois detectores foi o hélio, com fluxo e velocidade linear de 2,80 mL min⁻¹ e 50,8 cm seg⁻¹ (CG-DIC) e 1,98 mL min⁻¹ e 50,9 cm seg⁻¹ (CG-EM), respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:30; a coluna capilar utilizada foi a de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx[®]-5MS (0,25 µm de espessura do filme); programação da temperatura do forno: por 3 minutos a temperatura

inicial foi de 40 °C, em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C min⁻¹ até atingir a temperatura de 180 °C, que foi mantida por 10 minutos, com um tempo total de análise de 59,67 min; a temperatura utilizada no detector FID foi de 240 °C e do MS de 200 °C.

Foi retirado, dos *vials* contendo as amostras, um volume de 1 µL de uma solução de 3% de óleo essencial dissolvido em hexano com DMA 0,1 mol L⁻¹ (padrão externo para controle de reprodutibilidade), para as análises. As análises por CG-EM foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos seg⁻¹ e fragmentos detectados de 29 à 400 (m/z). As análises por CG-DIC foram realizadas por uma chama formada por H₂ e ar atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL min⁻¹ e 400 mL min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente. A detecção dos íons ocorre quando os compostos orgânicos presentes na amostra são misturados com o gás de arraste (He) e é produzida uma corrente proporcional à quantidade desses compostos na amostra.

Para identificar os componentes presentes nos óleos essenciais foi realizada uma comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelos índices de retenção de Kovats (IK). Para calcular o IK, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇-C₄₀ (Supelco-USA) e o tempo de retenção ajustado de cada composto, obtidos através do CG-DIC, comparando-se os valores calculados para cada composto, com os dados da literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2011; EL-SAYED, 2016).

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total dos constituintes da amostra, dados obtidos pelas análises realizadas em CG-DIC. Foram considerados compostos, aqueles com área relativa acima de 0,5% e para a definição dos compostos majoritários foi considerada área acima de 10%.

2.5 LEVANTAMENTO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS EM ESPÉCIES DE *Psidium* COM DADOS DA LITERATURA

Adicionalmente foi realizada uma pesquisa com relação aos compostos químicos presentes em espécies do gênero *Psidium*, na literatura visando ampliar informações

sobre os compostos presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero, totalizando informações de 14 espécies, sendo que destas, doze foram diferentes das 11 investigadas no presente trabalho. No entanto, para fins de comparação com os dados obtidos das espécies estudadas neste trabalho, foi realizada uma categorização dos compostos mais abundantes considerando a metodologia proposta por Padovan et al. (2014). Nesta categorização a proposta foi reduzir os efeitos sobre as análises quanto a métodos de extração e identificação de óleo essencial, idade ou estágio de desenvolvimento dos tecidos coletados, bem como regiões de coleta, uma vez que os dados foram obtidos por diferentes metodologias.

2.6 MORFOLOGIA EXTERNA E MICROMORFOLOGIA FOLIAR

Foram avaliados atributos da morfologia externa de três indivíduos de cada uma das seguintes espécies: *P. brownianum*, *P. longipetiolatum*, *P. myrtoides*, *P. guineense*, *P. cattleianum*, *P. guajava*, *P. cauliflorum* e *P. grazielae*. Medidas foram tomadas de folhas expandidas, utilizando paquímetro digital. As características físicas das espécies consideradas como defesas mecânicas contra herbivoria em nosso estudo foram comprimento, largura e espessura das folhas, consistência (cartácea ou coriácea) e presença de tricomas. Essas características foram avaliadas em 30 folhas coletadas aleatoriamente de todos os indivíduos das espécies estudadas. A presença de tricomas e espinhos foi registrada com o auxílio de microscópio estereoscópio.

A contabilização do índice de glândulas foi realizada por metodologia de diafanização e coloração. Folhas inteiras foram diafanizadas, segundo a técnica de Foster (1949). Para calcular a frequência média das estruturas secretoras subepidérmicas, foram examinados 25 campos ópticos de secções paradérmicas adjacentes à epiderme das faces adaxial e abaxial das folhas, realizando-se a contagem e o cálculo da média aritmética, sob o aumento 10X.

O índice glandular foi dividido em quatro categorias quanto a densidade, baixo (até 50 glândulas), médio (51-100 glândulas), alto (101-150 glândulas) e muito alto (acima de 150). Para as análises morfológicas externas, medidas de folhas totalmente estendidas, foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital.

2.7 ÍNDICE DE HERBIVORIA

Ramos da copa de três indivíduos por população foram amostrados, em seguida desfolhados, sendo 30 folhas avaliadas ao acaso quanto ao Índice de Herbivoria (IH) (DIRZO; DOMÍNGUEZ, 1995). O IH utiliza classes de área foliar consumida por herbívoros em cada uma das folhas (Tabela 2) e é obtido usando uma média ponderada da frequência de folhas em cada uma das classes. Para calcular o IH utilizou-se a seguinte equação:

$$IH = \sum_{i=0}^5 \frac{(n_i \cdot i)}{N}$$

n_i : Número de folhas do indivíduo em cada classe

i : Valor da classe de herbivoria

N : Total de folhas amostradas por indivíduo

Tabela 2. Classes de herbivoria segundo a porcentagem estimada de área foliar consumida (como proposto por Dirzo e Domínguez, 1995)

Classe de herbivoria	Área foliar consumida (%)
0	0
1	1-6
2	7-12
3	13-25
4	26-50
5	51-100

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de rendimento e densidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas através do teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa R (R, 2016).

Para compreender a relação entre os dados obtidos com o estudo da morfologia externa das folhas (consistência e espessura) micromorfologia foliar (índice glandular, tamanho de glândula e tipos de tricomas) e dados como índice de herbivoria e rendimento de óleo essencial foi realizada uma análise de correspondência. Nesta análise, as características avaliadas receberam as seguintes classificações gerais: muito

alto, alto, médio, baixo e nulo (Apêndice 1). Através do gráfico obtido foi possível visualizar a associação existente entre as características. A análise de correspondência foi obtida com o programa R (R, 2016).

A partir dos compostos identificados nos óleos essenciais das onze espécies de *Psidium* analisadas foi feito um agrupamento do tipo *heatmap* utilizando-se distância euclidiana média padronizada, com o auxílio do programa R (R, 2016). Nesta análise buscou-se identificar grupos de espécies e compostos demonstrando assim, quais compostos são majoritários e quais espécies os possuem em comum.

Por fim, os óleos essenciais das espécies estudadas foram comparados com dados provenientes de outras espécies do gênero descritas na literatura, em um segundo *heatmap*. Nesta análise foi adotado o critério descrito por Padovan et al. (2014), que considera a ordem de abundância dos compostos presentes em cada espécie. Assim, de ordem decrescente foi dado o valor 7 para o primeiro composto mais abundante em um perfil, 6 para o segundo composto mais abundante em um perfil e assim sucessivamente até que se chegasse ao valor 2 para o sexto composto mais abundante. Esta metodologia nos permitiu investigar a distribuição de quimiotipos presentes entre as espécies de *Psidium*.

3 RESULTADOS

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS DE 11 ESPÉCIES DE *Psidium*

Os óleos essenciais das folhas das 11 espécies analisadas apresentaram aparência levemente viscosa e amarelada. O maior rendimento médio de extração foi apresentado por *P. cauliflorum* (0,51%) e o menor por *P. acutangulum* (0,20%). A densidade média variou de 0,92 g/cm³ (*P. guineense* 1, *P. sp1* e *P. acutangulum*) a 0,84 g/cm³ (*P. cattleianum* 1) e os índices de refração variaram entre 1,4955 a 1,4761 (Tabela 3).

Tabela 3. Média do rendimento de extração e propriedades físicas dos óleos essenciais de 11 espécies de *Psidium*

Espécies	Rendimento* de extração (%m/m)	Densidade* 20°C (g/cm ³)	Índice de Refração 20°C (η)
<i>P. brownianum</i> 1	0,29 ^g	0,90 ^b	1,4850
<i>P. brownianum</i> 2	0,29 ^g	0,85 ^f	1,4910
<i>P. brownianum</i> 3	0,30 ^f	0,91 ^b	-
<i>P. brownianum</i> 4	0,28 ^g	0,85 ^f	-
<i>P. longipetiolatum</i> 1	0,28 ^g	0,87 ^e	-
<i>P. longipetiolatum</i> 2	0,27 ^g	0,88 ^d	-
<i>P. myrtoides</i> 1	0,23 ⁱ	0,89 ^c	-
<i>P. myrtoides</i> 2	0,24 ^h	0,90 ^c	-
<i>P. myrtoides</i> 3	0,22 ⁱ	0,91 ^b	-
<i>P. guineense</i> 1	0,30 ^f	0,92 ^a	1,4765
<i>P. guineense</i> 2	0,28 ^g	0,85 ^f	1,4770
<i>P. guineense</i> 3	0,27 ^g	0,89 ^c	1,4761
<i>P. cattleianum</i> 1	0,32 ^e	0,84 ^f	1,4770
<i>P. cattleianum</i> 2	0,30 ^f	0,85 ^f	1,4820
<i>P. guajava</i> 1	0,40 ^c	0,88 ^d	1,4955
<i>P. guajava</i> 2	0,45 ^b	0,88 ^d	1,4915
<i>P. cauliflorum</i>	0,51 ^a	0,86 ^e	1,4835
<i>P. sp1</i> (Índ 1)	0,32 ^e	0,90 ^c	1,4925
<i>P. sp1</i> (Índ 2)	0,34 ^d	0,92 ^a	1,4915
<i>P. acutangulum</i>	0,20 ^j	0,92 ^a	1,4955
<i>P. sp2</i> (Rox)	0,34 ^d	0,85 ^f	1,4810
<i>P. grazielae</i> 1	0,44 ^b	0,85 ^f	-
<i>P. grazielae</i> 2	0,40 ^c	0,86 ^f	-

Rendimento de extração % m/m (baseada em biomassa seca); *Dados submetidos à ANOVA. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

A partir das análises dos óleos essenciais obtidas pelo CG-DIC e CG-EM foram identificados 59 compostos que representaram 38,4-69,8% da composição total dos óleos essenciais de indivíduos das 11 espécies (Tabela 4).

Tabela 4. Teor percentual de 59 compostos químicos encontrados nos óleos essenciais extraídos das folhas de plantas pertencentes ao gênero *Psidium*, considerando os compostos com Área Relativa > 0,5%

COMPOSTOS	IK	ESPÉCIES																						
		B1	B2	B3	B4	L1	L2	M1	M2	M3	Gi1	Gi2	Gi3	C1	C2	Ga1	Ga2	Cl1	Í1	Í2	AC	R1	GR1	GR2
<i>α</i> -pineno	0932	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,2	-	-	-	1,2	-	-
<i>β</i> -pineno	0974	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
limoneno	1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
1,8-cineol	1026	-	-	-	7,4	-	-	-	-	-	-	0,8	0,5	-	-	4,5	3,4	-	3,1	3,9	4,6	4,9	-	-
ocimeno <(Z)- <i>β</i> ->	1032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-
<i>γ</i> -terpineno	1054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	1,1	-	-
terpinoleno	1086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
linalool	1095	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,7	-	-	-	-	0,9	1,7	0,9	1,4	-	-
<i>α</i> -camfolenal	1122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
borneol	1165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-
terpinen-4-ol	1170	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	1,0	1,0	1,9	-	-
hidrocinamaldeído	1178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>α</i> -terpineol	1186	-	-	-	5,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	0,6	2,6	2,5	3,0	2,2	2,9	-	-
<i>α</i> -terpinil acetato	1346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	1,7	-	-	-	-
<i>α</i> -copaeno	1374	0,5	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	10,0	7,3	2,8	3,0	1,2	-	13,4	1,0	0,8	1,1	1,6	-	-
geranil acetato	1379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -elemeno	1389	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	1,3
<i>β</i> -cariofileno	1417	1,3	-	-	20,3	-	0,5	0,5	0,6	-	-	-	-	32,2	21,5	12,1	5,9	-	11,0	11,6	9,7	31,3	-	-
<i>β</i> -humuleno	1436	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aromadendreno	1439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	5,9	2,5	-	-	-	2,2	-	-	-	-
<i>α</i> -humuleno	1452	-	-	-	1,9	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	3,0	-	-	6,4	-	-
<i>α</i> -acoradieno	1464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,6	-	-	0,7	-	-	-	-
alloaromadendreno	1465	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	0,7	0,5	-	-	-	1,3	-	-	-	-
<i>γ</i> -muuroleno	1478	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	0,5	-
ar-curcumeno	1479	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	0,8	-	-	-	-
eremophileno	1486	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -selineno	1489	1,7	1,0	1,0	1,5	-	2,1	1,2	-	1,0	-	3,2	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	6,8
viridifloreno	1496	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
<i>α</i> -selineno	1498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-
<i>α</i> -muuroleno	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,8	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -bisaboleno	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	0,6	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -curcumeno	1514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -sesquifelandreno	1521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	2,8	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-
<i>δ</i> -cadineno	1522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	1,9	0,8	-	-	-	-	5,6	0,7	-	0,7	1,6	-	-
<i>trans</i> -hidrato de sesquisabineno	1530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-
<i>α</i> -calacoreno	1544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-nerolidol	1561	-	-	-	-	1,9	8,5	0,8	1,7	1,3	-	3,4	3,4	12,7	9,5	2,3	6,4	0,6	-	17,1	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1582	52,2	44,7	46,4	23,7	50,3	52,2	28,3	16,2	28,7	38,1	3,5	6,3	-	-	15,9	4,2	0,5	8,3	-	7,9	9,8	54	28,1

Continuação...

epiglobulol	1588	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	1,4	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-
globulol	1590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,7	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
viridiflorol	1592	-	0,6	0,8	-	-	-	0,8	0,8	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,5	1,7	-
cedrol	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1,3	-	1,2	-	-	14,4	-	-	-	-
ledol	1602	-	-	-	-	-	-	2,2	2,3	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
longifolenaldehyde	1631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
α -acorenol	1632	-	-	-	-	-	-	2,2	0,9	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -eudesmol	1652	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,4	-	-	-
β -bisabolol	1674	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,3	-	-	1,4	-	-	-	-
γ -eudesmol	1630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	3,1	8,6	-	-	-	-
δ -cadinol	1636	1,8	-	0,8	-	-	-	1,2	3,0	1,4	-	-	1,0	-	-	3,8	-	0,6	-	-	-	-	-	-
t-cadinol	1640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-
cubenol	1645	0,6	0,9	1,1	0,8	-	-	2,0	3,7	2,4	-	-	5,4	-	-	1,3	-	1,4	1,0	1,5	1,1	-	-	-
α -cadinol	1652	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	8,5	-	-	-	-	-	16,7	2,6	-	-	2,1	12,8
α -bisabolol	1685	-	-	-	-	-	-	2,2	7,4	3,6	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-
selin-11-en-4- α -ol	1691	-	-	-	-	2,0	1,3	-	-	-	-	-	-	2,1	4,1	10,3	-	-	-	-	-	-	-	-
isolongifolol	1723	-	-	-	-	-	-	4,9	1,8	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)- β -santalol	1738	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E,E-farnesal	1740	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2E,6E)-farnesol	1742	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	4,4	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2E,6E)-farnesil acetato	1845	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	1,9	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total identificado		58.6	47.7	50.1	69.8	54.2	65.1	46.3	38.4	47.8	43.3	39.9	51.1	66.7	56.1	62.7	41,4	51.5	59.9	69.4	55.7	68.4	58.3	49.0
Monoterpenos hidrocarbonetos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.7	0	0	0	2.3	0	0
Monoterpenos Oxigenados		0	0	0	17.3	0	0	0	0	0	0	1.3	0.5	0.7	0	5.7	4	4.5	7.6	9.6	8.7	11.1	0	0
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		4	1.5	1	26.3	0	3.1	1.7	0.6	1	3.9	16.5	12.1	41.2	33.9	17.8	11.4	25.6	15.7	18	12	43	0.5	1.3
Sesquiterpenos Oxigenados		54.6	46.2	49.1	26.2	54.2	62	44.6	37.8	46.8	39.4	18.1	35	24.8	22.2	39.2	26	3.7	36	40.1	35	12	57.8	47.7
Outros		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3.5	0	0	0	0	0	0.6	1.7	0	0	0	0

Dados expressos pela % média da área relativa obtida por normalização da área do pico, sem fator de correção; Códigos: B1 (*P. brownianum* 1); B2 (*P. brownianum* 2); B3 (*P. brownianum* 3); B4 (*P. brownianum* 4); L1 (*P. longipetiolatum* 1); L2 (*P. longipetiolatum* 2); M1 (*P. myrtoides* 1); M2 (*P. myrtoides* 2); M3 (*P. myrtoides* 3); Gi1 (*P. guineense* 1); Gi2 (*P. guineense* 2); Gi3 (*P. guineense* 3); C1 (*P. cattleianum* 1); C2 (*P. cattleianum* 2); Ga1 (*P. guajava* 1-Paluma); Ga2 (*P. guajava* 2-CVII); Cl1 (*P. cauliflorum* 1); Í1 (*P. sp1* - Araçá da Índia 1); Í2 (*P. sp1* - Araçá da Índia 2); AC (*P. acutangulum*); R1 (*P. sp2* -Araçá Roxo); GR 1 (*P. grazielae* 1); GR 2 (*P. grazielae* 2); IK = índice de retenção ou Kovats calculado.

Dez compostos foram considerados majoritários nas onze espécies, por apresentar área relativa maior que 10%. Os compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno foram os majoritários que ocorreram em maior proporção na composição dos óleos essenciais das espécies estudadas. Em todas as espécies pelo menos um destes compostos foi majoritário nos óleos, a exceção de *P. cauliflorum* que apresentou apenas o óxido de cariofileno, porém como composto minoritário (0,5%) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5. Compostos majoritários do óleo essencial de 11 espécies de *Psidium* spp.

N	Compostos	TR	IRCal	IRTab	NE	NE*	Varição ¹ %
1	α -pineno	8,58	932	932	2	1	11,2
2	α -copaeno	28,55	1374	1374	12	2	10,0 - 13,4
3	β -cariofileno	30,46	1419	1417	13	7	11,0 - 32,2
4	(<i>E</i>)-nerolidol	36,31	1566	1561	13	2	12,7 - 17,1
5	óxido de cariofileno	36,95	1582	1582	20	13	15,9 - 54,0
6	cedrol	37,56	1597	1600	4	1	14,4
7	α -eudesmol	38,76	1631	1630	1	1	16,4
8	β -bisabolol	40,34	1673	1674	2	1	12,3
9	α -cadinol	39,47	1650	1652	6	2	12,8 - 16,7
10	selin-11-en-4- α -ol	38,94	1636	1638	5	1	10,3

N (Número de compostos); TR (Tempo de Retenção – minutos); IRcal (Índice de Retenção Calculado); IRtab (Índice de Retenção Tabelado); NE (número de espécies em que o composto foi identificado); NE* (número de espécies em que o composto foi identificado como majoritário); ¹- considerado apenas para as espécies que apresentam o composto como majoritário.

Destaque também foi dado aos compostos que ocorreram na maioria das espécies como minoritários como: (*E*)-nerolidol, cubenol, α -copaeno e β -selieno que ocorreram em sete espécies cada; α -terpeniol que ocorreu em seis espécies; e 1,8-cineol, viridiflorol e δ -cadinol que ocorreram em cinco espécies.

Algumas espécies apresentaram compostos majoritários exclusivos como, *P. guajava* 2 – “Cortibel VII” (β -bisabolol - 12,3%), *P. acutangulum* (α -eudesmol – 16,4%), *P. sp1* – “Araçá da Índia” (Cedrol – 14,4%) e *P. cauliflorum* (α -pineno 11,2%).

Dentre os cinquenta e nove compostos identificados em todas as espécies, sete foram exclusivos da espécie *P. cauliflorum* e outros seis compartilhados entre esta espécie e no máximo outras duas espécies. Outras espécies apresentaram compostos minoritários únicos como *P. myrtoides*, *P. guineense* e *P. guajava*. Variação intraespecífica pronunciada foi observada na composição dos óleos em amostras das espécies *P. guineense* e *P. brownianum* (Tabela 4).

Quanto a composição geral, houve predominância de sesquiterpenos nos óleos essenciais em todas as plantas avaliadas das 11 espécies, variando de 56,8% a 100%. Os sesquiterpenos oxigenados foram os mais representados na maioria das espécies, com mais de 90% da composição dos óleos de três indivíduos de *P. brownianum*, *P. longipetiolatum*, *P. myrtoides* e *P. grazielae*. Os teores de monoterpenos foram baixos e ausentes em algumas espécies, com uma variação de 0,97 a 43,1% quando presentes. A espécie *P. cauliflorum* foi a que apresentou a composição com maior teor de monoterpenos (43%) (Figura 1).

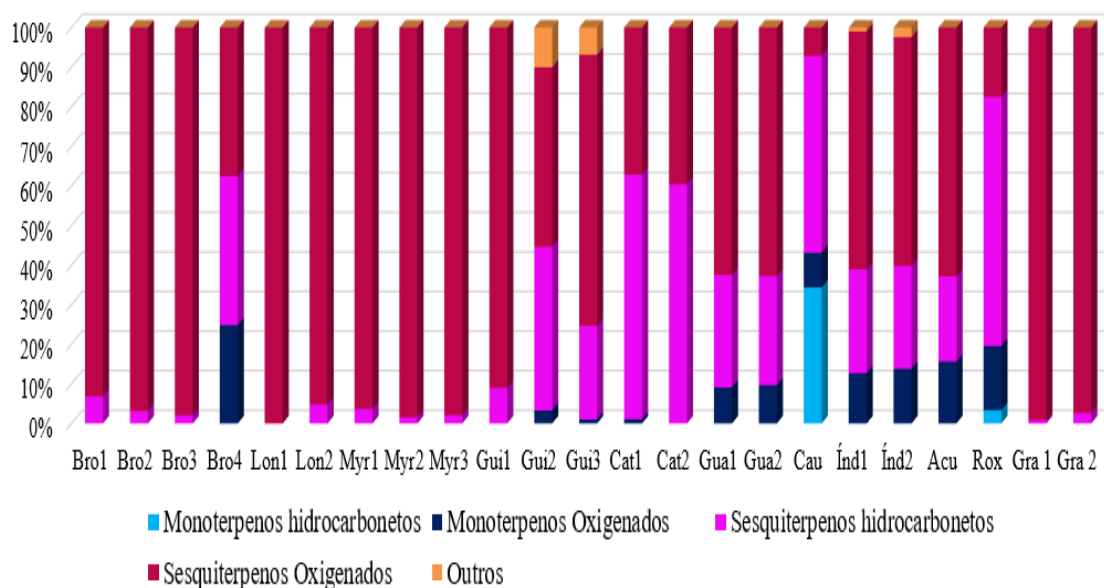


Figura 1. Comparação entre os teores de mono e sesquiterpenos nos óleos essenciais de 11 espécies de *Psidium*. Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*.

3.2 DIVERSIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Psidium* spp.

Na análise de agrupamento, realizada com base na composição de óleos essenciais de cada espécie foi observada a formação de três grupos principais (Figura 2).

O primeiro grupo (G1) apresentou nove indivíduos (*P. sp.* 2; *P. brownianuam* 4; *P. guajava* 1 e 2; *P. sp.* 1, 1 e 2; *P. acutangulum* e *P. cattleianum* 1 e 2). O composto majoritário em comum entre todos os nove indivíduos foi o β -cariofileno. Além deste, óxido de cariofileno e 1,8-cineol também estiveram presentes na maioria dos indivíduos, sendo também responsáveis por diferenciar este grupo dos demais. O G2 foi formado por três indivíduos, (*P. guineense* 2 e 3 e *P. cauliflorum*). Nestes indivíduos, três compostos majoritários foram encontrados em comum, óxido de cariofileno, (*E*)-nerolidol e α -copaeno. O terceiro grupo foi formado por onze indivíduos (*P. myrtoides* 1, 2 e 3; *P. brownianum* 1, 2 e 3; *P. longipetiolatum* 1 e 2; *P. grazielae* 1 e 2; e *P. guineense* 1), sendo o composto óxido de cariofileno o majoritário, entre todos os indivíduos deste grupo.

Desta forma, os compostos que mais ocorreram nas espécies foram importantes para separar grupos de espécies, a exemplo dos compostos β -cariofileno, óxido de cariofileno, 1,8-cineol, α -copaeno e (*E*)-nerolidol, sendo os compostos óxido de cariofileno e β -cariofileno os mais abundantes entre todas os indivíduos estudados.

Visando uma interpretação mais ampla sobre a composição dos óleos essenciais das espécies do gênero *Psidium*, dados disponíveis na literatura foram obtidos, e outras 14 espécies foram inclusas (sendo 12 diferentes das estudadas neste trabalho), totalizando 25 espécies e 60 indivíduos avaliados. Mais de 200 compostos presentes nos óleos essenciais de *Psidium* foram detectados, dos quais 33 foram considerados majoritários (Apêndice 2).

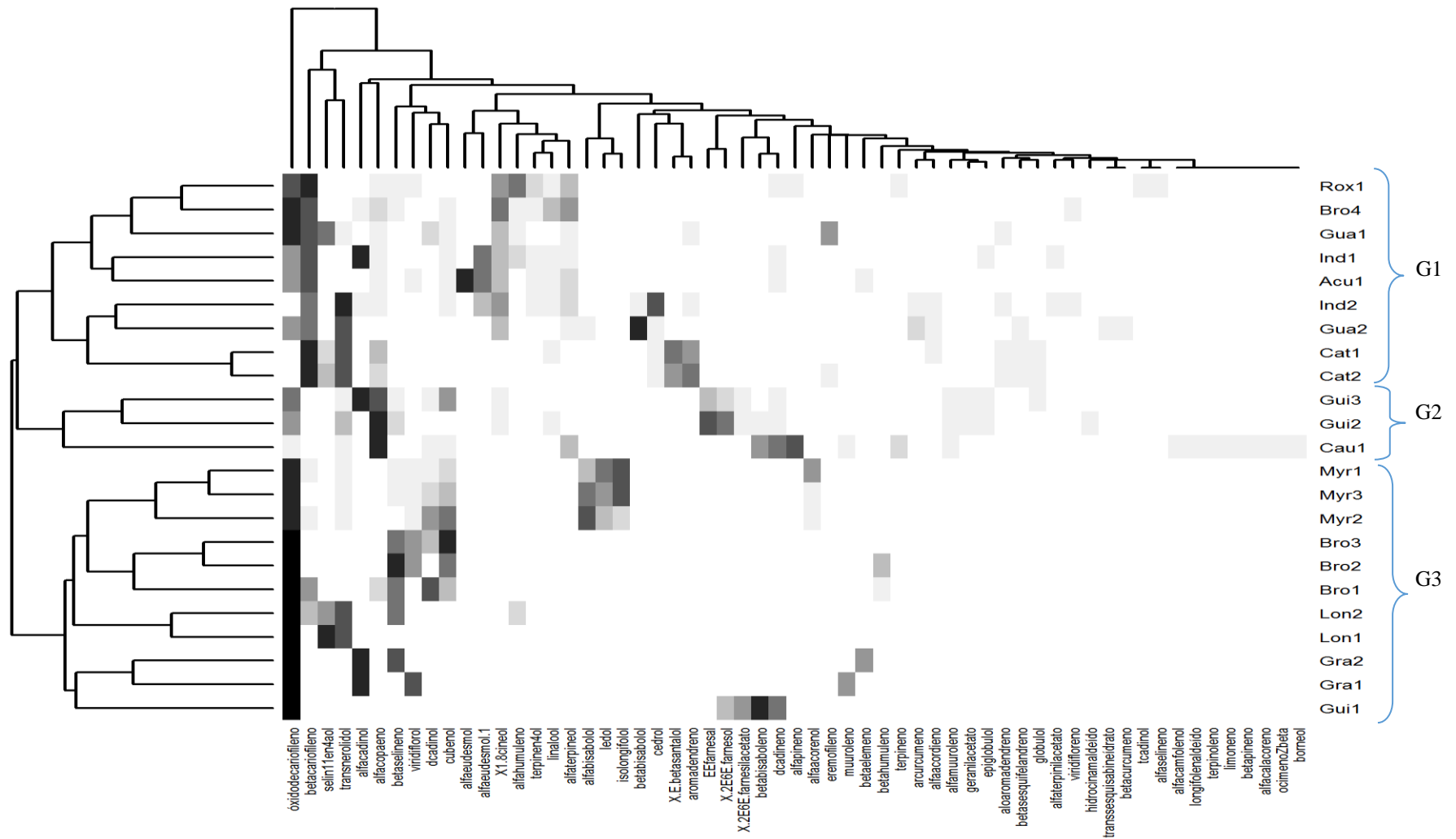


Figura 2. *Heatmap* dos indivíduos de *Psidium* e os constituintes do óleo essencial das respectivas plantas. As escalas representam a área relativa (%) dos compostos (quanto mais escuro, maior quantidade de composto).

A relação entre as espécies estudadas neste trabalho com dados da literatura, de acordo com a composição dos óleos essenciais, foi evidenciada em novo agrupamento, considerando apenas os seis compostos que mais ocorrem em cada amostra. Foram formados sete grupos principais. O primeiro grupo (G1) foi formado por 6 espécies (*P. guajava*, *P. cattleianum*, *P. striatulum*, *P. sartorianum*, *P. friedrichsthalianum* e *P. sp1*) tendo como compostos majoritários β -cariofileno e (*E*)-nerolidol. O (G2) foi formado por *P. aff aerugineum* e *P. guajava* (indivíduos V e XVII). As espécies *P. salutare* e *P. guajava* IV (G3) apresentaram como composto majoritário viridiflorol. Além de viridiflorol, *P. salutare* também apresentou epi- α -cadinol e α -cadinol como compostos majoritários (Apêndice 2, Figura 3).

A variação intraespecífica e a relação de *P. guajava* e *P. guineense* foi evidenciada em diferentes grupos. O G4 foi composto por duas espécies, *P. guajava* (indivíduos I, XV, XVIII e XIX) e *P. guineense* (indivíduo I), neste grupo, limoneno foi o composto majoritário em comum. O G5 foi composto por *P. guajava* (indivíduos III, X, XIV, XVI e XX), *P. acutangulum*, *P. pohlianum*, *P. guyanensis* e *P. caudatum* cujo composto majoritário em comum foi 1,8-cineol. O G6 foi composto por três espécies (*P. guineense*, *P. guajava* e *P. cauliflorum*) com β -bisaboleno como composto em comum.

O último grupo, G7, foi o mais diverso, com 12 espécies (*P. myrsinoides*, *P. myrsinites*, *P. cattleianum*, *P. sp2*, *P. brownianum*, *P. guajava*, *P. sp1*, *P. acutangulum*, *P. longipetiolatum*, *P. grazielae*, *P. guineense* e *P. myrtoides*) representadas por 28 plantas agrupadas, que apresentaram como componentes majoritários β -cariofileno e óxido de cariofileno (Apêndice 2, Figura 3).

Assim, os compostos mais abundantes encontrados em quase a totalidade de indivíduos estudados foram β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Ressalta-se a presença do monoterpene limoneno no G4, nas espécies *P. guajava* (indivíduo I – local = Egito, órgão = folha; indivíduo XV – local = Índia, órgão = folha; indivíduo XVIII – local = Equador, órgão = folha; e indivíduo XIX – local = Nigéria, órgão = folha) e *P. guineense* (indivíduo I – local = Boa Vista, órgão = folha). Além do limoneno, outros dois monoterpenos se destacam, o α -pineno e o 1,8-cineol no grupo 5. O 1,8-cineol esteve presente em todos os indivíduos deste grupo: *P. guajava* (indivíduo III – local = Ceará, órgão = folha; indivíduo X – local = Lavras, órgão = folha; XIV – local = Tailândia, órgão = folha; indivíduo XVI – local = Índia, órgão = caule;

indivíduo XX – local = Belém, órgão = folha), *P. acutangulum* (local = Boa Vista, órgão = folha), *P. pohlianum* (local = Ceará, órgão = folha), *P. guyanensis* (local = Ceará, órgão = folha) e *P. caudatum* (local = Colômbia, órgão = folha). O composto α -pineno esteve presente em *P. guajava*, indivíduos XVI e XX, *P. acutangulum*, *P. pohlianum*, *P. guyanensis* e *P. caudatum* (Apêndice 2, Figura 3).

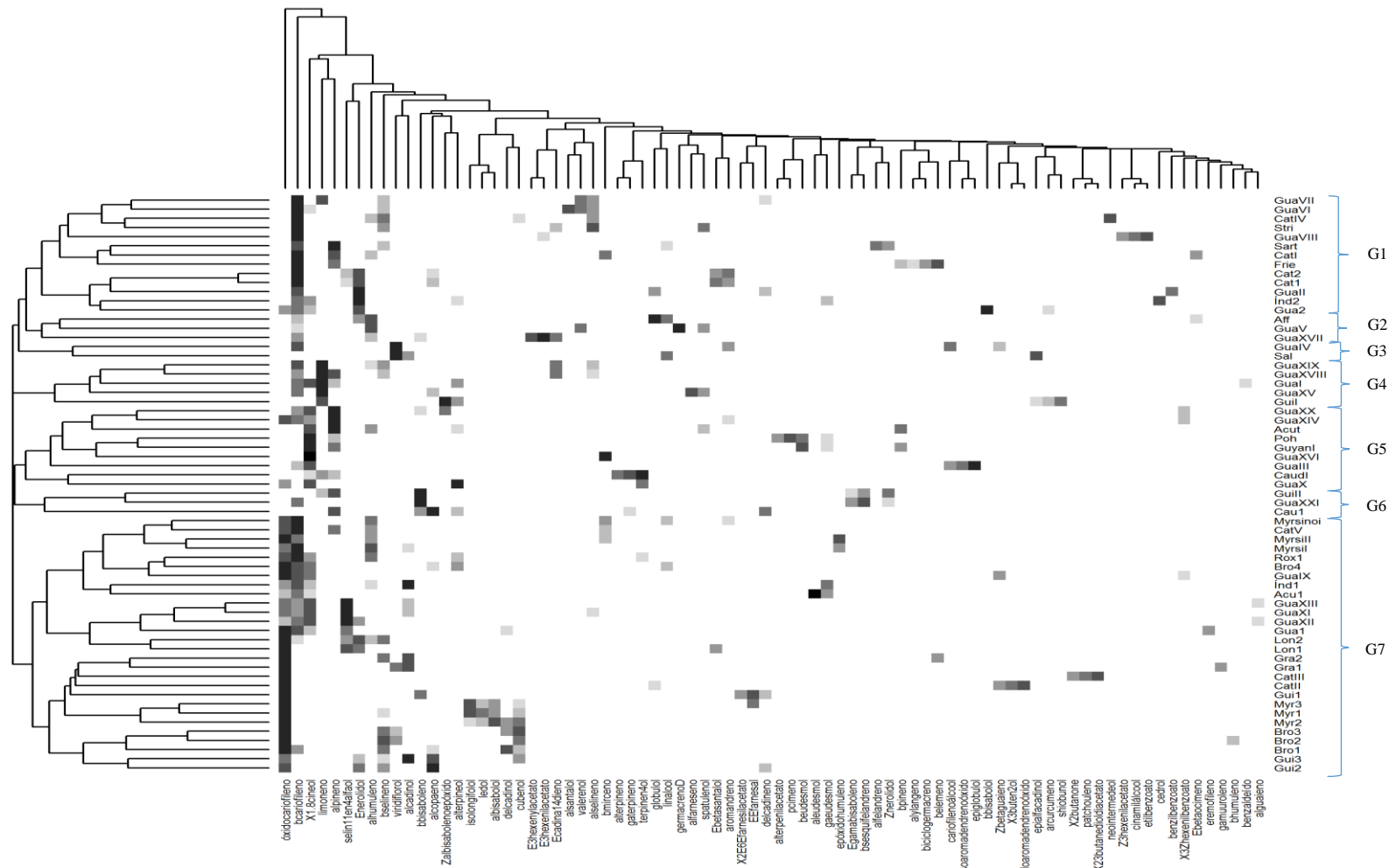


Figura 3. *Heatmap* de 60 plantas de *Psidium* (23 do presente trabalho mais 37 da literatura) e 80 compostos considerados majoritários. As escalas representam a área relativa (%) dos compostos (quanto mais escuro, maior quantidade de composto).

3.3 MICROMORFOLOGIA FOLIAR E ÍNDICE DE HERBIVORIA

O comprimento das folhas variou 2 -16 x 1- 6.8 mm (comprimento x largura). A espessura variou de 0.1 – 0.7 mm, sendo diretamente relacionada com a consistência das folhas. A presença de tricomas variou entre glabra, glabrescente e pilosa (Figura 4, Tabela 6). Quanto ao índice de herbivoria, *P. brownianum*, *P. longipetiolatum*, *P. myrtoides* e *P. grazielae* foram as mais consumidas. *Psidium cauliflorum* apresentou o menor índice de herbivoria, seguido de *P. guajava* (Figura 5, Tabela 6).

Com relação ao índice glandular, *P. grazielae* apresentou quantidade muito alta de glândulas, com uma média de 215,7 glândulas, seguida por *P. cauliflorum* (média = 160,0). A menor quantidade de glândulas foi apresentada por *P. longipetiolatum* (média = 28,0), *P. guineense* (média = 49,0), *P. cattleianum* (média = 44,7) e *P. guajava* (média = 31,7) (Figura 5, Tabela 6). As glândulas foram categorizadas quanto ao tamanho em grandes, médias e pequenas (Figura 6, Tabela 6).

Pela análise de correspondência verificou-se maior relação entre as espécies *P. cattleianum*, *P. guineense* e *P. guajava*, associados ao baixo índice glandular, médio índice de herbivoria e consistência coriácea das folhas. As espécies *P. longipetiolatum*, *P. myrtoides* e *P. brownianum* também apresentaram correspondência, por apresentarem folhas com consistência semelhante, ausência/ou baixa presença de tricomas, elevado índice de herbivoria e baixo rendimento de óleo essencial.

A espécie *P. cauliflorum* foi a mais distinta das demais espécies ficando mais próxima de *P. grazielae*. Ambas as espécies apresentaram comprimento, largura e espessura de folhas semelhantes, ambas de consistência cartácea, apresentaram glândulas de tamanho pequeno e maior média de índice glandular.

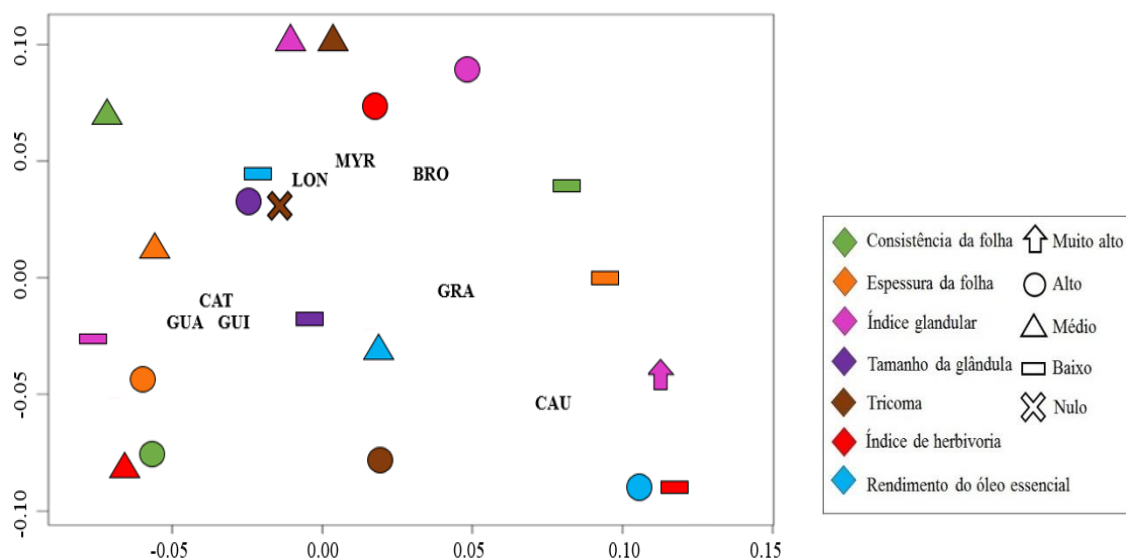


Figura 4. Análise de correspondência entre sete características avaliadas de oito espécies de *Psidium*. Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*.

Tabela 6. Características de micromorfologia foliar

	Bro	Lon	Myr	Gui	Cat	Gua	Cau	Gra
Comprimento folha (cm)	2-10	6-12	2,5-11	3-16,5	3-14	3,5-11	4,7-10	4,5-11,5
Largura folha (cm)	1-7	2,3-5,5	1-4,5	1,6-6,8	1-8	2,5-6	2-5	2-4,7
Espessura folha (mm)	0,1-0,2	0,2-0,5	0,1	0,2-0,5	0,5-0,7	0,2-0,5	0,1-0,2	0,1-0,2
Consistência	cartácea	cartácea/ coriácea	cartácea	coriácea	coriácea	coriácea	cartácea	cartácea
Tricomas	glabra	glabra	glabrescente	pilosa	glabra	pilosa	pilosa	glabra
Tamanho glândula	grande	grande	pequena	pequena	pequena	grande	pequena	pequena
Rendimento de óleo essencial	0,29	0,27	0,24	0,29	0,31	0,42	0,51	0,42
Índice herbivoria	2,0	1,7	1,7	1,3	1,3	1,0	0,7	1,7
Índice glandular	102,7	28,0	77,0	49,0	44,7	31,7	160,0	215,7

Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*.

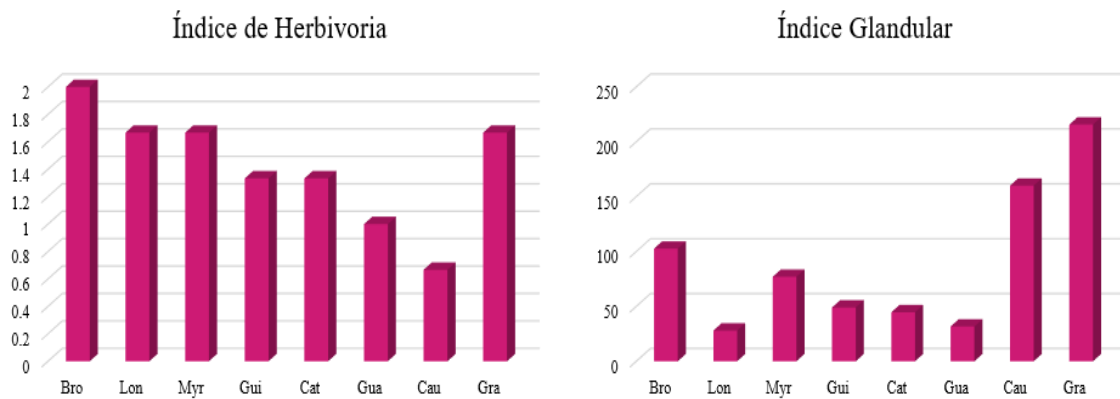


Figura 5. Índice de Herbivoria e Índice glandular de espécies de *Psidium*. Legenda: Bro = *P. brownianum*; Lon = *P. longipetiolatum*; Myr = *P. myrtoides*; Gui = *P. guineense*; Cat = *P. cattleianum*; Gua = *P. guajava*; Cau = *P. cauliflorum*; Índ = *P. sp1*; Acu = *P. acutangulum*; Rox = *P. sp 2*; Gra = *P. grazielae*.

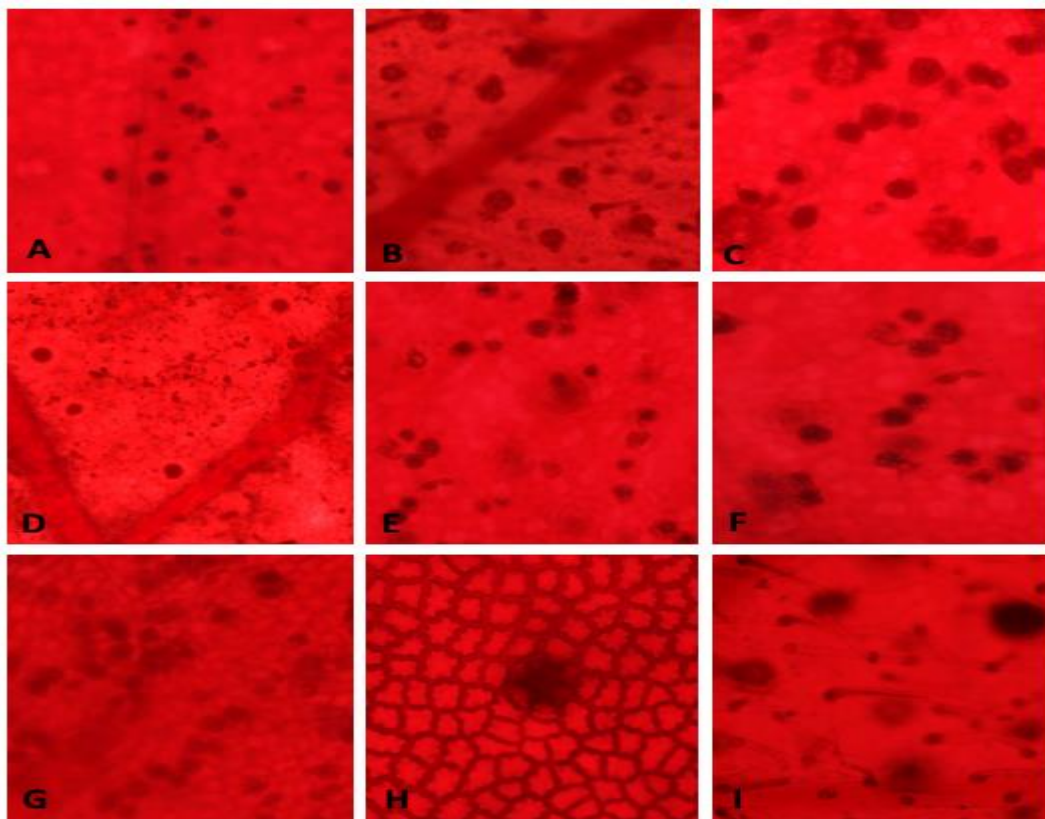


Figura 6. Secções paradérmicas (10 X) evidenciando estruturas secretoras em espécies de *Psidium*. A) *P. cattleianum* B) *P. guajava* C) *P. brownianum* D) *P. guineense* E) *P. myrtoides* F) *P. longipetiolatum* G) *P. cauliflorum* H) *P. brownianum* – estrutura secretora em detalhe I) *P. guajava* – tricomas em detalhe.

4. DISCUSSÃO

4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS DE 11 ESPÉCIES DE *Psidium*

As densidades e os índices de refração obtidos corroboram valores encontrados na literatura, onde foram utilizadas as mesmas análises em óleos essenciais no gênero *Psidium* (KAMRAN et al., 2012; SOUZA et al., 2015). Estes parâmetros físicos podem ser utilizados como indicadores no controle de qualidade, quando comparados a valores teóricos (CERIMELE; RINGUELET, 2008).

Os teores de sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais foram predominantes, como relatado em *P. guajava* em diferentes trabalhos (SOARES et al., 2007; ATHIKOMKULCHAI et al., 2008; KHADHRI et al., 2014) e em *P. myrsinites* (MEDEIROS et al., 2015). Monoterpenos também foram encontrados como constituintes predominantes dos óleos essenciais de espécies de *Psidium*. Diferentes trabalhos evidenciaram a importância desta classe de terpenos em *P. guajava* e *P. guineense* (SOLIMAN et al., 2016); na casca de *P. guajava* (BHALKE et al., 2008), em *P. guajava* (SACCHETTI et al., 2005), em *P. caudatum* (YÁÑEZ et al., 2002), em *P. pohlianum* (SANTOS et al., 1997) e em *P. guajava* cultivar Paluma (LIMA et al., 2010).

Existem alguns fatores que colaboram para as diferenças encontradas nos perfis de óleo essencial que podem influenciar direta ou indiretamente a biossíntese de terpenos afetando a relação entre sesquiterpenos e monoterpenos (BOHLMANN, 2010; BEYAERT et al., 2012; KÖLLNER et al., 2013; ZULAK; BOHLMANN, 2010; RIBEIRO et al., 2014). A relação de monoterpenos e sesquiterpenos é influenciada pela síntese de geranyl pirofosfato (GPP) e farnesil pirofosfato (FPP), os precursores de mono e sesquiterpenos, respectivamente. A síntese de ambos ocorre através de enzimas únicas em diferentes compartimentos celulares (monoterpenos em cloroplastos, sesquiterpenos no citosol), no entanto, ambos são sintetizados pelo mesmo precursor (DUDAREVA et al., 2013). O que irá influenciar na diversidade de monoterpenos e sesquiterpenos será a variação na eficiência das enzimas, que são responsáveis por catalisar a conversão de alguns poucos substratos em milhares de estruturas de terpenos (DEGENHARDT et al., 2009).

Assim os monoterpenos α -pineno e 1,8-cineol amplamente representados em tribos australianas de Myrtaceae (PADOVAN et al., 2014), apresentam em comum o mesmo precursor (KESZEI et al., 2010). Em contrapartida, a maior eficiência de enzimas relativas à síntese de sesquiterpenos em *Psidium* foi evidenciada pela importância dos compostos óxido de cariofileno e β -cariofileno, compostos de similar estrutura e oriundos de mesmo precursor (KESZEI et al., 2010).

Além dos fatores genéticos, outros fatores também podem influenciar na composição final de óleos essenciais como, estágio de desenvolvimento da planta da qual o óleo essencial será extraído (FIGUEIREDO et al., 2008), presença de plantas em zonas geográficas distintas (YAPI et al., 2014) e técnica escolhida para a extração do óleo essencial (MU'AZU et al., 2016). Este fato faz com que o conhecimento da variabilidade quimiotípica seja imprescindível para que o uso do óleo essencial possa ser direcionado adequadamente.

4.2 VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Psidium*

O composto óxido de cariofileno esteve presente em grande parte das espécies estudadas sendo considerado componente majoritário na maioria das vezes em que ocorreu, podendo se tratar de um potencial marcador químico para o gênero *Psidium*. Athikomkulchai et al. (2008) também encontraram óxido de cariofileno como composto majoritário em *P. guajava*. Este composto também esteve presente de forma majoritária em outras espécies do gênero *Psidium*, como o encontrado por Chalannavar et al. (2012, 2013) em *P. cattleianum*; Dias et al. (2015) em *Psidium myrsinites* e Freitas et al. (2002) em *Psidium myrsinoides*.

Para as plantas de *P. cattleianum* analisadas foram encontrados como compostos majoritários β -cariofileno e (*E*)-nerolidol (planta 1) e β -cariofileno (planta 2). Chalannavar et al., (2012, 2013), no entanto, estudaram a mesma espécie e conseguiram detectar óxido de cariofileno como composto majoritário.

Alguns fatores podem ter contribuído para que os teores de óxido de cariofileno encontrados por Chalannavar et al. (2013, 2012) fossem maiores do que o encontrado neste trabalho para *P. cattleianum*. Um dos fatores se refere a localização geográfica, visto que o trabalho de Chalannavar et al. (2013, 2012), foi realizado na África do Sul e

o presente trabalho no Brasil. Além disso, a coleta de folhas deste trabalho foi realizada em maio de 2014 (inverno), enquanto que em Chalannavar et al. (2013, 2012), estas foram coletadas em outubro e setembro de 2010 (final do inverno, início da primavera).

A sazonalidade é um importante fator que contribui para variações na composição e rendimento dos óleos essenciais. Devido as variações no clima, como comprimento do dia, temperatura e umidade, que podem se diferenciar no decorrer das estações do ano, uma maior ou menor produção de determinado composto pode ocorrer (FIGUEIREDO et al., 2008).

Outros fatores que podem ter causado essa diferença na composição de *P. cattleianum*, se referem a possíveis injúrias que naturalmente podem ocorrer nas plantas e que nem sempre são observadas. As plantas produzem sob circunstâncias normais, ou seja, quando estão saudáveis, uma grande quantidade de metabólitos secundários. No entanto, quando submetidas a qualquer tipo de injúrias mecânicas ou químicas (feridas, infestações por predadores ou tratamentos com herbicidas) podem ser induzidas a uma produção de novos compostos que anteriormente não estavam presentes na planta (FIGUEIREDO et al., 2008).

Nas três plantas de *P. guineense* avaliadas, óxido de cariofileno, α -copaeno e α -cadinol estiveram presentes como compostos majoritários, respectivamente. Esta espécie também foi estudada anteriormente por Silva et al. (2003) e por Tucker et al. (1995) que encontraram β -bisaboleno + α -pineno e β -bisaboleno, respectivamente, como compostos majoritários (Apêndice 2). No entanto, β -bisaboleno esteve presente em pequenas quantidades nas duas primeiras plantas de *P. guineense* analisadas neste trabalho.

Silva et al. (2003) também encontraram óxido de cariofileno, α -copaeno e α -cadinol na composição de *P. guineense*, mostrando que estes compostos, apesar de nem sempre se apresentarem de forma majoritária podem fazer parte do perfil cromatográfico da espécie.

Para o perfil de *P. guajava* foram estudados dois diferentes genótipos, Paluma e Cortibel VII. Como compostos majoritários em Paulma foram encontrados β -cariofileno, óxido de cariofileno e selin-11-em-4- α -ol. Composição semelhante a encontrada por Souza et al. (2017) que também estudaram a cultivar Paluma e encontraram em sua composição como compostos majoritários, β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Em Cortibel VII β -bisabolol foi identificado como composto majoritário. Souza et al. (2017) estudaram 17 cultivares de Cortibel e dentre estas, onze foram compostas majoritariamente por β -bisabolol.

Alguns outros autores estudando *P. guajava* também encontraram os mesmos compostos majoritários presentes em Paluma, como Satyal et al. (2015) que encontraram β -cariofileno, Lima et al. (2009) que encontraram óxido de cariofileno e Athikomkulchai et al. (2008) que encontraram β -cariofileno e óxido de cariofileno como compostos majoritários. Tucker et al. (1995) encontraram em *P. guajava*, β -bisabolol como composto majoritário, assim como o encontrado no presente estudo para a cultivar Cortibel VII. Selin-11-en-4- α -ol também foi encontrado por Lima et al. (2010) como um dos compostos majoritários de duas cultivares de *P. guajava*, Pedro Sato e Século XXI.

É importante salientar que em alguns casos, a extração do óleo essencial foi realizada em diferentes órgãos das plantas (frutos, cascas, folhas), muitas vezes não sendo informado com relação ao estágio de desenvolvimento destes. Os óleos essenciais geralmente se concentram em uma região particular da planta, no entanto, quando ocorrem em vários órgãos da mesma planta apresentam, frequentemente, diversos perfis químicos (OUSSALAH et al., 2007). El-Ahmady et al. (2013), por exemplo, encontraram diferentes composições de óleo essencial de *P. guajava* quando estudaram seus frutos e folhas. Nas folhas, encontraram o β -cariofileno (16,9%) e selin-11-en-4- α -ol (8,3%) como componentes majoritários, enquanto que nos frutos, além do β -cariofileno (17,6%), também encontraram limoneno (11%) como componente majoritário.

Além disso, o estágio de desenvolvimento do órgão da planta do qual o óleo essencial é extraído é, muitas vezes, determinante com relação a composição do óleo essencial. Na fase de maturação do botão floral, por exemplo, pode ocorrer um aumento no rendimento e simultaneamente uma alteração na composição química do óleo, em que alguns componentes podem variar de vestigiais (10%) nas fases iniciais, a majoritários (50-70%) quando o órgão está completamente desenvolvido (FIGUEIREDO et al., 2008). A medida que a planta envelhece, pode ocorrer uma diminuição no componente majoritário da planta (SCAVRONI et al., 2005).

Alguns outros compostos, ainda que não classificados como majoritários merecem destaque por estarem presentes em pelo menos nove das 23 plantas analisadas.

Dentre estes encontram-se 1,8-cineol e β -selineno (presentes em 9 plantas), α -copaeno (12 plantas), além de cubenol (em 13 plantas).

Os resultados destes estudos apontam para a existência de mais de um perfil cromatográfico para os óleos essenciais de *Psidium*, pressupondo que exista variabilidade quimiotípica nas espécies do gênero.

4.3 AGRUPAMENTO DE ESPÉCIES DE ACORDO COM SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho foi possível observar a formação de um grande grupo de espécies, que possivelmente ocorreu, pois a maioria dos indivíduos estudados apresentaram como compostos majoritários, β -cariofileno e óxido de cariofileno. Estes resultados corroboram o que foi sugerido por Padovan et al. (2014), de que existe um padrão de compostos na tribo Myrteae que corresponde ao aparecimento de β -cariofileno no lugar de 1,8-cineol que havia sido relatado anteriormente, como um dos principais quimiotipos das demais tribos da família Myrtaceae.

Esta composição majoritária de β -cariofileno também foi relatada por Souza et al. (2017) que ao estudarem 22 genótipos de *P. guajava* encontraram β -cariofileno em dezessete indivíduos como composto majoritário.

Além deste padrão de β -cariofileno também deve ser ressaltada a presença como composto majoritário de óxido de cariofileno nas espécies pertencentes ao gênero *Psidium*.

Apesar da presença em poucos indivíduos e em quantidades relativamente menores, também devem ser mencionados os compostos α -pineno e 1,8-cineol. Estes compostos são considerados majoritários em diversas tribos da família Myrtaceae, porém, isto não foi observado para as espécies da tribo Myrteae aqui estudadas. No entanto, estes compostos aparecem em indivíduos, cujas vias de síntese são conservadas no gênero (PADOVAN et al., 2014), no entanto, na maioria das vezes a presença de monoterpenos no presente trabalho foi minoritária.

Com relação a *P. cauliflorum*, este se trata de um indivíduo cuja distribuição é menor, sendo raro encontrá-lo. É ainda um indivíduo diploide e portanto, sugere-se que seja mais antigo que os demais. Este foi o indivíduo com a maior variação na

composição do óleo essencial. Ao contrário de todos os outros indivíduos, α -pineno e α -copaeno foram os compostos majoritários encontrados neste indivíduo, ainda apresentando em sua composição quantidade moderada de δ -cadineno, que somente foi encontrado nos demais indivíduos, como componente traço.

4.4 DIVERSIDADE DE QUIMIOTIPOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Psidium*

Quimiotipos são definidos pelo composto mais abundante encontrado em um indivíduo (PADOVAN et al., 2014). Neste estudo foi observada uma grande variação na composição química dos óleos essenciais entre as espécies.

O composto α -pineno é provavelmente o mais antigo terpeno foliar em Myrtaceae. Apesar deste composto ter sido identificado poucas vezes como majoritário neste trabalho, aparentemente foi o primeiro a aparecer em elevadas concentrações no antepassado comum de todas as Myrtaceae (PADOVAN et al., 2014).

Mapeando os padrões de terpenos foliares com relação a filogenia, Padovan et al. (2014) sugeriram que existem algumas prováveis trajetórias evolucionárias que podem ter ocorrido. Uma delas indica que o antepassado comum de todas as Myrtaceae possuía elevados níveis dos monoterpenos 1,8-cineol e α -pineno, e que a maquinaria que levava à síntese de 1,8-cineol foi sendo perdida diversas vezes em Xanthostemoneae e nas linhagens Syncarpieae e Lindsayomyrteae, assim como nos cladogramas que continham Myrteae, Tristanieae e Syzygieae.

Nossos dados corroboram e reforçam o que foi encontrado por Padovan et al. (2014), que mostraram ao analisar a tribo Myrteae, apesar de a terem representado com uma baixa quantidade de espécies, que ainda que o composto 1,8-cineol seja um dos terpenos foliares mais abundantes, uma diferença nesta composição é encontrada quando as espécies desta tribo são analisadas. Essa diferença se trata do aparecimento de β -cariofileno no lugar do composto 1,8-cineol. Ainda deve-se salientar que a presença de 1,8-cineol, ainda que em menores proporções neste estudo, se trata de uma importante característica da família Myrtaceae.

A ocorrência de elevado nível de α -pineno é uma característica que apesar de ser comum na maior parte das tribos de Myrtaceae (PADOVAN et al., 2014), não foi tão naturalmente encontrada nas espécies aqui estudadas, o que pode sugerir que aquelas

que apresentam este composto, além do 1,8-cineol, em sua composição, provavelmente possuem vias de síntese mais conservadas.

Neste trabalho, a maioria das espécies apresentou como padrão, sesquiterpenos, sendo possível observar, que na grande parte (60%) dos indivíduos estudados houve a presença de um padrão de β -cariofileno ou de óxido de cariofileno, sendo até mesmo possível observar a presença de ambos em um mesmo indivíduo.

Esta grande variação observada na composição dos óleos essenciais, pode ocorrer devido à grande família de genes terpeno sintases (TPS) responsáveis pela biossíntese dos terpenos. A família TPS é constituída por 3 classes e 7 subfamílias. A classe I consiste em TPS-c (copalil difosfato e ent-caureno), TPS-e/f (ent-caureno e outros diterpenos, assim como alguns mono e sesquiterpenos) e TPS-h (específico à *Selaginella*); a classe II consiste de TPS-d (específico a gimnosperma) e a classe III apresenta TPS-a (sesquiterpenos), TPS-b (monoterpenos cíclicos e hemiterpenos) e TPS-g (monoterpenos acíclicos) (KÜLHEIM et al., 2015).

Geralmente, plantas que emitem ou armazenam poucos terpenos, possuem apenas um pequeno número de TPS, enquanto que plantas que apresentam uma maior complexidade quanto a mistura de terpenos, que são usualmente armazenados em tricomas, ou outras estruturas glandulares, como é o caso das espécies de Myrtaceae, tendem a conter um número maior de genes TPS (KÜLHEIM et al., 2015).

Em *Eucalyptus grandis* foram descobertos 113 genes TPS funcionais (KÜLHEIM et al., 2015). Canal (2016), através de buscas em bancos de dados genômicos nos genomas referência de *E. grandis* fez a reconstrução da via de biossíntese de terpenos em *P. guajava*, sendo identificadas 83 potenciais cópias gênicas de TPS. Este estudo mostrou que *P. guajava* apresenta número semelhante de genes TPS quando comparado ao gênero *Eucalyptus* e, portanto, pode-se sugerir que este seja o motivo de tamanha variação na composição dos óleos essenciais aqui estudados.

Devido à grande variação encontrada neste trabalho, muitas vezes dentro de uma mesma espécie, como foi o caso de *P. guajava* e diante do fato de ainda não termos um estudo que mostre de fato quais as classes de genes são responsáveis pela biossíntese de terpenos em *Psidium* é possível sugerir que este gênero contenha uma família diversa e abundante de TPS e que trabalhos adicionais sejam realizados para que isto possa ser elucidado.

Diante do exposto, sugere-se como marcadores da tribo Myrteae, os compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno.

4.5 MICROMORFOLOGIA E ÍNDICE DE HERBIVORIA

Inicialmente, pela predição do trabalho, esperava-se que espécies com baixa densidade de pontuações translúcidas, fossem as mais consumidas por herbívoros, pois aparentemente possuiriam menos defesas químicas que as outras espécies. Entretanto, nossos resultados mostraram que a variabilidade de compostos presentes nas espécies foi mais importante para evitar a herbivoria do que o número de glândulas. A baixa densidade de pontuações translúcidas nas folhas de *P. guajava*, *P. guineense* e *P. cattleianum* não indica, necessariamente, que esta espécie produz poucos compostos secundários.

Os metabólitos secundários produzidos por estas espécies podem ser mais eficientes em afastar eventuais herbívoros que os compostos secundários encontrados nas espécies com alto índice glandular. *Psidium guajava* e *P. cattleianum* apresentaram como componentes majoritários sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados que estão diretamente relacionados na defesa contra microrganismos e predadores. Plantas de cana-de-açúcar, quando atacadas pela broca da cana (*Diatraea saccharalis*) liberam altas taxas do sesquiterpeno β -cariofileno que exerceu uma alta atratividade ao inimigo natural da broca da cana, o parasitoide *Cotesia flavipes* (RIFFEL et al., 2013). No milho, por exemplo, o sesquiterpeno β -cariofileno é o principal composto emitido após o ataque da lagarta da raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*). Este atua no solo como atraente do nematoide *Heterorhabditis megidis*, inimigo natural da lagarta (RASMANN et al., 2008).

Além disso, os resultados indicaram que três das espécies menos consumidas por herbívoros (*P. cauliflorum*, *P. guajava* e *P. guineense*) apresentavam tricomas nas folhas e consistência coriácea, que diminuem a palatabilidade das folhas e atuam na defesa física contra herbívoros (Tabela 6). Superfícies foliares com tricomas glandulares representam uma barreira estrutural contra herbívoros, dificultando o acesso à epiderme foliar (SCHOONHOVEN et al., 2005). As folhas glabras não contam com defesa física, e por isso são mais atingidas pela herbivoria, como por exemplo *P. brownianum*, *P. longipetiolatum* e *P. grazielae* que foram mais predadas (Figura 1, Tabela 6).

Psidium cauliflorum, foi a espécie que apresentou a menor porcentagem de área predada. Essa espécie apresenta grande densidade de glândulas, variedade de compostos secundários e tricomas nas superfícies foliares. Todas essas características em conjunto dificultam a herbivoria das suas folhas.

Os indivíduos amostrados neste estudo encontravam-se em ambientes de Floresta de Tabuleiro (*P. longipetiolatum* e *P. grazielae*), Mata de encosta (*P. cauliflorum* e *P. guineense*), Restinga (*P. brownianum*, *P. cattleianum* e *P. myrtoides*), e áreas antropizadas como pastos, e beiras de estrada (*P. guajava* e *P. guineense*) (Tabela 1).

As espécies coletadas em áreas de Mata de encosta e Mata de tabuleiro (exceto *P. cauliflorum*, que apresenta tricomas na superfície foliar) apresentaram um índice de herbivoria alto, com consistência cartácea e espessura 0.2 - 0.5 mm.

As espécies de áreas de restinga e áreas antropizadas de forma geral (exceto *P. brownianum*) foram menos predadas, e embora tivessem baixo índice glandular apresentaram folhas com consistência coriácea e espessura entre 0.2 – 0.7 mm. Em ambientes com solos pobres em nutrientes e maior exposição à radiação solar o investimento de recursos das plantas em novas folhas é custoso e as espécies tendem a desenvolver folhas mais espessas.

Dessa forma, é possível supor que, a principal defesa física contra herbivoria para as espécies ocorrentes nas áreas estudadas seja o aumento do mesofilo, fazendo com que a espessura da folha seja maior quando comparada com a espessura de uma folha no interior da mata em condição de sombreamento (LARCHER, 1986). O aumento do mesofilo altera a textura das folhas, tornando-as mais rígidas e dificulta a penetração dos aparelhos bucais bem como a digestão por herbívoros (LUCAS et al., 2007; ANGELO; DALMOLIN, 2007). Adicionalmente, dificulta a entrada para patógenos e é uma importante estratégia para diminuir a evapotranspiração em períodos de estresse hídrico (SCHOONHOVEN et al., 2005; LUCAS et al., 2007; ANGELO; DALMOLIN, 2007; FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013).

A partir dos resultados pode-se inferir que maior herbivoria foi encontrada em áreas de Mata de Encosta e Tabuleiro, corroborando a hipótese de que em ambientes com maior disponibilidade de recursos a planta irá investir mais em crescimento e menos em defesa.

5 COSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a presença de sesquiterpenos foi bastante pronunciada em comparação com os monoterpenos nos constituintes voláteis das espécies de *Psidium* estudadas. De maneira geral, pode-se observar que dois compostos foram os mais abundantes nos indivíduos estudados, β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Algumas poucas espécies apresentaram α -pineno e 1,8-cineol como compostos majoritários, o que sugere que estas possuam vias de síntese mais conservadas que as demais, visto que estes provavelmente foram os compostos pioneiros em Myrtaceae.

Apesar dos compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno terem sido os majoritários em grande parte dos indivíduos analisados, muitos outros compostos identificados, como 1,8-cineol, α -pineno, limoneno e α -humuleno foram responsáveis pela formação de distintos grupos, onde até mesmo indivíduos de uma mesma espécie se dispersaram, como foi o caso de *P. guajava* e *P. guineense*.

A grande diversidade de compostos encontrados neste trabalho pode ter ocorrido devido a presença de uma grande família de terpeno sintases, responsáveis pela síntese de terpenos. Apesar de não se saber ao certo quais classes de TPS estão envolvidas na síntese de terpenos em *Psidium*, pode-se ter uma base de sua magnitude ao se analisar dados publicados em *Eucalyptus*, que mostram uma ampla classe de TPS atuando na síntese de terpenos deste gênero.

Com relação ao índice de herbivoria, pode-se observar que de uma forma geral, este foi baixo para todas as espécies evidenciando a importância da composição dos óleos essenciais e estruturas foliares relacionadas com este tipo de defesa.

Foi observado que a variabilidade de compostos presentes nas espécies foi mais importante para evitar a herbivoria do que o número de glândulas que os indivíduos apresentaram. Dessa forma, a diversidade de compostos produzidos pelas espécies pode ser mais eficiente em afastar herbívoros que os compostos encontrados nas espécies com alto índice glandular, neste estudo.

Todas as espécies deste estudo apresentaram maiores quantidades de sesquiterpenos na composição de seu óleo essencial, e estes estão diretamente relacionados na defesa contra microrganismos e predadores, o que pode explicar os baixos índices de herbivoria encontrados para as espécies. No entanto, destaque também

deve ser dado à presença de tricomas e a consistência coriácea das folhas, que também ajudaram na redução da herbivoria, por diminuírem a palatabilidade das folhas.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4^a ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ÂNGELO, A. C.; DALMOLIN, A. Interações herbívoro planta e suas implicações para o controle biológico – que tipos de inimigos naturais procurar? In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; DALMOLIN, A.; SMITH, C. W. (org.). **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**. Curitiba: FUPEF, p. 71-91, 2007.

ATHIKOMKULCHAI, S.; WATTHANACHAIYINGCHAROEN, R.; TUNVICHIEEN, S.; VAYUMHASUWAN, P.; KARN SOMKIET, P.; SAE-JONG, P.; RUANGRUNGSI, N. The development of anti-acne products from *Eucalyptus globulus* and *Psidium guajava* oil. **Journal of Health Research**, v. 22, n. 3, p. 109-113, 2008.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, v. 2, p. 377, 1984.

BHALKE, R.D.; PATEL, S. J.; GIRME, A.S.; ANARTHE, S. J. Major volatile constituent of bark and leaves of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). **Pharmacology online**, v. 3, p. 187-190, 2008.

BEYAERT, I.; KOPKE, D.; STILLER, J.; HAMMERBACHER, A.; YONEYA, K.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J.; HILKER, M. Can insect egg deposition ‘warn’ a plant of future feeding damage by herbivorous larvae? **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, p. 101-108, 2012.

BIEGELMEYER, R.; ANDRADE, J. M. M.; ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DRESCH, R. R.; MARIN, R.; RASEIRA, M. C. B.; HENRIQUES, A. T. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and

Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, 2011.

BOHLMANN, J.; KEELING, C. I. Terpenoid biomaterials. **The Plant Journal**, v. 54, p. 656-669, 2008.

CANAL, Drielli. **Prospecção de genes envolvidos na biossíntese de óleos essenciais em *Psidium guajava* L.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de ciências exatas, naturais e da saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

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

CHALANNAVAR, R. K.; NARAYANASWAMY, V. K.; BAIJNATH, H.; ODHAV, B. Chemical composition of essential oil of *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (Myrtaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p. 8341-8347, 2012.

CHALANNAVAR, R. K.; NARAYANASWAMY, V. K.; BAIJNATH, H.; ODHAV, B. Chemical constituents of the essential oil from leaves of *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 13, p. 783-789, 2013.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-1637, 2009.

DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; RODRIGUES, K. A. F.; BRITO, M. C. A.; ROSA, C. S.; AMARAL, F. M. M.; MONTEIRO, O. S.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; MORAES, D. F. C. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils

Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

DIRZO, R.; DOMÍNGUEZ, C. A. Plant-herbivore interactions in a mesoamerican tropical dry forest. In: **Seasonally dry tropical forest** (BULLOCK, S. H.; MOONEY, A.; MEDINA, E.). Cambridge: Cambridge University Press, p. 305-325, 1995.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.

EL-AHMADY, S. H.; ASHOURA, M. L.; WINK, M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves. **Journal of Essential Oil Research**, 2013.

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

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and fragrance journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, p. 48, 2009.

FREITAS, M. O.; MORAIS, S. M. R. Volatile Constituents of *Psidium myrsinoides* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 5, p. 364-365, 2002.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.4, p.509-530, 2006.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1-27, 2008.

KAMRAN, A.; MISHRA, R. K.; GUPTA, R.; KUMAR, A.; BAJAJ, A. K.; DIKSHIT, A. Therapeutic effects of essential oil from waste leaves of *Psidium guajava* L. against cosmetic embarrassment using phylogenetic approach. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 745-752, 2012.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844-852, 2010.

KHADHRI, A.; MOKNI, R.E.; ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M. E. M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KÖLLNER, T. G.; LENK, C.; SCHNEE, C.; KÖPKE, S.; LINDEMANN, P.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. **Plant Biology**, v.13, n. 15, 2013.

KÜLHEIM, C.; PADOVAN, A.; HEFER, C.; KRAUSE, S. T.; KÖLLNER, T. G.; MYBURG, A. A.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. The Eucalyptus terpene synthase gene family. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.

LANDRUM, L. R. 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex. **Sida**, v. 20, p. 1449-1469, 2003.

LANDRUM, L. R.; FUNCH, L. S. Two New Species of *Psidium* (Myrtaceae) from Bahia, Brazil. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 18, n. 1, p. 74-77, 2008.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1223-1280, 1994.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1986.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1777-1781, 2009.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; NELSON, D. L. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 41-44, 2010.

LUCAS, E. J., HARRIS, S. A., MAZINE, F. F., BELSHAM, S. R., NIC LUGHADHA, E. M., TELFORD, A., CHASE, M. W. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.

MEDEIROS, F. C. M.; MENEZZI, C. H. S. D.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 4, p. 289-292, 2015.

METCALFE, C. R. AND CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1950.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **Plos One**, v. 8, 2013.

MORI, S. A., BOOM, B. M., CARVALINO, A. M., SANTO, T. S. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, v. 15, p. 68-70, 1983.

MU'AZU, K.; ABDULLAH1, M.; INUWA, B.; UMARU, S. M.; ADAM, S. I.; KHALID, M. A. Effect of Different Extraction Method on Yield & Composition of Essential Oil from Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) & *Eucalyptus citriodora* Leave. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v.6, 2016.

NIC LUGHADHA, E. N., PROENÇA, C., A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, p. 480-503, 1996.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Database 69. **NIST Chemistry WebBook**, 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2017.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; ADELEKE, K. A.; EKUNDAYO, O.; KOENIG, W. A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. **Flavour and fragrance journal**, v. 18, p. 136-138, 2003.

OSBOURN, A. Saponins and plant defence-a soap story. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 4-9, 1996.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 2007.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 695-716, 2014.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237-243, 2002.

PINHO, A. I.; WALLAU, G. L.; NUNES, M. E. M.; LEITE, N. F.; TINTINO, S. R.; CRUZ, L. C.; CUNHA, F. A. B.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

PINO, J. A.; QUERIS, O. Differences of volatile constituents between unripe, partially ripe and ripe guayabita del pinar (*Psidium salutare* H.B.K.) fruit macerates. **Food Chemistry**, v. 109, p. 722-726, 2008.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RASMANN, S.; TURLINGS, T. C. J. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, v. 117, p. 362-369, 2008.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249-259, 2014.

RIFFEL, C. T.; PRANDO, H. F.; BOFF, M. I. C. Primeiro relato de ocorrência de *Telenomus podisi* (Ashmead) e *Trissolcus urichi* (Crawford) (Hymenoptera: Scelionidae) como parasitoides de ovos do percevejo-do-colmo-do-arroz, *Tibraca limbativentris* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae), em Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 3 p. 447-448, 2010.

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

SANTOS, F. A.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N.; MANOEL, A. N.; SILVEIRA, E. R. Antibacterial Activity of Essential Oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 67-69, 1997.

SATYAL, P.; PAUDEL, P.; LAMICHHANE, B.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 11-14, 2015.

SCAVRONI, J.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, L. C. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) grown with biosolid. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 4, p. 345-352, 2005.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**, 2^a Ed. Oxford: Oxford University Press, 2005.

SHINODA, T.; NAGAO, T.; NAKAYAMA, M.; SERIZAWA, H.; KOSHIOKA, M.; OKABE, H.; KAWAI, A. Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 587-599, 2002.

SILVA, J. D.; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* ssp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 3, p. 240-243, 2003.

SOARES, F. D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M. O. M.; MONTEIRO, A. R. Volatile and non-volatile chemical composition of the White guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 15-21, 2007.

SOLIMAN, F. M.; FATHY, M. M.; SALAMA, M. M.; SABER, F. R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University**, 2016.

SOUZA, Tércio da Silva de. **Perfil cromatográfico do óleo essencial e diversidade quimiotípica de *Psidium guajava* L.** 2015. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

SOUZA, T. S. FERREIRA, M. S. F.; MENINI, L.; SOUZA, J. L. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. B.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; SILVA, R. F. Essential oil of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in stimulating mycorrhizal sibipiruna seedlings (*Ceasalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 69-78, 2012.

THUAYTONG, W.; ANPRUNG, P. Bioactive Compounds and Prebiotic Activity in Thailand-Grown Red and White Guava Fruit (*Psidium guajava* L.). **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 3, p. 205-208, 2011.

TYAGI, A. K.; BUKVICKI, D.; GOTTARDI, D.; TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. Eucalyptus Essential Oil as a Natural Food Preservative: In Vivo and In Vitro Antiyeast Potential. **BioMed Research International**, 2014.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J. Volatile leaf oils of American Myrtaceae III *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *P. guineense* Sw., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu. **Journal of essential oil research**, v. 7, p. 187-190, 1995.

VASCONCELOS, T. N. C.; PROENÇA, C. E. B.; AHMAD, B.; AGUILAR, D. S.; AGUILAR, R.; AMORIM, B. S.; CAMPBELL, K.; COSTA, I. R.; DE-CARVALHO, P. S.; FARIA, J. E. Q.; GIARETTA, A.; KOOIJ, P. W.; LIMA, D. F.; MAZINE, F. F.; PEGUERO, B.; PRENNER, G.; SANTOS, M. F.; SOEWARTO, J.; WINGLER, A.; LUCAS, E. J. Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 109, p. 113-137, 2017

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Myrtaceae Revisited: A Reassessment Of Infraclassical Groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

WCSP (World Checklist of Selected Plant Families). 2011. **World checklist of selected plant families**. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp>>. Acesso em: 15 de março de 2013.

YAPI, T. A.; BOTI, J. B.; TONZIBO, Z. F.; AHIBO, C. A.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J.; TOMI, F. Chemical Variability of *Xylopi* *quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, 2014.

YÁÑEZ, X.; PINZÓN, M. L.; SOLANO, F.; SÁNCHEZ, L. R. Chemical Composition of the Essential Oil of *Psidium caudatum* McVaugh. **Molecules**, v. 7, p. 712-716, 2002.

ZULAK, K. G.; BOHLMANN, J. Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 86-97, 2010.

7 APÊNDICES

Apêndice 1. Classificação das características de folhas, índice de herbivoria e rendimento de óleo essencial

Características avaliadas	Variáveis	Classificação
Consistência da folha	Cartácea	Baixo
	Cartácea/Coreácea	Médio
	Coriácea	Alto
Espessura da folha (mm)	0,1 - 0,2	Baixo
	>0,2 - 0,5	Médio
	>0,5 - 0,7	Alto
Tricoma	Glabro	Baixo
	Glabroscente	Médio
	Piloso	Alto
Índice glandular (média)	<40	Baixo
	>40 - 80	Médio
	>80 - 150	Alto
	>150	Muito Alto
Tamanho da glândula	Pequena	Baixo
	Grande	Alto
Índice de herbivoria	<1	Baixo
	1 - 1,5	Médio
	>1,5 - 2	Alto
Rendimento de óleo essencial (% m/m)	<0,4	Baixo
	>0,4 - 0,5	Médio
	>0,5	Alto

Apêndice 2. Compostos majoritários (área relativa $\geq 10\%$) em óleos essenciais de espécies pertencentes ao gênero *Psidium*

Espécie	Composto majoritário (% área relativa)	Tipo*	Parte da planta	Local	Referência
<i>P. guajava</i>					
(GuaI)	limoneno (54,7) 1,8-cineol (32,1)	MH MO	Folha	El-Behera (Egito)	Soliman et al., 2016
(GuaII)	(<i>E</i>)-nerolidol (35,5) β -cariofileno (15,8)	SO SH	Folha	Kathmandu, (Nepal)	Satyral et al., 2015
(GuaIII)	epiglobulol (19,2)	SO	Folha	Ceará (Brasil)	Pinho et al., 2014
	1,8-cineol (13,3)	SO			
	Óxido de isoaromadendrenol (11,1) álcool cariofileno (10,2)	SO			
(GuaIV)	viridiflorol (36,4)	SO	Folha	Chenchou (Tunisia)	Khadhri et al., 2014
(GuaV)	germacreno D (16,7)	SH	Caule	Chenchou (Tunisia)	Khadhri et al., 2014
	α -humuleno (10,9)	SH			
	valerenol (10,6)	SO			
(GuaVI)	β -cariofileno (16,9)	SH	Folha	Cairo (Egito)	El-Ahmady et al., 2013
(GuaVII)	β -cariofileno (17,6)	SH	Fruto	Cairo (Egito)	El-Ahmady et al., 2013
	limoneno (11,0)	MH			
(GuaVIII)	β -cariofileno (57,4) etil benzoato (11,3)	SH C ₉ H ₁₀ O ₂	Fruto	Nakorn Ratchasima (Tailândia)	Thuaytong; Anprung, 2011
(GuaIX)	óxido de cariofileno (13,8)	SO	Folha	Lavras (Brasil)	Lima et al., 2009
(GuaX)	1,8-cineol (42,7)	MO	Folha (Paluma)	Lavras (Brasil)	Lima et al., 2008
	α -terpineol (38,7)	MO			
(GuaXI)	selin-11-en-4- α -ol (21,5)	SO	Folha (Pedro Sato)	Lavras (Brasil)	Lima et al., 2008
	1,8-cineol (17,7)	MO			

Continuação...

(GuaXII)	selin-11-en-4- α -ol (21,0)	SO	Folha (século XXI)	Lavras (Brasil)	Lima et al., 2008
	1,8-cineol (18,8)	MO			
	β -cariofileno (12,1)	SH			
(GuaXIII)	selin-11-en-4- α -ol (22.1)	SO	Folha (variedade e selvagem)	Lavras (Brasil)	Lima et al., 2008
	1,8-cineol (12.8)	MO			
(GuaXIV)	α -pineno (23,8)	MH	Folha	Nakhon Nayok (Tailândia)	Athikomkulchai et al., 2008
	óxido de cariofileno (17,2)	SH			
	β -cariofileno (14,3)	SO			
(GuaXV)	limoneno (27,1)	MH	Folha	Ahmednagar (Índia)	Bhalke et al., 2008
	α -farneseno (23.2)	SH			
	β -cariofileno (20,7)	SH			
(GuaXVI)	1,8-cineol (72,7)	MO	Caule	Ahmednagar (Índia)	Bhalke et al., 2008
	β -mirceno (16,1)	MH			
(GuaXVII)	<i>cis</i> -3-hexenil acetato (21,7)	$C_8H_{14}O_2$	Fruto	Santa Tereza (Brasil)	Soares et al., 2007
	<i>trans</i> -3-hexenil acetato (17,8)	$C_8H_{14}O_2$			
	<i>trans</i> -cadina-1.4-dieno (17,1)	SH			
	β -cariofileno (12,9)				
(GuaXVIII)	limoneno (33,3)	MH	Folha	Macas (Equador)	Sacchetti et al., 2005
	α -pineno (29,5)	MH			
	<i>trans</i> -cadina-1.4-dieno (12,7)	$C_8H_{14}O_2$			
(GuaXIX)	limoneno (42,1)	MH	Folha	Ogbomoso (Nigéria)	Ogunwande et al., 2003
(GuaXX)	β -cariofileno (21,3)	SH			
	α -pineno (23,9)	MH	Folha e caule	Belém (Brasil)	Silva et al., 2003
1,8-cineol (21,4)	MO				
(GuaXXI)	β -bisaboleno (19,2)	SH	Folha	Arizona (EUA)	Tucker; Maciarelo, 1995
	β -sesquifelandreno (14,7)	SH			

Continuação...					
<i>P. cattleianum</i>					
(CatI)	α -pineno (28,0) β -mireceno (13,4) β -cariofileno (28,8)	MH MH SH	Folha	El-Behera (Egito)	Soliman et al., 2016
Continuação...					
(CatII)	óxido de cariofileno (29,5)	SO	Folha	KwaZulu-Natal (África)	Chalannavar et al., 2013
(CatIII)	óxido de cariofileno (12,4)	SO	Folha	KwaZulu-Natal (África)	Chalannavar et al., 2012
(CatIV)	β -cariofileno (22,5) β -selineno (10,1) neo-intermedeol (14,0)	SH SH SO	Fruto	Pelotas (Brasil)	Biegelmeier et al., 2011
(CatV)	β -cariofileno (59,9)	SH	Folha	Arizona (EUA)	Tucker; Maciarelo, 1995
<i>P. caudatum</i> (Caud)	terpinen-4-ol (47,7) γ -terpineno (11,5)	MO MH	Folha	Pamplona (Colômbia)	Yáñez et al., 2002
<i>P. guyanensis</i> (Guyan)	1,8-cineol (40,5) β -eudesmol (19,5) α -pineno (13,9)	MH MO SO	Folha	Ceará (Brasil)	Santos et al., 1997
<i>P. aff aerugineum</i> (Aff)	globulol (15,3) α -humuleno (14,4)	SO SH	Folha	Ceará (Brasil)	Santos et al., 1997
<i>P. pohlianum</i> (Poh)	1,8-cineol (63,3) ρ -cimeno (14,1)	MO MH	Folha	Ceará (Brasil)	Santos et al., 1997
<i>P. acutangulum</i> (Acut)	α -pineno (14,8) 1,8-cineol (12,9) β -pineno (10,1)	MH MO MH	Folha e caule	Boa Vista (Brasil)	Silva et al., 2003
<i>P. striatulum</i> (Stri)	β -cariofileno (28,6)	SH	Folha e caule	Carolina (Brasil)	Silva et al., 2003
<i>P. guineense</i>					
(GuiI)	β -bisaboleno (17,4)	SH	Folha e caule	Boa Vista (Brasil)	Silva et al., 2003
(GuiII)	α -pineno (12,8) β -bisaboleno (12,1)	MH SH	Folha	Arizona (EUA)	Tucker; Maciarelo, 1995

Continuação...

<i>P. myrsinites</i>					
(MyrsiI)	β -cariofileno (26,05)	SH	Folha	Maranhão (Brasil)	Dias et al., 2015
	α -humuleno (23,92)	SH SO			
	óxido de cariofileno (10,09)				
(MyrsiII)	óxido de cariofileno (26,1)	SO	Folha	Brasília (Brasil)	Medeiros et al., 2015
<i>P. myrsinoides</i> (Myrsinoi)	β -cariofileno (22,4)	SH	Folha	Brasília (Brasil)	Freitas et al., 2002
	óxido de cariofileno (19,7)	SO			
<i>P. salutare</i> (Sal)	viridiflorol (37,2)	SO	Fruto	Pinar del Río (Cuba)	Pino; Queris, 2008
	epi- α -cadinol (28,7)	SO			
	α -cadinol (12,3)	SO			
<i>P. friedrichsthalianum</i> (Frie)	β -cariofileno (36,8)	SH	Folha	Arizona (EUA)	Tucker; Maciarello, 1995
	β -elemeno (12,8)	SH			
	α -pineno (10,6)	SH			
<i>P. sartorianum</i> (Sart)	α -pineno (16,6)	SH	Folha	Arizona (EUA)	Tucker; Maciarello, 1995
	β -cariofileno (12,3)	SH			

*Monoterpeno Hidrogenado (MH); Monoterpeno Oxigenado (MO); Sesquiterpeno Hidrogenado (SH); Sesquiterpeno Oxigenado (SO).

CAPÍTULO III

Effects of two chemotypes of *Psidium guajava* essential oils in *Spodoptera frugiperda**

*Nas normas da revista “*Journal of Essential Oil Research*”.

Carolina O. Bernardes^a, Hugo B. Zago^b, Tércio S. de Souza^c, Samuel F. da Silva^a,
Drielli Canal^a, Adésio Ferreira^a, Marcia F. S. Ferreira^a

^a*Department of Biology, Federal University of Espírito Santo, Alegre, Brazil;*

^b*Department of Entomology, Federal University of Espírito Santo, Alegre, Brazil;*

^c*Department of Chemistry, Federal Institute of Espírito Santo, Alegre, Brazil;*

^d*Department of Biology, Federal University of Espírito Santo, Alegre, Brazil*

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, (Smith), is an important pest, which may cause harm in relevant cultivations if not controlled. The genus *Psidium* is one of the most promising from the Myrtaceae family. *Psidium* species have showed antimicrobial and insecticidal potential. In this study, the chemical composition of the essential oil of two guava genotypes and their effects were verified upon *S. frugiperda* caterpillars. The chemical composition of the essential oils showed the presence of thirteen components in both genotypes. The major components found in Paluma were, caryophyllene oxide (15.9%), β -caryophyllene (12.1%) and selin-11-en-4- α -ol (10.3%) and in Cortibel VII, β -bisabolol (12.3%). Both essential oils presented repellency effect, under 10 ppm and 100 ppm, to the *S. frugiperda* caterpillars.

Keywords: Fall armyworm; guava; volatile oil; chemical composition; biological activity.

1. INTRODUCTION

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is an important pest, which specially attacks maize, sorghum, cotton and rice cultivations and may cause harm if not controlled (CRUZ, 1995; JUÁREZ et al., 2014). Among the control methods, the use of synthetic insecticides and transgenic plants (Bt maize) have been considered the most common ways of controlling the pest, however,

the first may be toxic and harmful to the environment, besides, both may cause the selection of resistant insects (TAVARES et al., 2009; STORER et al., 2010). Studies that search for an alternative to these management forms, become fundamental in order to apply control methods that may be environmentally correct to contain this and other pests.

The use of essential oils as an alternative on insect pests control has been studied due to the fact that conscious consumers and the low toxicity to the animals, makes their use, as low risk insecticides, grow considerably. Several effects of the essential oils were related on insects, among these, repellency, mortality, hormonal dysfunctions and disturbs that may promote reduction on growth (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Among the major plant families from which the essential oils may be obtained, Myrtaceae presents as remarkable characteristics, secretor structures of essential oil on its vegetative and reproductive organs (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984).

Psidium is one of the most promising genus from the Myrtaceae family and comprehends about 150 species (ELLSHOFF et al., 1995). The chemical composition of the essential oil of several *Psidium* species has been investigated, and mono and sesquiterpenes have been related as major components (EL-AHMADY et al., 2013; SCUR et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Some *Psidium* species, as *P. guajava* and *P. cattleianum* have been showing antimicrobial and insecticidal potential that may be related to its terpene characteristic composition (SATYAL et al., 2015, SCUR et al., 2016). However, the most part of these studies do not consider the used genotype.

Nevertheless, different chemotypes of essential oils from guava cultivars in Brazil have been reported (SOUZA et al., 2017), suggesting the existence of cultivars with more efficient chemotypes for *S. frugiperda* control. Once, guava commercial orchards are generally composed by seedlings of vegetative propagation, and production pruning generates a great quantity of leaf biomass, that could be used as an alternative to the pest control. The aim of this research was to verify the essential oil effects of guava from the cultivar Paluma and Cortibel VII genotype, upon *S. frugiperda* caterpillars, since both genotypes were described presenting different chemotypes (SOUZA et al., 2017).

2. EXPERIMENTAL

2.1 *Plant Material*

Completely expanded leaves were collected from two genotypes of *P. guajava*, Paluma (commercial genotype) and Cortibel VII (obtained from a cross-pollination orchard). The collects were carried out in 14 August 2015, in the morning period (among 07:00 and 09:00 a.m.), in Mimoso do Sul, south of the state of Espírito Santo, Brazil, with latitude of 21° 01' 12,99" South, longitude 41° 17' 13,48" West and altitude of 250 metros. The collect was carried out at chest height (1.3m) and around the trees crown diameter. All the plants presented high leaf biomass quantity and no reproductive structures. The collected material was packed in identified paper bags, which were transported to the Plant Breeding and Genetics Laboratory of the Center of Agrarian Sciences and Engineering of the Federal University of Espírito Santo – CCAE-UFES.

The plant material was shadow-dried at environmental temperature, for around one week to eliminate the humidity and to stabilize the leaves enzymatic content, with the purpose of avoiding changes on the original scent principles (16). The dried leaves were weighted and stored in plastic bags sealed and kept in freezer at -20°C until the extraction of the essential oils.

2.2 *Essential oil extraction*

The essential oils were obtained by hidrodestillation in Clevenger apparatus, in the Laboratory of Plant Samples Prepare of CCAE-UFES. The leaves, which were previously dried (around 100 g of leaves per glass flask) were distilled with 1 L of reverse osmosis water in a deep round glass flask of 2 L for four hours, according to the recommended methodology of Farmacopeia Brasileira for volatile oils (BRASIL, 2010).

The water and oil vapors were mixed and after cooling, the condensation of oil and water molecules occurred, and then were separated by solubility and density difference. The hydrolate was collected and submitted to centrifugation at 12,000 rpm, for 5 minutes. The oil was removed, with the assistance of a micropipette and stored in

flasks protected from light in a freezer at the temperature of -20°C, for posterior analysis (CASTRO et al., 2006; YAPI et al., 2014).

2.3 Determination of the essential oil yield, refraction index and relative density

The yield of the essential oil extracted was determined in triplicate for each genotype. The results were expressed in percentage of essential oil mass (g) in the biomass of dry leaf (g) (% m/m).

The determination of the essential oils refraction index was carried out in the Laboratory of Chemical of the Federal Institution of Espírito Santo – IFES. Two oil drops were put, with the assistance of a micropipette, in a refractometer (Quimis Q767B) with four decimal places, equipped with a thermometer. The equipment was adjusted to the experimental conditions, with the environment temperature equal to 20°C ± 2°C. The reading was carried out accordingly to the scales shown by the equipment, after the closure of the prisms that it is compounded with.

The determination of the essential oils density was carried out in the Laboratory of Plant Samples Prepare of CCAE-UFES, at temperature of 20°C, through the weighting in triplicate of a fixed volume of oil, with the assistance of a micropipette. For the weighting, an analytical balance with four decimal places was used (Shimadzu AUY220).

2.4 Identification of the essential oil constituents

The essential oil samples were analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) and by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE), with the following conditions: the carrier gas used by both detectors was Helium gas, with flood and linear velocity of 2.80 mL. minute⁻¹ and 50.8 cm.second⁻¹ (GC-FID) and 1.98 mL.minute⁻¹ and 50.9 cm.second⁻¹ (GC-MS); the injector temperature was of 220°C in the split ratio of 1:30; a 30 m x 0.25 mm fused silica capillary column was used, and a stationery phase Rtx[®]-5MS (0.25 µm of film thickness) was applied. The oven temperature programming: initial temperature of 40°C, for three minutes, followed by a

gradual temperature increase of $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{minute}^{-1}$ until it reached a temperature of 180°C , which was maintained for ten minutes, with a total analysis time of 59.67 minutes; the temperature used for the FID detector was of 240°C and in MS of 200°C .

A volume of $1\ \mu\text{L}$ of a solution of 3% of the essential oil diluted in hexane with DMA $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (external pattern for reproducibility control) was withdraw from the vials, which contained the samples, for the analyses. The analyses by GC-MS were carried out in an equipment by electronic impact, with impact energy of 70 eV; carriage velocity of 1000; carriage interval of $0.50\ \text{fragments}\cdot\text{second}^{-1}$ and fragments detected from twenty-nine to 400 (m/z). The analyses by GC-FID were carried out by a flame formed by H_2 and atmospheric air with temperature of 300°C . Floods of $40\ \text{mL}\cdot\text{minute}^{-1}$ and $400\ \text{mL}\cdot\text{minute}^{-1}$ for H_2 and air were used, respectively. The ions detection occurs when the organic compounds present in the sample are mixed with the carrier gas (He), and a chain, proportional to the quantity of these compounds in the sample, is produced. If only He and H_2 were mixed, a little chain would be produced among the electrodes.

To identify the components present in the essential oils, a comparison of the mass spectrum obtained, with the ones available in the data bank of the spectrotec (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) and by the Kovats retention indexes (KI), was carried out. To calculate KI, a mixture of saturated alkanes $\text{C}_7\text{-C}_{40}$ (Supelco-USA) was used, and the retention time was adjusted from each component obtained through GC-FID, comparing the calculated values for each component, with the data from literature (ADAMS, 2007, EL-SAYED, 2016; NIST, 2017).

The relative percentage of each essential oil component was calculated through the rate among the integral peak area and the total area of all the samples components, data obtained by the analyses carried out in GC-FID. For the identification of the chromatographic profile, components with relative area higher or equal to 0.5% were considered and to define the major components, an area higher than 10% was considered.

2.5 Creation of *Spodoptera frugiperda*

The caterpillars used on the tests were obtained from the *S. frugiperda* creation kept in the entomology sector from NUDEMAFI (Nucleus of Scientific and

Technologic Development in Phytosanitary Management of Pests and Diseases) of CCAE-UFES.

The adults of *S. frugiperda* were created in PVC cages (15 cm of diameter x 20 cm of height). The cages were involved by sulfite paper, where the posture was carried out. In the interior part of the PVC cage, a solution of sugar-cane syrup at 10% was offered as a source of nutriment for the adults.

After the postures, the egg masses were collected from the sulfite paper through cuts with scissors, then, they were kept in plastic circular gerbox (12 cm diameter x 9 cm height) where they remained until larval phase. The caterpillars were transferred, with the assistance of a brush with thin bristles, to acrylic recipients (3cm diameter x 5cm height) containing 5g of artificial diet based on beans, wheat germ and beer yeast suggested by Nalim (1991), where they were kept until completing four days old. After this period, the caterpillars were individualized in acrylic recipients (6cm diameter x 2cm height), fed with the same artificial diet, until completing pupae phase.

2.6 Biological tests

The tests were carried out in 15 May 2016, at the Laboratory of Plant Samples Prepare of CCAE-UFES. The following methodology was adopted for the preparation of both, Paluma and Cortibel VII essential oil. First, the essential oil was diluted in ethanol/ distilled water 1:1 v/v, on 10 and 100 ppm concentrations. This solution was stored in a deep round glass flask involved by aluminum paper at 4°C, for posterior use. The treatments were: Treatment 1 – essential oil solution with ethanol/ distilled water 1:1 proportion, at 10 ppm; Treatment 2 – essential oil solution with ethanol/ distilled water 1:1 proportion, at 100 ppm; Treatment 3 – ethanol/ distilled water solution 1:1 proportion; Treatment 4 – distilled water (TRABOULSI et al., 2002; LIMA et al., 2009). All the treatments were prepared moments before the tests setting.

2.7 Preference test with chance of choice

Fresh maize leaves were collected in the morning, in the experimental field of the Federal Institute of Espírito Santo, IFES-Alegre. The leaves were cut into sections with dimensions of 4cm x 4cm. After, the leaves were washed with distilled water and

put into a Becker containing distilled water and sodium hypochlorite (10%), during five minutes. Subsequently, the leaves were rinsed with distilled water and put upon filter paper to dry. After dried, each leaf section was immersed in each of the four treatments, for ten seconds and were vertically disposed upon towel paper for ten minutes, so that the excess of solution was withdraw.

Four leaf sections, corresponding to each one of the treatments, were disposed equally distant in Petri dishes of 14 cm diameter, covered with filter paper moistened with distilled water. After the schematization of the treated leaves in the Petri dishes, twenty caterpillars from the maximum of 24 hours old (first instar) were released in the center of each Petri dish. The plates were closed with plastic film, which was perforated by a needle for aeration. Ten replicates were used; each one consisted of one of the Petri dishes, with the twenty caterpillars. The plates were kept in acclimatized chambers with temperature of $25 \pm ^\circ\text{C}$, with photo phase of 12 hours. The caterpillars were counted in each leaf section, at twenty-four, forty-eight and seventy-two hours, after their release in the Petri dishes (CASTRO et al., 2006; LIMA et al., 2009).

2.8 Preference test without chance of choice

For the test without chance of choice, Petri dishes with 10cm diameter were used, the leaf sections were treated and obtained with the same methodology described on the above item. However, leaf sections correspondent to each one of the four treatments were put individually in the Petri dishes (one leaf section per plate), which contained a filter paper moistened with distilled water. Afterwards, ten caterpillars were released upon the leaves with the respective treatments. The plates were closed with plastic film perforated by a needle for aeration. Four treatments were carried out with six replicates, which consisted of each one of the Petri dishes, with the ten caterpillars.

The plates were stored in acclimatized chambers with temperature of $25 \pm ^\circ\text{C}$, with photo phase of 12 hours. The mortality of the caterpillars was evaluated at forty-eight and ninety-six hours. After the first forty-eight hours, the leaf sections were changed by new ones, which passed by the same procedure. The test continued to be evaluated the same way, nevertheless, the caterpillars that were in the plates were kept the same (LIMA, 2006).

2.9 Statistic analysis

Data from yield and oil density were submitted to the variance analysis and the means were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). For the tests with and without chance of choice, the completely randomized design was used. The results were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). Data from the tests with and without chance of choice were transformed in $\sqrt{x+0.5}$, before the analyses. All the statistical analyses were carried out with the R program (R, 2016).

3. RESULTS

3.1 Chromatographic profile of the essential oils

Paluma and Cortibel VII essential oils presented slightly viscous and yellow appearance. Both oils did not differ statistically regarding yield extraction and density and presented similar refraction indexes (Table 1).

Table 1. Mean of the extraction yield and physical properties of Paluma and Cortibel VII essential oils

Genotypes	Extraction yield* (% m/m)	Density* 20°C (g/cm ³)	Refraction index 20°C (η)
Paluma	0.40a	0.88a	1.4955
Cortibel VII	0.45a	0.88a	1.4915

Extraction yield (based on dry biomass); *Data submitted to ANOVA. Means followed by the same lowercase letter in the vertical do not differ among each other by Tukey test ($P < 0.05$)

Different compositions of the essential oil were confirmed for the two studied genotypes (Table 2). The sesquiterpenes presented notability on the constitution of Paluma and Cortibel VII essential oils supplying 57.0% (17.8% - hydrocarbon sesquiterpenes; 39.2% - oxygenated sesquiterpenes) and 37.4% (11.4% - hydrocarbon sesquiterpenes; 26.0% - oxygenated sesquiterpenes) of the totality of components found in these oils, respectively. The other components appeared in a small proportion and

were identified as oxygenated monoterpenes (5.7% in Paluma and 4.0% in Cortibel VII) (Table 2).

It was possible to identify thirteen components, on Paluma essential oil. From this total, three components were considered major, as caryophyllene oxide (15.9%), β -caryophyllene (12.1%) and selin-11-en-4- α -ol (10.3%) when a relative area higher than 10% was considered (Table 2).

On Cortibel VII essential oil, thirteen components were also found. Among these, β -bisabolol (12.3%) was considered major with a relative area higher than 10% was considered (Table 2).

Table 2. Percentage content of twenty-one chemical components found in the essential oils extracted from leaves of two *Psidium guajava* genotypes, Paluma and Cortibel VII, considering the components with relative area $\geq 0.5\%$

N	Components	Retention index		Composition (% Relative Area)	
		Calculated	Reported*	Paluma	Cortibel
01	1,8-cineole	1031	1026	4.5	3.4
02	α -terpineol	1190	1186	1.2	0.6
03	α -copaene	1375	1374	1.2	-
04	β -caryophyllene	1419	1417	12.1	5.9
05	aromadendrene	1438	1439	2.5	-
06	α -humulene	1452	1452	1.5	-
07	alloaromadendrene	1459	1461	0.5	-
08	α -acoradiene	1463	1464	-	0.6
09	α -curcumene	1483	1479	-	3.4
10	eremophilene	1485	1486	5.6	-
11	β -curcumene	1512	1514	-	0.7
12	β -sesquiphellandrene	1524	1521	-	0.8
13	<i>trans</i> -sesquisabinene hydrate	1533	1530	-	0.9
14	<i>trans</i> -nerolidol	1567	1561	2.3	6.4
15	caryophyllene oxide	1583	1582	15.9	4.2
16	cedrol	1597	1600	-	1.2
17	δ -cadinol	1634	1636	3.8	-

18	selin-11-en-4- α -ol	1639	1638	10.3	-
19	cubenol	1643	1645	1.3	-
Continuação...					
20	β -bisabolol	1673	1674	-	12.3
21	α -bisabolol	1685	1685	-	1.0
Identified Total		-	-	62.7	41.4
Hydrocarbon Monoterpenes		-	-	-	-
Oxygenated Monoterpenes		-	-	5.7	4.0
Hydrocarbon Sesquiterpenes		-	-	17.8	11.4
Oxygenated Sesquiterpenes		-	-	39.2	26.0

N (Number of chemical components); CalRI (Calculated Retention Index); TabRI (Retention Index, table). *Adams (2007).

3.2 Biological tests

On the tests with chance of choice, with Paluma essential oil, it was not observed significant difference on the behavior of *S. frugiperda* first instar caterpillars after twenty-four hours from the beginning of the treatments. However, on the evaluations at forty-eight and seventy-two hours it was observed a reduction on the number of caterpillars on the leaf sections treated with essential oil under the concentration of 100 ppm (Table 3).

Regarding Treatment 3 (Leaves treated with the solution ethanol/ distilled water) and 4 (leaves treated with distilled water), the caterpillars presented a similar behavior, at twenty-four hours and at seventy-two hours what demonstrates that the ethanol used on the essential oil dilution was not the cause of the caterpillars repellency. It was observed a preference by the caterpillars on the treatment with the lower dose of essential oil (10 ppm) in relation to the higher one (100 ppm) at seventy-two hours with Paluma essential oil (Table 3).

For the tests with chance of choice, with Cortibel VII essential oil, at twenty-four hours, it was observed the caterpillars preference by the treatment with 100 ppm of essential oil. At forty-eight hours there was no preference between the treatments. With

seventy-two hours the caterpillars presented preference, by the treatments with 10 ppm of essential oil and the treatment with ethanol/distilled water (Table 3).

As it refers to the treatments with water and ethanol/ distilled water, in general, the caterpillars presented preference by ethanol/ distilled water, showing that the ethanol used on the essential oil dilution did not cause the caterpillars repellency (Table 3)

Table 3. Mean number (\pm standard deviation) of *Spodoptera frugiperda* caterpillars upon leaves sections of maize treated with Paluma and Cortibel VII essential oil, with chance of choice

Treatments	*Mean number of caterpillars (Paluma essential oil)		
	24 hours	48 hours	72 hours
1. Essential oil (10 ppm)	1.7 \pm 0.8 aA	1.4 \pm 0.6 abA	1.5 \pm 0.5 aA
2. Essential oil (100 ppm)	1.3 \pm 0.5 aA	1.3 \pm 0.5 bA	1.0 \pm 0.4 bA
3. Ethanol/ distilled water	1.5 \pm 0.7 aA	1.9 \pm 0.5 aA	1.4 \pm 0.5 abA
4. Distilled water	1.7 \pm 0.7 aA	1.7 \pm 0.6 abA	1.3 \pm 0.6 abA
CV(%)	44.78	36.85	38.50
Treatments	*Mean number of caterpillars (Cortibel VII essential oil)		
	24 hours	48 hours	72 hours
1. Essential oil (10 ppm)	1.6 \pm 0.7 abA	1.7 \pm 0.7 aA	1.4 \pm 0.6 abA
2. Essential oil (100 ppm)	2.0 \pm 0.6 aA	1.6 \pm 0.5 aAB	1.2 \pm 0.5 bB
3. Ethanol/ distilled water	1.9 \pm 0.9 abA	1.9 \pm 0.9 aA	1.9 \pm 0.8 aA
4. Distilled water	1.3 \pm 0.6 bA	1.3 \pm 0.5 aA	1.2 \pm 0.5 bA
CV(%)	43.40	40.18	43.26

*Means obtained by $\sqrt{x+0.5}$ transformation. Means followed by the same lowercase letter among lines and by the same capital letter among columns, do not differ statistically from each other by Tukey test ($P < 0.05$).

For the tests without chance of choice there was an increase on the caterpillars mortality on the treatments with Paluma essential oils after ninety-six hours from the beginning of the treatment on both concentrations (Table 4). At ninety-six hours, it was also observed a lower mortality rate on the caterpillars that were consuming leaf sections treated with only water. For the treatments with Cortibel VII essential oil, no significant differences were observed among either treatments by the Tukey test ($P < 0.05\%$).

Table 4. Mean Mortality (\pm standard deviation) of *Spodoptera frugiperda* caterpillars treated with Paluma and Cortibel VII essential oils, without chance of choice

*Mean of dead caterpillars (Paluma essential oil)		
Tratamentos	48 hours	96 hours
1. Essential oil (10 ppm)	8.5 \pm 1.1 aA	10.0 \pm 0.0 aB
2. Essential oil (100 ppm)	8.5 \pm 0.9 aA	9.8 \pm 0.3 aB
3. Ethanol/ distilled water	7.8 \pm 2.4 aA	10.0 \pm 0.0 aA
4. Distilled water	6.1 \pm 2.1 aA	7.5 \pm 1.7 bA
CV(%)	25.59%	10.26%
*Mean of dead caterpillars (Cortibel VII essential oil)		
1. Essential oil (10 ppm)	8.5 \pm 1.1 aA	9.3 \pm 0.4 aA
2. Essential oil (100 ppm)	9.0 \pm 1.1 aA	9.6 \pm 0.0 aA
3. Ethanol/ distilled water	7.0 \pm 2.0 aA	8.3 \pm 1.8 aA
4. Distilled water	7.5 \pm 1.6 aA	8.3 \pm 1.3 aA
CV(%)	21.10%	14.91%

*Means followed by the same lowercase letter among lines and by the same capital letter among columns, do not differ statistically from each other by Tukey test ($P < 0.05$)

4 DISCUSSION

4.1 Chromatographic profile of the essential oils

The chemotypes difference among the studied genotypes was confirmed in this work, as reported by Souza et al. (2017). In spite of Paluma and Cortibel VII leaves used for the essential oil extraction belong to the same species, and were collected in the same field experiment, that is, with the same agronomical conditions, temperature, luminosity and water available, differences on the essential oils composition occurred.

Such difference, on the composition of Paluma and Cortibel VII essential oils, may have occurred by influence of genetic factors (SOUZA et al., 2017). Essential oils are volatile products, part of complex natural mixtures that are resultant from the aromatic plants secondary metabolism (BAKKALI et al., 2008). Any factor that may affect the metabolic pathways from which the essential oils are synthesized, will also affect the final product.

Other authors found several substances in common with the ones FOUND in this work, on *P. guajava* essential oil. El-Ahmady et al. (2013), also analyzed *P. guajava* and found forty-two components, among these, β -caryophyllene (16.9%) was the major component. Souza et al. (2017) analyzed twenty-two guava genotypes and found sixteen major components. In all the genotypes, the components that presented higher mean values, on the relative proportions of the oil were β -caryophyllene (16.0%), α -humulene (11.4%) and β -bisabolol (8.8%). On the present work, the presence of two of these components, here also identified as major components β -caryophyllene and β -bisabolol, besides the presence, even in a lower quantity of α -humulene, corroborates what was found by Souza et al. (2017).

Some of the identified components were reported in several researches showing insecticidal activities. The insecticidal activity of *Pistacia lentiscus* essential oil was confirmed when it was tested against *Ectomyelois ceratoniae* and *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (BACHROUCH et al., 2008). Altogether, thirty-three components were found, which the major ones were terpinen-4-ol (23.3%), β -caryophyllene (22.2%) and α -terpineol (7.2%). Alshebly et al. (2017) studied the insecticidal effect of *Hedychium larsenii* (Zingiberaceae) essential oil, against three mosquitoes (*Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*), where α -curcumene and epi- β -bisabolol were considered the major components and insecticidal effect was found.

Obeng-Ofori et al. (1997) found 1,8-cineole (37.0%) as the major component on *Ocimum kenyense* (Ayobangira) essential oil and tested the component isolated (with 98% purity), through toxicological and repellency tests against some insects of stored grains, *Sitophilus granarius* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae); *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae) and obtained positive results. Prates et al. (1998), also tested the component 1,8-cineole isolated against *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and the results confirmed the insecticidal activity of this component upon these pests.

Even though 1,8-cineole have appeared in a smaller proportion in the present study, it is possible that it may have potentized the activity performed by Paluma and Cortibel VII essential oils.

4.2 Biological tests

Despite the use of plants with insecticidal properties be an antique practice, the essential oils of these plants have reappeared as an object of research, and have been studied as an alternative to the integrated pest management (ISMAN, 2006; KNAAK et al., 2012). This way, insecticide plants have been evaluated with the aim to reduce *S. frugiperda* population, in a way that it does not cause economic damage (KNAAK et al., 2012).

Several terpenes and terpenoids present in essential oils perform their activity on the insects through their neurotoxic effects. This way, the activities of the essential oils happen due to mechanisms that affect neurotoxic targets as, inhibition of cytochrome P450 (REGNAULT-ROGER et al., 2012), inhibition of acetylcholinesterase activity (VIEGAS JÚNIOR, 2003), blockage of *octopamine* receptors binding sites (ENAN, 2001), inhibition of ionotropic GABA receptors (PRIESTLEY et al., 2003), altering efficiently the cellular activity and biological processes on insects. However, the efficacy of the essential oils varies according to the chemical profile of their components and with the entomological target (REGNAULT-ROGER et al., 2012).

Due to the complexity of the number of components found in the essential oils, it may not be accurately determined which component(s) is responsible for the alteration on the behavior and physiology of the insects. Nevertheless, studies with some isolated components may be developed to verify the efficacy of the activity, or even it may be suggested that determined components in conjunct could have performed any alteration on the insects.

On this research, Paluma essential oil presented three sesquiterpenes as major components, β -caryophyllene (12.1%), caryophyllene oxide (15.9%) and selin-11-en-4- α -ol (10.3%) (Table 5). The sesquiterpenes show a series of biological properties including from defense against herbivores to chemical information that are responsible to point when the plant-insect interaction occurs (DEGENHARDT et al., 2003; ENGELBERTH et al., 2004).

Lima et al. (2009) reported repellent effect of the essential oil extracted from *P. guajava* cv. Pedro Sato leaves, in *S. frugiperda*. The essential oil was characterized with 81.9% of sesquiterpenes, with the major componentes: caryophyllene oxide (13.8%); β -caryophyllene (7.2%) and 1,8-cineole (7.0%).

Tripathi & Upadhyay (2009) found in the essential oil of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaves, four major components, sabinene (41.0%), terpinen-4-ol (12.3%), β -pinene (10.0%) and β -caryophyllene (8.0%) also identified as major component in the present work. The authors attributed to the conjunct work of these major components, the insecticidal/repellent effect found against four pests of stored grains, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae), *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Gleiser and Zygadlo (2007) studied the effects of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) essential oil, against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and observed that the composition of both essential oils was quantitatively similar; however, β -caryophyllene was an important component present in *L. turbinata* oil. Because only *L. turbinata* essential oil had induced a significantly higher mortality to the adult females, it was considered that β -caryophyllene was the component, which performed the most important role in the essential oil activity.

The component caryophyllene oxide joined with β -caryophyllene were identified as major in *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) essential oil (ORTEGA et al., 2015). The insecticidal activity of this oil was verified in *S. frugiperda* caterpillars and the obtained results demonstrated insecticidal and insectistatistical activities against the pest. The major components found in *S. ballotiflora* essential oil, caryophyllene oxide (15.9%) and β -caryophyllene (12.7%) were considered responsible for conferring the referred insecticide and insectistatistical activities of the experiment.

Cortibel VII essential oil presented different composition from the one found in Paluma. As major component, β -bisabolol (12.3%) was identified in this oil. In spite of β -caryophyllene and caryophyllene oxide had not been presented as major components in Cortibel VII, they were also present on this genotype essential oil with a lower quantity when compared with Paluma (6.0% and 4.2% respectively) and they may be responsible for the repellency activity promoted by the oil in *S. frugiperda* caterpillars (Table 5).

Larvicidal activity from *Clausena dentata* essential oil was found in *Aedes aegypti* larva, and in the essential oil composition, four major components were found, among them β -bisabolol (RAJKUMAR; JEBANESAN, 2010). For the determination of the exact component that was responsible by the activity, isolated studies must be

carried out, nevertheless, it is suggested that the major components in conjunct had larvicidal activity, what demonstrates that special attention must be paid to each of the found components.

The components identified either in Paluma or in Cortibel VII essential oils presented repellency effect against *S. frugiperda* caterpillars, despite the difference in their composition. Nevertheless, when mortality was studied, only Paluma essential oil was efficient.

5 CONCLUSION

Paluma and Cortibel VII essential oils presented different major components. In Paluma, the major components were caryophyllene oxide (15.9%), β -caryophyllene (12.1%) and selin-11-en-4- α -ol (10.3%) and in Cortibel VII only β -bisabolol (12.3%) was identified as a major component.

Both essential oils presented repellency effect, under the evaluated concentrations, to *S. frugiperda* caterpillars. The repellency effect was higher with the increase on the exposure time of the caterpillars to the treatments, for both evaluated cultivars. Nevertheless, for mortality, only Paluma essential oil was efficient.

The effects found in this study are related to the distinct essential oil chemotypes previously demonstrated and that are confirmed here.

6 DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Foundation for Research and Innovation Support of Espírito Santo (FAPES), and to the Coordination of improvement of higher level personnel (CAPES) for the financial support and opportunity to carry out this work, and to the Federal Institute of Espírito Santo by the support.

8 REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4^a Ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ALSHEBLY, M. M.; ALQAHTANI, F. S.; GOVINDARAJAN, M.; GOPINATH, K.; VIJAYAN, P.; BENELLI, G. Toxicity of ar-curcumene and epi- β -bisabolol from *Hedychium larsenii* (Zingiberaceae) essential oil on malaria, chikungunya and St. Louis encephalitis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, p. 149-157, 2017.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, Viçosa: UFV, v. 2, p. 377, 1984.

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

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D. P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho: na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, p. 45, 1995.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I. T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: Engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 169-176, 2003.

EL-AHMADY, S. H.; ASHOURA, M. L.; WINK, M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves. **Journal of Essential Oil Research**, 2013.

ELLSHOFF, Z. E.; GARDNER, D. E.; WIKLE, C.; SMITH, C.W. Annotated bibliography of the genus *Psidium*, with emphasis on *P. cattleianum* (strawberry guava) and *P. guajava* (common guava), forest weeds in Hawaii. Cooperative National Park Resources Studies Unit, University of Hawai'i at Manoa, Department of Botany. **Technical Report 95**, p. 102, 1995.

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

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 130, p. 325-337, 2001.

ENGELBERTH, J.; ALBOR, H. T.; SCHMELZ, E. A.; TUMLINSON, J. H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1781-1785, 2004.

GLEISER R. M.; ZYGADLO J. A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 101, p. 1349-1354, 2007.

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

JUÁREZ, M. L.; SCHÖFL, G.; VERA, M. T.; VILARDI, J.C.; MURÚA, M. G.; WILLINK, E.; HÄNNIGER, S.; HECKEL, D. G.; GROOT, A. T. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v, 152, p. 182-199, 2014.

KNAAK, N.; TAGLIARI, M. S.; MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas Mediciniais Sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, v.7, n.1, p.1-6, 2012.

LIMA, Rafaela Karin. Dissertação. **Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2006.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1777-1781, 2009.

METCALFE, C. R. AND CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Oxford: Claredon Press, v.2, 1950.

NALIN, D. N. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) – (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. Tese (Doutorado em Agronomia/ Entomologia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Database 69. **NIST Chemistry WebBook**, 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2017.

OBENG-OFORI, D.; REICHMUTH, C. H.; BEKELE, J.; HASSANALI, A. Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 237-243, 1997.

ORTEGA, N. C. C.; CHÁVEZ, M. M. G.; BRITO, R. F.; MACÍAS, A. F.; ASUNCIÓN, D. R.; GONZÁLEZ, D. E. M.; MORENO, V. P.; LÓPEZ, M. A. R. Composition of the Essential Oil of *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) and Its Insecticidal Activity. **Molecules**, v. 20, p. 8048-8059, 2015.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M.; FABRIS, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; FOSTER, J. E. Insecticidal Activity of Monoterpenes Against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 243-249, 1998.

PRIESTLEY, C. M.; WILLIAMSON, E. M.; WAFFORD, K. A.; SATTELLE, D. B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 1363-1372, 2003.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

SATYAL, P.; PAUDEL, P.; LAMICHHANE, B.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 11-14, 2015.

SCUR, M.C.; PINTO, F. G. S.; PANDINI, J. A.; COSTA, W. F.; LEITE, C. W.; TEMPONI, L. G. Antimicrobial and antioxidant of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian of Journal Biology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2016.

SOUZA, T. S. FERREIRA, M. S. F.; MENINI, L.; SOUZA, J. L. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. B.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; JÚNIOR, S. L. A.; FREITAS, S. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 384-388, 2009.

TRABOULSI, A. F.; TAOUBI, K.; EL-HAJ, S.; BESSIERE, J. M.; RAMMAL, S. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, v. 58, p. 491-495, 2002.

TRIPATHI A. K.; UPADHYAY, S. Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 29, n. 4, p. 219-228, 2009.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

YAPI, T. A.; BOTI, J. B.; TONZIBO, Z. F.; AHIBO, C. A.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J.; TOMI, F. Chemical Variability of *Xylopi*a *quintasii* Engl. & Diels Leaf Oil from Côte d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, 2014.