



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

BEATRIZ STEFFANIE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE
Plectranthus CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE E AVALIAÇÃO
DO SEU POTENCIAL ACARICIDA SOBRE O *Tetranychus urticae*.**

Recife

2024

BEATRIZ STEFFANIE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE
Plectranthus CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE E AVALIAÇÃO
DO SEU POTENCIAL ACARICIDA SOBRE O *Tetranychus urticae*.**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado (a) em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Martins de Moraes

Recife

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Beatriz
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE PLECTRANTHUS
CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ACARICIDA
SOBRE O TETRANYCHUS URTICAE. / Beatriz Silva. - 2024.
76 f. : il.

Orientador: Marcilio Martins de Moraes.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife,
2024.

1. Plectranthus. 2. Composição química. 3. Óleo essencial. 4. Tetranychus urticae.. I. Moraes, Marcilio
Martins de, orient. II. Título

CDD

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

BEATRIZ STEFFANIE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE
Plectranthus CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE E AVALIAÇÃO
DO SEU POTENCIAL ACARICIDA SOBRE O *Tetranychus urticae*.**

Aprovada em: 31 de julho de 2024.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcilio Martins de Moraes – Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara – 1º avaliador
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Carolina Alves de Araújo – 2º avaliadora EREM
Padre Osmar Novaes (EREMPON)

Dedico este trabalho a minha avó Berenice que, infelizmente, não pôde acompanhar fisicamente o meu processo até o final, mas deixou-me a mais pura motivação: as lembranças de nós e a honra de ser sua neta.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e provar o tempo todo que se faz presente em minha vida. E agradeço eternamente a minha avó Berenice que descansou poucos meses antes da conclusão do meu curso, mas continuou a me guiar e proteger, inspirando-me a seguir em frente no momento mais difícil da minha vida. Suas bênçãos e memórias foram fundamentais para a realização deste trabalho. Espero que estejas orgulhosa de mim, vovó.

Agradeço a minha família, em especial meus pais, Edivânia e Bordabery, e meu padrasto, Rodrigo, meus irmãos, Maria Alice e Kauã, minha avó Severina, minha tia Solange e meus primos Bruno e Vitória, por sempre buscar compreender minha rotina, por demonstrar orgulho e se alegrar comigo a cada conquista.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu professor orientador, Marcilio Martins. Primeiramente por confiar no meu potencial desde as aulas de Química Orgânica IV, e em segundo lugar, por me dar a oportunidade de conhecer uma área fantástica da química e trabalhar nela. Sua orientação, paciência e incentivo durante todo o processo de elaboração desta monografia foram fundamentais para que desse certo. Muito obrigada, professor.

Agradeço aos meus colegas do LPNBio, Alice, Ariadna, Carol, Carlos, Larissa, Lucas, Mabson, Mirian, Rodolfo, Sara, Sérgio, Thales, Tchiara, Yara e Elaine que generosamente contribuíram neste trabalho e me acolheram desde o primeiro dia.

Agradeço à escola onde estudei, Fundação Bradesco, e a todos meus professores que me acompanharam do ensino fundamental ao ensino médio, os quais tenho um enorme sentimento de gratidão, admiração e respeito.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aqueles que me mostraram o verdadeiro significado de amizade, Lucas, Daiane e Willyane. A Lucas, que sempre esteve comigo nos melhores e piores momentos, na vida pessoal e acadêmica e que juntos encerramos um ciclo no ensino médio e embarcamos nessa jornada, construindo um novo e mais complexo ciclo, porém que não deixou de ser maravilhoso ao seu lado. Obrigada por tudo. A Daiane, minha parceira número um no laboratório que faz o possível para me ver bem e feliz. E a Willyane, que me encheu de trabalhos acadêmicos e me fez aprender muito sobre sala de aula e materiais didáticos. A amizade e o apoio incondicional de vocês foram essenciais para que eu pudesse

superar os desafios e alcançar este objetivo. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

A vida pode ser tão instável quanto o clima. Mudando constantemente, nunca estagnando. Nem sempre vai ficar ensolarado, mas a neve também não dura para sempre (Tanjirō Kamado).

RESUMO

As plantas são organismos vivos capazes de produzir metabólitos secundários como mecanismo de defesa e desenvolvimento. O que estimula a ativação do metabolismo secundário são alterações nas condições naturais necessárias para sobrevivência da planta, denominadas de estresses bióticos ou abióticos. Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de constituintes oriundos do metabolismo secundário das plantas, e apresentam diferentes propriedades biológicas, desde para fins medicinais a controle de pragas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a variação da composição química dos OEs de duas espécies do gênero *Plectranthus* (*P. barbatus* e *P. ornatus*) sob condições controladas de estresse e o potencial antioxidante e acaricida frente ao *Tetranychus urticae* (ácaro rajado). As espécies foram separadas em grupos e submetidas em condições diferentes de estresse: Predação manual (PM), salicilato de metila (SM), jasmonato de metila (MJ), salino (S), escassez hídrica (E), radiação ultravioleta (UV), e o grupo sem nenhum estresse (controle). Os OEs foram obtidos por meio de hidrodestilação e a composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG-MS). Os dados foram submetidos a análises multivariadas (PCA, *heatmap* e rede molecular). A atividade acaricida foi avaliada de forma comparativa através da CL₉₀ do controle positivo Azamax e a atividade antioxidante pelos métodos ABTS^{·+} e DPPH[·]. Para ambas espécies, a composição química identificada nos grupos controle obteve predominância de constituintes derivados dos sesquiterpenos, tendo como constituinte majoritário o (*E*)-cariofileno. Entretanto, nos grupos estressados, os monoterpenos se apresentaram em maiores percentuais, diminuindo significativamente o percentual do composto majoritário do controle. Essa variação foi confirmada por todas análises multivariadas utilizadas. Os OEs de ambas espécies apresentaram baixa atividade acaricida contra o ácaro rajado, tendo como taxas de mortalidade iguais a 12,00% (*P. barbatus*) e 22,72% (*P. ornatus*). A *P. barbatus* desempenhou melhor atividade antioxidante por ABTS^{·+} (62,74µg/ml) enquanto a *P. ornatus* apresentou para DPPH[·] (163,50µg/ml). Entretanto, comparado aos controles positivos Trolox (4,13µg/ml) e ácido ascórbico (1,62µg/ml), respectivamente, as atividades apresentadas pelas duas espécies foram relativamente baixas. Portanto, foi possível verificar que os OEs dessas espécies apresentam atividades antioxidantes e acaricida, ainda que baixas, e que diferentes condições de estresse alteram a composição química da planta.

Palavras-chave: *Plectranthus*, Composição química, Óleo essencial, *Tetranychus urticae*.

ABSTRACT

Plants are living organisms capable of producing secondary metabolites as a defense and development mechanism. What stimulates the activation of secondary metabolism are changes in the natural conditions necessary for the survival of the plant, called biotic or abiotic stresses. Essential oils (EOs) are complex mixtures of constituents originating from the secondary metabolism of plants, and have different biological properties, from medicinal purposes to pest control. Thus, the objective of this study was to investigate the variation in the chemical composition of EOs from two species of the genus *Plectranthus* (*P. barbatus* and *P. ornatus*) under controlled stress conditions and the antioxidant and acaricidal potential against *Tetranychus urticae* (spotted spider mite). The species were separated into groups and subjected to different stress conditions: manual predation (PM), methyl salicylate (SM), methyl jasmonate (MJ), saline (S), water scarcity (E), ultraviolet radiation (UV), and the group without any stress (control). The EOs were obtained by hydrodistillation and the chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrum (GC-MS). The data were subjected to multivariate analyses (PCA, heatmap and molecular network). The acaricidal activity was evaluated comparatively through the LC90 of the positive control Azamax and the antioxidant activity by the ABTS⁺ and DPPH methods. For both species, the chemical composition identified in the control groups showed a predominance of constituents derived from sesquiterpenes, with (E)-caryophyllene as the major constituent. However, in the stressed groups, monoterpenes were present in higher percentages, significantly reducing the percentage of the major compound of the control. This variation was confirmed by all multivariate analyses used. The EOs of both species showed low acaricidal activity against the two-spotted spider mite, with mortality rates equal to 12.00% (*P. barbatus*) and 22.72% (*P. ornatus*). *P. barbatus* showed better antioxidant activity for ABTS⁺ (62.74 µg/ml) while *P. ornatus* showed better for DPPH (163.5 µg/ml). However, compared to the positive controls Trolox (4.13 µg/ml) and ascorbic acid (1.62 µg/ml), respectively, the activities presented by both species were relatively low. Therefore, it was possible to verify that the EOs of these species present antioxidant and acaricidal activities, although low, and that different stress conditions alter the chemical composition of the plant.

Keywords: *Plectranthus*. Chemical composition. Essential oil. *Tetranychus urticae*.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Folhas de <i>Canavalia ensiformes</i> L. infestadas com <i>T. urticae</i> (ácaro rajado).	20
Figura 2. Etapas do ciclo de vida do <i>T. urticae</i> (ácaro rajado).....	21
Figura 3. Unidade de isopreno.....	24
Figura 4. Exemplos de mono e sesquiterpenos.	25
Figura 5. Estrutura básica de um fenilpropanóide e exemplos de fenilpropanóides.	26
Figura 6. Hidrodestilação de <i>P. ornatus</i> em aparelho tipo <i>Clevenger</i> modificado.....	27
Figura 7. <i>Plectranthus barbatus</i>	29
Figura 8. <i>Plectranthus ornatus</i>	30
Figura 9. Estruturas dos compostos (<i>E</i>)-cariofileno e óxido de cariofileno.....	30
Figura 10. Enraizamento na hidroponia (A) e Plantação de <i>P. ornatus</i> e <i>P. barbatus</i> (B).	31
Figura 11. Processo de obtenção de óleo essencial por hidrodestilação.....	32
Figura 12. Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.	33
Figura 13. Plantação dos feijões-de-porcos (A) e a Criação de <i>T. urticae</i> (B).	33
Figura 14. Bioensaio de Toxicidade Residual.	34
Figura 15. Atividade antioxidante por DPPH [·]	35
Figura 16. Atividade antioxidante por ABTS ^{·+}	36
Figura 17. Construção da rede molecular.....	37
Figura 18. Cromatograma das folhas controle do óleo essencial de <i>P. barbatus</i>	41
Figura 19. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse por predação manual.	42
Figura 20. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse com salicilato de metila.	42
Figura 21. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse com jasmonato de metila.	43
Figura 22. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse salino.	44
Figura 23. Folhas de <i>P. barbatus</i> após 31 dias sem água.....	44
Figura 24. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse por escassez hídrica.	45
Figura 25. Cromatograma das folhas de <i>P. barbatus</i> sob condição de estresse por radiação ultravioleta.	45
Figura 26. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> controle.	49
Figura 27. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse por predação manual....	50
Figura 28. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse com salicilato de metila.	51
Figura 29. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse com jasmonato de metila.	51
Figura 30. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse salino.....	52
Figura 31. Folhas de <i>P. ornatus</i> após 34 dias sem água.....	52

Figura 32. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse por escassez hídrica.....	53
Figura 33. Cromatograma do óleo essencial de <i>P. ornatus</i> sob estresse por radiação UV.....	53
Figura 34. PCA dos compostos voláteis das folhas de <i>P. barbatus</i>	57
Figura 35. PCA dos compostos voláteis das folhas de <i>P. ornatus</i>	58
Figura 36. <i>Heatmap</i> dos compostos voláteis das folhas de <i>P. barbatus</i>	61
Figura 37. <i>Heatmap</i> dos compostos voláteis das folhas de <i>P. ornatus</i>	63
Figura 38. Rede Molecular dos compostos voláteis das folhas de <i>P. barbatus</i> sob diferentes tipos de estresses.	64
Figura 39. Rede Molecular dos compostos voláteis das folhas de <i>P. ornatus</i> sob diferentes tipos de estresses.	66
Figura 40. Resultados dos Bioensaios de Toxicidade residual frente ao ácaro rajado.	68

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos terpenos de acordo com o número de átomos de carbono.....	24
Tabela 2. Composição química comparativa da <i>P. barbatus</i> controle e sob condições de estresses.	47
Tabela 3. Composição química comparativa da <i>P. ornatus</i> controle e sob condições de estresse.	54
Tabela 4. Bioensaio de Toxicidade residual.	67
Tabela 5. Atividade Antioxidante (CE ₅₀ µg/ml) dos óleos essenciais das espécies estudadas.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
OEs	Óleos essenciais
UV	Ultravioleta
eV	Elétron-volt
LPNBio	Laboratório de Produtos Naturais Bioativos
CL ₉₀	Concentração Letal responsável por matar 90% da população
CE ₅₀	Concentração efetiva média necessária para sequestrar 50% dos radicais
GNPS	<i>Global Natural Products Network</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1.	<i>Tetranychus urticae</i> (ácaro-rajado).....	20
3.1.1.	Ciclo de vida	21
3.1.2.	Controle da praga	21
3.2.	Óleos essenciais.....	22
3.2.1.	Definição	22
3.2.2.	Composição química e o metabolismo secundário	22
3.2.3.	Método de extração	26
3.3.	Espécies estudadas	27
3.3.1.	<i>Plectranthus barbatus</i>	28
3.3.2.	<i>Plectranthus ornatus</i>	29
4.	METODOLOGIA	31
4.1.	Coleta e identificação do material vegetal	31
4.2.	Obtenção dos óleos essenciais.....	31
4.3.	Identificação química por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).....	32
4.4.	Criação de <i>T. urticae</i> (ácaro rajado).....	33
4.5.	Bioensaio de Toxicidade residual.....	34
4.6.	Atividade Antioxidante	35
4.6.1.	Atividade Antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH'	35
4.6.2.	Atividade Antioxidante de sequestro de radicais livres ABTS^{•+}	35
4.7.	Análise Multivariada	36
4.7.1.	Rede molecular – GNPS	36
4.7.2.	Análise de Componentes Principais (PCA)	38

4.7.3.	Análise Heatmap (mapa de calor).....	38
4.8.	Análise estatística.....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Análise da composição química dos óleos essenciais das espécies estudadas.....	39
5.1.1.	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>P. barbatus</i>	40
5.1.2.	Composição química das folhas de <i>P. ornatus</i>.....	49
5.2.	Análise de Componentes Principais (PCA).....	57
5.2.1.	Análise PCA dos constituintes voláteis de <i>P. barbatus</i>	57
5.2.2.	Análise PCA dos constituintes voláteis de <i>P. ornatus</i>.....	58
5.3.	Análise Heatmap (Mapa de calor)	59
5.3.1.	Análise Heatmap dos constituintes voláteis de <i>P. barbatus</i>.....	59
5.3.2.	Análise Heatmap dos constituintes voláteis de <i>P. ornatus</i>.....	61
5.4.	Rede Molecular.....	64
5.4.1.	Rede molecular dos constituintes voláteis de <i>P. barbatus</i>	64
5.4.2.	Rede molecular dos constituintes voláteis de <i>P. ornatus</i>	65
5.5.	Bioensaio de Toxicidade residual dos óleos essenciais das espécies estudadas.....	67
5.6.	Teste de Atividade Antioxidante dos óleos essenciais das espécies estudadas.....	68
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

As pragas agrícolas representam uma ameaça aos cultivos, resultando em prejuízos significativos na produção de alimentos. Entre essas pragas, podemos destacar o *Tetranychus urticae*, conhecido como ácaro rajado, uma espécie polífaga e cosmopolita que ataca uma variedade de culturas e que, no Brasil, tem causado danos aos cultivos de feijão, tomate e mamão (Moraes, 2012). O ácaro rajado é um sugador de seiva das folhas das plantas, causando amarelecimento e queda das mesmas, o que reduz a produção e pode levar à morte das plantas mais jovens (Abou-El-Ela, 2014).

O controle dessa praga geralmente é realizado por meio da aplicação de acaricidas comerciais como Azamax, Decis ou Orthus, os quais inicialmente se mostram efetivos. No entanto, com a frequente utilização desses produtos, o ácaro rajado adquire resistência aos princípios ativos presentes nesses produtos, acarretando a utilização de quantidades cada vez maiores pelos agricultores desses acaricidas (Alyokhin *et al.*, 2015). O uso desses acaricidas de modo indiscriminado, com dosagens cada vez maiores, pode levar a contaminação do solo, danos à saúde das pessoas que aplicam o produto, morte de organismos não-alvo e contaminação dos produtos agrícolas que chegam a nossas mesas (Júnior; Santos, 2002). Como alternativa ao uso desses inseticidas temos o uso dos óleos essenciais que vem se mostrando promissores para o controle dessa praga.

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias naturais extraídas de plantas através de diferentes técnicas como por exemplo hidrodestilação. São constituídos por substâncias voláteis de baixo peso molecular, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Sua aplicação é ampla e abrange diversos setores industriais, destacando-se na indústria perfumista, alimentícia e farmacêutica (Craveiro; Queiroz, 1993). Devido à sua composição complexa, os OEs não apenas exibem propriedades aromáticas, mas também apresentam capacidade antifúngica, antioxidante e acaricida (Simões; Spitzer, 2003), sendo a última responsável por torná-los aptos a serem utilizados no controle de pragas como o ácaro rajado.

Os compostos presentes nos OEs podem estar atrelados ao mecanismo de defesa das plantas contra as diversas condições ambientais (Halder *et al.*, 2019). A origem dos compostos presentes nos OEs de plantas é conhecida como metabolismo

secundário (Paul Dewick, 2009). Esse processo é ativado em resposta a diversos fatores de estresse que afetam as células vegetais. Esses estresses podem ser categorizados como bióticos, originados por organismos vivos como insetos, fungos e bactérias, ou abióticos, desencadeados por estressores físicos como variação de temperatura, escassez ou excesso hídrico, exposição à luz intensa e radiação UV, ou por agentes químicos como variações de concentrações, metais pesados, estresse osmótico, e moléculas de sinalização intracelular, como jasmonato de metila e ácido salicílico (Halder *et al.*, 2019; Wang; Wu, 2013; Hou *et al.*, 2023).

Dentre as espécies vegetais estudadas para a produção de óleos essenciais com potenciais acaricidas, destaca-se o gênero *Plectranthus*, popularmente conhecido como boldo e amplamente encontrado em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil, que pertence à família Lamiaceae, a qual compreende espécies que são fontes de compostos antifúngicos, antibacteriano e inseticidas (Rasikari *et al.*, 2005; Matu; Van Staden, 2003).

Duas notáveis espécies desse gênero são a *Plectranthus barbatus*, conhecida como boldo-brasileiro, e a *Plectranthus ornatus*, chamada de boldo-chinês ou boldo-miúdo. Ambas são exemplos de diversas espécies de *Plectranthus* introduzidas no país, que se adaptaram ao clima e solo locais, que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de problemas digestivos e hepáticos (Rodrigues *et al.*, 2011). Entretanto, até o momento, poucos estudos abordam possíveis variações na composição dos óleos essenciais dessas espécies em respostas a estresses e seu potencial acaricida contra o *Tetranychus urticae*.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar a variação da composição química dos compostos voláteis das espécies de *Plectranthus ornatus* e *Plectranthus barbatus* em resposta a diferentes estresses e avaliar o seu potencial antioxidante e acaricida para o controle do ácaro rajado (*T. urticae*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar variações na composição química dos compostos voláteis de *Plectranthus ornatus* (boldo-chinês) e *Plectranthus barbatus* (boldo-brasileiro) sob condições de estresses e avaliar sua toxicidade sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*).

2.2. Objetivos específicos

- Cultivar espécies de *Plectranthus ornatus* e *Plectranthus barbatus* e submeter a diferentes condições de estresses;
- Obter o óleo essencial das folhas de *Plectranthus* cultivadas em diferentes condições de estresses;
- Traçar o perfil químico e identificar os principais constituintes dos óleos essenciais de *P. ornatus* e *P. barbatus* através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Comparar o perfil químico das plantas através de técnicas quimiométricas;
- Avaliar o potencial acaricida dos óleos *in vivo*, através de bioensaios toxicidade residual sobre o *Tetranychus urticae*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos óleos através dos testes DPPH· e ABTS·⁺.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado)

A família Tetranychidae possui mais de 70 gêneros distribuídos no mundo, englobando mais de 1.200 espécies. Entre essas espécies podemos destacar o *Tetranychus urticae* Koch (Bolland; Gutierrez; Flechtmann, 1998). Conhecida popularmente como ácaro-rajado, essa praga está entre as seis espécies no Brasil com importância econômica por causar sérios danos a diferentes culturas (Moraes; Flechtmann, 2008). Devido a sua capacidade cosmopolita, o ácaro rajado ataca uma grande diversidade de culturas, sejam elas de cultivo ou ornamental, tais como algodão, tomate, feijão, milho, soja, alface e morango (Moraes; Flechtmann, 2008).

Uma das características dessa espécie é a produção de teia, o que facilita tanto a sua locomoção quanto à deposição dos ovos, além da sua grande capacidade de adaptação nas plantas hospedeiras. O ácaro rajado prefere a parte inferior das folhas já formadas das plantas, entretanto podem-se dispersar nas folhas em formação como também nos frutos. Durante o ataque do caro rajado às folhas, as células são rompidas e a clorofila é removida, causando disfunções na planta devido a saliva injetada pela praga e posteriormente queda das folhas (Moraes; Flechtmann, 2008) (**Figura 1**).

Figura 1. Folhas de *Canavalia ensiformes* L. infestadas com *T. urticae* (ácaro rajado).



Fonte: Autora (2024)

3.1.1. Ciclo de vida

O ácaro rajado tem um curto ciclo de vida dividido em cinco fases de desenvolvimento: ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto (Moraes; Flechtmann, 2008) (**Figura 2**). Segundo Lopes *et al.* (2023), o ciclo de vida do ácaro rajado, desde o ovo até a fase adulta, varia entre 10 e 12 dias em temperaturas em torno de 25 °C. Cada fêmea pode ovopositar mais de 100 ovos em seu período fértil e os adultos vivem em média um mês (Moraes; Flechtmann, 2008; Silva, 2023).

Figura 2. Etapas do ciclo de vida do *T. urticae* (ácaro rajado).



Fonte: Autora (2024)

De acordo com Moraes e Flechtmann (2008), uma fêmea não fertilizada pode iniciar uma nova população ao produzir inicialmente machos, que podem inseminar a própria mãe. A partir dessa inseminação, a fêmea pode então gerar filhas, o que contribui significativamente para a rápida seleção de linhagens de ácaros resistentes a acaricidas.

3.1.2. Controle da praga

A forma de controle mais utilizada para o ácaro rajado é a aplicação de inseticidas sintéticos (Silva, 2019). Entretanto, o uso descontrolado desses inseticidas acarretam em vários danos, como a contaminação do solo, mamíferos, além de ser letal em organismos não-alvos e possibilitar o surgimento de populações de pragas mais resistentes (Gonçalves *et al.*, 2017).

O surgimento de resistência tem sido relatado na literatura como um dos principais problemas no controle do ácaro rajado por acaricidas sintéticos (Souza Filho *et al.*, 1994; Stocco, 2014) e está relacionado ao seu curto ciclo de vida e a alta capacidade de reprodução (Moraes; Flechtmann, 2008). Dessa forma, a busca por inseticidas

botânicos, como OEs, para o controle do ácaro rajado com baixa toxicidade ao meio ambiente tem se intensificado (Mercês, 2019). Sendo necessário e urgente encontrar inseticidas botânicos com toxicidade superior ou equivalente aos inseticidas comerciais, mais seletivos e que não prejudiquem o meio ambiente e os mamíferos.

3.2. Óleos essenciais

3.2.1. Definição

Os óleos essenciais podem ser definidos como compostos voláteis resultantes do metabolismo secundário das plantas (Steffens, 2010; Amorim, 2007). São considerados misturas complexas que apresentam funções biológicas importantes e podem ser extraídos das raízes, caule, folhas, casca ou frutos das plantas (Amorim, 2007). Além disso, os óleos essenciais possuem solubilidade limitada em água, sendo solúveis em solventes orgânicos de caráter apolar (Simões *et al.*, 2007).

3.2.2. Composição química e o metabolismo secundário

As plantas produzem metabólitos primários que estão diretamente relacionados ao seu desenvolvimento, nutrição, crescimento e reprodução. Como exemplo de metabólitos primários tem-se os compostos de alto peso molecular, tais como os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Entretanto, diferentemente dos demais organismos, o reino vegetal possui a capacidade de produzir outros metabólitos de baixa massa molecular distribuídos de forma restrita e limitada em certas famílias e gêneros (Rockenbach *et al.*, 2018; Moraes, 2016). Esses metabólitos, chamados de metabólitos secundários ou produtos secundários, são produzidos pela via secundária do metabolismo vegetal através de modificações biossintéticas e não fazem parte do metabolismo essencial. Os metabólitos secundários variam tanto qualitativamente quanto quantitativamente, a depender do órgão, estágios de desenvolvimento e condições de estresses (Moraes, 2016).

O metabolismo secundário das plantas está associado às respostas das mesmas quando expostas a diferentes condições de estresse, que pode ser caracterizado como biótico ou abiótico. Os bióticos são de origem biológica, tais como ataques de herbívoros, bactérias ou leveduras, enquanto os abióticos são condições ambientais, tais como variações de temperatura, radiação UV, escassez hídrica e

salinidade, as quais induzem uma série de alterações bioquímicas nas vias biossintéticas da planta, estimulando o metabolismo secundário (Silva-Santos, 2023).

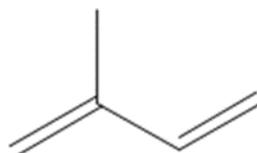
De acordo com Fumagali (2008), os produtos secundários desempenham um papel fundamental na adaptação das plantas ao ambiente que vivem e contribuem com a interação entre elas e diversos ecossistemas, aumentando, assim, a probabilidade de sobrevivência das espécies, pois são responsáveis por várias atividades biológicas que se tornam seu mecanismo de defesa, como por exemplo, para defender-se de ataques de patógenos, os metabólitos secundários podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais.

As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário apresentam uma grande variedade em suas estruturas, portanto, são classificadas de acordo com sua origem biossintética (Paul Dewick, 2009). As classes dos terpenóides e dos fenilpropanóides são exemplos de metabólitos secundários (Moraes, 2016).

Segundo Simões *et al.* (2007), os óleos essenciais são constituídos quimicamente por derivados da classe dos terpenóides e/ou fenilpropanóides, sendo a primeira predominante. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos a álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, óxidos, éteres, ésteres a compostos que apresentam enxofre.

A classe dos terpenóides é formada por compostos de origem biossintética da via do mevalonato e/ou deoxixilulose, responsáveis pela formação das unidades isoprênicas (**Figura 3**). As unidades isoprênicas são responsáveis pela formação dos monoterpenos e os sesquiterpenos, frequentemente encontrados na composição química dos óleos essenciais (Simões *et al.*, 2007). Compostos dessas classes químicas apresentam volatilidade acentuada em razão de seus baixos pesos moleculares. Segundo Natal (2021), os terpenóides desempenham funções fisiológicas, metabólicas, de comunicação e defesa nos organismos que se fazem presentes, e são classificados conforme a quantidade de átomos de carbono (**Tabela 1**).

Figura 3. Unidade de isopreno.



Fonte: Autora (2024)

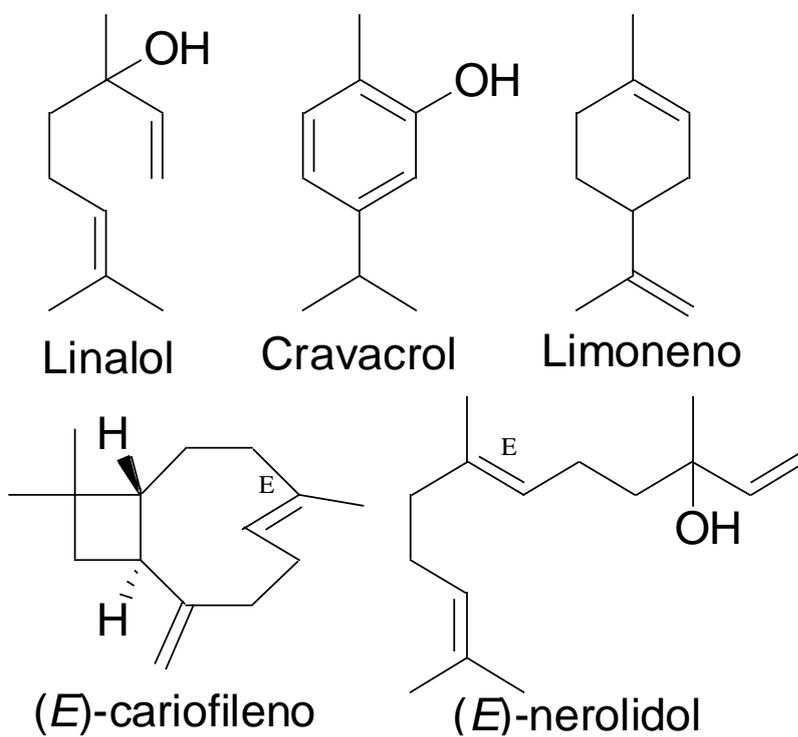
Tabela 1. Classificação dos terpenos de acordo com o número de átomos de carbono.

Número de carbonos	Designação
C ₅	Hemiterpeno
C ₁₀	Monoterpeno
C ₁₅	Sesquiterpeno
C ₂₀	Diterpeno
C ₂₅	Sesterterpenos
C ₃₀	Triterpenos
C ₄₀	Tetraterpeno
C _{>40}	Politerpenos

Fonte: Natal (2021)

Os monoterpenos apresentam papel crucial na defesa das plantas contra patógenos, exibindo atividade inseticida contra diversos insetos, e são utilizados no preparo de vários inseticidas comerciais devido à sua baixa toxicidade para mamíferos (Natal, 2021). Já os sesquiterpenos estão presentes em óleos essenciais e funcionam como fitoalexinas, compostos antibióticos produzidos durante ataques microbianos. Alguns exemplos mais comuns de monoterpenos são o linalol, carvacrol e o limoneno, enquanto (*E*)-nerolidol e (*E*)-cariofileno são exemplos de sesquiterpenos (**Figura 4**).

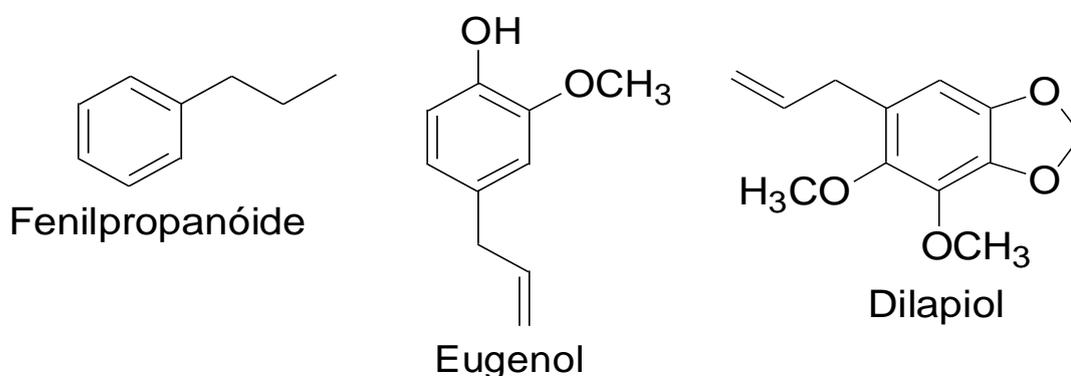
Figura 4. Exemplos de mono e sesquiterpenos.



Fonte: Autora (2024)

A classe dos fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmicos e *p*-cumárico. Esses compostos são formados por um anel fenólico conectado a uma cadeia alquil, geralmente composta por três carbonos (**Figura 5**). Além disso, podem possuir diferentes substituintes ligados ao anel fenólico, como grupos alquila e hidroxila, ou podem formar combinações da estrutura básica (Harmatha *et al.*, 2011). Relatos na literatura mostram que os fenilpropanóides apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, cicatrizante, antibiótica e anticâncer (Cunha *et al.*, 2018).

Figura 5. Estrutura básica de um fenilpropanóide e exemplos de fenilpropanóides.



Fonte: Autora (2024)

3.2.3. Método de extração

A hidrodestilação é o método convencional de maior aplicação para obtenção de óleos essenciais, além de ser o mais viável economicamente e mais eficiente técnica de extração (Amorim, 2007; Santos *et al.*, 2004). O processo consiste em aquecer o material em água destilada no aparelho tipo *Clevenger* modificado (**Figura 6**) e os vapores são condensados formando duas fases imiscíveis, o hidrolato, que se refere a parte aquosa, e o óleo essencial, que é a fase orgânica (Amorim, 2007).

Figura 6. Hidrodestilação de *P. ornatus* em aparelho tipo *Clevenger* modificado.



Fonte: Autora (2024)

Diversos estudos citados por Amorim (2007) relatam a vantagem referente ao rendimento dos óleos essenciais obtidos por esta técnica comparada a outras, como por exemplo a de arraste a vapor, e a desvantagem encontrada está relacionada ao extenso período de extração, que varia de 3 a 5 horas.

3.3. Espécies estudadas

Plectranthus (L'Her.) é um dos gêneros pertencentes à família Lamiaceae que contém cerca de 300 espécies distribuídas globalmente, sendo 62 espécies do gênero investigadas no âmbito medicinal (Barbosa *et al.*, 2023). São caracterizadas por seu rápido desenvolvimento e por sua capacidade de tolerar a escassez de recursos naturais, como luz solar e chuva (Silva *et al.*, 2023). Um grande número de espécies desse gênero tem sido relatado para o tratamento de doenças relacionadas à pele, problemas respiratórios, digestivos e infecciosos (Mota *et al.*, 2014).

O uso dessas espécies, referidas como boldo, na medicina popular, está relacionada com a produção de óleos essenciais com propriedades antidiarréicas, analgésicas e estimulantes da digestão (Lorenzi; Matos, 2002). Entre os gêneros pertencentes à família Lamiaceae, o gênero *Plectranthus* se destaca por ser o mais rico em diterpenos e óleos essenciais constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos (Abdel-Mogib *et al.*, 2002).

Estudos dos óleos essenciais de *Plectranthus* revelaram que o gênero apresenta várias propriedades biológicas importantes como atividades antifúngicas, antibacteriana, atividades inseticidas e antitumorais (Khan; Al-Saleem; Alkhatlan, 2016).

3.3.1. *Plectranthus barbatus*

A *Plectranthus barbatus* (**Figura 7**) é originária da Índia, e distribuída pela África oriental, Ásia, China e Brasil. Conhecida no Brasil como falso-boldo, boldo-brasileiro ou sete-dores, a planta é de fácil ocorrência nos diferentes biomas do país (Alasbahi e Melzig, 2010; Lorenzi; Matos, 2002). São plantas herbáceas ou subarborescentes de até 1,5 metros de altura, pouco ramificada com folhas largas, medindo de 5 a 8 cm, opostas, ovaladas de bordos denteadas, flexíveis e com sabor amargo (Lorenzi; Matos, 2002).

Dentre as espécies do gênero *Plectranthus*, a *Plectranthus barbatus* (*P. barbatus*) é uma das mais utilizadas devido a sua ampla variedade de usos na medicina tradicional (Alasbahi; Melzig, 2010). De acordo com Lorenzi e Matos (2002), o uso medicinal é feito através do chá das folhas frescas de *P. barbatus* e pode ser utilizado no tratamento de problemas relacionados ao estômago, como azia e gastrite, além de atuar como estimulante da digestão e do apetite. Estudos realizados por Kanyal *et al.* (2021) comprovaram as propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos óleos essenciais obtidos de diversas partes da *P. Barbatus*.

Figura 7. *Plectranthus barbatus*.



Fonte: Autora (2024)

3.3.2. *Plectranthus ornatus*

Conhecida popularmente como boldo-miúdo ou boldo-chinês, a *Plectranthus ornatus* (*P. ornatus*) (**Figura 8**) é considerada arbustiva e ornamental devido a sua facilidade em se desenvolver e por ser bastante ramificada (Sousa *et al.*, 2020). Possui folhas pequenas, suculentas e aromáticas, e o caule de fina espessura e herbáceo (Ávila, 2015). É utilizada na medicina popular para tratamento de insuficiência hepática e dores no estômago (Silva *et al.*, 2023).

Até o presente momento, a maioria dos estudos realizados com essa espécie são de interesse de isolar os constituintes diterpênicos e analisar suas propriedades biológicas no uso medicinal. Já foi constatado na literatura que essa espécie possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antipiréticas e diuréticas (Bangay *et al.*, 2024). Estudos farmacológicos realizados por Sitareki *et al.*, (2002) demonstrou os efeitos antibióticos, anti-inflamatórios, antioxidantes e citotóxicos em células de leucemia e câncer de pulmão (Suárez-Barreiro *et al.*, 2023).

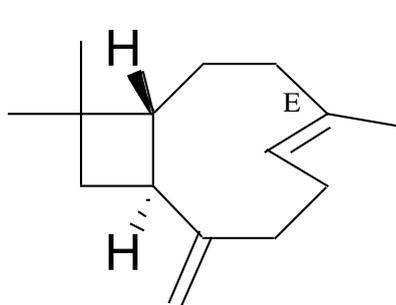
Os compostos (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno (**Figura 9**) foram encontrados como constituintes majoritários tanto do óleo essencial quanto do extrato das folhas de *P. ornatus* e estão associados às ações antibacteriana e repelente contra insetos (Silva, 2023; Suárez-Barreiro *et al.*, 2023).

Figura 8. *Plectranthus ornatus*.

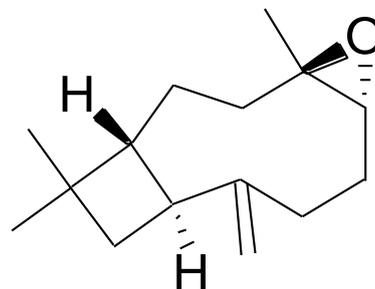


Fonte: Autora (2024)

Figura 9. Estruturas dos compostos (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno.



(*E*)-cariofileno



Óxido de cariofileno

Fonte: Autora (2024)

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

A coleta dos galhos das espécies de *P. barbatus* e *P. ornatus* foi realizada no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Em seguida, foram submetidos ao método de hidroponia, no qual cada galho foi individualmente colocado em um recipiente com água, com a água sendo trocada diariamente para garantir condições ideais para o aparecimento e desenvolvimento das raízes no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos. Após a fase de enraizamento, as plantas foram transplantadas em vasos contendo areia comercial e cultivadas para condução dos procedimentos experimentais (**Figura 10**).

Figura 10. Enraizamento na hidroponia (A) e Plantação de *P. ornatus* e *P. barbatus* (B).



Fonte: Autora (2023)

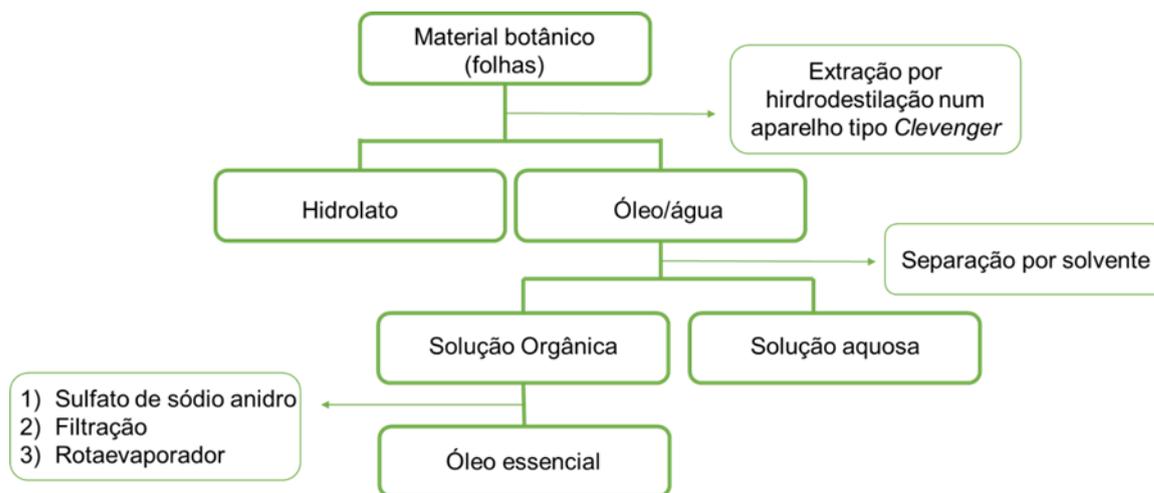
4.2. Obtenção dos óleos essenciais

O óleo essencial das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* foram obtidos por hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger* modificado. O rendimento do óleo foi calculado após duas horas de extração, com base no peso das folhas frescas, separadas no início do processo. Após as duas horas o óleo ainda continuou sendo extraído.

O óleo essencial foi extraído com adição de n-hexano ao hidrolato. A água foi separada do solvente por diferença de densidade e os resquícios de água foram

removidos com a adição de sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o óleo dissolvido no solvente orgânico foi filtrado em papel de filtro e o volume foi reduzido em rotaevaporador (**Figura 11**). Em seguida, o óleo foi armazenado em um recipiente de vidro fechado, pesado para calcular o teor do óleo e mantido a -5°C até a análise.

Figura 11. Processo de obtenção de óleo essencial por hidrodestilação.



Fonte: Autora (2024)

4.3. Identificação química por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).

A análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foi conduzida utilizando um sistema cromatográfico CG-EM QP2010 SE Plus Shimadzu (**Figura 12**) com um detector seletivo de massa. O sistema operava com impacto de elétrons a 70 eV, intervalo de varredura de 0,5 s e fragmentos de m/z 40 a 550 Da. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. A amostra líquida injetada continha volume de 1 μL do óleo diluído (1/100) em hexano destilado. A identificação da composição química dos compostos voláteis foi feita através da comparação com a literatura (Adams, 2017).

Figura 12. Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.

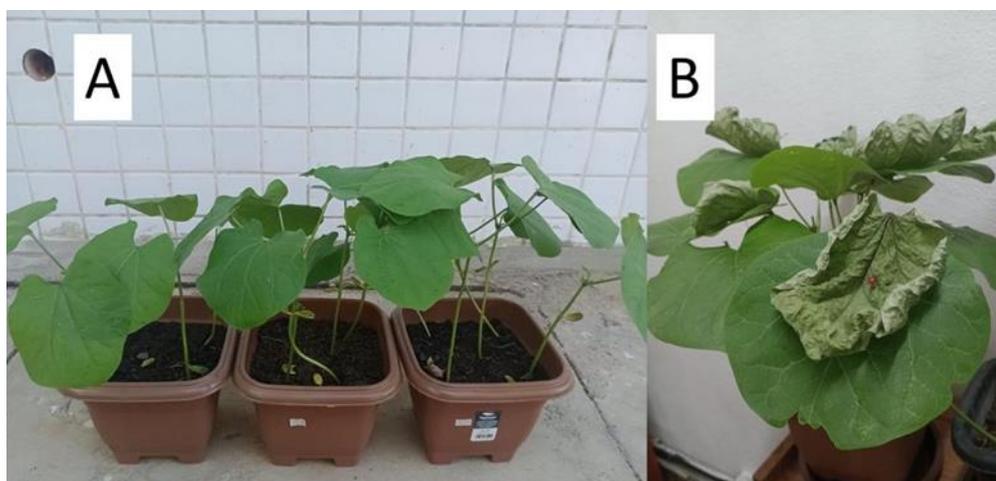


Fonte: Autora (2024)

4.4. Criação de *T. urticae* (ácaro rajado)

Plantas de feijão-de-porco, (*Canavalia ensiformes* L.) foram cultivadas em vasos com capacidade de 5 L contendo terra misturada com húmus. Após 25 dias de idade foram levadas para o Laboratório de Biologia de Insetos da UFRPE e infestadas com ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro rajado, para manutenção da criação (Figura 13).

Figura 13. Plantação dos feijões-de-porcós (A) e a Criação de *T. urticae* (B).

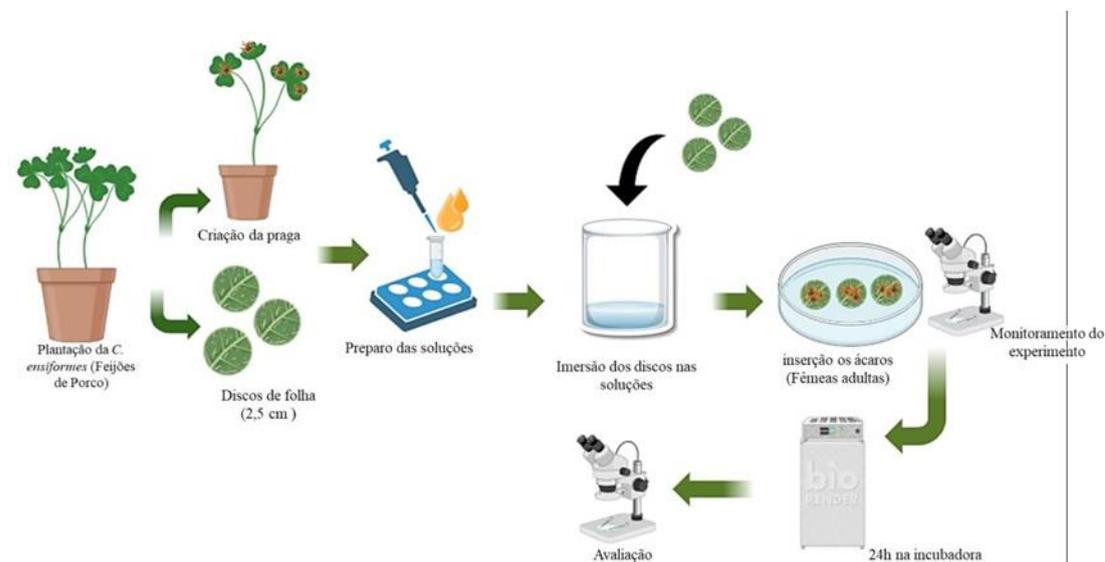


Fonte: Autora (2024)

4.5. Bioensaio de Toxicidade residual

Discos de folha de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) de 2,5 cm de diâmetro foram utilizados nos testes. Cada disco de folha de *C. ensiformis* foi imerso na solução dos óleos essenciais das espécies *P. barbatus* e *P. ornatus* por 15 segundos e, após secar em temperatura ambiente, três discos foram transferidos para uma placa de petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo um disco de espuma umedecido com água destilada e um disco de papel-filtro. Algodão umedecido foi colocado ao redor de cada disco de folha de feijão-de-porco para evitar a fuga dos ácaros. Dez fêmeas adultas do *T. urticae* foram transferidas para cada disco de folha, totalizando 30 ácaros por repetição. A mortalidade foi determinada após 24 h de exposição e os ácaros considerados mortos quando, após um leve toque com a extremidade de um pincel de cerdas finas (número 00), foram incapazes de se deslocar por uma distância superior ao comprimento do seu corpo. Todos os tratamentos foram repetidos três vezes, totalizando 90 ácaros por tratamento. (Figura 14)

Figura 14. Bioensaio de Toxicidade Residual.



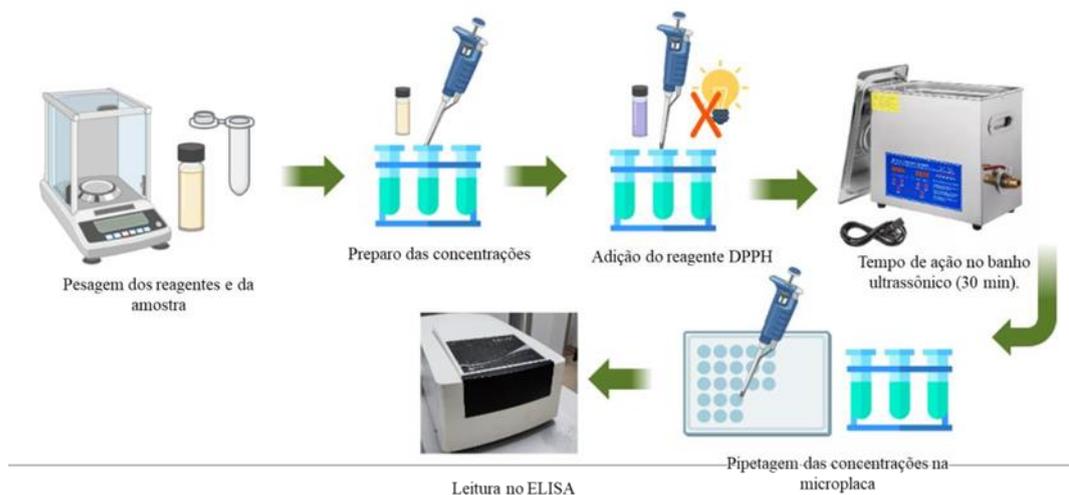
Fonte: Autora (2024)

4.6. Atividade Antioxidante

4.6.1. Atividade Antioxidante por sequestro de radicais livres DPPH[•]

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* foi realizada utilizando o radical livre DPPH[•], conforme a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006). Foram preparadas soluções estoque do óleo essencial e da fração de etanol em diferentes concentrações (0,10 a 5,0 mg/mL). Em uma análise preliminar, protegidos da luz, volumes adequados das soluções estoque das amostras e 0,9 mL da solução de DPPH[•] foram transferidos para tubos Eppendorf de 1 mL, e o volume foi completado com EtOH após homogeneização. As amostras foram sonicadas por 30 minutos e a quantidade de DPPH[•] foi medida utilizando um dispositivo UV-vis (Biochrom EZ Read 2000) a um comprimento de onda de 517 nm, em uma placa de 96 poços. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo e todas as concentrações foram testadas em triplicata (**Figura 15**).

Figura 15. Atividade antioxidante por DPPH[•].



Fonte: Autora (2024)

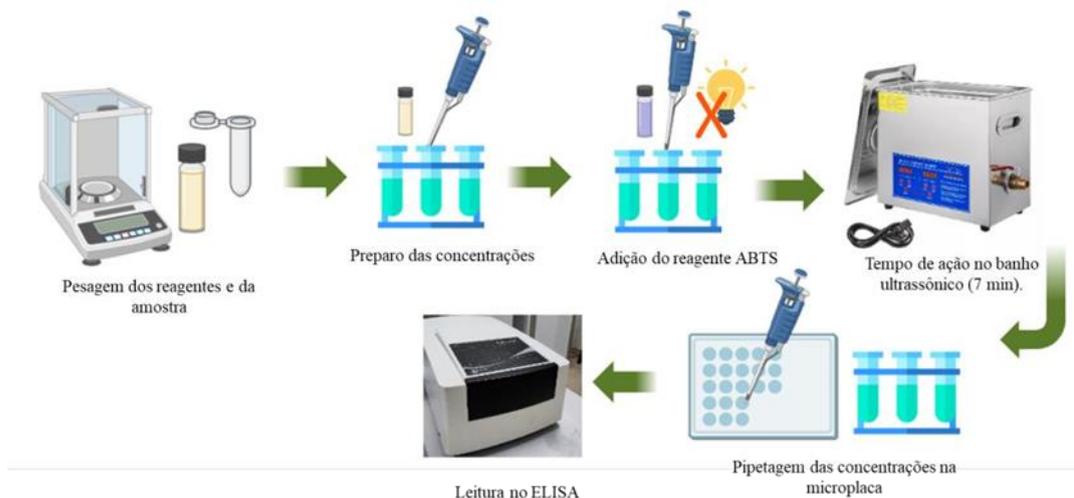
4.6.2. Atividade Antioxidante de sequestro de radicais livres ABTS^{•+}

A determinação da atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* contra o cátion radical ABTS^{•+} foi realizada seguindo a

metodologia descrita por Re *et al.*, (1999). As concentrações iniciais das soluções das amostras foram de 0,10–5,0 mg/mL, com a adição de 0,9 mL da solução radical $ABTS^{\cdot+}$ e completando o volume de 1 mL com EtOH. Após homogeneização, as amostras foram sonicadas por 7 minutos em um aparelho UV-vis (Biochrom EZ Read 2000). A absorbância das amostras e o controle positivo foram medidos em um comprimento de onda de 734 nm usando uma microplaca de 96 poços. Todas as concentrações foram testadas em triplicata (**Figura 16**).

A eficiência 44 antirradicalar foi estabelecida por meio de análise de regressão linear e o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido por meio do programa estatístico GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram expressos através do valor da Concentração Efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais. O Trolox foi utilizado como o composto padrão.

Figura 16. Atividade antioxidante por $ABTS^{\cdot+}$.



Fonte: Autora (2024)

4.7. Análise Multivariada

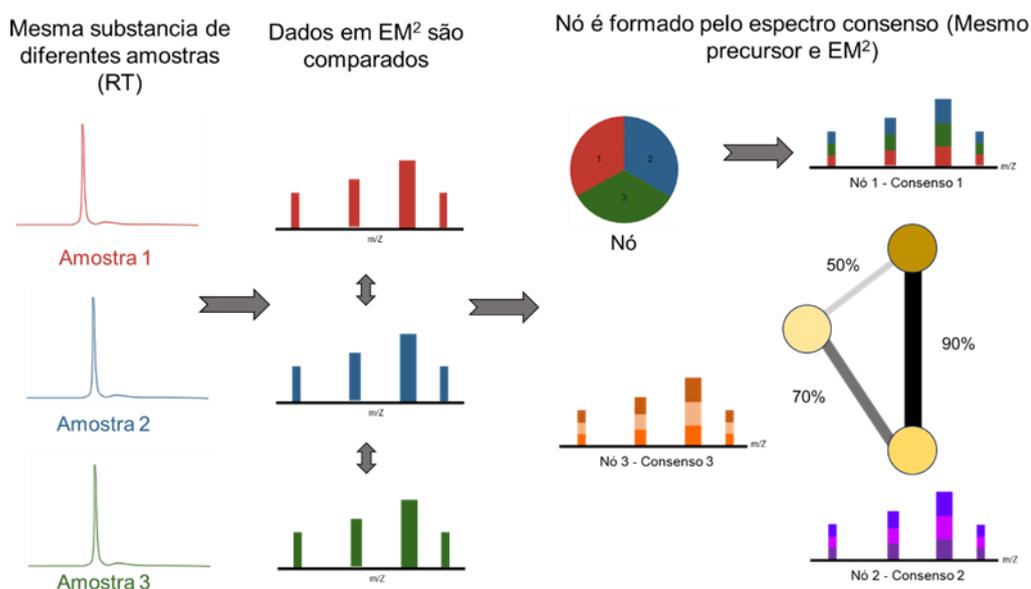
4.7.1. Rede molecular – GNPS

A *Global Natural Products Network* (GNPS) é uma plataforma destinada à análise e visualização de dados por meio de redes moleculares aplicadas a produtos

naturais e peptídeos (Pilon *et al.*, 2020). Neste contexto, a análise por redes moleculares se destaca como uma ferramenta para organizar e visualizar grandes volumes de dados (Pilon *et al.*, 2019).

Os algoritmos do GNPS organizam cada espectro obtido, classificando-os conforme sua similaridade espectral, calculada pelo coeficiente de cosseno (Figura 17). Esse coeficiente é determinado entre os espectros dentro das amostras ou entre as amostras e os espectros de referência nos bancos de dados. Dessa forma, são formados agrupamentos espectrais utilizando um limiar pré-definido de similaridade de cosseno, cujo valor varia de 0 a 1, onde 1 indica 100% de similaridade e 0 representa total disparidade. Os nós são conectados por arcos, cuja cor e largura representam o grau de similaridade entre eles (Aron *et al.*, 2020). Assim, os compostos que compartilham perfis de fragmentação semelhantes são agrupados em clusters, o que facilita a visualização dos dados e reduz o tempo necessário para a mineração de dados em estudos metabolômicos não-alvos (Silva *et al.*, 2021).

Figura 17. Construção da rede molecular.



Fonte: Tenório (2024)

4.7.2. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica estatística utilizada para melhor visualização e interpretação das diferenças e semelhanças entre as amostras estudadas. O PCA é capaz de identificar as direções de maior variância nos dados, conhecidas como componentes principais (PCs), e projetar os dados originais nestes componentes. Essa abordagem possibilita a identificação de padrões nos dados e a simplificação da sua complexidade, facilitando a análise e interpretação dos dados (Jolliffe, 2002).

4.7.3. Análise *Heatmap* (mapa de calor)

O mapa de calor é uma representação gráfica de uma matriz de dados, onde as cores indicam a intensidade dos valores de cada variável em relação a cada amostra. As cores “quentes” (vermelhas) representam valores mais altos e as cores “frias” (azuis) representam valores mais baixos. Quanto mais próximo do vermelho, maior é a atividade da variável na amostra, por outro lado, quanto mais próximo do azul, menor é a atividade da variável na amostra (Heer e Shneiderman, 2012).

4.8. Análise estatística

Após atenderem aos testes de normalidade e homogeneidade de variância (Proc Univariate) os dados de mortalidade foram submetidos à ANOVA e as comparações das médias realizadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o software SAS (versão 9.0) SAS INSTITUTE 2002.

Para a análise multivariada, a plataforma online GNPS foi utilizada para melhorar a identificação de compostos em dados de CG-EM por meio da construção de uma rede molecular. Nesta rede, os nós representam os metabólitos secundários das amostras estudadas. Os dados de CG-EM dos óleos essenciais de *P. barbatus* e *P. ornatus* foram usados para gerar a rede molecular. O fluxo de trabalho foi ajustado com parâmetros específicos, como o precursor de 2.000 Da e a tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,5 Da. Após os ajustes, foi obtida uma rede molecular, filtrada para manter um cosseno acima de 0,7 e picos correspondentes acima de seis, além de manter as arestas entre os 10 nós mais semelhantes. A biblioteca espectral do

GNPS foi usada para comparar os espectros, e a visualização das correlações espectrais foi feita com o software Cytoscape2.

Análise de componentes principais (PCA) e *Heatmap* foram realizadas para avaliar a variação química dos constituintes voláteis das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus*. Para análise multivariada de componentes principais (PCA) foi utilizado o software PAST 4.03. (Hammer *et al.*, 2001) e para análise *Heatmap* foi utilizada a plataforma MetaboAnalyst® 5.0 (www.metaboanalyst.ca) (Pang *et al.*, 2021). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Para ambas as análises, os dados foram organizados em uma matriz X (I x J), onde I representa as amostras e J os compostos identificados. Os dados de CG-EM foram exportados em formato ASCII para Microsoft Excel, e as construções dos modelos de PCA e *Heatmap* foram realizadas na plataforma MetaboAnalyst® 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da composição química dos óleos essenciais das espécies estudadas

A composição química dos óleos essenciais das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* cultivadas em condições normais (controle) e sob condições de estresses foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um espectro de massa (CG-EM). Um total de vinte e um indivíduos de cada planta foram divididas em sete grupos, e cada grupo foi submetido a uma condição de estresse diferente. Os estresses realizados foram: predação manual (PM), pelos elicitores salicilato de metila (SM) e jasmonato de metila (MJ), por salinidade (S) e por escassez hídrica (E). Após o período de estresse (2h) as espécies foram coletadas, extraído os óleos e realizada as análises por CG-EM. Todo experimento foi realizado em triplicata. A identificação dos compostos dos óleos foi realizada através da comparação dos índices de retenção e do espectro de massa obtido com os dados presentes na literatura (Adams, 2017).

5.1.1. Composição química do óleo essencial das folhas de *P. barbatus*

Na identificação dos componentes voláteis das folhas das espécies do grupo controle de *P. barbatus* foi possível identificar 13 compostos, correspondendo a 94,11% dos compostos (**Tabela 2; Figura 18**). Foram identificados como constituintes majoritários o (*E*)-cariofileno, componente responsável por 41,08% da composição, bem como o germacreno D (18,14%) e o α -ylangeno (8,69%).

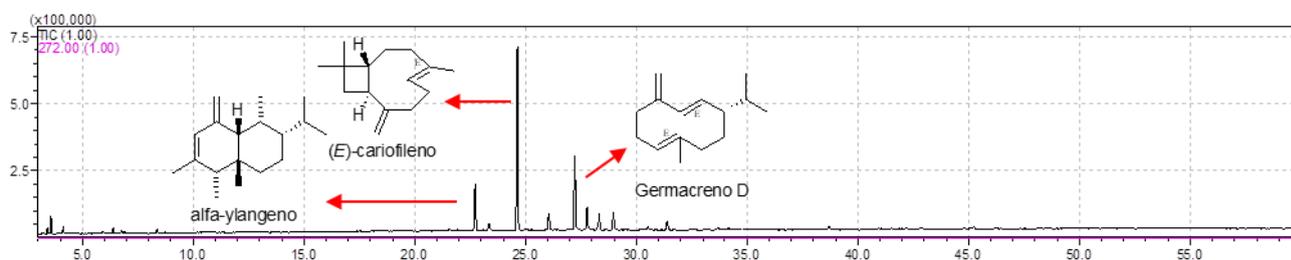
Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados na literatura. Trabalho realizado por Bandeira *et al.*, (2011) com a espécie de *P. barbatus* coletadas no Rio Grande do Sul, também encontrou o (*E*)-cariofileno (21,02%) e o germacreno D (15,52%) como uns dos constituintes majoritários. Por outro lado, o composto valenceno (22,85%) identificado em alto percentual nas amostras da espécie coletada no Rio Grande do Sul não foi encontrado em nossas análises. Assim como os resultados aqui observados para o óleo das folhas de *P. barbatus*, dos Santos *et al.* (2015) relatou a presença de (*E*)-cariofileno (17,98%) e germacreno D (17,35 %) como constituintes majoritários da planta coletada em São Paulo.

Por outro lado, análise da composição química dos óleos de *P. barbatus* coletado em Portugal revelou em sua composição a presença majoritária de α -pinene (12,1-67,0%), oct-1-em-3-ol (traços - 28,0%), β -pineno (0,1-22,0%) e (*E*)-cariofileno (7,0-12,0%) (Mota *et al.*, 2014). Trabalho realizado na Índia com o óleo essencial da planta revelou em sua composição química a presença majoritária do eugenol (31,12%), α -pinene (19,38%) e (*E*)-cariofileno (18,42%) (Govindarajan *et al.*, 2016). Espécime de *P. barbatus* coletada na Arabia Saudita revelou em sua composição a presença majoritária de 4-carene (23,21%), γ -terpineno (16,07%) e mirceno (14,9%) (Shaheen *et al.*, 2017). Já a análise da composição química do óleo de *P. barbatus* coletada em diferentes vilarejos de Ruanda apresentou em sua composição química a presença majoritária de aromadendrene (8,2-23,6%) e acetato de α -fenchil (0,7-10,4%) (Muhayimana *et al.*, 2011).

Comparando a composição química dos óleos de *P. barbatus* coletadas em diferentes continentes observa-se diferenças significativas nas composições químicas com relatos de compostos da classe dos monoterpenos e fenilpropanóides surgindo como constituintes majoritários dos óleos. Essas diferenças observadas entre as

composições químicas do óleo essencial extraído da *P. barbatus* pode estar relacionada com o local da coleta da planta. (Simões *et al.* 2007).

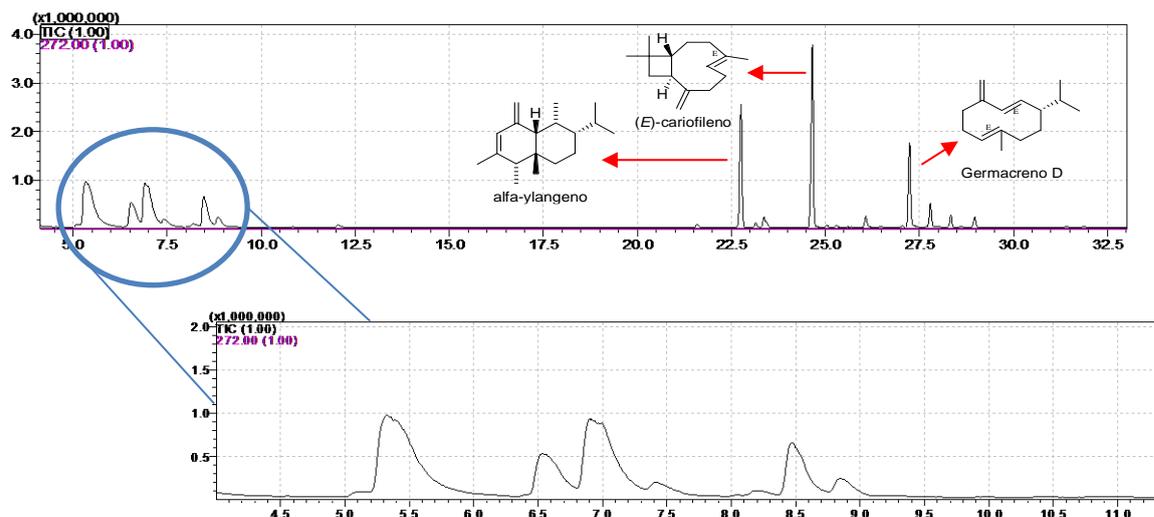
Figura 18. Cromatograma das folhas controle do óleo essencial de *P. barbatus*.



Fonte: Autora (2024)

Com o objetivo de avaliar variações nas composições químicas dos óleos de *P. barbatus*, os diferentes grupos da planta foram submetidos a condições de estresse. Análise da composição química do óleo das folhas de *P. barbatus* submetidas ao estresse por predação manual (PBPM), realizado com cortes nas bordas das folhas usando uma tesoura, foi possível identificar 15 compostos, totalizando 91,65% da composição química dos voláteis (**Tabela 2; Figura 19**). Os constituintes majoritários encontrados foram α -pineno (18,46%) e o (*E*)-cariofileno (16,93%). Diferentemente do cromatograma da amostra controle, o estresse por predação manual apresentou alguns monoterpenos de baixo índice de retenção, incluindo seu composto majoritário, como pode ser observado na Figura 19.

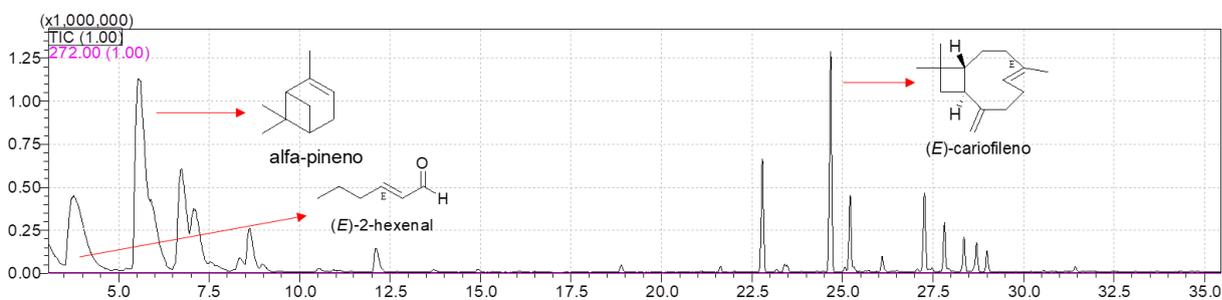
Figura 19. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse por predação manual.



Fonte: Autora (2024)

Nas folhas de *P. barbatus* submetidas ao estresse com o elicitor salicilato de metila (PBSM), um total de 21 compostos foram identificados, representando cerca de 98,87% da composição química do óleo (Tabela 2; Figura 20). Os constituintes majoritários encontrados foram o α -pineno com 27,96%, seguido do (*E*)-2-hexenal (15,20%), β -pineno (11,98%), o canfeno (7,81%) e o (*E*)-cariofileno (7,55%). Comparado com a composição química do óleo da amostra controle, o estresse por salicilato de metila reduziu a produção do (*E*)-cariofileno, sendo este observado em quantidade cerca de 5 vezes menor do que a observada no óleo do controle.

Figura 20. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse com salicilato de metila.

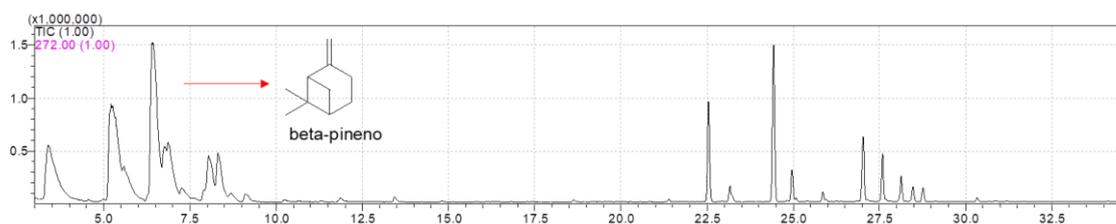


Fonte: Autora (2024)

Da composição química das folhas de *P. barbatus* estressadas com o elicitor jasmonato de metila (PBMJ), foi possível identificar 96,36% dos constituintes voláteis (**Tabela 2; Figura 21**). Os constituintes majoritários se concentram na classe dos monoterpenos, sendo o β -pineno o de maior percentual (21,96%). Esse elicitor, assim como o salicilato de metila, simula a predação da planta por insetos, estimulando a planta a produzir compostos capazes de conter essa predação, tais como os monoterpenos.

Pode-se considerar que os elicitores salicilato de metila e jasmonato de metila, fitohormônios conhecidos por aumentarem em percentual na planta quando submetidas à condições de predação. Neste caso a adição de salicilato de metila a planta simulou uma condição de predação e esta respondeu ao estresse ativando a via do 1-desoxixilulose-5-fosfato e conseqüentemente aumentou a produção de monoterpenos, como α -pineno, β -pineno e o canfeno, que se apresentam como toxinas e inibidores contra insetos (Viegas Júnior, 2023).

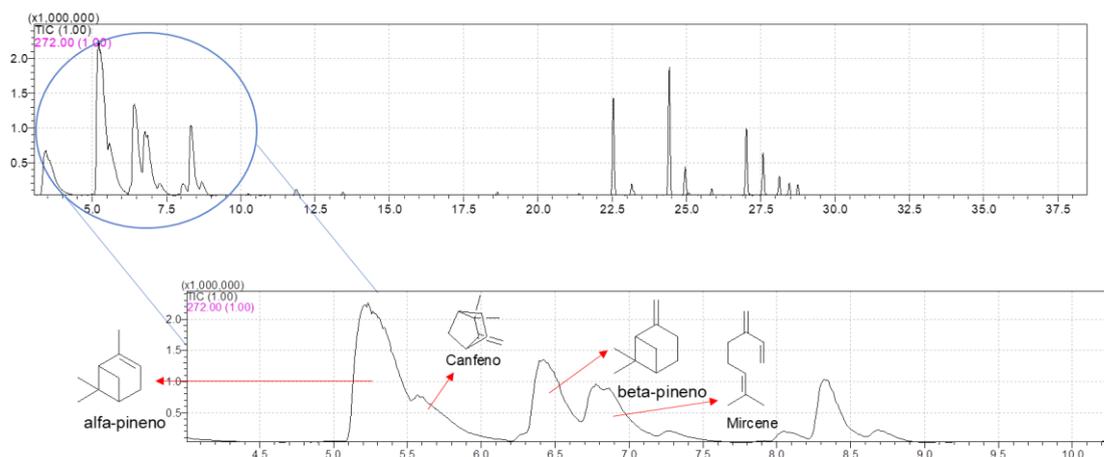
Figura 21. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse com jasmonato de metila.



Fonte: Autora (2024)

A análise da composição química dos óleos do grupo de *P. barbatus* estressado por adição solução salina (PBS), no qual as amostras de *P. barbatus* foram submetidas a uma solução salina, aplicada diretamente na terra, permitiu identificar cerca de 18 compostos, que representa 94,36% do total (**Tabela 2; Figura 22**). Os constituintes voláteis majoritários encontrados foram os monoterpenos α -pineno (27,48%) e β -pineno (13,03%), seguidos do mirceno (10,89%) e o canfeno (8,34%), todos, não foram encontrados na amostra controle, evidenciando a mudança significativa da composição desta espécie quando submetida a este estresse.

Figura 22. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse salino.



Fonte: Autora (2024)

Na composição química das folhas de *P. barbatus* submetidas ao estresse de escassez hídrica (PBE), as amostras ficaram sem receber água por 31 dias. No trigésimo primeiro dia, as folhas apresentaram uma perda do turgor, visivelmente representado pela perda de sua rigidez, diminuindo sua estrutura ereta (**Figura 23**).

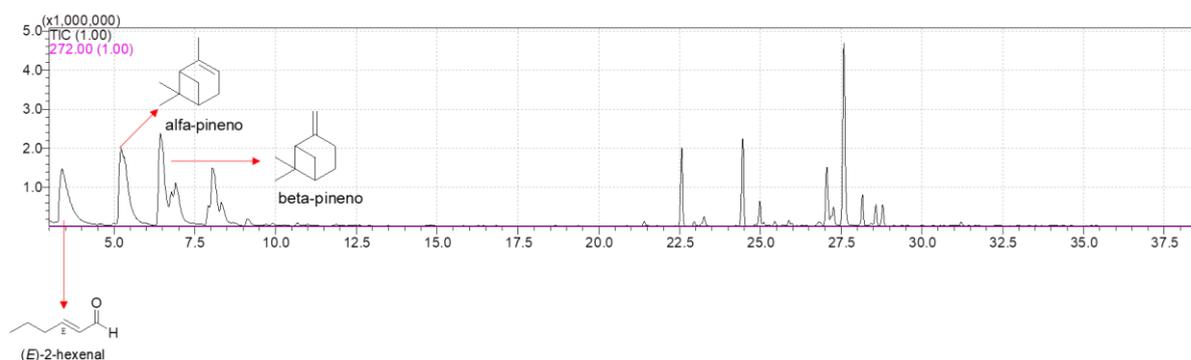
Figura 23. Folhas de *P. barbatus* após 31 dias sem água.



Fonte: Autora (2024)

A análise da composição química deste óleo permitiu a identificação de 17 compostos representando 95,66% do óleo (Tabela 2; Figura 24). Destes, os que se apresentaram como majoritários foram o β -pineno (17,73%) e o α -pineno (17,68%), seguidos por (*E*)-2-hexenal (12,98%). Todos os majoritários encontrados no PBE não foram identificados na análise do óleo do grupo controle, comprovando a variação da composição química desta espécie quando submetida ao estresse.

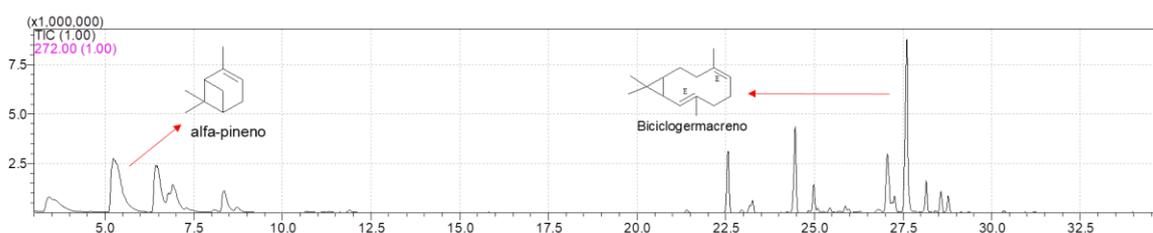
Figura 24. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse por escassez hídrica.



Fonte: Autora (2024)

No estresse realizado com radiação ultravioleta (PBUV), as amostras foram expostas a luz UV (254 nm), em uma cabine fechada durante duas horas. Após o tempo de exposição, as folhas foram coletadas, os óleos extraídos e realizado análise por CG-MS. Com o resultado da análise foi possível identificar 20 compostos, correspondentes a 88,86% da composição química total. Os constituintes majoritários foram o α -pineno (20,16%) e o biciclogermacreno (16,80%) (Tabela 2; Figura 25).

Figura 25. Cromatograma das folhas de *P. barbatus* sob condição de estresse por radiação ultravioleta.



Fonte: Autora (2024)

Comparando a composição química da *P. barbatus* submetidas aos estresses e ao grupo controle, foi possível perceber variações qualitativas e quantitativas em suas composições. As diferentes condições de estresse a que as plantas foram aqui submetidas podem ter ativado distintas rotas metabólicas acarretando a produção de compostos como os monoterpenos, não observados na análise do óleo da amostra controle (**Tabela 2**).

Tabela 2. Composição química comparativa da *P. barbatus* controle e sob condições de estresses.

Compostos	IR	Controle (%)	PBPM (%)	PBSM (%)	PBMJ (%)	PBS (%)	PBE (%)	PBUV (%)
(2E)-Hexenal	921	-	6,47	15,20	10,59	5,31	12,98	3,25
α -Pineno	932	-	18,46	27,96	17,25	27,48	17,68	20,16
Canfeno	946	-	-	7,81	4,65	8,34	-	-
β -Pineno	974	-	15,13	11,98	25,82	13,03	17,73	11,53
Mirceno	988	1,39	-	7,48	-	10,89	5,92	1,92
Limoneno	1024	-	0,50	0,94	5,27	1,09	8,33	0,32
(Z)- β -Ocimeno	1032	0,76	6,59	3,53	5,27	7,40	2,50	4,12
(E)- β -Ocimeno	1044	-	2,05	-	0,81	1,30	-	0,89
γ -Terpineno	1054	-	-	-	0,65	-	0,72	-
Ocimeno	1128	-	-	1,69	-	-	-	-
Acetato de isobornila	1283	-	-	0,26	-	-	-	-
α -Cubebeno	1348	-	-	0,19	-	-	0,22	-
α -Ylangeno	1373	10,77	11,25	-	-	4,21	-	5,21
α -Copaeno	1374	-	-	3,87	4,25	-	4,39	-
β -Bourboneno	1387	-	0,41	-	-	-	0,23	-
β -Cubebeno	1387	1,60	1,06	0,25	0,72	0,70	-	0,52

β -Elemeno	-	-	-	-	-	-	0,40	1,00
β -cariofileno	1417	41,08	16,93	7,55	6,81	5,66	4,88	7,57
β -Gurjuneno	1431	-	-	2,52	1,34	1,25	1,30	2,28
α -trans-Bergamoteno	1432	0,35	-	-	-	-	-	0,29
α -Humuleno	1452	4,08	1,04	0,54	0,35	0,28	0,21	0,49
γ -Muuroleno	-	-	-	-	-	2,90	-	0,37
Germacreno D	1480	18,14	7,72	2,82	2,86	-	3,75	6,58
β -Selineno	1489	-	-	-	-	-	-	1,84
Biciclogermacreno	1500	-	-	-	-	-	-	16,80
α -Zingibereno	1493	4,60	1,88	1,44	1,81	1,60	11,81	-
β -Bisaboleno	1505	4,45	1,02	1,14	1,04	0,83	1,53	2,37
Isobornila isovalerato	1521	-	-	1,02	-	1,60	-	-
δ -Cadineno	1522	4,04	0,94	0,71	-	0,49	-	1,35
(E)-Nerolidol	1561	0,70	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1582	2,15	-	0,15	-	-	-	-
Total (%)	-	94,11	91,45	99,05	89,49	94,36	94,58	88,86
Monoterpenos	-	2,15	49,20	76,85	70,31	74,84	65,86	42,19
Sesquiterpenos	-	91,96	42,25	22,20	19,18	19,52	28,72	46,67

5.1.2. Composição química das folhas de *P. ornatus*.

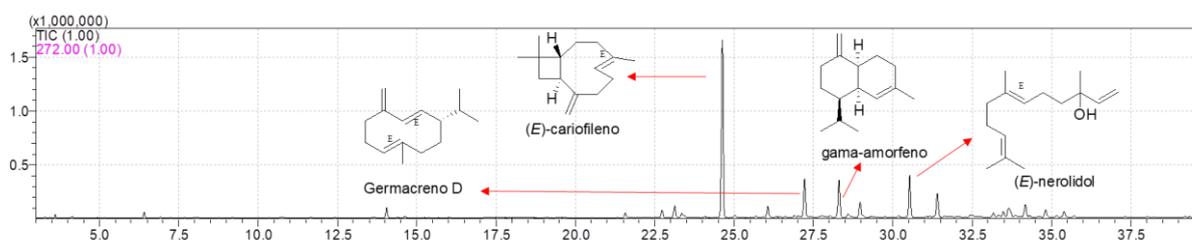
Na análise da composição química do óleo essencial das folhas de *P. ornatus* controle foram identificados 14 compostos correspondentes a 85,55% (**Tabela 3; Figura 26**). Os constituintes majoritários encontrados foram o (*E*)-cariofileno (39,07%) e o γ -amorfeno (8,67%), seguidos do germacreno D (8,31%) e o (*E*)-nerolidol (8,24%).

Estes resultados estão de acordo com trabalhos relatados na literatura. A composição química do óleo essencial da planta coletada no estado do Ceará, analisadas por Ferreira (2012), também apresentou o (*E*)-cariofileno (27,08%) e o germacreno D (4,04%) como principais constituintes. O estudo realizado por Silva (2023) mostrou o (*E*)-cariofileno como composto majoritário de duas espécimes de *P. ornatus* coletadas em duas cidades diferentes no estado do Pará, sendo o percentual 12,84% na variedade PA-603 e 29,61% na variedade PA-600. Entretanto, a espécime PA-603 apresentou baixo percentual de γ -amorfeno (0,22%), enquanto a espécime PA-600 não apresentou este composto em sua composição.

Por outro lado, o estudo realizado por Mota *et al.* (2014) o (*E*)-cariofileno (traço - 11,4%) também se apresentou como constituinte majoritário do óleo essencial de *P. ornatus* cultivadas em Portugal, em percentual menor que os estudos realizados no Brasil. Além disso, os compostos germacreno D e γ -amorfeno não apareceram em suas análises.

Ao comparar as composições químicas dos óleos essenciais de *P. ornatus* cultivadas em diferentes regiões de um mesmo país ou em outro continente, é notória a disparidade dos compostos e seus respectivos percentuais em cada análise. A variação na composição química da espécie está intrinsecamente relacionada com o seu local de cultivo.

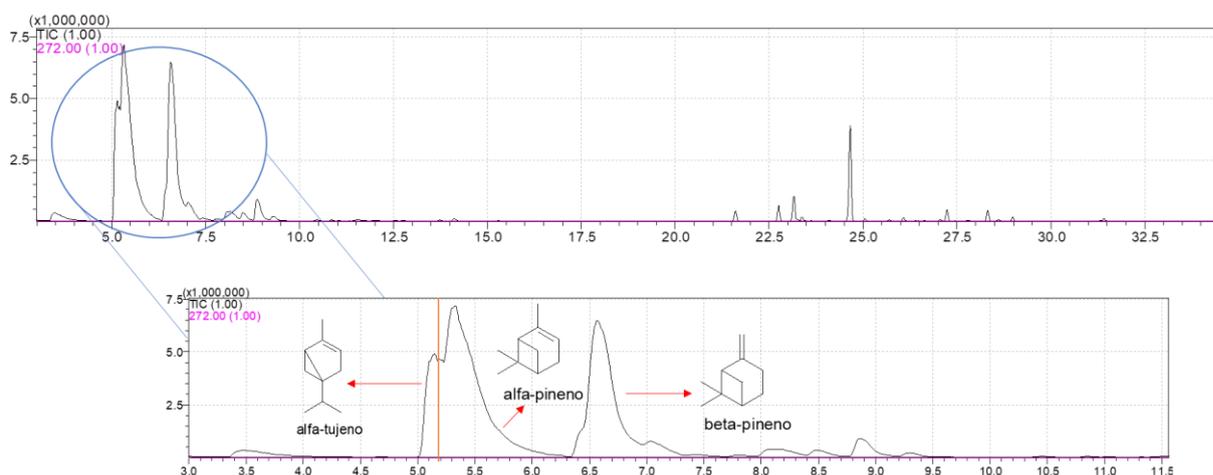
Figura 26. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* controle.



Fonte: Autora (2024)

Nas amostras de *P. ornatus* submetidas ao estresse por predação manual (POPM), foi possível identificar 15 compostos da composição química do óleo essencial, totalizando 96,66% (**Tabela 3; Figura 27**). Os compostos que apresentaram maiores percentuais foram o α -pineno (41,45%), o β -pineno (28,58%) e o α -tujeno (12,51%). O (*E*)-cariofileno foi encontrado em menor percentual quando comparado à amostra controle, cerca de oito vezes menor.

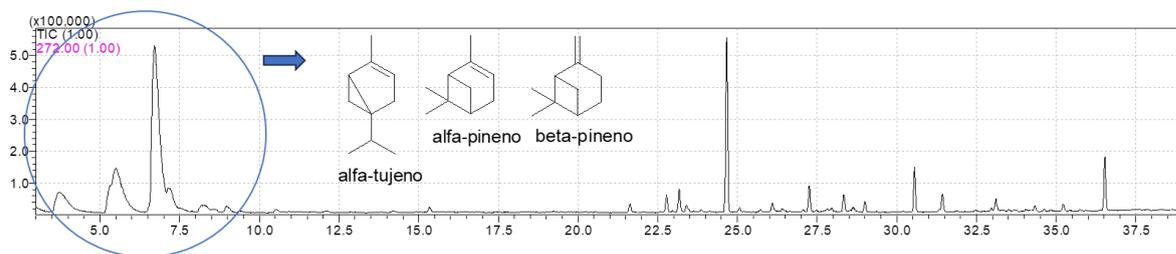
Figura 27. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse por predação manual.



Fonte: Autora (2024)

O óleo essencial das folhas de *P. ornatus* submetidas ao estresse com elicitador salicilato de metila (POSM) apresentou 14 compostos (92,88%) (**Tabela 3; Figura 28**). Dentre eles, os constituintes majoritários foram, assim como por predação manual, o α -pineno (46,81%), o β -pineno (16,27%) e o α -tujeno (15,46%), porém em percentuais distintos.

Figura 28. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse com salicilato de metila.

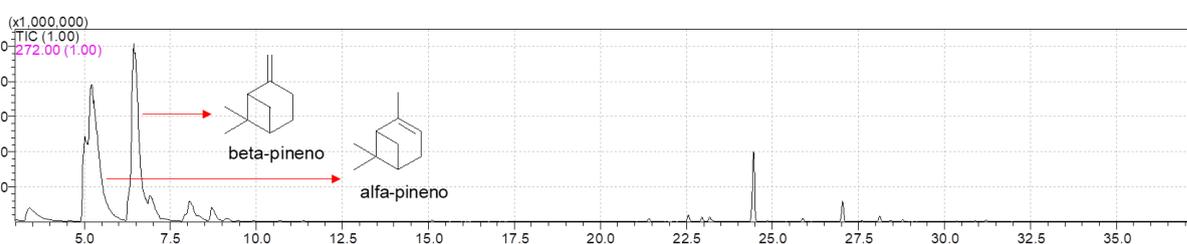


Fonte: Autora (2024)

Já no estresse provocado pelo segundo elicitor, jasmonato de metila (POMJ), cerca de 91,86% da composição química do óleo essencial foi identificada, representada por 14 compostos (**Tabela 3; Figura 29**). Os constituintes com maiores percentuais foram o α -pineno (35,93%), o β -pineno (34,64%).

Dado o aumento da produção de monoterpenos a partir desses estresses, pode-se considerar que os elicitores salicilato de metila e jasmonato de metila, fitohormônios conhecidos por aumentarem em percentual na planta quando a planta está em condições de predação. Neste caso a adição de salicilato de metila a planta simulou uma condição de predação e está respondeu ao estresse ativando a via do 1-desoxixilulose-5-fosfato e consequentemente aumentou a produção de monoterpenos, como α -pineno, β -pineno e o canfeno, que se apresentam como toxinas e inibidores contra insetos (Viegas Júnior, 2023).

Figura 29. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse com jasmonato de metila.

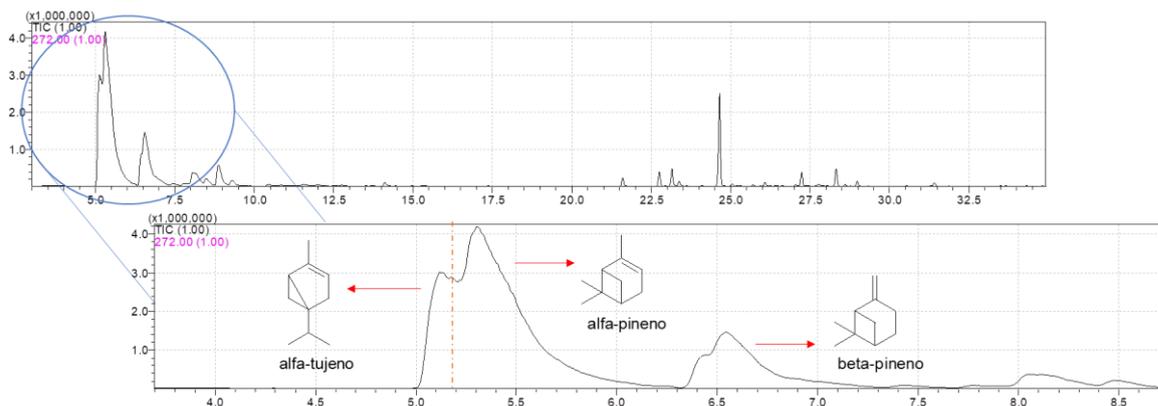


Fonte: Autora (2024)

A análise da composição química do óleo essencial do grupo estressado por solução salina (POS), aplicada diretamente na terra, permitiu identificar 16 compostos, os quais representam 93,94% (**Tabela 3; Figura 30**). Os constituintes majoritários

encontrados foram o α -pineno (47,34%), o β -pineno (23,63%) e o α -tujeno (16,07%). Todos esses monoterpenos não foram identificados na amostra controle, o que comprova a variação qualitativa da composição química a partir deste estresse.

Figura 30. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse salino.



Fonte: Autora (2024)

No estresse provocado pela escassez hídrica (POE) as amostras de *P. ornatus* passou o período de 34 dias sem contato com água. Diferentemente da *P. barbatus*, as folhas da planta apresentaram uma maior resistência à perda do turgor, mantendo na maioria das folhas sua rigidez e estrutura ereta, precisando de mais alguns dias após o tempo estimado (31 dias) para apresentar mudança em sua estrutura foliar (**Figura 31**).

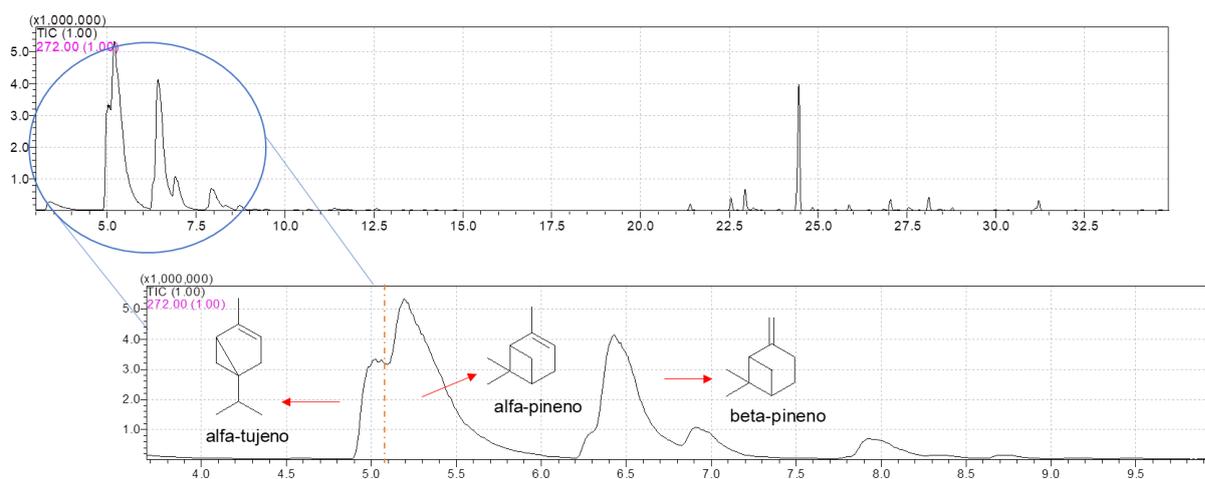
Figura 31. Folhas de *P. ornatus* após 34 dias sem água.



Fonte: Autora (2024)

O percentual total da composição química do óleo produzido a partir deste estresse encontrado foi 91,24%, representado por 13 compostos (**Tabela 3; Figura 32**). Os constituintes majoritários encontrados foram α -pineno (40,40%), maior percentual do composto em relação a todos os outros estresses, o β -pineno (24,71%) e o α -tujeno (11,38%).

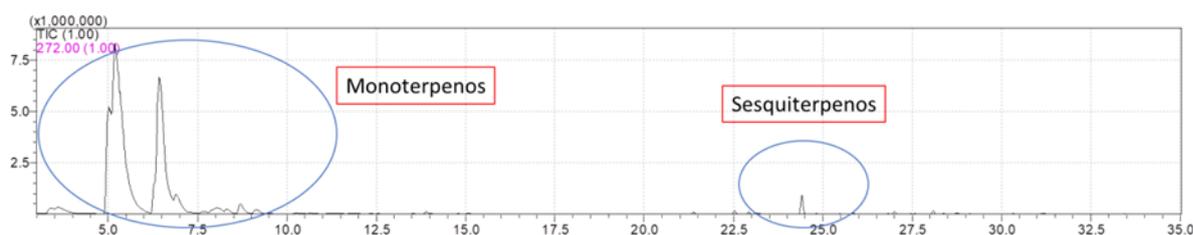
Figura 32. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse por escassez hídrica.



Fonte: Autora (2024)

A análise da composição química do óleo essencial de *P. ornatus* exposta à radiação ultravioleta (POUV) 11 compostos foram identificados, os quais compõem 94,08% da composição total (**Tabela 3; Figura 33**). Os constituintes voláteis majoritários encontrados foram α -Pineno (47,80%), o β -pineno (28,94%) e o α -tujeno (12,17%). Este estresse gerou a menor produção de compostos da classe dos sesquiterpenos, conseqüentemente foi o que mais ativou a via da 1-desoxixilulose-5-fosfato aumentando a produção de compostos derivados da classe dos monoterpenos. Dessa forma, este estresse foi o que mais obteve variação da composição química quando comparado à amostra controle.

Figura 33. Cromatograma do óleo essencial de *P. ornatus* sob estresse por radiação UV.



Fonte: Autora (2024)

Tabela 3. Composição química comparativa da *P. ornatus* controle e sob condições de estresse.

Compostos	IR	Controle (%)	POPM (%)	POSM (%)	POMJ (%)	POS (%)	POE (%)	POUV (%)
α -Tujeno	924	-	12,51	15,46	8,81	16,07	11,38	12,17
α -Pineno	932	-	41,45	46,81	35,93	47,34	40,4	47,8
β -Pineno	974	-	28,58	16,27	34,64	23,63	24,71	28,94
α -Terpineno	1014	-	-	-	-	0,32	-	0,24
ρ -Cimeno	1020	-	1,59	-	0,42	0,87	3,93	1,30
Limoneno	1024	-	-	-	3,03	1,29	-	-
Silvestreno	1025	-	-	-	0,73	-	-	-
(Z)- β -Ocimeno	1032	-	0,82	3,25	-	1,27	-	0,55
(E)- β -Ocimeno	1044	-	2,46	-	1,76	0,71	0,51	1,19
γ -Terpineno	1054	-	0,42	0,76	0,37	-	-	0,51
Terpinoleno	1086	-	-	0,17	-	0,17	-	-

Terpinen-4-ol	1174	1,95	-	-	-	0,21	-	-
α -Cubebeno	1348	0,91	0,49	0,5	0,37	0,15	-	-
α -Ylangeno	1373	-	-	0,91	-	-	-	-
α -Copaeno	1374	1,67	0,77	-	-	0,21	0,62	0,16
β -Bourbonene	1387	2,64	1,3	1,17	0,24	0,2	1,13	-
β -Cubebeno	1387	1,05	-	-	0,3	-	-	-
(<i>E</i>)-Cariofileno	1417	39,07	4,89	6,02	3,87	1,6	6,42	1,09
β -Copaeno	1430	0,48	-	-	-	-	0,12	-
α -Humuleno	1452	2,39	-	0,23	-	0,06	0,28	-
γ -Muuroleno	1478	-	0,53	-	1,06	0,16	0,54	0,13
Germacreno D	1480	8,31	-	0,84	-	-	-	-
γ -Amorfeno	1495	8,67	-	-	0,30	-	0,68	-
Cupreneno	1505	-	0,55	-	-	-	-	-

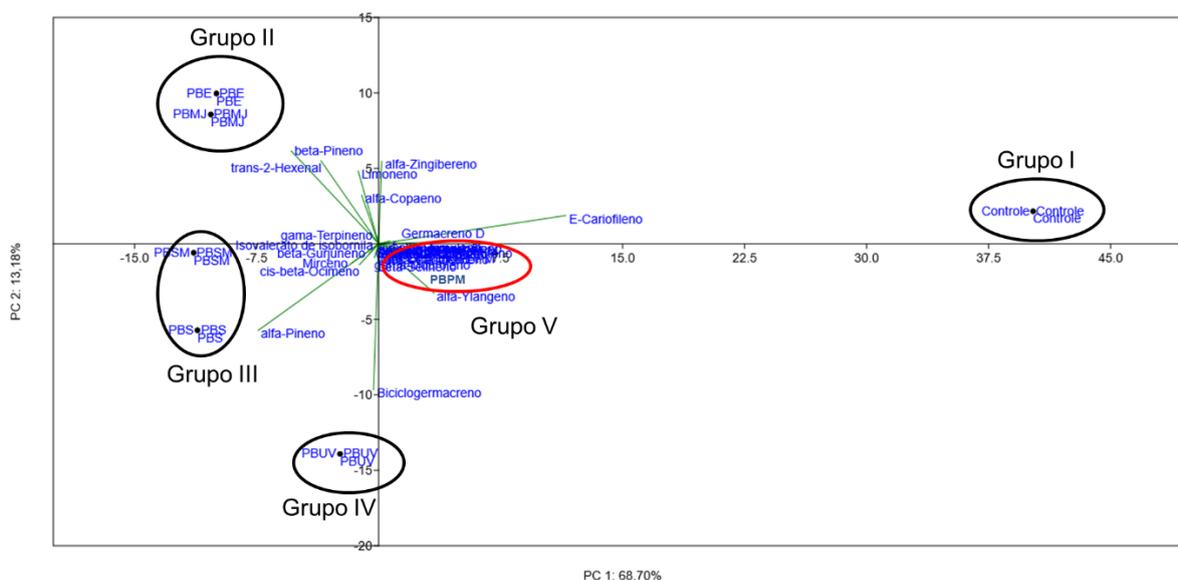
γ -Cadineno	1513	0,73	-	-	-	-	-	-
δ -Cadineno	1522	3,46	0,18	0,30	-	-	-	-
(E)-Nerolidol	1561	8,24	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1582	5,47	0,12	0,19	-	-	0,52	-
α -Cadinol	1652	2,94	-	-	-	-	-	-
Total (%)	-	87,98	96,66	92,88	91,83	93,94	91,24	94,08
Monoterpenos	-	1,95	87,83	82,72	85,69	91,56	80,93	92,7
Sesquiterpenos	-	86,03	8,83	10,16	6,14	2,38	10,31	1,38

5.2. Análise de Componentes Principais (PCA)

5.2.1. Análise PCA dos constituintes voláteis de *P. barbatus*

A análise por PCA dos compostos voláteis de *P. barbatus* submetidas a diferentes condições de estresses (**Figura 34**) permitiu a separação de cinco grupos distintos: Grupo I: controle; Grupo II: estresses PBMJ e PBE; Grupo III: estresses PBS e PBSM; Grupo IV: estresse PBUV; Grupo V: estresse PBPM. A variabilidade dos compostos voláteis foi explicada por dois componentes [PC1 (68,70%) e PC2 (13,18%)], com 81,88% da variabilidade dos dados. A separação dos grupos indica a influência das condições de estresse nos componentes voláteis produzidos pela *P. barbatus*.

Figura 34. PCA dos compostos voláteis das folhas de *P. barbatus*.



Fonte: Autora (2024)

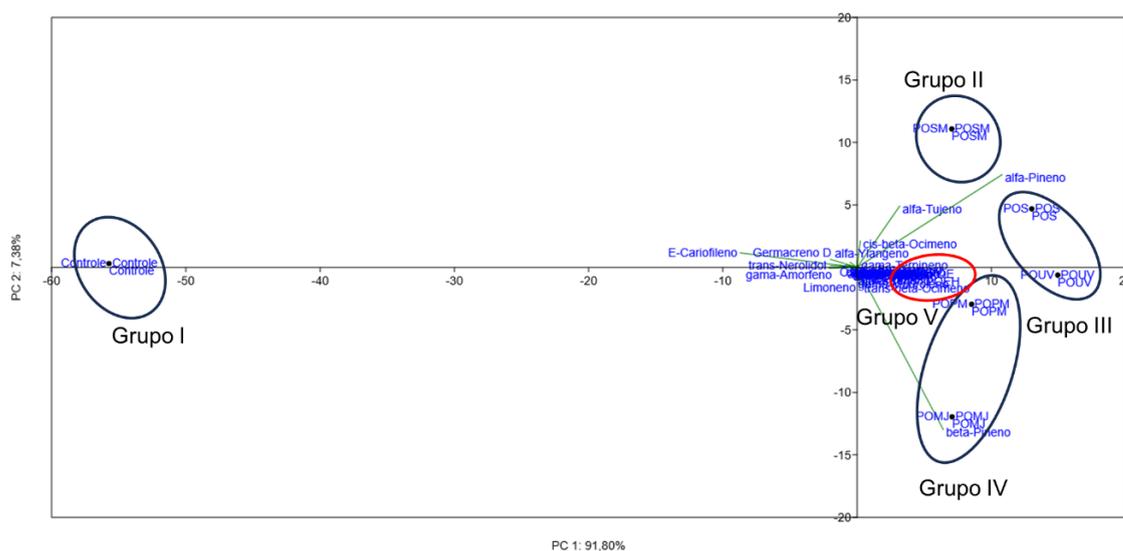
O grupo I diferiu dos demais grupos devido à presença em maior percentual do (*E*)-cariofileno (41,08%) em sua composição química. Além disso, essa diferenciação também está relacionada com a ausência de monoterpênicos, compostos que se apresentaram nos demais grupos nos quais as folhas de *P. barbatus* foram submetidas a diferentes condições de estresse.

As amostras do grupo II diferiram dos demais grupos devido à presença do monoterpene β -pineno, onde houve a maior produção deste composto. Da mesma forma que o grupo V se diferenciou dos demais pela alta produção do composto α -ylangeno. Já a separação do grupo III pode ser explicada pelo maior percentual do composto α -pineno (PBSM= 27,96% e PBS= 27,48%) em comparação às amostras controle e aos demais estresses. As espécies estressadas por radiação UV (grupo IV) diferiram dos demais grupos, pois foi o único grupo que apresentou o composto biciclogermacreno (16,80%) em sua composição.

5.2.2. Análise PCA dos constituintes voláteis de *P. ornatus*

Análise por PCA dos compostos voláteis de *P. ornatus* submetidas a diferentes estresses (**Figura 35**) permitiu a separação de cinco grupos distintos: Grupo I: controle; Grupo II: estresse POSM; Grupo III: estresses POS e POUV; Grupo IV: POMJ e POPM; Grupo V: estresse POE. A variabilidade dos compostos voláteis foi explicada por dois componentes [PC1 (91,80%) e PC2 (7,38%)], com 99,18% da variabilidade dos dados. A separação dos grupos indica a influência das condições de estresse nos componentes voláteis produzidos pela *P. ornatus*.

Figura 35. PCA dos compostos voláteis das folhas de *P. ornatus*.



Fonte: Autora (2024)

O grupo I, composto pelas amostras controle, diferiu dos demais grupos por apresentar o maior percentual de (*E*)-cariofileno (39,07%) e o menor percentual de monoterpenos (1,95%) em sua composição química. Comparando esta análise com a composição química da planta (**Tabela 3**), foi possível observar que, ao submeter a espécie a estresses, o percentual do composto (*E*)-cariofileno, majoritário nas amostras controle, reduziu-se significativamente (de 39,07% para 1,09%), enquanto o percentual de monoterpenos aumentou. Isso pode estar relacionado à ativação da via 1-desoxixilulose-5-fosfato quando a planta sofre algum tipo de alteração, pois todos os estresses aplicados resultaram na produção de monoterpenos.

O grupo II diferiu dos demais grupos, pois o composto α -ylangeno (0,91%) só foi detectado quando a espécie foi submetida ao estresse POSM. Já o grupo III diferiu dos demais grupos devido a maior produção do α -pineno quando a espécie foi submetida aos estresses POUV (47,80%) e POS (47,34%). O grupo V, destacado em vermelho, se localizou no centro pela presença de (*E*)- β -ocimeno e a ausência de alguns compostos, como limoneno, germacreno D, α -ylangeno e (*Z*)- β -ocimeno. Por fim, o grupo IV diferiu dos demais grupos devido ao maior percentual do composto β -pineno (34,64%).

5.3. Análise *Heatmap* (Mapa de calor)

Heatmap é uma representação gráfica de uma matriz de dados, onde as cores indicam a intensidade dos valores de cada variável em relação a cada amostra. As cores “quentes” (vermelhas) representam valores mais altos e as cores “frias” (azuis) representam valores mais baixos. Quanto mais próximo do vermelho, maior é a atividade da variável na amostra, por outro lado, quanto mais próximo do azul, menor é a atividade da variável na amostra (Heer e Shneiderman, 2012).

O perfil químico dos constituintes voláteis de *P. barbatus* e *P. ornatus* controle e sob diferentes condições de estresse também foi avaliado através de análise de *heatmap* e os resultados obtidos estão em consonância com os dados do PCA.

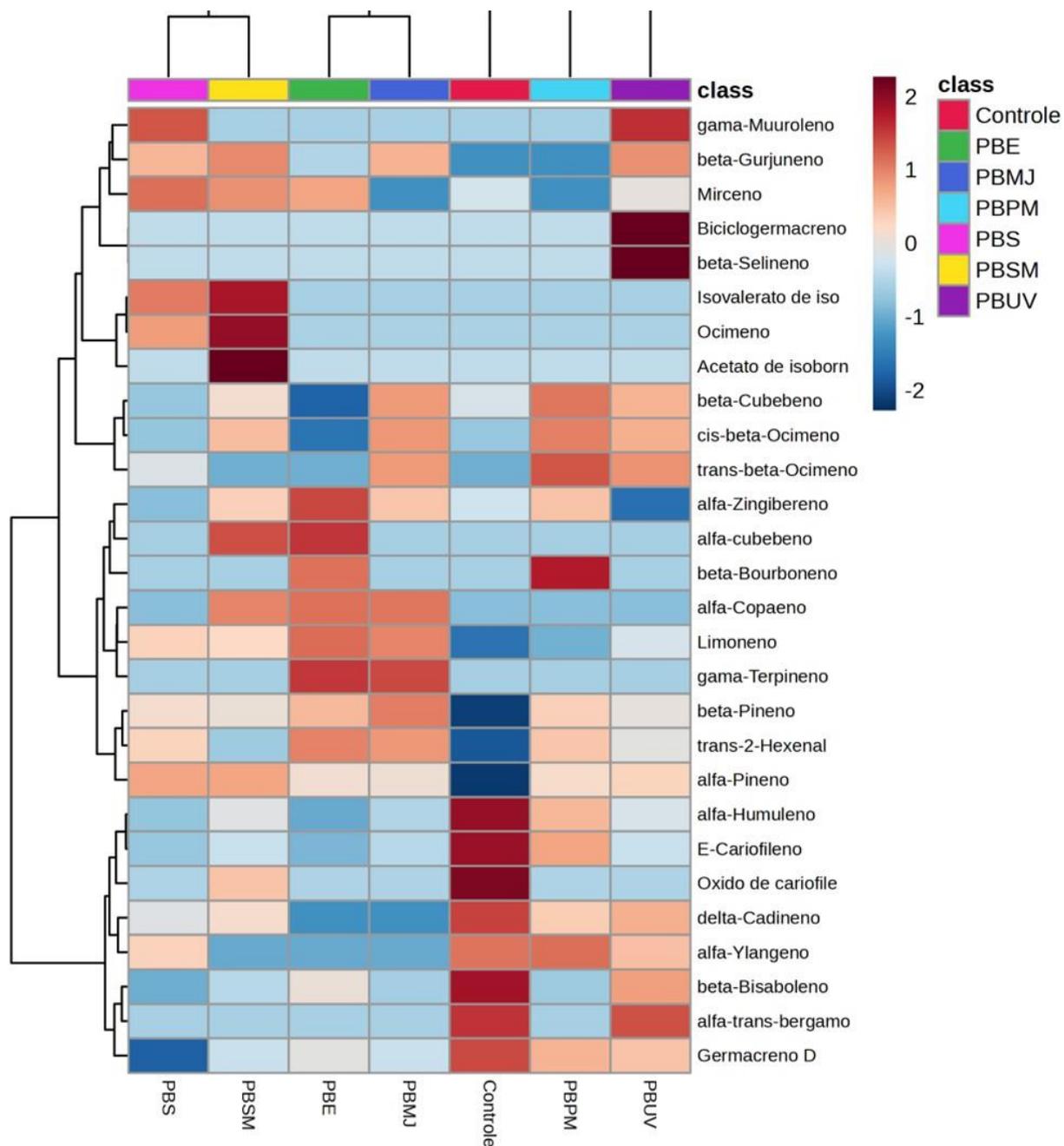
5.3.1. Análise *Heatmap* dos constituintes voláteis de *P. barbatus*

Através do *Heatmap* (**Figura 36**) foi possível identificar maior presença dos compostos α -humuleno (4,08%), (*E*)-cariofileno (41,08%), óxido de cariofileno (2,15%), γ -cadineno (4,04%), β -bisaboleno (4,45%), germacreno D (18,14%) e α -trans-bergamoteno (0,35%). Com exceção da amostra controle, todos os grupos

apresentaram alta similaridade com um dos demais grupos. O grupo PBE e PBMJ apresentaram similaridades tanto na ausência como na presença de um mesmo constituinte e isso pode ser visualizado pelas cores. A maior parte das cores quentes e frias dos dois grupos se concentram numa mesma região do mapa de calor.

Outro fator que foi observado a partir desta análise, foi o surgimento de constituintes específicos de determinados estresses. O composto acetato de isobornila foi identificado exclusivamente no estresse PBSM, enquanto os compostos biclogermacreno e β -selineno apareceram apenas no estresse PBUV, comprovando a análise da composição química descrita na Tabela 2.

Figura 36. *Heatmap* dos compostos voláteis das folhas de *P. barbatus*.



Fonte: Autora (2024)

5.3.2. Análise *Heatmap* dos constituintes voláteis de *P. ornatus*

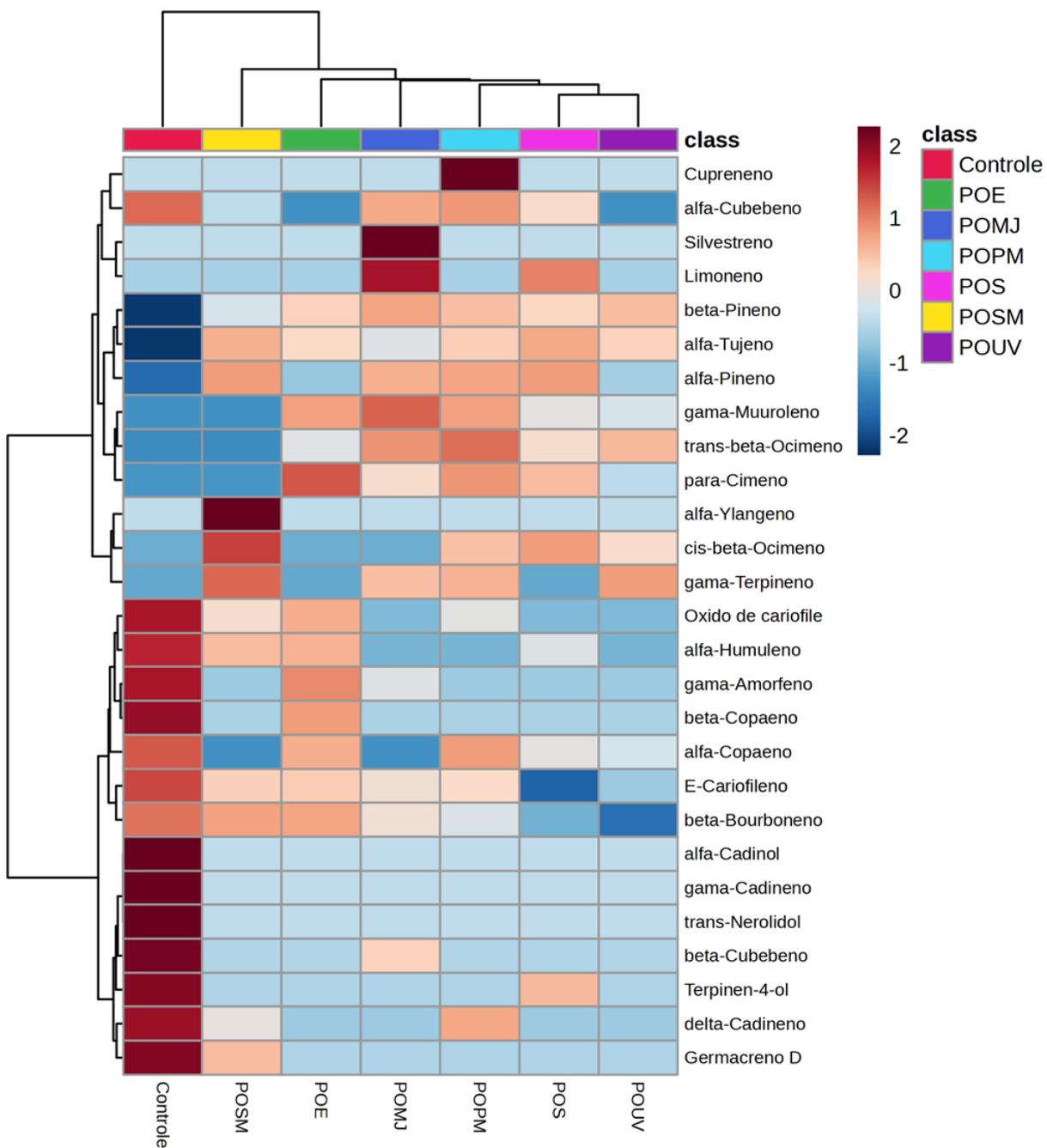
Pela análise *Heatmap* (Figura 37), observou-se o agrupamento dos grupos por similaridade, apresentando a separação do grupo controle dos demais grupos, nos quais a planta foi submetida a diferentes condições de estresse. Este resultado revela

que cada estresse causou mudanças significativas na composição química da espécie, que podem ser observadas pela disparidade de cor em relação à presença de compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos. No grupo controle, compostos como β -copaeno, (*E*)-nerolidol, α -cadinol, γ -cadineno, γ -amorfenol e germacreno D aparecem com uma cor vermelha intensa, enquanto nos outros grupos esses compostos apresentam coloração azul de menor intensidade. Comparando esta análise com a Tabela 1, esses dados estão de acordo com a composição química encontrada, pois alguns compostos, como β -copaeno, (*E*)-nerolidol e α -cadinol, foram exclusivos do grupo controle, enquanto os demais sesquiterpenos apresentaram-se em percentuais menores (< 2,00%)

Além da disparidade do grupo controle, também foi possível visualizar a similaridade entre os grupos POS e POUV, confirmando o agrupamento desses grupos na análise PCA. A semelhança se deu principalmente pela ausência de alguns compostos da classe dos sesquiterpenos. Comparando com a Tabela 3, essa similaridade pode também ser confirmada pela presença de compostos com percentuais iguais ou semelhantes, como por exemplo, α -tujeno, α -pineno e terpinoleno.

Ainda comparando o *heatmap* com a tabela de composição (**Tabela 3**), é possível visualizar os constituintes que surgiram após a espécie ser submetida a algum estresse específico. A *P. ornatus* quando submetida ao estresse POSM houve o surgimento do composto α -ylangeno (0,91%) na composição química. No estresse POMJ surgiu o composto silvestreno (0,73%). Enquanto que no estresse POPM houve o surgimento do composto cupreneno (0,55%).

Figura 37. Heatmap dos compostos voláteis das folhas de *P. ornatus*.



Fonte: Autora (2024)

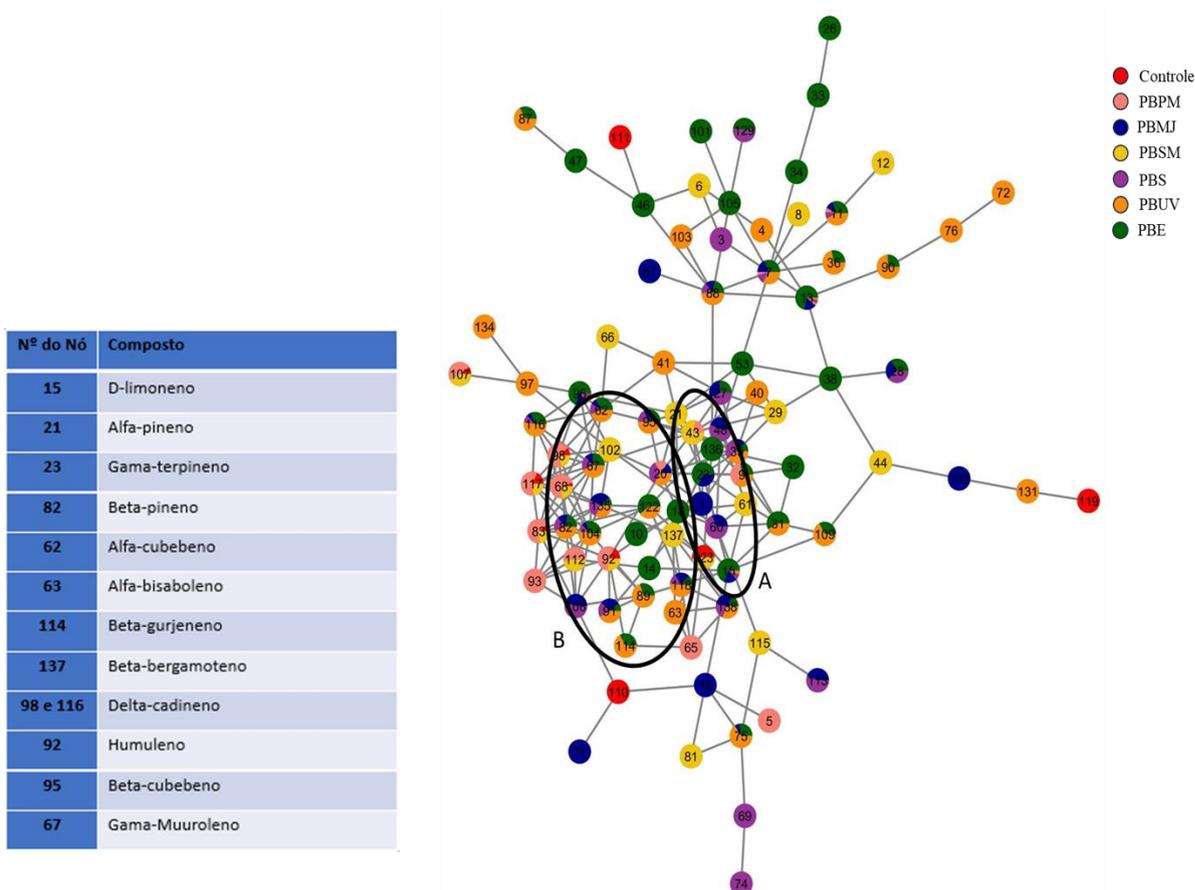
5.4. Rede Molecular

5.4.1. Rede molecular dos constituintes voláteis de *P. barbatus*

Os dados de CG-EM foram processados para busca em bibliotecas, resultando na geração de uma rede molecular na plataforma GNPS. Esta rede é constituída com base em semelhanças espectrais entre os componentes detectados. Não são incluídos todos os componentes detectados, mas apenas aqueles que apresentam uma relação biossintética. Os componentes, representados como nós, são conectados quando apresentam uma similaridade espectral mínima de seis picos por espectro de MS. Isso reflete semelhanças nos padrões de fragmentação, indicando estruturas químicas similares.

A análise da rede molecular dos compostos voláteis de *P. barbatus* gerou um total de 3 clusters. A figura 38 mostra um fragmento da rede molecular gerada. Cada nó apresenta um gráfico de pizza, composto pelas cores vermelho (amostra controle), rosa (estresse PBPM), azul (estresse PBMJ), amarelo (estresse PBSM), roxo (estresse PBS), laranja (estresse PBUV) e verde (estresse PBE).

Figura 38. Rede Molecular dos compostos voláteis das folhas de *P. barbatus* sob diferentes tipos de estresses.



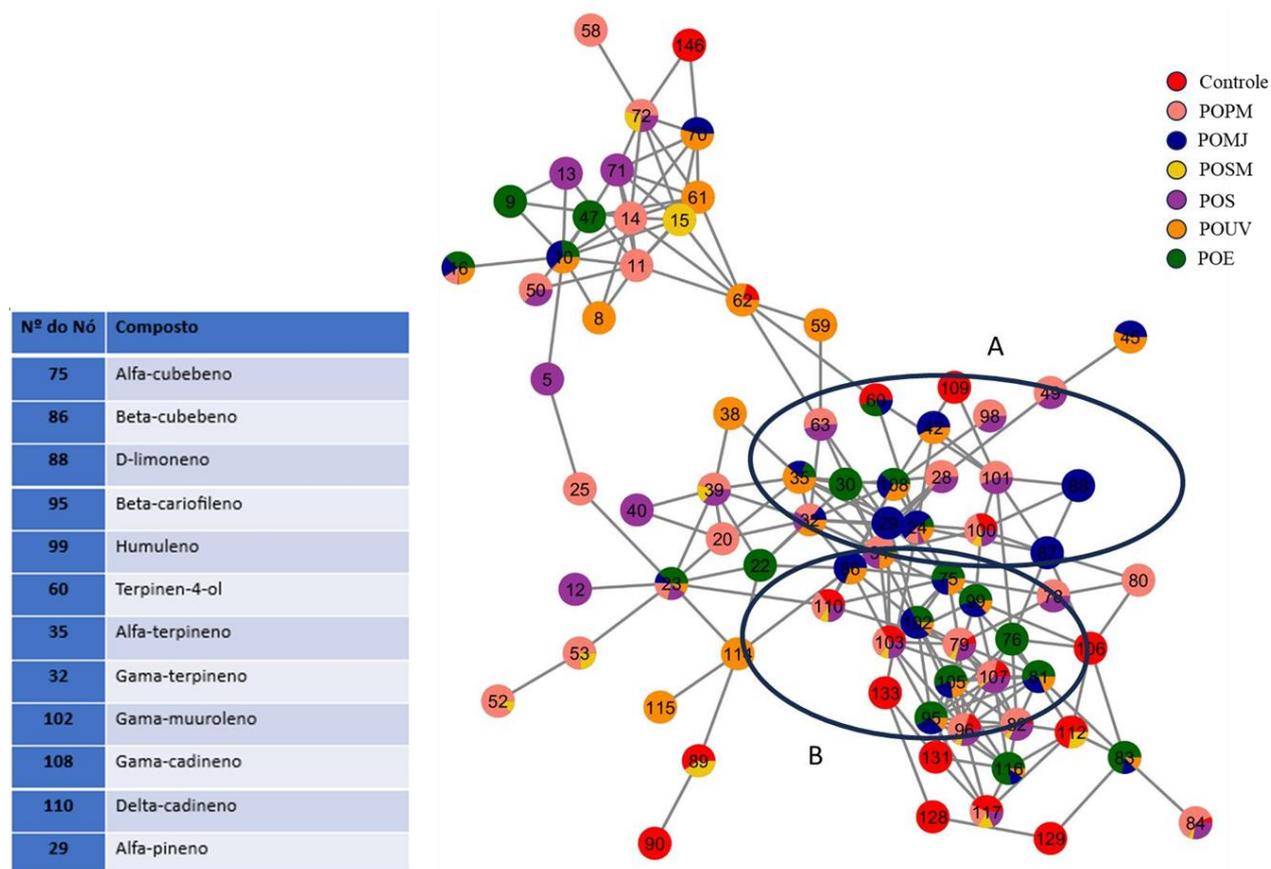
Fonte: Autora (2024)

Observando o fragmento da rede molecular da espécie *P. barbatus* pode-se perceber a presença predominante da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos. No grupo A foi possível anotar os compostos monoterpênicos: limoneno (nó 15), α -pineno (nó 21) e γ -terpineno (nó 23). No grupo B (classe dos sesquiterpenos), foi possível anotar os compostos: α -cubebeno (nó 62), α -bisaboleno (nó 63), β -gurjeneno (nó 114), δ -cadineno (nó 98), humuleno (nó 92), β -cubebeno (nó 95) e gamamuroleno (nó 67). Todos os compostos citados foram identificados na composição dos voláteis da espécie *P. barbatus*.

5.4.2. Rede molecular dos constituintes voláteis de *P. ornatus*

A análise da rede molecular dos compostos voláteis de *P. ornatus* gerou um total de 7 clusters. A figura 39 mostra um fragmento da rede molecular gerada. Cada nó apresenta um gráfico de pizza, composto pelas cores vermelho (amostra controle), rosa (estresse PBPM), azul (estresse PBMJ), amarelo (estresse PBSM), roxo (estresse PBS), laranja (estresse PBUV) e verde (estresse PBE).

Figura 39. Rede Molecular dos compostos voláteis das folhas de *P. ornatus* sob diferentes tipos de estresses.



Fonte: Autora (2024)

Observando o fragmento da rede molecular da espécie *P. ornatus* pode-se perceber a presença predominante da classe terpenos, com compostos mono e sesquiterpênicos. Compostos monoterpênicos foram anotados no grupo A: limoneno (nó 88), terpinen-4-ol (nó 60), α -terpineno (nó 35), γ -terpineno (nó 32) e α -pineno (nó 29). No grupo B foi possível anotar os sesquiterpenos: α -cubebeno (nó 75), β -cubebeno (nó 86), (*E*)-cariofileno (nó 95), humuleno (nó 99), γ -muuroлено (nó 102) e δ -cadineno (nó 110). Todos os compostos citados foram identificados na composição dos voláteis da espécie *P. ornatus*.

Esta é uma vantagem notável da abordagem de redes moleculares, uma vez que o método verifica e evita a possibilidade de reportar moléculas falsas da planta

que não fazem parte das suas vias biossintéticas. É importante destacar que os gráficos de pizza em cada nó não ilustram a distribuição absoluta, mas sim a distribuição relativa da composição dos voláteis das folhas das espécies *P. barbatus* e *P. ornatus* em cada estresse aplicado.

5.5. Bioensaio de Toxicidade residual dos óleos essenciais das espécies estudadas

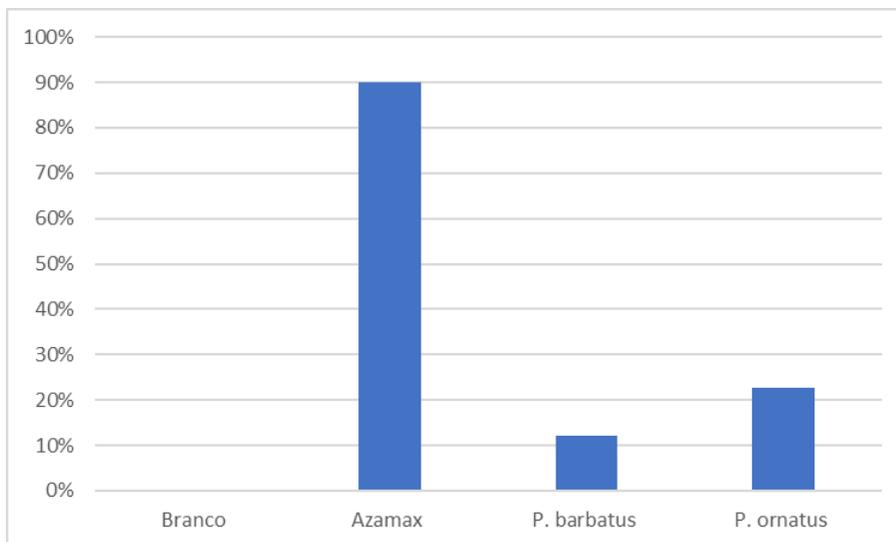
Os bioensaios de toxicidade residual foram realizados com os óleos essenciais das amostras controle das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* sobre os ácaros rajados. Os testes foram realizados a partir da CL_{90} (5,72 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do controle positivo, o inseticida botânico Azamax. Os resultados demonstrados revelaram que os óleos essenciais das folhas das duas espécies apresentam uma baixa toxicidade em relação ao controle positivo (**Tabela 4; Figura 40**).

Tabela 4. Bioensaio de Toxicidade residual.

Tratamento (5,72 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	Mortalidade (%)
<i>P. ornatus</i>	22,72
<i>P. barbatus</i>	12,00
Azamax	90,00

Fonte: Autora (2024)

Figura 40. Resultados dos Bioensaios de Toxicidade residual frente ao ácaro rajado.



Fonte: Autora (2024)

Entretanto, o óleo essencial ainda pode ser utilizado como um inseticida botânico, devido à sua composição química complexa, que contribui para a diminuição da resistência das pragas (Rodrigues, 2021). Estudos na literatura comprovam que os inseticidas convencionais, por conterem um único princípio ativo em sua composição, favorecem a rápida adaptação e resistência das pragas, resultando na diminuição de sua eficácia (Da Ressureição Garrido; Botton (2021); Melo, 2017).

5.6. Teste de Atividade Antioxidante dos óleos essenciais das espécies estudadas

Os óleos essenciais das folhas de *P. barbatus* e *P. ornatus* foram analisados quanto ao seu potencial sequestrador de radicais livres DPPH[·] e ABTS^{·+}. Os resultados da concentração efetiva média (EC₅₀) do teste DPPH[·] e ABTS^{·+} dos óleos das duas espécies estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade Antioxidante (CE₅₀µg/ml) dos óleos essenciais das espécies estudadas.

Amostra	DPPH	ABTS
	CE ₅₀ µg/ml (Intervalo)	CE ₅₀ µg/ml (Intervalo)
<i>P. ornatus</i>	163,50 (154,4 - 171,90)	228,30 (221,20 - 236,40)
<i>P. barbatus</i>	193,30 (185,07 - 202,00)	62,74 (54,14 - 82,30)
Ac. ascórbico	1,63 (1,43 - 1,82)	-
TROLOX	-	4,14 (3,72 - 5,83)

Fonte: Autora (2024)

O óleo essencial de *P. barbatus* apresentou uma maior atividade antioxidante para o teste ABTS⁺ do que no teste de DPPH[·]. Já o óleo essencial de *P. ornatus* se mostrou mais ativo para o teste de DPPH[·] do que para o teste de ABTS⁺. Ainda assim, os controles positivos ácido ascórbico e TROLOX mostraram uma maior ação antioxidante do que a observada para os óleos das duas espécies.

Esses resultados podem ser atribuídos à composição química das plantas. No estudo realizado por Albuquerque *et al.* (2006), o mesmo teste de atividade antioxidante por DPPH[·] com os óleos essenciais de *P. ornatus* demonstrou um alto potencial antioxidante. Os constituintes majoritários identificados na composição química deste óleo foram o eugenol (38%) e o timol (14,1%), ambos são compostos fenólicos com atividade antioxidante comprovadas na literatura (Cruz *et al.*, 2022; Teles *et al.*, 2021). Visto que nenhum dos óleos essenciais estudados apresentaram em sua composição compostos fenólicos, a baixa atividade antioxidante pode ser explicada pela composição química encontrada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo metabolômico com as espécies *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus ornatus* revelaram variações significativas na composição química dos óleos essenciais entre os grupos controle e aqueles submetidos a diferentes condições de estresse. Essas mudanças estão relacionadas ao potencial de cada condição de ativar vias metabolômicas da planta alterando sua composição de forma qualitativa e quantitativa.

Nas ambas espécies, a classe dos sesquiterpenos foi predominante na composição química dos grupos controle. No entanto, nos grupos sob condições de estresse, sofreu uma queda significativa com aumento de constituintes monoterpênicos. Essa variação da composição química foi confirmada e melhor visualizada a partir de análises multivariadas (PCA, *Heatmap* e Rede molecular - GNPS).

Em relação à atividade acaricida frente ao ácaro rajado, as duas espécies se mostraram com baixo potencial quando comparada a CL₉₀ do controle positivo Azamax, apresentando taxa de mortalidade 12,00% para *P. barbatus* e 22,72% para *P. ornatus*.

As duas espécies também apresentaram baixa atividade antioxidante por sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS) quando comparados aos controles positivos ácido ascórbico (1,62 µg/ml) e TROLOX (4,14 µg/ml), respectivamente. Comparando as duas espécies, a *P. barbatus* apresentou melhor atividade por cátion radical ABTS (62,74 µg/ml), enquanto a *P. ornatus* apresentou melhor atividade para o radical DPPH (163,25 µg/ml). O baixo potencial antioxidante está relacionado à composição química encontrada nas espécies que pode variar de acordo com a sazonalidade e o local de coleta e cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H. A.; BATTERJEE, S. M. Chemistry of the genus *Plectranthus*. **Molecules**, v. 7, n. 2, p. 271-301, 2002.
- ABOU-EL-ELA, AA, 2014. Eficácia de cinco acaricidas contra o ácaro-aranha-de-duas-manchas *Tetranychus urticae* Koch e seus efeitos colaterais em alguns inimigos naturais. **Journal of Basic & Applied Zoology**, vol. 67, no. 1, pp. 13-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.03.001>
» <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.03.001>
- ALBUQUERQUE, R. L. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 1, p. 24-26, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.1730>. Acesso em: 27 jul. 2024.
- ADAMS, R. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Ed. 4.1, 2017.
- ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: uma revisão da fitoquímica, usos etnobotânicos e farmacologia – parte 1. **Planta médica**, v. 07, p. 653- 661, 2010.
- ALYOKHIN, A. *et al.* A Rainha Vermelha em um campo de batata: Manejo integrado de pragas versus dependência química no controle do besouro da batata do Colorado. **Pest Management Science**, v.71, p.343-356, 2015. <https://doi.org/10.1002/ps.3826>
- AMORIM, A. C. L.; DE REZENDE, C. M.; DE MIRANDA, A. L. P. **Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**: fitoquímica e avaliação farmacológica do óleo essencial bruto e frações. UFRJ, 212 f., 2007.
- ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.
- ÁVILA, F.N. **Contribuição ao conhecimento químico de *Plectranthus ornatus* Codd**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BANGAY, G. *et al.* Halimane derivatives from *Plectranthus ornatus* Codd. as novel anti-cancer agents. **Biomed Pharmacother.**, v. 174, p. 116516, May 2024. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116516.
- BARBOSA, M. O. *et al.* *Plectranthus* species with anti-inflammatory and analgesic potential: A systematic review on ethnobotanical and pharmacological findings. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5653, 2023.

BOLLAND, H. R.; J GUTIERREZ; FLECHTMANN, C. H. W. **World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari:Tetranychidae)**. Leiden; Boston: Brill, 1998.

MELO, J. P. R. **Produtos formulados a base de óleos essenciais para o manejo de populações de traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), resistentes ao ingrediente ativo deltametrina**. 2017. 121 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRUZ, J. E. R. D. *et al.* Compostos fenólicos, atividade antioxidante e antibacteriana do extrato das folhas e casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Revista Ciência Agronômica**, v. 53, e20217903, 2022.

CUNHA, F. V. M. *et al.* Fenilpropanoides: ferramentas para promoção da estabilidade genômica. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 10, 2018.

DA RESSURREIÇÃO GARRIDO, L.; BOTTON, M. **Recomendações técnicas para evitar resistência de patógenos, insetos e ácaros-pragas a fungicidas e inseticidas na cultura da videira**. Embrapa, 2021.

FERREIRA, E. B. **Avaliação da composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de sete espécies de plantas cultivadas no Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Do Ceará. Ceará, p. 107, 2012.

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008.

GOVINDARAJAN, M. *et al.* Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Parasitology Research**, v. 115, p. 807-815, 2016.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2001.

HARMATHA, J. *et al.* Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 5-10, 2011.

HALDER, M.; SARKAR, S.; JHA, S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 12, p.

880-895, 2019.

HEER, J.; SHNEIDERMAN, B. Interactive dynamics for visual analysis: A taxonomy of tools that support the fluent and flexible use of visualizations. **Queue**, v. 10, n. 2, p. 30-55, 2012.

HO, S. *et al.* Ácido salicílico exógeno aumentou a resistência do milheto rabo-de-raposa (*Setaria italica*) à *Sclerospora graminicola*. **Plant Growth Regulation**, v. 99, n. 1, p. 35-44, 2023.

JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis for special types of data**. Springer New York, p. 338-372, 2002.

JUNIOR, O. P. A.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, p. 589-599, 2005.

KHAN, M. *et al.* Um estudo detalhado sobre caracterização química de componentes de óleos essenciais de duas espécies de *Plectranthus* cultivadas na Arábia Saudita. **J. Arab. Chem. Soc.**, v. 20, p. 711-721, 2016.

KANYAL, J. *et al.* Estudo da composição química comparativa e atividades biológicas nos óleos essenciais de diferentes partes de *Coleus barbatus* (Andrews) Bent. ex G. Don. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 4, p. 808-825, 2021.

LOPES, R. P. *et al.* Caracterização química e avaliação do potencial acaricida do óleo essencial de alecrim e seu principal composto α -pineno sobre o ácaro rajado, *Tetranychus urticae*. **Pesquisa de Produtos Naturais**, v. 37, n. 17, p. 2940-2944, 2023. DOI: 10.1080/14786419.2022.2137799.

MATU, E. N.; VAN STADEN, J. Atividades antibacterianas e anti-inflamatórias de algumas plantas usadas para fins medicinais no Quênia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 35-41, 2003.

MERCÊS, P. F. F. **Isolamento, caracterização e aplicação de compostos bioativos como defensivos naturais de folhas de leguminosas (Leguminosae)**. 149 folhas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de Acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Fealq, 2008.

MORAES, M. M. **Relação entre a toxicidade de mono e sesquiterpenos**

identificados no óleo essencial de espécies dos gêneros *Ocotea* (Lauraceae) e *Eugenia* (Myrtaceae) sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). 111 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

MORAES, M. M. **Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK.** 142 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MOTA, L. *et al.* Composição dos óleos voláteis e bioatividade dos óleos essenciais de *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus* e *P. ornatus* cultivados em Portugal. *Química e Biodiversidade*, v. 11, p. 719-732, 2014. DOI: 10.1002/cbdv.201300161.

NATAL, C. M. **Derivados de compostos naturais com potencial aplicação como biopesticidas.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

PAUL M. DEWICK, **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** Ed. 3. WILEY, 2009.

PILON, A. C. *et al.* Mass spectral similarity networking and gas-phase fragmentation reactions in the structural analysis of flavonoid glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10413-10423, 2019.

PILON, A. C. *et al.* Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, p. 329-354, 2020.

RASIKARI, H. L. *et al.* Atividades acaricidas e citotóxicas de extratos de gêneros selecionados de Lamiaceae australianas. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 4, p. 1259-1266, 2005.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 587-590, 2011.

RODRIGUES, L. V. B. **Composição química, atividade citotóxica, acaricida e antioxidante do óleo essencial das flores de *Caesalpinia echinata* (Pau-brasil).** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.

SANTOS, A. S. *et al.* **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório.** Embrapa, 2004.

SHAHEEN, U. *et al.* HPLC profile of phenolic constituents, essential oil analysis and antioxidant activity of six *Plectranthus* species growing in Saudi Arabia. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 345-354, 2017.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SILVA, E. *et al.* Untargeted metabolomics analysis by UHPLC-MS/MS of soybean plant in a compatible response to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Metabolites**, v. 11, n. 3, p. 179, 2021.

SILVA, L. R. R. **Estudo morfoanatômico, histoquímico e fitoquímico do óleo essencial de *Plectranthus ornatus* codd. (Lamiaceae)**. 59 f. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2023.

SILVA, M. M. C. **Composição química e propriedade acaricida dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Melaleuca leucadendra*, *Piper aduncum* e de suas misturas binárias sobre o *Tetranychus urticae***. 99 f.: il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Química, Recife, 2019.

SILVA-SANTOS, L. *et al.* Yeast extract and chitosan elicitation improves essential oil, regulates plant growth and antioxidative system in *Lippia alba* (Mill) NE Brown (Verbenaceae). **South African Journal of Botany**, v. 163, p. 756-769, 2023.

SOUSA, T. A. *et al.* Estudo alométrico e fenológico do boldo chinês (*Plectranthus ornatus* Codd, Lamiaceae) cultivado com diferentes fontes de matéria orgânica. **Revista Ambientale**, v. 2, p. 23-31, 2020.

SOUZA FILHO, M. F. *et al.* Suscetibilidade do ácaro-rajado proveniente de videira de Pilar do Sul, SP, a diversos acaricidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 1187-1192, 1994.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

STOCCO, R. S. M. **Resistência de *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) aos acaricidas Etoxazole e Spiromesifen e estratégias de**

manejo em morangueiro e roseira. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2014.

SUÁREZ-BARREIRO, J. *et al.* Biodynamic Substrate for the Optimization of Biomass and Constitution of Metabolites of *Plectranthus Ornatus*. **Research Square**, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2689538/v1>

TELES, A. M. *et al.* Caracterização por GC-MS da atividade antibacteriana, antioxidante e antitripanossômica do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e do eugenol. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, n. 1, p. 6663255, 2021.

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

VIANA, A. J. S. **Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus Schltr.* (Lamiaceae).** 2011. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

WANG, J. W.; WU, J. Y. Elicidores eficazes e estratégias de processo para aumento da produção de metabólitos secundários em culturas de raízes peludas. **Biotecnologia de sistemas de raízes peludas**, p. 55-89, 2013.